

Klinik für Innere Medizin IV – Nieren- und Hochdruckkrankheiten  
Universität des Saarlandes  
Homburg  
Direktor: Univ.-Professor Dr. med. Danilo Fliser

# Die Rolle des NLRP3-Inflammasoms und IL-1 $\beta$ bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
der medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes

2020

Anna Paschen

geboren am 31.08.1990 in Hamburg

Tag der Promotion: 22.09.2020  
Dekan: Prof. Prof. Dr. M. D. Menger  
Berichterstatter: Prof. Dr. D. Fliser  
Prof. Dr. T. Volk



# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>Tabellen- und Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>III</b>
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>V</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>VI</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. Definition und Klassifikation der chronischen Niereninsuffizienz</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2. Epidemiologie der chronischen Niereninsuffizienz</b> .....	<b>2</b>
<b>1.3. Prognose von Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz</b> .....	<b>3</b>
<b>1.4. Kardiovaskuläre Ereignisse als Hauptursache der hohen Mortalität bei Niereninsuffizienz</b> .....	<b>3</b>
<b>1.5. Traditionelle kardiovaskuläre und CKD-spezifische Risikofaktoren</b> .....	<b>4</b>
<b>1.6. Unterschiede der adaptiven und angeborenen Immunität</b> .....	<b>5</b>
<b>1.7. Bestandteile des angeborenen Immunsystems</b> .....	<b>5</b>
1.7.1. Zellen des angeborenen Immunsystems .....	<b>6</b>
1.7.2. Mustererkennungsrezeptoren (PRRs).....	<b>6</b>
1.7.3. Toll-like Rezeptoren (TLRs) .....	<b>8</b>
1.7.4. NOD-like Rezeptoren (NLRs).....	<b>9</b>
1.7.5. Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs) und Schadens-assoziierte molekulare Muster (DAMPs) .....	<b>9</b>
<b>1.8. Das Inflammasom – ein zentraler Bestandteil des angeborenen Immunsystems</b> .....	<b>10</b>
1.8.1. Struktur und Funktion des Inflammasoms.....	<b>10</b>
1.8.2. Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms .....	<b>11</b>
<b>1.9. Zielsetzung</b> .....	<b>13</b>
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>14</b>
<b>2.1. Material</b> .....	<b>14</b>
2.1.1. Geräte .....	<b>14</b>
2.1.2. Verbrauchsmaterialien.....	<b>14</b>
2.1.3. Chemikalien.....	<b>15</b>
2.1.4. Medien und Pufferlösungen .....	<b>16</b>
<b>2.2. Methodik</b> .....	<b>18</b>
2.2.1. Ethikvotum .....	<b>18</b>
2.2.2. Die Studiengruppe .....	<b>18</b>
2.2.3. Probenentnahme .....	<b>18</b>
2.2.4. Methodischer Versuchsaufbau .....	<b>19</b>
2.2.5. Gewinnung humaner monozytärer Zellen (PBMC) .....	<b>19</b>
2.2.6. Zellstimulation.....	<b>22</b>

2.2.7. Enzym linked immunosorbent Assay (ELISA).....	24
2.2.8. RNA-Isolation .....	25
2.2.9. cDNA-Synthese.....	26
2.2.10. qPCR .....	27
2.2.11. Amplifikationskurve, Schmelzkurve und C <sub>T</sub> -Wert .....	28
2.2.12. Statistik.....	28
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>29</b>
<b>3.1. Charakterisierung der Studiengruppe .....</b>	<b>29</b>
3.1.1. Rekrutierung.....	29
3.1.2. Demographische Ausgangsdaten und Patientencharakteristika .....	29
3.1.3. Grunderkrankungen.....	31
3.1.4. Komorbiditäten und kardiovaskuläre Risikofaktoren.....	32
3.1.5. Parameter der Nierenfunktion .....	34
3.1.6. Weitere Laborparameter.....	35
<b>3.2. Expression von Inflammasom-Komponenten.....</b>	<b>36</b>
3.2.1. Expression von NLRP3 .....	37
3.2.2. Expression von ASC.....	38
3.2.3. Expression von IL1B.....	39
<b>3.3. Sekretion von IL-1B.....</b>	<b>40</b>
3.3.1. Stimulation mit LPS .....	40
3.3.2. Stimulation mit LPS + ATP .....	41
3.3.3. Stimulation mit LPS + Nigericin.....	42
3.3.4. Stimulation mit LPS + Alum.....	43
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>44</b>
<b>4.1. IL-1B - ein Schlüsselzytokin.....</b>	<b>44</b>
4.1.1 Biologische Wirkungen .....	44
4.1.2. Prozessierung und Aktivierung .....	45
4.1.3. Sekretion.....	46
<b>4.2. Zell-spezifische Aktivierungswege des NLRP-Inflammasoms .....</b>	<b>47</b>
<b>4.3. Endogene Aktivatoren des NLRP3-Inflammasoms bei Nierenerkrankungen.....</b>	<b>49</b>
4.3.1 ATP .....	49
4.3.2. HMGB1 .....	50
4.3.3. S100.....	50
4.3.4. Harnsäure.....	50
4.3.5. Hitzeschockproteine (HSP) .....	51
4.3.6. Extrazelluläre Matrix (ECM)-Glykoproteine .....	51
<b>4.4. Rolle des NLRP3-Inflammasoms bei der Entstehung und Progression von Nierenerkrankungen.....</b>	<b>52</b>

4.4.1. Diabetische Nephropathie .....	53
4.4.2. Renales Ischämie-Reperfusionsschädigungsmodell (IRI).....	54
4.4.3. Unilaterale Ureterobstruktion (UUO).....	54
4.4.4. Kristall-induzierte Erkrankungen .....	55
4.4.5. Autoimmunologische Nierenerkrankungen.....	55
<b>4.5. Rolle des NLRP3-Inflammasoms bei der Entstehung CKD-assoziiertes kardiovaskulärer Erkrankungen.....</b>	<b>56</b>
4.5.1. Atherosklerose.....	56
4.5.2. Arterielle Hypertonie.....	56
4.5.3. Herzinsuffizienz .....	57
<b>4.6. Therapeutische Ansätze einer antiinflammatorischen Therapie .....</b>	<b>58</b>
4.6.1. NLRP3-Inhibitoren.....	58
4.6.2. Biologicals.....	61
<b>4.7. Limitationen.....</b>	<b>63</b>
<b>4.8. Ausblick und Zusammenfassung .....</b>	<b>63</b>
<b>5. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>65</b>
<b>6. Eigene Publikationen .....</b>	<b>79</b>
<b>7. Danksagung.....</b>	<b>80</b>

## Abkürzungsverzeichnis

<b>AAV</b>	ANCA-assoziierte Vaskulitis
<b>ACB- OP</b>	Aortokoronare Bypass-Operation
<b>A-Domain</b>	Acidic transactivation domain
<b>AHA</b>	American Heart Association
<b>ALR</b>	AIM2-like Rezeptor
<b>ANCA</b>	Antineutrophile zytoplasmatische Antikörper
<b>ASC</b>	Apoptosis-associated speck-like protein containing a carboxyterminal CARD
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>BIR-Domäne</b>	Baculovirus inhibitor of apoptosis repeat domain
<b>CAPS</b>	Kryopyrin-assoziiertes autoinflammatorisches Syndrom
<b>CARD</b>	Caspase activation and recruitment domain
<b>cDNA</b>	Complementary DNA
<b>CFTR</b>	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
<b>CKD</b>	Chronic kidney disease, chronische Nierenerkrankung
<b>CLR</b>	C-type lectin receptor
<b>CRP</b>	C-reaktives Protein
<b>CVD</b>	Cardiovascular disease
<b>DAMP</b>	Damage-associated molecular pattern
<b>dsDNA</b>	Doppelstrang DNA
<b>EAE</b>	Experimentale autoimmun Encephalomyelitis
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraacetat
<b>ELISA</b>	Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay
<b>ESRD</b>	End-stage renal disease
<b>FBS</b>	Fetales Bovines Serum
<b>GFR</b>	Glomeruläre Filtrationsrate
<b>eGFR</b>	Errechnete Glomeruläre Filtrationsrate
<b>GN</b>	Glomerulonephritis
<b>H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub></b>	Destilliertes Wasser
<b>HMGB-1</b>	High-mobility group box 1 Protein
<b>HD</b>	Hämodialyse

<b>HDL-C</b>	HDL-Cholesterin
<b>HRP</b>	Meerrettichperoxidase
<b>IL</b>	Interleukin
<b>IL-1Ra</b>	Interleukin-1-Rezeptorantagonist
<b>IRI</b>	Ischämie-Reperfusionsschädigungsmodell
<b>KHK</b>	Koronare Herzkrankheit
<b>LDL-C</b>	LDL-Cholesterin
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharid
<b>LRR</b>	Leucine rich repeat
<b>MHC</b>	Major histocompatibility complex
<b>mRNA</b>	Messenger RNA
<b>MyD88</b>	Myeloid differentiation primary response gene 88
<b>NACHT-Domain</b>	Nucleotide-binding and oligomerization domain
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
<b>NLR</b>	NOD (Nucleotide-binding oligomerization domain)-like Rezeptor
<b>NLRA</b>	NLR mit einer Acidic-transactivation domain (A-Domain)
<b>NLRB</b>	NLR mit einer Baculovirus inhibitor of apoptosis repeat domain (BIR-Domain)
<b>NLRC</b>	NLR mit einer Caspase activation and recruitment domain (CARD)
<b>NLRP3</b>	NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3
<b>NLRX</b>	NLR mit noch unbekannter domain
<b>PAMP</b>	Pathogen-associated molecular pattern
<b>pAVK</b>	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
<b>PBMC</b>	Peripheral blood mononuclear cell
<b>PBS</b>	Phosphat bufferd saline
<b>PRR</b>	Pattern-recognition rezeptor
<b>qPCR</b>	Real-time quantitativ polymerase chain reaction
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction
<b>PYD</b>	Pyrin domain
<b>RAGE</b>	Receptor for advanced glycation endproducts
<b>RLR</b>	Retinoic acid-inducible gene (RIG)-I-like rezeptor
<b>ROS</b>	Reaktive Sauerstoffspezies
<b>RPM</b>	Rounds per minute



<b>RPMI</b>	Roswel Park Memorial Institute Nährmedium
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>THP</b>	Tamm-Horsfall-Protein
<b>TIR</b>	Toll-Interleukin rezeptor domain
<b>TLR</b>	Toll-like receptor
<b>TNF</b>	Tumor-Nekrosefaktor
<b>UUO</b>	Unilaterale Ureterobstruktion

## Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung/ Tabelle</b>	<b>Name</b>	<b>Seite</b>
Abbildung 1	Inflammasom-Komponenten und Zytokinveränderung durch aktives NLRP3	11
Abbildung 2	Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms	12
Abbildung 3	Methodischer Versuchsaufbau	19
Abbildung 4	Zellschichtung nach Zentrifugation	20
Abbildung 5	Versuchsaufbau Zellkultur	23
Abbildung 6	Rekrutierungsschema	29
Abbildung 7	NLRP3-Genexpression in humanen Monozyten von Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz im Vergleich zu Gesunden	37
Abbildung 8	ASC-Genexpression in humanen Monozyten von Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz im Vergleich zu Gesunden	38
Abbildung 9	IL1B-Genexpression in humanen Monozyten von Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz im Vergleich zu Gesunden	39
Abbildung 10	IL-1 $\beta$ -Konzentration im Zellkulturüberstand humaner Monozyten von Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz im Vergleich zu Gesunden, nach Stimulation mit LPS	40

Abbildung 11	IL-1 $\beta$ -Konzentration im Zellkulturüberstand humaner Monozyten von Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz im Vergleich zu Gesunden, nach Stimulation mit LPS und ATP	41
Abbildung 12	IL-1 $\beta$ -Konzentration im Zellkulturüberstand humaner Monozyten von Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz im Vergleich zu Gesunden, nach Stimulation mit LPS und Nigericin	42
Abbildung 13	IL-1 $\beta$ -Konzentration im Zellkulturüberstand humaner Monozyten von Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz im Vergleich zu Gesunden, nach Stimulation mit LPS und Alum	43
Tabelle 1	Schweregradeinteilung der chronischen Niereninsuffizienz	2
Tabelle 2	Traditionelle kardiovaskuläre Risikofaktoren	4
Tabelle 3	CKD-spezifische Risikofaktoren	4
Tabelle 4	Arten von Mustererkennungsrezeptoren	7
Tabelle 5	Ausgewählte endogene Mustererkennungsrezeptor-Liganden	8
Tabelle 6	Geräte und deren Hersteller	14
Tabelle 7	Materialien und deren Hersteller	14
Tabelle 8	Chemikalien und deren Hersteller	16
Tabelle 9	Medien und Pufferlösungen	17
Tabelle 10	Reaktionsansatz cDNA-Synthese	26
Tabelle 11	Inkubationsansatz cDNA- Synthese	26
Tabelle 12	qPCR Mastermix	27
Tabelle 13	Ablaufprotokoll qPCR	27
Tabelle 14	Demographische Daten und Patientencharakteristika	31
Tabelle 15	Grunderkrankungen der Studiengruppen	32
Tabelle 16	Komorbiditäten der Studiengruppen	33
Tabelle 17	Kardiovaskuläre Risikofaktoren der Studiengruppen	34
Tabelle 18	Nierenparameter der Studiengruppen	35
Tabelle 19	Weitere Laborparameter der Studiengruppen	36

## Zusammenfassung

Die chronische Nierenerkrankung (CKD) hat sich innerhalb der letzten Jahrzehnte zu einer weltweiten Gesundheitsproblematik entwickelt. Sie geht mit einer hohen Morbidität und Mortalität einher. Dadurch werden hohe Therapiekosten verursacht. Kardiovaskuläre Erkrankungen zählen, unter anderem, zu den wichtigsten Komorbiditäten. Eine, durch das angeborene Immunsystem vermittelte, sterile Entzündung spielt bei Entstehung und Progression der CKD und deren Komorbiditäten eine entscheidende Rolle. Im Rahmen der Manifestation und Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion nehmen das NLRP3-Inflammasom und die Interleukine der IL-1-Super-Familie, insbesondere IL-1 $\beta$  eine zentrale Rolle ein. Ziel dieser Arbeit war es die Aktivität des NLRP3-Inflammasoms bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz zu untersuchen. Hierzu wurden Monozyten von Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz und von gesunden Probanden isoliert. In diesen Zellen wurde sowohl die Expression der Inflammasom-Komponenten als auch die Freisetzung von IL-1 $\beta$  nach Stimulation als Maß für die Inflammasom-Aktivität quantifiziert. Die Ergebnisse belegen, dass die Komponenten des NLRP3-Inflammasoms ASC, NLRP3 und IL-1B in Monozyten von Patienten mit chronischer Nierenkrankheit im Vergleich zu gesunden Probanden signifikant stärker exprimiert werden. Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, dass Monozyten von Patienten mit chronischer Nierenerkrankung im Vergleich zu gesunden Probanden signifikant mehr IL-1 $\beta$  nach Stimulation mit bekannten NLRP3-Aktivatoren sezernieren. Diese Ergebnisse zeigen, dass das NLRP3-Inflammasom bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung stärker aktiviert ist und deuten auf eine wichtige pathophysiologische Rolle des NLRP3-Inflammasoms bei der CKD-assoziierten sterilen Inflammation hin. Ebenfalls legen sie nahe, dass eine therapeutische Modulation des NLRP3-Inflammasoms ein potenzielles therapeutisches Target darstellen könnte.

## Abstract

Chronic kidney disease (CKD) has developed into a global public health problem. It is associated with high morbidity and mortality and causes high therapy costs. Cardiovascular diseases are among the most important comorbidities. Sterile inflammation mediated by the innate immune system plays a crucial role in the development and progression of CKD and its comorbidities. The NLRP3-inflammasome and interleukins of the IL-1 super family, in particular IL-1 $\beta$ , play a central role in the manifestation and maintenance of the inflammatory reaction. The aim of this work was to investigate the activity of the NLRP3-Inflammasome in patients with CKD. For this purpose, monocytes from patients with CKD and healthy volunteers were isolated and both the expression of the inflammasome components and the release of IL-1 $\beta$  after stimulation were quantified as a measure of the inflammasome activity. The results show that the expression of the components of the NLRP3 inflammasome ASC, IL1B and NLRP3 are higher in monocytes from patients with CKD as compared to healthy volunteers. In addition, it was demonstrated that monocytes from patients with chronic kidney disease secrete significantly more IL-1 $\beta$  upon stimulation with known NLRP3 activators compared to monocytes from healthy volunteers. These results, that the NLRP3 inflammasome is more activated in patients with CKD, suggest an important pathophysiological role of the NLRP3 inflammasome in CKD-associated sterile inflammation and highlight modulation of the NLRP3 inflammasome as a potential therapeutic target.

# 1. Einleitung

## 1.1. Definition und Klassifikation der chronischen Niereninsuffizienz

Der Begriff chronische Niereninsuffizienz (CKD) steht für eine Gruppe heterogener Erkrankungen, welche die Nierenfunktion und die Nierenstruktur beeinflussen (1). Laut der National Kidney Foundation liegt eine CKD vor bei:

1. einem Nierenschaden  $\geq 3$  Monate, der durch eine Biopsie oder Marker für Nierenschäden bestätigt worden ist, mit oder ohne Verminderung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) auf  $\leq 60$  ml/min/1,73m<sup>2</sup> oder (2, 3)
2. einer GFR  $\leq 60$  ml/min/1,73m<sup>2</sup>  $\geq 3$  Monate, mit oder ohne Nierenschäden (4, 5).

Die Definition ist unabhängig von der Ätiologie (6). Nierenschäden werden gesichert durch Biopsien, oder Marker für Nierenschäden wie die Proteinurie (Ausscheidung von Eiweiß im Urin  $> 300$  mg pro 24 h), ein verändertes Urinsediment oder Pathologien in der Bildgebung (6). Erhöhte Albuminwerte im Urin sind frühe Marker für Nierenschäden durch Diabetes mellitus, Glomerulonephritiden sowie arterielle Hypertonie und sind mit einer schlechten Prognose bezüglich der Progression der Nierenerkrankung und kardiovaskulären Erkrankungen (CVD) assoziiert (4).

Anhand der glomerulären Filtrationsrate (GFR) lässt sich die Nierenfunktion sowie der Schweregrad der CKD abschätzen (7). Sie gibt an, wie viel Volumen pro Zeiteinheit von den Glomeruli der Nieren filtriert wird und wird allgemein, als der beste Nierenfunktionsindex, angesehen (4). Bei gesunden, jungen Erwachsenen liegen die Werte bei 120-130 ml/min/1,73m<sup>2</sup>, mit dem Alter nehmen sie kontinuierlich ab (7). Niedrige Werte sind mit zunehmenden Komplikationen der CKD assoziiert (4). Berechnet werden kann die eGFR (estimated GFR) anhand der CKD-EPI Kreatinin Formel, welche seit 2012 als klinischer Standard verwendet wird (8).

$$141 \times \min\left(\frac{SCr}{k}, 1\right)^\alpha \times \max\left(\frac{SCr}{k}, 1\right)^{-1,209} \times 0,993^{Alter} \times (1,018 \text{ wenn weiblich}) \\ \times (1,159 \text{ wenn dunkelhäutig})$$

**CKD-Epi Kreatinin Formel:** SCr steht für Serumkreatinin (mg/dl); k ist 0,7 für Frauen und 0,9 für Männer;  $\alpha$  ist -0,329 für Frauen und -0,411 für Männer; min ist das Minimum für  $\frac{SCr}{k}$  oder 1; max ist das Maximum für  $\frac{SCr}{k}$  oder 1.

Da das Serumkreatinin abhängig von der individuellen Muskelmasse ist, kann die Abschätzung der eGFR anhand des Serumkreatinins bei Menschen mit sehr wenig, oder sehr viel Muskelmasse problematisch sein. Es kann zu falsch normalen Werten bei bereits eingetretener Nierenfunktionseinschränkung kommen (9). In solchen Fällen kann Cystatin C, ein von der Muskelmasse weitestgehend unabhängiger Faktor, mittels der CKD-EPI Cystatin C Formel, zur sensitiveren Berechnung der eGFR verwendet werden (8).

Laut aktuellen KDIGO Leitlinien ist der Goldstandard der eGFR Abschätzung, eine Berechnung anhand Serumkreatinin und Serum-Cystatin C (8).

$$135 \times \min\left(\frac{SCr}{k}, 1\right)^\alpha \times \max\left(\frac{SCr}{k}, 1\right)^{-0,601} \times \min\left(\frac{SCysC}{0,8}, 1\right)^{-0,375} \times \max\left(\frac{SCysC}{0,8}, 1\right)^{-0,711} \\ \times 0,995^{Alter} (1,018 \text{ wenn weiblich}) \times (1,159 \text{ wenn dunkelhäutig})$$

**CKD-EPI Kreatinin-Cystatin C-Formel:** SCr steht für Serumkreatinin (mg/dl); k ist 0,7 für Frauen 0,9 für Männer;  $\alpha$  ist -0,248 für Frauen und -0,207 für Männer;  $\min\left(\frac{SCr}{k}, 1\right)$  ist das Minimum für  $\frac{SCr}{k}$  oder 1;  $\max\left(\frac{SCr}{k}, 1\right)$  ist das Maximum für  $\frac{SCr}{k}$  oder 1; SCysC steht für Serum- Cystatin C (mg/l);  $\min\left(\frac{SCysC}{0,8}, 1\right)$  ist das Minimum von  $\frac{SCysC}{0,8}$  oder 1;  $\max\left(\frac{SCysC}{0,8}, 1\right)$  ist das Maximum von  $\frac{SCysC}{0,8}$  oder 1.

Mittels der GFR lässt sich die CKD in fünf Schweregrade einteilen (siehe Tabelle 1).

Stadium	Beschreibung	GFR [ml/min]
1	Nierenschaden mit leicht erhöhter oder normaler GFR	$\geq 90$
2	Nierenschaden mit leicht eingeschränkter GFR	60-89
3a	Mittelgradig-moderat eingeschränkte GFR	45-59
3b	Mittelgradig-schwer eingeschränkte GFR	30-44
4	Schwer eingeschränkte GFR	15-29
5	Nierenversagen	$< 15$

**Tabelle 1** Schweregradeinteilung der chronischen Niereninsuffizienz (CKD) (4, 5).

## 1.2. Epidemiologie der chronischen Niereninsuffizienz

Die chronische Niereninsuffizienz hat sich innerhalb der letzten Jahrzehnte zu einer weltweiten Gesundheitsproblematik entwickelt (6). Neben Herz-, cerebrovaskulären sowie Krebserkrankungen gehört die chronische Niereninsuffizienz zu den Haupttodesursachen chronischer Erkrankungen innerhalb der Industrienationen (2). Inzidenz und Prävalenz der chronischen Niereninsuffizienz steigen in Europa, den USA und Japan stetig an (10). Im Laufe der letzten zwanzig Jahre hat sich die Inzidenz mehr als verdoppelt (11). Arterielle Hypertonie

und Diabetes mellitus, die beiden Hauptursachen für das Voranschreiten der chronischen Niereninsuffizienz, häufen sich in der Bevölkerung und leisten hier einen großen Beitrag (10). Die Prävalenz steigt steiler als die Inzidenz, da Patienten, durch die immer effizienter werdenden Therapieoptionen, länger überleben (10). Ebenfalls steigt die Notwendigkeit für den Einsatz von Nierenersatzverfahren, wie Dialyse und Nierentransplantation, rapide an (2, 12).

### **1.3. Prognose von Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz**

Die chronische Niereninsuffizienz führt zu einer signifikanten Steigerung der Morbidität und Mortalität (11). Schaut man sich die Progression von Nierenerkrankungen an, haben Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz ein hohes Risiko im Krankheitsverlauf eine terminale Niereninsuffizienz (ESRD) zu erreichen (13). Hier kann nur noch durch Dialyse oder Nierentransplantation das Langzeitüberleben gesichert werden (13, 14). Die Prävalenz niedriger CKD-Stadien ist jedoch bei weitem höher als die der ESRD (6, 15). Das mögliche Outcome von Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz umfasst nicht nur die ESRD, es bestehen außerdem komplexe Beziehungen zu anderen Erkrankungen (11). So treten sehr häufig kardiovaskuläre Erkrankungen auf sowie, durch die verminderte Nierenfunktion ausgelöste Komplikationen, wie Störungen des Wasser-, Elektrolyt- und Säure-Basen-Haushaltes (6).

### **1.4. Kardiovaskuläre Ereignisse als Hauptursache der hohen Mortalität bei Niereninsuffizienz**

Die chronische Niereninsuffizienz ist mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse assoziiert (16). Im Jahr 2003 hat die American Heart Association (AHA) bekanntgegeben, dass Patienten mit CKD als Hochrisikogruppe, für im Krankheitsverlauf auftretende kardiovaskuläre Ereignisse, einzuschätzen sind (17). Bei Patienten mit CKD ist das Risiko an einem kardiovaskulären Ereignis zu sterben sogar höher als jenes, eine ESRD zu entwickeln (17). Selbst in Abwesenheit traditioneller, kardiovaskulären Risikofaktoren, haben Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse (18). Diese renal-kardiovaskuläre Assoziation findet man vor allem bei Patienten in weiter fortgeschrittenen CKD-Stadien. Aber auch Patienten mit nur leicht reduzierter Nierenfunktion weisen eine gesteigerte kardiovaskuläre Belastung auf. Diese Belastung führt zu erhöhter Mortalität, erhöhter Wahrscheinlichkeit für kardiovaskuläre Ereignisse sowie gesteigerter

Hospitalisierung (1, 18). Eine direkte Abhängigkeit zwischen dem Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse und dem Stadium der CKD ist erkennbar (14)

### **1.5. Traditionelle kardiovaskuläre und CKD-spezifische Risikofaktoren**

Risikofaktoren sind definiert, als ein messbares Element oder eine Charakteristik, die ursächlich, mit einer erhöhten Krankheitsrate verbunden ist und ein unabhängiger und signifikanter Prädiktor für das Risiko eine Krankheit zu entwickeln, darstellt (19). Traditionelle kardiovaskuläre Risikofaktoren sind hier definiert als Faktoren, die in der „Framingham Heart Study“ genutzt wurden, um das Risiko für die Entstehung einer symptomatisch ischämischen Herzkrankheit einzuschätzen und sind in Tabelle 2 aufgeführt (19, 20)

<b>Traditionelle kardiovaskuläre Risikofaktoren</b>
Bluthochdruck
Nikotinabusus
Diabetes mellitus
Dyslipidämie (Hypercholesterinämie, Hypertriglyzeridämie, HDL-C↓, LDL-C↑)
Adipositas
Physikalische Inaktivität

**Tabelle 2** Traditionelle kardiovaskuläre Risikofaktoren (17, 19, 21).

Die meisten der traditionellen kardiovaskulären Risikofaktoren wie Bluthochdruck, Diabetes mellitus, oder Dyslipidämie, weisen bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz eine hohe Prävalenz auf (17). Neben den traditionellen kardiovaskulären, lassen sich ebenfalls CKD-spezifische Risikofaktoren beschreiben.

<b>CKD-spezifische Risikofaktoren</b>
Männliches Geschlecht
Afroamerikanische Abstammung
Alter
Nicht-steroidale Antirheumatika (NSAR)
Verminderte Nephronen-Anzahl (z.B. bei geringem Geburtsgewicht)
Schlafapnoe-Syndrom
Proteinurie

**Tabelle 3** CKD-spezifische Risikofaktoren (22–27)



## **1.6. Unterschiede der adaptiven und angeborenen Immunität**

Die chronische Niereninsuffizienz ist durch ein pro-inflammatorisches Mikromilieu charakterisiert, welches die Progression der Niereninsuffizienz selbst, als auch die Entstehung kardiovaskulärer Komplikationen fördert (28, 29). Hierbei spielt sowohl eine Aktivierung des adaptiven als auch des angeborenen Immunsystems eine wichtige Rolle.

Die angeborene Immunität besteht aus einer Vielzahl angeborener physikalischer, chemischer, zellulärer sowie humoraler Abwehrmechanismen gegen Krankheitserreger und benötigt keine primäre Prägung, oder Antigenadaption (30). Sie basiert auf der unspezifischen Erkennung von bestimmten exogenen und/ oder endogenen pathogenen Mustern, welche von Mustererkennungsrezeptoren (PRRs) gebunden werden (31). Aus der Aktivierung dieser PRRs resultiert eine sofortige Zellaktivierung, die zum Auslösen der Komplement- und Koagulationskaskade sowie zur Opsonierung führt (31). Des Weiteren kommt es zur Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine und Chemokine und zur Phagozytose (31). Die angeborene Abwehr ist also direkt nach Erregerkontakt aktiv und gewährleistet eine erste, schnelle Abwehrreaktion (30).

Die erworbene Immunität hingegen besteht aus zellulären und humoralen Mechanismen (32). Im Gegensatz zum angeborenen kann das erworbene Immunsystem spezifische Erreger erkennen und diese gezielt abtöten (32). Im Rahmen der zellulären Abwehr binden T- und B-Lymphozyten spezifische Histokompatibilitätskomplex (MHC)-gebundene Antigene und eliminieren diese (31). In der humoralen Abwehr spielen Immunglobuline eine wichtige Rolle. Diese neutralisieren und opsonieren Antigene, aktivieren das Komplementsystem und führen so zur Einleitung der Zellyse (30). Die Erregererkennung erfolgt über antigenspezifische Zellen, die eine vorherige Aktivierung benötigen (33). Diese erfolgt meist über eine Aktivierung des angeborenen Immunsystems (33). Die erworbene Immunität ist der angeborenen also nachgeschaltet und reagiert dementsprechend langsamer, aber dafür hochspezifisch (33). Beide, die angeborene, sowie die erworbene Immunität spielen eine wichtige Rolle in der Entstehung und Progression der chronischen Niereninsuffizienz (16).

## **1.7. Bestandteile des angeborenen Immunsystems**

Wie bereits beschrieben besteht das angeborene Immunsystem aus physikalischen, chemischen, zellulären sowie humoralen Abwehrmechanismen, die alle von Geburt an vorhanden sind (30). Zu den physikalischen und chemischen Mechanismen gehören unter anderem die intakte Haut, Schleimhäute und die Produktion von Sekreten und Schleim (30).

Zu den Zellen des angeborenen Immunsystems zählen Granulozyten, Zellen des monozytären Phagozytensystems, natürliche Killerzellen und dendritische Zellen (31, 34).

### **1.7.1. Zellen des angeborenen Immunsystems**

**Granulozyten** gehören zu den Leukozyten, von denen sie etwa 40-60 % ausmachen (30). Sie werden von Chemokinen an den Ort der Entzündung gelockt und sind vor allem an der Akutabwehr beteiligt (35). Aktuelle Studien nach sind sie an der Regulierung, der Rekrutierung und der Aktivierung von dendritischen Zellen beteiligt (35). Je nach Eigenschaften und Morphologie werden sie unterteilt in Neutrophile, Eosinophile und Basophile, wobei die Neutrophilen den größten Teil ausmachen und zur Phagozytose befähigt sind (35).

Das **monozytäre Phagozytensystem** besteht aus phagozytosefähigen Zellen, die von Monozyten abstammen. Sie machen etwa 4-8 % der Leukozyten aus. Monozyten werden im Knochenmark gebildet und verbleiben zunächst im Blut. Nach kurzer Zeit migrieren sie in periphere Gewebe und differenzieren dort zu Makrophagen. Lokalisiert sind sie unter anderem in der Niere, Leber, Lunge, Knorpel, Knochen und Gehirn. Sie besitzen die Fähigkeit zur amöboiden Fortbewegung und Adhäsion an Oberflächen und sind beteiligt an Erregerelimination durch Phagozytose, Antigenpräsentation mittels MHC-II-Molekülen sowie Sekretion proinflammatorischer Zytokine, Chemokine, Wachstums- und Komplementfaktoren (36).

**Natürliche Killerzellen** stammen von lymphoiden Stammzellen ab, werden aber, wegen ihrer schnellen Reaktionsbereitschaft und fehlender Rezeptoren zur speziellen Antigenerkennung, dem angeborenen Immunsystem zugeordnet (36, 37). Sie sind beteiligt an der unspezifischen Antigenerkennung und dem Erkennen und Abtöten virusinfizierter oder entarteter Zellen sowie der Zytokinsekretion (36, 37).

**Dendritische Zellen** gehören zu den professionell antigenpräsentierenden Zellen und besitzen wie Makrophagen MHC-II-Rezeptoren auf der Oberfläche (38). Sie haben einen Zellkörper mit langen, verzweigten Fortsätzen und dienen der Erkennung und T-Zell-Präsentation unspezifischer Antigene (38).

### **1.7.2. Mustererkennungsrezeptoren (PRRs)**

Zur Erkennung von Mikroorganismen nutzt das angeborene Immunsystem eine Reihe von Mustererkennungsrezeptoren (PRRs) (34). Diese Rezeptoren befinden sich auf der Zelloberfläche und in intrazellulären Kompartimenten (34). Zu ihren Hauptfunktionen zählen

Opsonierung, Aktivierung proinflammatorischer Signalwege, Aktivierung der Komplement- und Koagulationskaskade, Phagozytose und Einleitung von Apoptose (34). Sie erkennen konservierte Strukturen, sogenannte Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs) und bei Zellschädigung entstehende, endogene Moleküle, die sogenannten Gefahr-assoziierten molekularen Muster (DAMPs) (39). Die durch die PRRs ausgelöste intrazelluläre Signalkaskade führt zur Expression von Entzündungsmediatoren, welche die Elimination von Pathogenen und infizierten Zellen koordinieren (39). Folglich spielt das angeborene Immunsystem nicht nur eine wichtige Rolle im Aufspüren von Pathogenen, wie Bakterien, Viren, oder Pilzen, sondern ist ebenfalls in sterile Entzündungsprozesse involviert (40). PRRs werden, neben Makrophagen und dendritischen Zellen, ebenfalls von einer Reihe nicht-professioneller Immunzellen exprimiert, zu denen endotheliale und epitheliale Zellen sowie neutrophile Granulozyten zählen (39, 40). Die Expression der meisten dieser Rezeptoren lässt sich auch im Nierengewebe nachweisen (40). Alle PRRs besitzen bestimmte Gemeinsamkeiten (41). Erstens erkennen alle PRRs PAMPs (41). Zweitens werden PRRs konstitutiv exprimiert und erkennen Pathogene ungeachtet ihrer Phase im Lebenszyklus (41). Derzeit sind fünf Arten von PRRs bekannt (39, 40). Ihrer subzellulären Lokalisation nach können sie in zwei Gruppen unterteilt werden, transmembrane und intrazelluläre PRRs (*siehe Tabelle 4*) (39).

<b>Transmembrane PRRs</b>	<b>Intrazelluläre PRRs</b>
Toll-like Rezeptoren (TLRs)	RIG-I-like Rezeptoren (RLRs)
C-Typ-Lectin-Rezeptoren (CLRs)	NOD-like Rezeptoren (NLRs)
	AIM2-like Rezeptoren (ALRs)

**Tabelle 4** Arten von Mustererkennungsrezeptoren (eng. pattern recognition receptors, PRRs) (42).

Toll-like Rezeptoren (TLRs) und C-Typ-Lectin-Rezeptoren (CLRs) sind transmembrane Proteine, die in der Plasmamembran und in Endosomen lokalisiert sind, wo sie DAMPs und PAMPs im extrazellulären Milieu identifizieren (39). Die zweite Gruppe setzt sich zusammen aus zytoplasmatischen Proteinen und beinhaltet RIG-I-like Rezeptoren (RLRs), AIM2-like Rezeptoren (ALRs) und NOD-like Rezeptoren (NLRs), welche sich in intrazellulären Kompartimenten befinden (39). Während CLRs und RLRs vor allem in die Erkennung von Viren und Pilzen involviert sind, spielen TLRs und NLRs eine wichtige Rolle in der Erkennung endogener Liganden und werden mit verschiedenen Krankheitszuständen, wie Atherosklerose, arterieller Hypertonie sowie chronischer Niereninsuffizienz, assoziiert (40). Bekannte Liganden sind in Tabelle 5 aufgeführt.

### 1.7.3. Toll-like Rezeptoren (TLRs)

Toll-like Rezeptoren (TLRs) können in der Zellmembran sowie in endosomalen Membranen lokalisiert sein (34). Beim Menschen sind 10 TLRs bekannt, bei Mäusen 13 (34). Diese verfügen jeweils über eine N-terminale Leucinreiche Domäne (LRR) zur Ligandenbindung und eine Toll-Interleukin Rezeptor Domäne (TIR) für die intrazelluläre Signaltransduktion. (34, 43). Nachdem ein Ligand an einen TLR gebunden hat, wird, über die TIR-Domäne, der Transkriptionsfaktor NFκB (nuclear factor-κB) aktiviert (34). Dieser transloziert in den Zellkern, wo er die Genexpression proinflammatorischer Zytokine reguliert (34). Ein weiterer Signalweg führt zur Expression von Typ-1-Interferon (39). Einige TLRs benötigen Ko-Rezeptoren zur Induktion der Signalwege, andere können nur in Kooperation miteinander die Signalkaskade auslösen (39, 44). TLR4 ist der am besten charakterisierteste TLR (39). Er erkennt Lipopolysaccharid (LPS), ein Bestandteil der äußeren Membran gram-negativer Bakterien (39). Ausgewählte endogene, mit CKD assoziierte Liganden sind in Tabelle 5 aufgeführt.

<b>Ligand</b>	<b>PRR</b>
Modifiziertes LDL	TLR1, TLR2
Hitzeschockprotein 60 und 70	TLR2, TLR4
High-mobility-group box 1 (HMGB1)	TLR2, TLR4
Harnsäure	TLR2, TLR4, NLRP3
Surfactantprotein A	TLR2, TLR4
Lipopolysaccharid (LPS)	TLR4
Hyaluron	TLR4
Fibronectin	TLR4
Fibrinogen	TLR4
Heparin Sulfat	TLR4
Adenosintriphosphat (ATP)	NLRP3, P2X <sub>7</sub>
Alum	NLRP3
Asbest	NLRP3
Kieselsäure	NLRP3
Nigericin	NLRP3

**Tabelle 5** Ausgewählte endogene Mustererkennungsrezeptor-Liganden (eng. pattern recognition receptors, PRRs) (37, 39, 45, 46).

#### **1.7.4. NOD-like Rezeptoren (NLRs)**

NOD-like Rezeptoren (NLRs) bilden eine weitere, wichtige Untergruppe der PRR-Familie (40). Sie sind im Zytoplasma der Wirtszelle lokalisiert (47). Die NLR-Familie besteht aus 23 Proteinen, die eine gemeinsame Grundstruktur aufweisen (47). Zentral besitzen sie eine nukleotid-bindende Domäne (NOD oder NACHT), welche die Oligomerisation initiiert und der Rezeptorfamilie ihren Namen verleiht (43, 47). Eine C-terminal lokalisierte LRR-Domäne ist für die direkte oder indirekte Ligandenerkennung zuständig (43, 47). N-terminal befindet sich die Effektor-Domäne, welche für die Protein-Signalmolekül-Interaktion zuständig ist und somit die Signalweiterleitung vermittelt (43, 47). Der Effektor-Domäne nach können NLRs in fünf Untergruppen eingeteilt werden: NLRP mit einer Pyrin-Domäne (PYD), NLRC mit einer Caspase-rekrutierungs-Domäne (CARD), NLRA mit einer Acidic-transactivation-Domäne (A-Domäne), NLRB mit einer Baculovirus Inhibitor of apoptosis repeat,-Domäne (BIR-Domäne) und NLRX (42, 48).

#### **1.7.5. Pathogen-assoziierte molekulare-Muster (PAMPs) und Schadens-assoziierte molekulare Muster (DAMPs)**

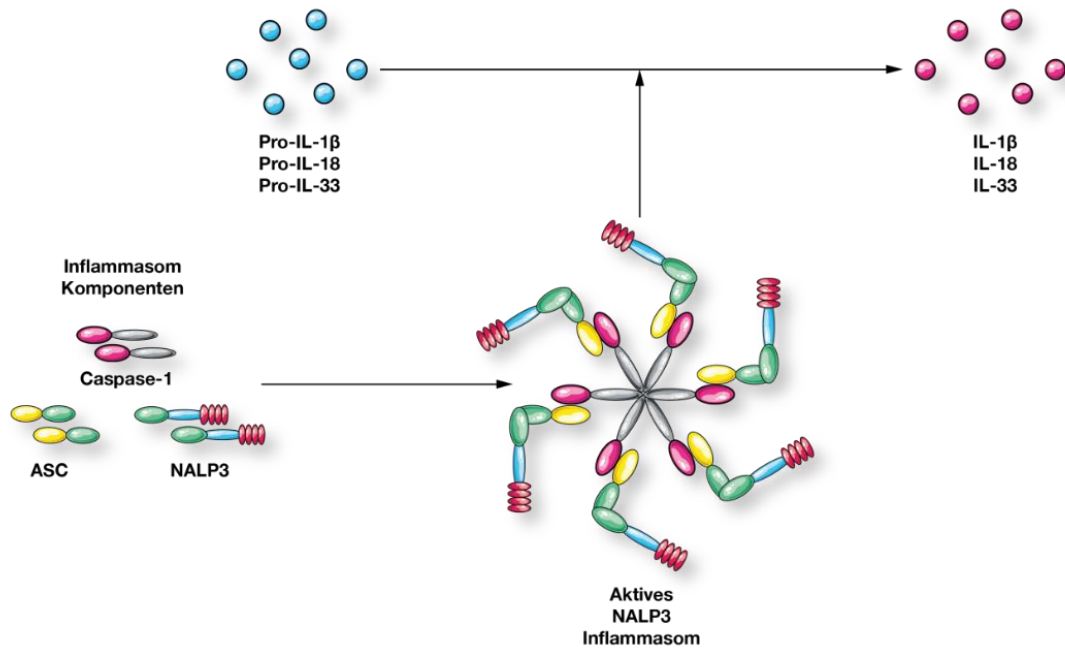
Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs) und Schadens-assoziierte molekulare Muster (DAMPs) sind Gefahrensignale, die von PRR tragenden Zellen erkannt werden und zu einer Aktivierung des angeborenen Immunsystems führen (49).

PAMPs sind von Mikroorganismen stammende Moleküle (34). Im Rahmen von Infektionen, wirken sie als exogene Liganden und machen das Immunsystem auf Pathogene aufmerksam (34). Sie kommen in vielen verschiedenen Organismen vor, jedoch nicht im Wirt selbst und helfen der Wirtszelle zwischen „eigen“ und „fremd“ zu unterscheiden (34). Im Gegensatz dazu sind DAMPs von der Wirtszelle vermittelte Moleküle. Sie werden im Rahmen von Traumata, Ischämien und Gewebsschäden von der beschädigten Zelle exprimiert und wirken als endogene Liganden, die eine Immunantwort initiieren und aufrecht erhalten (49). Diese Immunantwort kann in Anwesenheit, ebenso wie in Abwesenheit, von pathogenen Infektionen stattfinden. Eine erhöhte Serumkonzentration dieser DAMPs ist mit vielen entzündlichen Krankheiten assoziiert, einschließlich Sepsis, Atherosklerose, Morbus Crohn und Krebs (49).

## **1.8. Das Inflammasom – ein zentraler Bestandteil des angeborenen Immunsystems**

### **1.8.1. Struktur und Funktion des Inflammasoms**

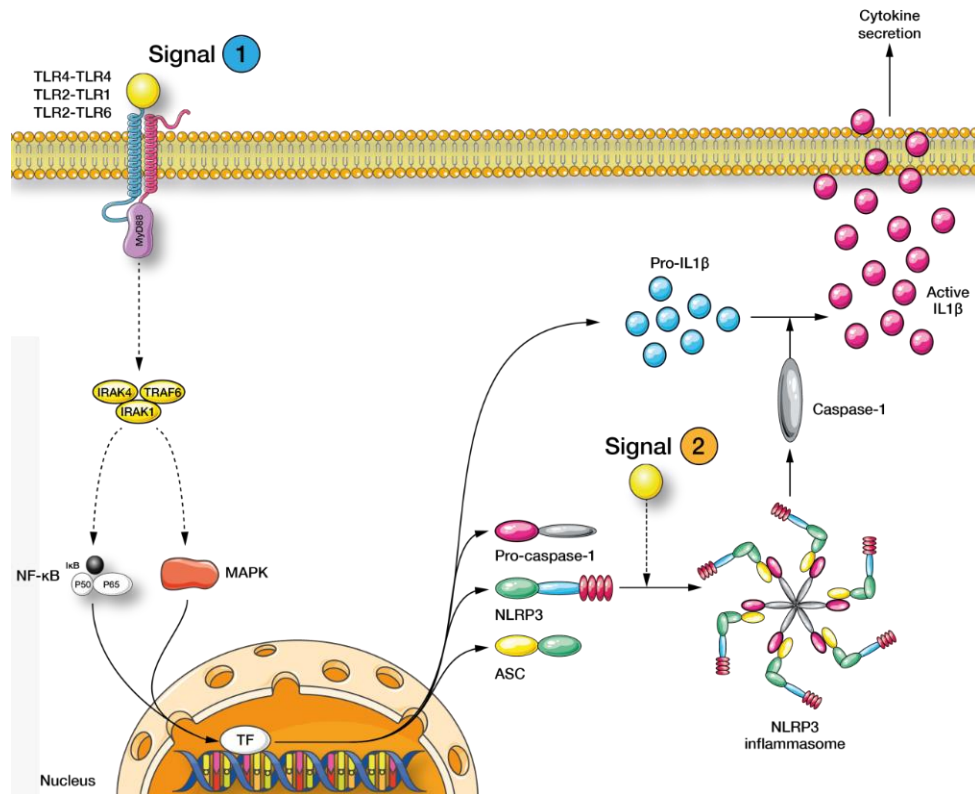
Inflammasome sind im Zytoplasma lokalisierte Multiproteinkomplexe, die im Rahmen von potenziellen Gefahren, wie Infektionen oder stress-assoziierten Stimuli zusammengesetzt werden (22, 23). Typischerweise bestehen Inflammasome aus einem Sensorprotein, einem Adapterprotein und dem Proenzym Procaspase-1 (50, 51). Zu den Sensorproteinen gehört u.a. die NOD-like Rezeptorfamilie (44, 51). Nach Aktivierung des Sensorproteins durch DAMPs und PAMPs, bindet es mit seiner Pyrin-Domäne das Adapterprotein ASC (Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD) (44). ASC wiederum bindet die monomere Procaspase-1 mittels seiner CARD-Rekrutierungsdomäne (44). Das zusammengesetzte Inflammasom führt zur Aktivierung von Caspase-1, welche wiederum die Prozessierung der proinflammatorischen Zytokine Pro-IL-1 $\beta$ , Pro-IL-18 und Pro-IL-33 in ihre biologisch aktiven Formen katalysiert (23, 24). Aktives IL-1 $\beta$  spielt eine essenzielle Rolle bei Immunreaktionen und ist an der Rekrutierung von Entzündungszellen an den Ort der Infektion beteiligt (26). IL-18 ist wichtig für die Bildung von Interferon- $\gamma$  und führt zu einer Aktivitätssteigerung der Zytolyse von natürlichen Killerzellen (26). IL-33 ist an der Alarmierung des Immunsystems im Rahmen von Gewebsschäden und Stress beteiligt. Neben der Aktivierung proinflammatorischer Zytokine, sind Inflammasome ebenfalls an der Einleitung von Pyroptose beteiligt (44). Pyroptose ist ein Caspase-1-abhängiger, programmierter Zelltod, bei dem die Zellen anschwellen (44). Die Plasmamembran rupturiert und es kommt zur Freisetzung weiterer proinflammatorischer Moleküle (44). Diese Eigenschaften machen Inflammasome zu wichtigen Bestandteilen des angeborenen Immunsystems (16). Die Inflammasomaktivität wird vom Körper streng reguliert, um eine exzessive Zytokinfreisetzung zu verhindern (52). Die Regulation der Aktivierung geschieht auf vielen, verschiedenen Ebenen (52). Auch bei der Entstehung und Progression der chronischen Niereninsuffizienz spielen Inflammasome eine wichtige Rolle (53). Von den bisher bekannten Inflammasomen ist das NLRP3-Inflammasom das am besten charakterisierte (54).



**Abbildung 1 Inflammasom-Komponenten und Zytokinveränderung durch aktives NLRP3:** Das aktive NLRP3-Inflammasom besteht aus drei Komponenten: NLRP3 mit Pyrin-, NACHT- und LRR (*leucine-rich-repeat*)-Domäne; das Adapterprotein ASC (*Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*) mit CARD (*n-terminal activation and recruitment domain*) und Pyrin-Domäne und Caspase-1 mit CARD-, p20- und p10-Domäne. Das Sensorprotein NLRP3 bindet nach Aktivierung ASC. ASC wiederum bindet Caspase-1. Das aktivierte Inflammasom katalysiert die Umwandlung der proinflammatorischen Pro-Zytokine Pro-IL-1 $\beta$ , Pro-IL-18 und Pro-IL-33 in ihre biologisch aktive Form.

### 1.8.2. Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms

Zur Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms werden zwei Signale benötigt (46, 51). Ein erstes Signal, welches auch als „Priming“ bezeichnet wird und ein zweites, welches die Zusammensetzung des Inflammasoms einleitet (siehe Abbildung 2) (46, 51). Liganden wie z.B. LPS, oder TNF- $\alpha$  (siehe Tabelle 5) binden an TLRs und führen zur vermehrten Expression von NLRP3 (46, 51). Normalerweise ist die Expression von NLRP3 relativ gering (55). Dieser, auch als „Signal 1“ bezeichnete, NF- $\kappa$ B-abhängige Vorgang führt neben vermehrter Expression von NLRP3 zur Expression von Procaspase-1, dem Adapterprotein ASC (*Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*) sowie Expression der Pro-Zytokine Pro-IL-1 $\beta$ , Pro-IL-18 und Pro-IL-33 (46, 51). „Signal 2“ induziert die Zusammensetzung des funktionalen Inflammasomkomplexes, welcher die Caspase-1-abhängige Spaltung der Proenzyme in ihre biologisch aktive Form katalysiert (16, 46).



**Abbildung 2 Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms:** Signal 1 besteht aus der Aktivierung von TLRs und führt zur Expression verschiedener Inflammasom-Bestandteile (ASC, NLRP3, Caspase-1), sowie den Pro-Formen von IL-1 $\beta$ , IL-18 und IL-33. Signal 2 leitet die Zusammensetzung des aktiven Inflammasom-Komplexes ein und induziert die Caspase-1-abhängige Spaltung der Pro-Zytokine in ihre biologisch aktive Form.

Als „Signal 2“ fungieren zahlreiche PAMPs, Toxine von bakteriellen, viralen, mykotischen, und protozoischen Pathogenen sowie DAMPs. Zu den DAMPs zählen u.a. kristalline Moleküle (Alum, Kieselsäure, Asbest) die Phagozytose für die Aktivierung benötigen, ATP das durch seinen Oberflächenrezeptor P2R7 agiert und porenformende Toxine wie Nigericin (*siehe Tabelle 5*) (46, 54).

Aktuell werden fünf Modelle vermutet, die „Signal 2“ vermitteln (16, 56).

- Zellulärer Ausstrom von Kalium-Ionen
- Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)
- Translokation von Mitochondrien
- Sekretion mitochondrialer DNA (mtDNA), oder Cardiolipin
- Lysosomale Destabilisierung



## **1.9. Zielsetzung**

Ziel dieser Arbeit war es, die Aktivität des wichtigsten Vertreters der Gruppe der Inflammasome, dem NLRP3-Inflammasom, bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz zu untersuchen. Hierzu wurden Monozyten von Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz und von gesunden Probanden isoliert. In diesen Zellen wurden sowohl die Expression der Inflammasom-Komponenten als auch die Freisetzung von IL-1 $\beta$  nach Stimulation als Maß für die Inflammasom-Aktivität quantifiziert.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Geräte

Gerät	Hersteller
Inkubator	Binder GmbH, Tuttlingen, D
Schüttler PMR-30 Plattform Rocker	Grant Bio, Oregon,USA
Sicherheitswerkbank Airstream Escro class II BSC	Biomedis Vertriebsgesellschaft GmbH, Gießen, D
Zentrifuge Megafuge 1.0 R	Heraeus Holding GmbH, Hanau, D
Zentrifuge 5804 R	Eppendorf AG, Hamburg, D
Mikrotiterplatten-Photometer Sunrise	Tecan Trading AG, Männedorf, CH

**Tabelle 6** Geräte und deren Hersteller

#### 2.1.2. Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
ELISA 96-Well Platten	Greiner Bio-One International GmbH, Frickhausen, D

**Tabelle 7** Materialien und deren Hersteller

### 2.1.3. Chemikalien

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller</b>
Aluminium (Alum crystals)	InvivoGen, San Diego, USA
Ammoniumchlorid 4N	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Adenosintriphosphat (ATP)	InvivoGen, San Diego, USA
Bovines Serum Albumin (BSA)	PAA Laboratories, Cölbe, D
Endotoxinfreies Wasser HyClone™ Water	GE Healthcare Life Sciences, Utah, USA
Fetales Bovines Serum (FBS)	Gibco/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Formaldehyd	Alfa Aesar GmbH, Karlsruhe, D
LPS-EB Ultrapure	InvivoGen, San Diego, USA
Ficoll Separationsmedium (LymphocytSeparation Medium 1077)	PromoCell bioscience alive GmbH, Heidelberg, D
Kaliumhydrogenkarbonat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Merck Millipore GmbH, Schwalbach, D
Nigericin	InvivoGen, San Diego, USA
Opti-MEM Reduced Serum Medium	Gibco/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Gibco/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Schwefelsäure 1M	Fisher Scientific, Loughborough, UK

Pen/Strep (10.000 U/l)	Gibco /Life Tfechnologies, Carlsbad, CA, USA
Trypanblau 0,4%	Sigma life science, St. Luis, USA
Tween-20	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Medium (RPMI-1640 GlutaMAX™)	Gibco/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Chloroform	Fisher Scienific, Loughborough, UK
Ethanol 75 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
H <sub>2</sub> O-DEPC	Fisher Scienific, Loughborough, UK
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Gibco/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Trizol	Fisher Scienific, Loughborough, UK

**Tabelle 8** Chemikalien und deren Hersteller

### 2.1.4. Medien und Pufferlösungen

Medium/ Pufferlösung	Rezept
Verdünnungsmedium	186,1 g Disodiummethylenediaminetetrat- acetat 2H <sub>2</sub> O  800 ml H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>  pH 8,0 mit NaOH einstellen autoklavieren
PBS/ EDTA Ansatz	500 mg PBS (ohne Mg und Ca)  5 ml 0,5M EDTA-Lösung
Ammoniumchlorid Lysepuffer (0,155M)	500 ml H <sub>2</sub> O  4,15 g NH <sub>4</sub> Cl

	0,5006 g KHCO <sub>3</sub> 0,1 ml EDTA-Lösung pH 7,4 mit Salzsäure titrieren
EDTA-Lösung (0,5 M)	186,1 g EDTA 800 ml H <sub>2</sub> O pH 8,0 mit NaOH einstellen auf 1000 ml auffüllen und autoklavieren
ELISA Coating-Puffer	200 µl 5X Coating-Buffer (Carbonatpuffer) 800 µl H <sub>2</sub> O
ELISA Waschpuffer	500 ml PBS 0,25 ml Tween 20
ELISA Assay Diluent	10 ml Assay Diluent Stock 40 ml PBS
ELISA Fixationsantikörperlösung	5 µl Fixationsantikörperansatz 995 µl Coating-Puffer
ELISA Detektionsantikörperlösung	5 µl Detektionsantikörperansatz 995 µl Assay Diluent
ELISA Avidin-horseradish-peroxidase (HRP)-Lösung	1 µl Avidin HRP 999 µl Assay Diluent
Aluminium (40 mM)	1 ml endotoxinfreies Wasser 20 mg Aluminium 5 min durch Ultraschall homogenisieren
ATP (200 mM)	1 ml endotoxinfreies Wasser 110 mg ATP
Nigericin (2,68 mM)	2 ml Ethanol 10 mg Nigericin 3 ml steriles PBS
Zellkulturmedium (Vollmedium)	500 ml RPMI 10 % FBS 1 % Pen/Strep

**Tabelle 9** Medien und Pufferlösungen

## **2.2. Methodik**

### **2.2.1. Ethikvotum**

Alle Versuche fanden im Zuge der „Untersuchungen zur Rolle des Inflammasoms bei der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen“ statt. Die hierfür benötigte Genehmigung wurde am 20.08.2013, unter der Kennziffer 155/13, von der Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes erteilt.

### **2.2.2. Die Studiengruppe**

Untersucht wurden Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz, welche von September 2014 bis März 2016 in der Klinik für Innere Medizin IV des Universitätsklinikums des Saarlandes rekrutiert wurden. Die Einteilung der chronischen Niereninsuffizienz erfolgte anhand der CKD-EPI-Kreatinin-Formel in die Stadien G1-G5. Hierbei wurden die Stadien G1 und G2 („G1-2“), sowie G4 und G5 („G4-5“) jeweils zu einer Gruppe zusammengefasst. Weitere Gruppen bildeten Hämodialysepatienten („HD“) sowie Patienten nach Nierentransplantation („Transplant“). Als Referenzgruppe diente eine Gruppe gesunder Probanden, welche aus Mitarbeitern der Universitätsklinik rekrutiert wurde. Als Ausschlusskriterium galt für alle Gruppen das Vorliegen einer bösartigen Krebserkrankung, einer Schwangerschaft, oder einer akuten Entzündung mit Leukozyten über 10000 Zellen/ $\mu$ L. Für die Referenzgruppe galt des Weiteren das Vorliegen einer pAVK, eines Diabetes mellitus, einer manifesten koronaren Herzkrankheit (KHK), einer zerebrovaskulären Erkrankung, oder einer regelmäßigen Medikamenteneinnahme als Ausschlusskriterium. Bei jedem Patienten wurden eine Anamnese, eine körperliche Untersuchung, eine Urindiagnostik und eine venöse Blutentnahme durchgeführt. Das abgenommene Blut diente einerseits der Isolierung von Monozyten, als auch der Gewinnung klinisch-chemischer Labordaten. Hierzu zählten Kreatinin, Cystatin C, Harnsäure, Harnstoff, Kalium, Albumin, Leukozyten, CRP, Hämoglobin und der HbA1c. Neben der Berechnung der eGFR mittels der bereits beschriebenen Formel (*siehe Abschnitt 1.1.*), erfolgte die Bestimmung von Albumin und Kreatinin im Urin.

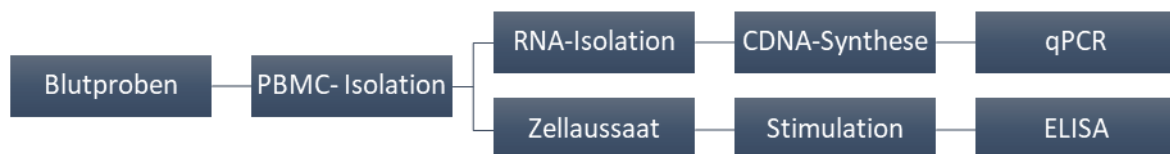
### **2.2.3. Probenentnahme**

Alle Probanden wurden vor der Blutentnahme entsprechend aufgeklärt und willigten in die Untersuchung ein. Die Probenentnahme erfolgte in der nephrologischen Ambulanz und der Dialysestation der Klinik für Innere Medizin IV an der Universität des Saarlandes. Entnommen

wurde venöses Blut aus der Ellenbeuge. Abgenommen wurden insgesamt 99ml venöses Blut in EDTA- und Serum-Monovetten, sowie Urin in einer Urin-Monovette.

#### 2.2.4. Methodischer Versuchsaufbau

Zur besseren Übersichtlichkeit wurde der Versuchsablauf in Abbildung 3 bildlich dargestellt. Die ersten zwei Schritte mit Entnahme der Blutproben und Isolation von Monozyten waren für alle Proben identisch. Ein Teil der Zellen wurde im Verlauf ausgesät und mit bekannten NLRP3-Aktivatoren stimuliert. Anschließend wurde mittels Enzym-linked Immunoabsorbend Assay (ELISA) die Konzentration von IL-1 $\beta$  im Überstand quantifiziert. Bei dem anderen Anteil der Zellen wurde die RNA isoliert und in cDNA umgewandelt. Anschließend wurde mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (qPCR) die relative Expression von NLRP3-Inflammasom-Bestandteilen und IL1 $\beta$  bestimmt.



**Abbildung 3 Methodischer Versuchsaufbau:** Die Blutproben stammen von Patienten mit CKD Grad 1-5, Hämodialysebehandlung, Z.n. Nierentransplantation sowie gesunden Probanden als Kontrollgruppe. Stimuliert wurde mit den NLRP3-Aktivatoren LPS, ATP, Nigericin und Alum.

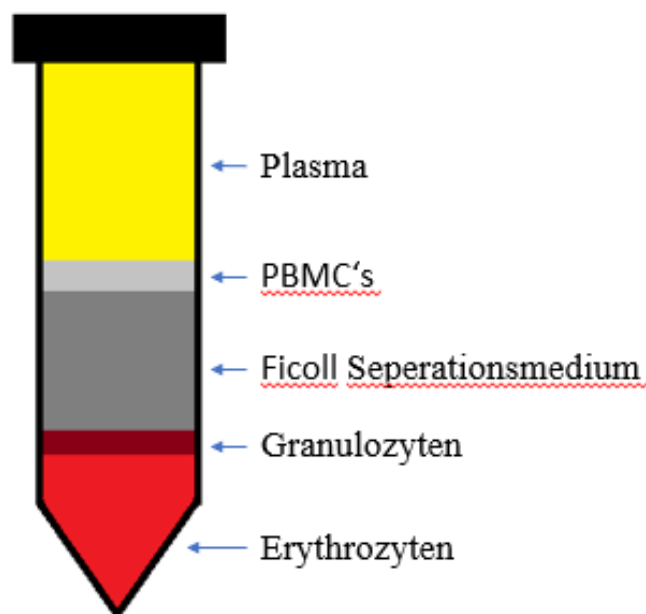
Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Versuche bei 20°C Raumtemperatur sowie unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

#### 2.2.5. Gewinnung humaner monozytärer Zellen (PBMC)

PBMC ist die Kurzform mononukleärer Zellen aus peripherem Blut (eng. peripheral blood mononuclear cells), welche in diesem Schritt durch Dichtegradientenzentrifugation mittels Ficoll isoliert wurden. Hierbei macht man sich die geringe Dichte der Monozyten, im Gegensatz zu anderen Blutbestandteilen, zu Nutze, um diese zu separieren.

Für die Isolation wurden pro Probanden 27 ml frisches Vollblut in einem EDTA-Röhrchen verwandt. Das Blut wurde frisch, unmittelbar nach Entnahme, verwandt. Das Verdünnungsmedium (PBS + 5ml 0,5 M EDTA) und das Separationsmedium (Ficoll) wurden auf RT erwärmt. In zwei 50 ml Falcon Röhrchen wurden je 9 ml Vollblut überführt und die

Blutröhrchen mit jeweils 9 ml PBS/EDTA ausgespült. Das beigefügte EDTA verhindert die Koagulation der Blutproben. Das Gemisch wurde zu dem Vollblut in ein 50 ml Falcon Röhrchen überführt. Zwei 50 ml Falcon Röhrchen wurden mit je 15 ml Separationsmedium befüllt und mit dem Blut/PBS/EDTA Gemisch überschichtet. Die Falcon Röhrchen wurden bei 400 G, bei RT, 30 Minuten lang zentrifugiert. Hierbei war es wichtig, dass ohne Bremse zentrifugiert wurde, da sich sonst, beim Abstoppen, die Schichten vermischt hätten. Die Dichte des Separationsmediums (1,077 g/ml) ermöglicht eine Trennung der Blutbestandteile gemäß ihrer spezifischen Dichte. Das Separationsmedium besitzt eine höhere Dichte als Monozyten sowie Lymphozyten und eine geringere als Erythrozyten und die meisten Granulozyten. Durch das Zentrifugieren bildeten sich folgende Schichten: Die oberste Schicht aus Blutplasma und PBS/EDTA, darunter eine milchige Schicht aus mononukleären Zellen, gefolgt von einer klaren Schicht aus Separationsmedium. In den untersten Schichten sammelten sich Granulozyten und Erythrozyten.



**Abbildung 4** Zellschichtung nach Zentrifugation

Die oberste Schicht aus Plasma und PBS/EDTA wurde mit einer Stabpipette vorsichtig abgenommen und verworfen. Die mononukleäre Zellschicht wurde unter Hin- und Herrühren mit einer 10 ml Spritze und einer 8-9 cm langen 20 G x 2 3/4“ Kanüle abgenommen und in ein neues 50 ml Falcon Röhrchen überführt. Das Falcon Röhrchen mit den mononukleären Zellen wurde mit PBS/EDTA auf 50 ml aufgefüllt und bei 400 G, bei 4 °C, mit Bremse, 10 min



zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde in 2,5 ml PBS resuspendiert, in ein 15 ml Falcon Röhrchen überführt und erneut mit PBS/ EDTA aufgefüllt. Bei 1200 Rounds per Minute (RPM) wurde das Falcon Röhrchen bei 4 °C, mit Bremse, 10 min zentrifugiert, um Thrombozyten und Zellbruchstücke zu entfernen. Es folgte ein zweiter Waschschrift, bei dem erneut der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 2 ml PBS resuspendiert wurde. Das 15 ml Falcon Röhrchen wurde dann mit PBS/ EDTA aufgefüllt und bei 300 G, bei 4 °C, mit Bremse, 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 2 ml PBS resuspendiert. Als nächster Schritt folgte eine 1:4 Lyse mit Ammoniumchlorid. Ammoniumchlorid dient der Lyse von, noch im Zellpellet vorhandener Erythrozyten. Zu der 2 ml PBS-Zell-Suspension wurde 6 ml Ammoniumchlorid zugegeben und dann für 10 min bei 4 °C inkubiert. Ein letztes Mal wurde bei 400 G, bei 4 °C, mit Bremse, 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet in 2 ml Medium (RPMI + 10 % FBS + 1% Pen/Strep) resuspendiert und mit Medium auf 10 ml aufgefüllt.

### **2.2.5.1. Bestimmung der Zellzahl**

Zur Bestimmung der Zellzahl der PBMCs im Zellkulturmedium wurde eine mikroskopische Zellzählung mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer vorgenommen. 10 µl der Zellsuspension wurden mit 90 µl Trypanblau (4 %) gemischt. 10 µl dieses Zell/Trypangemisches wurden in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert und anschließend unter einem Lichtmikroskop ausgezählt. Trypanblau färbt ausschließlich abgestorbene Zellen und totes Gewebe blau, lebende Zellen bleiben farblos. Die Quadranten einer Neubauer-Zählkammer sind 0,1 mm tief und 1 mm lang sowie breit. Hieraus errechnet sich das Volumen von 0,1 µl pro Quadranten. Gezählt wurden die lebenden Zellen in 4 großen Quadranten (64 Kleinquadranten), woraus sich folgende Formel für die Berechnung der Zellzahl pro ml Zellsuspension ergibt:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \left( \frac{\text{Zellzahl 4 Großquadranten}}{4} \right) \times \text{Verdünnungsfaktor Trypanblau} \\ \times 10.000 \times \text{Milliliter Zellsuspension}$$

Die Multiplikation mit dem Faktor 10.000 dient dem Ausgleich der vorherigen Verdünnung. Zur anschließenden Kultivierung und Stimulation der isolierten, mononukleären Zellen wurden diese in Zellkulturplatten ausgesät. Es wurden jeweils 200.000 Zellen auf 12 Wells einer 96-Lochplatte ausgesät. Hierzu wurden 3,2 Millionen Zellen mit 3,2 ml Nährmedium vermengt.

Pro Well wurden die Zellen in 0,2 ml Nährmedium inkubiert. Für die RNA-Lysate wurden anschließend 6 Millionen Zellen in RNase freie Eppendorf Röhren überführt.

### **2.2.6. Zellstimulation**

Im Anschluss wurden die ausgesäten Zellen für 1 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Während der Inkubation adhären die Monozyten am Boden der Wells. Eine Stunde nach Aussaat der Zellen wurde das Zellkulturmedium abpipettiert und frisches RPMI-Medium (RPMI-1640 GlutaMAX™) hinzugegeben. Der Mediumswechsel dient dazu, nicht adhärierende Zellen zu entfernen. Nachfolgend wurden die Zellen über Nacht, bei 37 °C und 5 % im RPMI-Medium inkubiert.

#### **2.2.6.1. Stimulation mit LPS**

Am Folgetag wurde das RBMI-Medium durch Opti-MEM Medium ersetzt. Es erfolgte zunächst eine Stimulation mit dem Lipopolysaccharid (LPS), einem Toll-like Rezeptor-Liganden. Hierzu wurden 5 µl LPS (10 ng/ml) in 200 µl H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> gegeben und mithilfe eines Schüttlers gut vermischt. Anschließend wurde ein Mastermix von LPS in Opti-MEM™ Medium hergestellt (1 µl LPS/ml). Pro Well der 96-Lochplatte wurden 5 µl der LPS/Opti-MEM™ Lösung hinzugegeben und die Platten anschließend für 3h bei 37 °C inkubiert. Abbildung 5 zeigt den genauen Aufbau der Zellkultur.

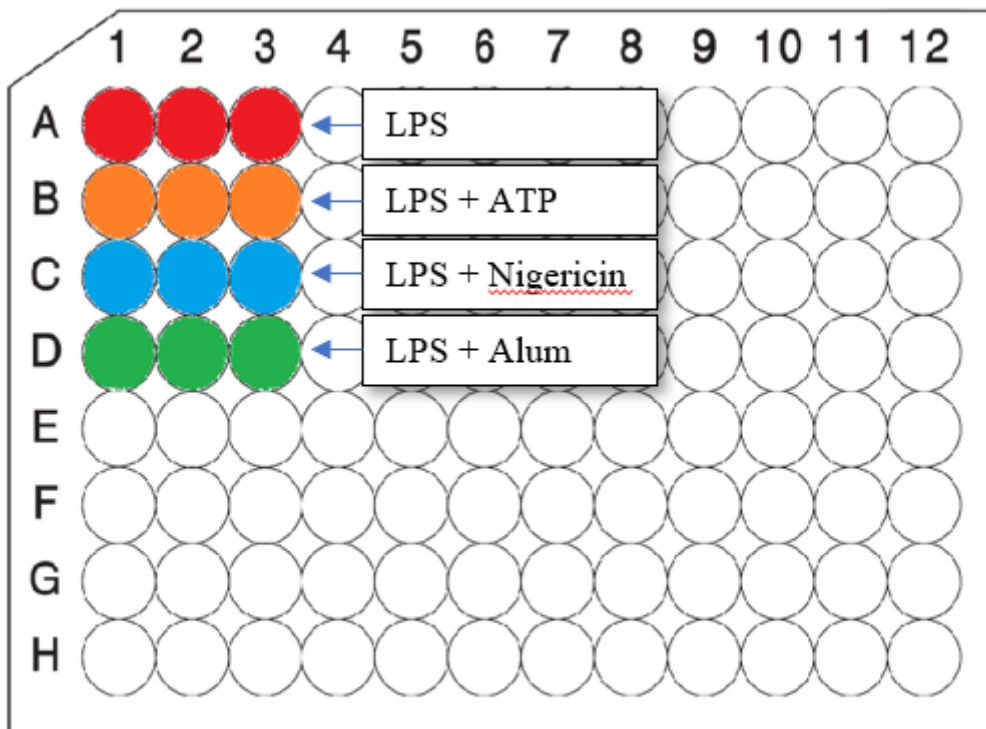


Abbildung 5 Versuchsaufbau Zellkultur: Neben jeder Reihe ist das entsprechende Stimulanz abgebildet.

### 2.2.6.2. Stimulation mit Alum, Nigericin und ATP

Nach 3 h wurden die Zellen aus dem Inkubator genommen und mit ATP (1 h), Nigericin (1 h) und Alum (3 h) stimuliert. Hierzu wurden die einzelnen Substanzen mit jeweils 200  $\mu$ l Medium angesetzt: 2  $\mu$ l ATP/ 200  $\mu$ l Medium (Endkonzentration 2 nM), 0,75  $\mu$ l Nigericin/ 200  $\mu$ l Medium (Endkonzentration 10  $\mu$ M) und 2  $\mu$ l Alum/ 200  $\mu$ l Medium (Endkonzentration 200  $\mu$ l/ml). Pro Well wurden jeweils 50  $\mu$ l der Substanz/ Medium-Gemische hinzugegeben. Für den genauen Aufbau siehe Abbildung 5.

Nach Ende der Stimulation wurden die 96-Lochplatten aus dem Inkubator genommen und mit 400 G, bei 4 °C, 10 min zentrifugiert. Anschließend wurden die Platten direkt auf Eis gelagert. Je 200  $\mu$ l der Überstände wurden vorsichtig abgenommen und, in auf Eis liegende, Eppendorf Rörchen überführt und für die spätere Verwendung zur IL-1 $\beta$  Messung mittels ELISA bei -80 °C eingefroren.

### 2.2.7. Enzym linked immunosorbent Assay (ELISA)

Beim Enzym linked immunosorbent Assay (ELISA) können mit Hilfe von Antikörpern, spezifische Proteine erkannt und quantifiziert werden.

Das in dieser Arbeit verwendete „Human IL-1 beta ELISA Kit“ (eBioscience) wurde den Herstellerangaben nach verwendet. Dazu wurde zunächst eine 96-Loch-Mikrotiterplatte mit jeweils 50 µl/Well IL-1β spezifischen „Capture-Antikörpern“ beschichtet und bei 4 °C über Nacht inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Mikrotiterplatte mit Waschpuffer (500 ml PBS + 25 ml 0,05 % Tween 20) folgte ein Blockierungsschritt, um unspezifische Bindungen zu verhindern. Hierzu wurde die Mikrotiterplatte über 1 h mit 100 µl/Well Assay Diluent (10 ml 5x Assay Diluent + 40 ml PBS) beschichtet. Um nicht gebundene Substrate zu entfernen, wurde erneut dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Nach Zugabe von 50 µl/Well des Überstandes der stimulierten PBMC (*siehe Abschnitt 2.2.6.2.*), sowie Zugabe der im Kit enthaltenen Standardreihe mit bekannten IL-1β Konzentrationen, wurde die Mikrotiterplatte für 2 h bei RT inkubiert. In dieser Zeit konnte IL-1β an die „Capture-Antikörper“ binden. Es folgte dreimaliges Waschen mit Waschpuffer. Als nächstes wurde der biotinylierte Sekundärantikörper hinzugegeben. Hierzu wurden 4 µl Sekundärantikörper mit 996 µl Assay Diluent angesetzt und jeweils 50 µl pro Well verwendet. Bei RT wurde die Mikrotiterplatte für 1 h inkubiert, in welcher der sekundäre Antikörper ebenfalls an das bereits gekoppelte IL-1β bindet. Nach viermaligem Waschen mit Waschpuffer erfolgte die Zugabe von 50 µl/Well Avidin-HRP-Lösung (HRP eng. horsredish peroxidase) für 40 min bei RT. Avidin-HRP bindet mit hoher Affinität an Biotin und erlaubt so den Nachweis von biotinylierten Antikörpern. Zur Entfernung von Überständen wurde die Mikrotiterplatte sechsmal mit Waschpuffer gewaschen. Um die Antikörper-Antigen-Komplexe quantifizierbar zu machen, erfolgte die Zugabe von 50 µl/Well H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-TMB Substratlösung (Tetramethylbenzidin) für 15 min in Dunkelheit bei RT. HRP reagiert mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, wodurch Protonen freigesetzt werden. Dies führt zu einer Oxidierung des farblosen TMB mit einem, daraus resultierenden, bläulichen Farbumschlag. Als letzter Schritt wurde Stopper-Lösung (1 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) hinzugeben, was zur Entstehung eines stabilen gelben Farbkomplexes führte. Die Lichtabsorption wurde bei 450 nm und 570 nm im Magellan Plate Reader gemessen. So konnte, im Vergleich zur Standard-Reihe, quantitativ die IL-1β Konzentration im Überstand bestimmt werden.

## **2.2.8. RNA-Isolation**

### **2.2.8.1. Stabilisierung von RNA Proben**

Die wie in 2.2.5.1 beschriebenen 6 Millionen, in Eppendorf Röhrchen überführten, Zellen wurden mit 4000 RPM, bei 4 °C, 10 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und verworfen. Das Zellpellet wurde in 300 µl TRI-Reagenz resuspendiert und bei -80 °C eingefroren.

### **2.2.8.2. RNA-Isolation aus stabilisierten Proben**

Zunächst wurde die isolierte RNA in cDNA transkribiert, welche abschließend in einer qPCR verwendet wurde. Die in TRI-Reagenz gelagerten Proben wurden aufgetaut und 5 min bei RT inkubiert. Im Verhältnis 1/5 (Chloroform/Trizol) wurde, unter Auf- und Abpipettieren, Chloroform zu den Proben in die Eppendorf Röhrchen hinzugegeben (60 µl Chloroform/ 300 µg Trizol). Anschließend wurden die Proben 15 s auf einem Schüttler gemischt. Chloroform führt zu einer Trennung des Homogenats. Hierbei geht RNA in die wässrige Phase, DNA in die Zwischenphase und Proteine in die organische Phase über. Die Proben wurden bei RT, 7 min, inkubiert, danach folgten 15 min Zentrifugation bei 4 °C und 11200 RPM. Die obere, wässrige Phase, welche die RNA beinhaltet, wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Eppendorf Röhrchen überführt. Der Rest wurde verworfen. Zur RNA-Präzipitation (RNA-Fällung aus der wässrigen Phase) wurde im Verhältnis 1/2 Isopropanol hinzugegeben (150 µl Isopropanol/ 300 µl Trizol). Durch Invertieren wurde die Probe gemischt und anschließend 5 min bei RT inkubiert. Nach 10 min Zentrifugation, bei 4 °C und 11200 RPM, wurde der Isopropanol-Überstand dekantiert. Die Probe wurde im Verhältnis 1/1 mit 75 %igem Ethanol gewaschen (300 µl Ethanol/ 300 µl Trizol). Durch Invertieren wurde die Probe gemischt. Es folgten 5 min Zentrifugation, bei 4 °C und 11200 RPM. Anschließend wurde das Ethanol direkt mittels Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Nach Zugabe von 30 µl DEPC-Wasser, wurden die Proben bei 55 °C, 10 min auf dem Schüttler inkubiert und anschließend herunterzentrifugiert. Es erfolgte dann die Bestimmung der RNA-Konzentration.

### **2.2.8.3. Messung RNA-Konzentration**

Die Messung der RNA-Konzentration erfolgte mittels NanoDrop Mikrovolumen Quantifizierung von Nukleinsäuren (Verhältnis A260/ A280 > 1,7 → Messung der Reinheit der RNA, optimales Verhältnis 1,7 - 2,0). 1,8 µl der in Abschnitt 2.2.8.2 gewonnen RNA wurden zur Messung der RNA-Konzentration eingesetzt.

### 2.2.9. cDNA-Synthese

Für die qPCR-Analyse muss die zu untersuchende RNA zunächst in die komplementäre cDNA (copy-DNA) umgeschrieben werden. Die cDNA wird mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase aus RNA synthetisiert. In dieser Arbeit erfolgte die cDNA-Synthese mit Hilfe des „DyNAmo cDNA Synthesis Kit for qRT-PCR“ von Thermo Scientific. Zum sterilen Pipettieren wurden Pipettenspitzen mit Filter benutzt. Zunächst wurde die isolierte RNA mit Nuklease-freiem H<sub>2</sub>O verdünnt. Es wurden 1 µg RNA in 7 µl Nuklease-freiem H<sub>2</sub>O gelöst. Um die Sekundärstrukturen zu denaturieren, wurden die RNA Proben 5 min bei 65 °C inkubiert und anschließend 2 min auf Eis gestellt. Im nächsten Schritt wurde der cDNA Mastermix durch Mischen von 2 x RT Puffer, Primer und Reverse Transkriptase angesetzt und die verdünnte RNA Vorlage hinzugegeben (*siehe Tabelle 10*).

Komponenten	1x
Nuklease-freies H <sub>2</sub> O	/
RT Buffer (2x)	10 µl
Random Hexamer Prime Set	1 µl
M-MuLV RNase H <sup>+</sup> Reverse Transkriptase	2 µl
	<b>13 µl</b>
Verdünnte RNA für cDNA/ H <sub>2</sub> O für cDNA-	7 µl
Ansatz	<b>20 µl</b>

**Tabelle 10** Reaktionsansatz cDNA-Synthese

Die Proben wurden in den programmierten Heizblock gestellt und das Programm gestartet (*siehe Tabelle 11*). Anschließend wurden die Proben bis zur qPCR auf Eis gelagert oder bei -20 °C eingefroren.

Schritt	Ziel	Temperatur	Zeit [min]
1.	Primer Extension	25 °C	10
2.	cDNA-Synthese	37 °C	30
3.	Termination	85 °C	5

**Tabelle 11** Inkubationsprotokoll cDNA-Synthese

### 2.2.10. qPCR

Die qPCR wurde unter Verwendung des „SYBR Green Maxima Kits“ (# K0252) von Thermo Scientific durchgeführt. Verwandt wurde jeweils 1 µl der cDNA (siehe Abschnitt 2.2.9.). Der Mastermix wurde durch Mischen von Nuklease-freiem H<sub>2</sub>O, Vorwärts- und Rückwärtsprimer und SYBR Green PCR Master Mix hergestellt und auf die Stripes aufgeteilt (je 24 µl). An einem gesonderten Arbeitsplatz wurde die cDNA hinzu pipettiert (siehe Tabelle 12).

Komponenten	1x
Nuklease-freies H <sub>2</sub> O	9,5 µl
Vorwärtsprimer	1 µl
Rückwärtsprimer	1 µl
SYBR Green PCR Master Mix	12,5 µl
	<b>24 µl</b>
cDNA+/ cDNA-/ H <sub>2</sub> O	1 µl
Ansatz	<b>25 µl</b>

Tabelle 12 qPCR Mastermix

Die Lösung wurde kurz zentrifugiert, wobei wichtig war, dass sich keine Luftblasen im Eppendorf Röhrchen bildeten. Danach wurden die Streifen in den programmierten Thermocycler gestellt und das entsprechende Programm gestartet (siehe Tabelle 13). Zunächst wird die cDNA durch Erhitzen denaturiert. Bei geringerer Temperatur erfolgt als nächster Schritt die Anlagerung eines Oligonukleotid-Paares an die denaturierte cDNA. Zuletzt wird der neue DNA-Strang durch den Einbau von Desoxynukleotiden synthetisiert.

Schritt	Ziel	Temperatur	Zeit	Anzahl Zyklen
1.	Hot start	95 °C	10 Min	1
2.	Denaturierung	95 °C	15 Sek	40
3.	Annealing	60 °C	30 Sek	40
4.	Elongation	72 °C	30 Sek	40
5.	Schmelzkurve			
6.	Abkühlen			

Tabelle 13 Ablaufprotokoll qPCR

Die Quantifizierung der mRNA des zu untersuchenden Gens erfolgte unter Einbeziehung des Referenzgens Hprt1 zur relativen Quantifizierung. Hprt1 ist ein „Housekeeping“ Gen, das in Monozyten basal exprimiert wird und dient als Referenz um die Expression, in Relation zu diesem Protein, beurteilen zu können.

### **2.2.11. Amplifikationskurve, Schmelzkurve und C<sub>T</sub>-Wert**

Nach Beendigung des Programms wurden die Amplifikationskurve, die Schmelzkurve sowie der C<sub>T</sub>-Wert ausgewertet. In der Amplifikationskurve wird die Messung der Amplifikatzunahme während jedes einzelnen Zyklus dargestellt. Die Schmelzkurvenanalyse wird durchgeführt, um sicherzustellen, dass lediglich ein Amplifikat entstanden ist. Jede dsDNA hat eine spezifische Schmelztemperatur, die definiert ist als diejenige Temperatur, bei der 50 % der dsDNA einzelsträngig vorliegt. Die Schmelzkurve wird erstellt, indem nach Beendigung der qPCR die DNA langsam erhitzt wird, wodurch Amplifikate und Heteroduplices „schmelzen“. Die Änderung der Fluoreszenz, die aus der Trennung der Moleküle resultiert, wird gemessen. Der C<sub>T</sub>-Wert ist ein Maß für die Quantität der vorliegenden DNA. Je mehr DNA in der Probe vorliegt, desto größer ist der C<sub>T</sub>-Wert. Er bezeichnet den PCR-Zyklus, bei dem das qPCR-Fluoreszenzsignal erstmals einen benutzer- oder programmfestgelegten Schwellenwert überschreitet.

### **2.2.12. Statistik**

Zur statistischen Analyse der Daten wurde das Programm „IBM SPSS Statistics 24“ verwendet. Die graphische Darstellung erfolgte mittels „GraphPad PRISM“. Kontinuierliche Variablen der Patientencharakteristika wurden als Mittelwert mit Standardabweichung angegeben, kategoriale Variablen als prozentuale Verteilung innerhalb der Gruppe. Stimulation und Zytokinbestimmung wurden stets in Duplikaten durchgeführt. Messwerte der qPCR sowie ELISA wurden als Dot Plots dargestellt. Der horizontale Strich gibt den arithmetischen Mittelwert, die Whiskers die Standardabweichung (standard error of mean, SEM) an. Gruppen wurden mithilfe des Kruskal Wallis Test mit anschließendem Dunns Multiple Comparison Test verglichen. Ein p-Wert von <0,05 wurde als statistisch signifikant gewertet.



## 3. Ergebnisse

### 3.1. Charakterisierung der Studiengruppe

#### 3.1.1. Rekrutierung

Insgesamt nahmen in der Zeit vom 10.04.2014 bis 29.04.2016, 245 Probanden an der Studie teil. Dies[e] wurden, wie bereits in der Methodik Abschnitt 2.2.2. beschrieben, in sechs verschiedene Gruppen unterteilt. Insgesamt wurden 102 Probanden aus der Studie ausgeschlossen, da am Tag der Blutentnahme keine Monozytenisolation durchgeführt werden konnte. An diesen Tagen wurden lediglich Serumproben für zukünftige Studien asserviert. In der gesunden Kontrollgruppe wurden 2 Patienten ausgeschlossen, da ein Diabetes mellitus oder ein arterieller Bluthochdruck vorlag.



Abbildung 6 Rekrutierungsschema.

#### 3.1.2. Demographische Ausgangsdaten und Patientencharakteristika

Um die einzelnen Gruppen besser untereinander vergleichen zu können, wurden zum Zeitpunkt der Blutentnahme, demographische Daten (Alter, Geschlecht), sowie Daten zu den Patientencharakteristika (Größe, Gewicht, BMI, Blutdruck, Herzfrequenz) erhoben.

Das Durchschnittsalter der Probanden lag bei  $61,7 \pm 15,3$  Jahren. Insgesamt konnte eine Korrelation zwischen Probandenalter und Grad der Niereninsuffizienz festgestellt werden. So

lag das Durchschnittsalter in den Gruppen G4-5, HD und Transplant über dem der Gruppen G1-2 und der Gesunden Kontrollgruppe. Das Alter der Gesunden Kontrollgruppe lag mit  $49,2 \pm 12,9$  Jahren ca. 10 Jahre unterhalb dem der restlichen Gruppen. 43 % der Studienteilnehmer waren weiblich, 57 % männlich. Insgesamt überwogen in allen Gruppen, außer bei den Gesunden, die männlichen Probanden.

Der BMI der Gruppen G1-2 und G3 lag über dem der gesunden Kontrollgruppe und Patienten in der Gruppe G4-5, während sich in den Gruppen HD und Transplant ein niedrigerer BMI zeigte. Beim Blutdruck fielen erhebliche Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen auf. Bei Patienten bis Stadium G4-5 lagen deutlich höhere Durchschnittswerte als in den restlichen Gruppen vor. Der höchste systolische Wert bestand mit  $150 \pm 26$  mmHg in der Gruppe G4-5, der niedrigste mit  $134 \pm 21$  mmHg in der gesunden Kontrollgruppe. Die Gruppen HD und Transplant wiesen deutlich niedrigere Werte auf als alle anderen Gruppen und lagen nur knapp über dem der Gesunden. Bei einer durchschnittlichen Herzfrequenz von  $71 \pm 12$  / min zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen.

Tabelle 14 zeigt einen Überblick, der zu Demographie und Patientencharakteristika erhobenen Daten.

	<b>CKD G1-2 (n=15)</b>	<b>CKD G3 (n=28)</b>	<b>CKD G4-5 (n=20)</b>	<b>HD (n=25)</b>	<b>Transplant (n=16)</b>	<b>Gesund (n=38)</b>	<b>Gesamt (n=142)</b>
<b>Alter (Jahre)</b>	59,7 ± 15,2	68,0 ± 11,8	71,5 ± 9,6	69,7 ± 11,0	52,1 ± 14,9	49,2 ± 12,9	61,7 ± 15,3
<b>Geschlecht (% weiblich)</b>	20	43	25	40	31	74	43
<b>Gewicht (kg)</b>	94,8 ± 20,8	88,5 ± 19,7	81,9 ± 15,8	78,9 ± 18,3	77,7 ± 20,8	79,3 ± 15,0	83,5 ± 18,4
<b>Größe (cm)</b>	173,0 ± 7,9	168,0 ± 8,6	168,5 ± 7,9	169,7 ± 8,5	167,5 ± 10,8	163,7 ± 9,8	168,4 ± 8,9
<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>	31,7	31,4	29,0	27,6	27,9	29,0	29,6
<b>RRsyst (mmHg)</b>	148 ± 23	143 ± 21	150 ± 26	137 ± 22	136 ± 20	134 ± 21	141 ± 23
<b>RRdiast (mmHg)</b>	83 ± 12	81 ± 9	81 ± 12	67 ± 14	82 ± 15	76,2 ± 14,3	78 ± 14
<b>Herzfrequenz (1/min)</b>	71 ± 14	67 ± 12	79 ± 12	71 ± 11	66 ± 11	70 ± 9	71 ± 12

**Tabelle 14 Demographische Daten und Patientencharakteristika der Studiengruppen:** Dargestellt sind Mittelwert ± Standardabweichung bzw. der prozentuale Anteil der jeweiligen Gruppe (%).

### 3.1.3. Grunderkrankungen

Zur genaueren Beurteilung der Studiengruppen ist es von Bedeutung, welche Erkrankung der chronischen Niereninsuffizienz zugrunde liegt. Hierzu erfolgte die Einteilung in vier Untergruppen: diabetische Nephropathie, vaskuläre Nephropathie, Glomerulonephritiden und Sonstige. In die Kategorie Sonstige wurden alle Grunderkrankungen zusammengefasst, welche keiner der drei anderen Kategorien zugeordnet werden konnten. Beispiele hierfür sind Nierenschädigung im Rahmen einer akuten Niereninsuffizienz, Schrumpfnieren unklarer Genese, polyzystische Nierenerkrankungen oder Nephrolithiasis. In Tabelle 15 ist die Verteilung der Grunderkrankung in den einzelnen Studiengruppen dargestellt.

	<b>CKD G1-2 (n=15)</b>	<b>CKD G3 (n=28)</b>	<b>CKD G4-5 (n=20)</b>	<b>HD (n=25)</b>	<b>Transplant (n=16)</b>	<b>Gesund (n=38)</b>
<b>Vaskuläre Nephropathie (%)</b>	40	50	50	40	12	0
<b>Diabetische Nephropathie (%)</b>	0	14	5	28	12	0
<b>Glomerulonephritiden (%)</b>	20	21	35	20	31	0
<b>Sonstige (%)</b>	40	32	15	52	50	0

**Tabelle 15** Zugrundeliegende Grunderkrankungen der chronischen Niereninsuffizienz in den einzelnen Studiengruppen: Dargestellt ist der prozentuale Anteil der jeweiligen Gruppe (%).

Die am häufigsten vorliegende Grunderkrankung war mit 30 % die vaskuläre Nephropathie. Dies spiegelt, wie bereits in Abschnitt 1.2. beschrieben, die typische Verteilung der Ursachen der chronischen Niereninsuffizienz in den Industrienationen wider. Gefolgt wurde die vaskuläre Nephropathie von sonstigen Erkrankungen mit insgesamt 27 %. Die diabetische Nephropathie war in fast allen Gruppen nur in geringem Anteil vertreten.

### **3.1.4. Komorbiditäten und kardiovaskuläre Risikofaktoren**

Neben den Grunderkrankungen wurden ebenfalls die Komorbiditäten sowie kardiovaskulären Risikofaktoren der Patienten erfasst. Bei den Probanden mit chronischer Niereninsuffizienz zeigte sich als häufigste Begleiterkrankung die koronare Herzkrankheit (KHK). In der Gruppe der Hämodialysepatienten lag diese bei 28 % vor. Ebenfalls zeigte sich häufig eine periphere arterielle Verschlusskrankheit. Insgesamt bei 7 % der Probanden. Tabelle 16 zeigt die Komorbiditäten in den einzelnen Studiengruppen.

	<b>CKD G1-2 (n=15)</b>	<b>CKD G3 (n=28)</b>	<b>CKD G4-5 (n=20)</b>	<b>HD (n=25)</b>	<b>Transplant (n=16)</b>	<b>Gesund (n=38)</b>
<b>KHK (%)</b>	13	14	20	28	6	0
<b>ACVB- OP (%)</b>	7	4	5	4	6	0
<b>Myokardinfarkt (%)</b>	13	4	10	8	6	0
<b>Schlaganfall (%)</b>	7	7	0	4	0	0
<b>pAVK (%)</b>	7	11	5	20	0	0

**Tabelle 16 Komorbiditäten in den Studiengruppen:** Dargestellt ist der prozentuale Anteil der jeweiligen Gruppe (%).

Neben den häufigsten Komorbiditäten wurden ebenfalls Risikofaktoren der chronischen Niereninsuffizienz erfasst. Hierzu zählten die arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, aktiver Nikotinabusus und Zustand nach Nikotinabusus. Der am häufigsten vorliegende Risikofaktor war mit insgesamt 58 % die arterielle Hypertonie. In der Gruppe der Gesunden lag definitionsgemäß keine arterielle Hypertonie oder Diabetes mellitus vor. 16 % der Gesunden waren aktive Raucher, 39 % ehemalige Raucher. In den anderen Gruppen überwogen mit Anteilen zwischen 60 % in der Gruppe G1-2 und 39 % in G3 ehemalige Raucher. Ein Diabetes mellitus lag insgesamt bei 32 % der Probanden vor.

	<b>CKD G1-2 (n=15)</b>	<b>CKD G3 (n=28)</b>	<b>CKD G4-5 (n=20)</b>	<b>HD (n=25)</b>	<b>Transplant (n=16)</b>	<b>Gesund (n=38)</b>
<b>Arterielle Hypertonie (%)</b>	87	82	75	80	69	0
<b>Diabetes Mellitus (%)</b>	27	46	40	56	38	0
<b>Nikotinabusus (%)</b>	7	11	10	12	0	39
<b>Z.n. Nikotinabusus (%)</b>	60	39	55	44	25	16

**Tabelle 17 Kardiovaskuläre Risikofaktoren in den Studiengruppen:** Dargestellt ist der prozentuale Anteil der jeweiligen Gruppe (%).

### 3.1.5. Parameter der Nierenfunktion

Zur Einschätzung der Nierenfunktion erfolgte die Berechnung der eGFR anhand der CKD-EPI Formeln nach KDIGO. Hierzu wurden die Kreatinin- und Cystatin C Werte im Serum erfasst. In der gesunden Kontrollgruppe lag die durchschnittliche eGFR mit  $96 \pm 17$  ml/min/1,73m<sup>2</sup> KÖF im Normbereich. Mit zunehmendem Stadium der chronischen Niereninsuffizienz zeigte sich, wie erwartet, eine Abnahme der eGFR. Zur weiteren Einschätzung der chronischen Niereninsuffizienz erfolgte die Bestimmung von Albumin im Urin. Mit zunehmendem Stadium der Nierenfunktion zeigte sich eine vermehrte Albuminausscheidung im Urin. In der Gruppe der Hämodialysepatienten war, bei zumeist fehlender Restdiurese, eine Erfassung der Urinparameter nicht sinnvoll. Beim Harnstoff, als direkt durch die Nierenfunktion beeinflusster Parameter, zeigte sich in allen Stadien der chronischen Niereninsuffizienz eine deutliche Zunahme im Gegensatz zu Werten bei gesunden Probanden.

	<b>CKD G1-2 (n=15)</b>	<b>CKD G3 (n=28)</b>	<b>CKD G4-5 (n=20)</b>	<b>HD (n=25)</b>	<b>Transplant (n=16)</b>	<b>Gesund (n=38)</b>
<b>Kreatinin im Serum (mg/dl)</b>	1,0 ± 0,3	3,5 ± 1,0	2,8 ± 1,2	7,8 ± 2,9	1,5 ± 0,4	0,8 ± 0,2
<b>Cystatin C im Serum (mg/l)</b>	1,0 ± 0,2	1,7	2,8	4,1 ± 3,7	1,6 ± 0,5	0,9 ± 0,2
<b>Harnstoff im Serum (mg/dl)</b>	34 ± 12	57 ± 21	114 ± 32	119 ± 33	61 ± 24	27 ± 9
<b>Albumin im Urin (mg/l)</b>	25,3	31,6	43,3	/	19,7	/
<b>eGFR CKD-EPI Kreatinin (ml/min/1,73m<sup>2</sup> KÖF)</b>	73 ± 19	44 ± 10	24 ± 13	5	53 ± 22	96 ± 17
<b>eGFR CKD-EPI Cystatin C (ml/min/1,73m<sup>2</sup> KÖF)</b>	74 ± 24	39 ± 10	17 ± 4	26	44 ± 16	96 ± 20
<b>eGFR CKD-EPI Kreatinin/CystatinC (ml/min/1,73m<sup>2</sup> KÖF)</b>	71 ± 8	40 ± 9	20 ± 5	25	46 ± 16	96 ± 19

**Tabelle 18 Nierenparameter der Studiengruppen:** Dargestellt sind Mittelwert ± Standardabweichung. Bei nicht normal verteilten Variablen erfolgte die Berechnung des IQR (Interquartal Range, Median)

### 3.1.6. Weitere Laborparameter

Neben den, in Abschnitt 3.1.5. beschrieben, nierenspezifischen Laborparametern wurden weitere wichtige laborchemische Parameter erfasst. Hierzu zählten, unter anderem, die zwei Entzündungsmarker C-reaktives Protein (CRP) und die Leukozyten. Beim CRP zeigte sich eine positive Korrelation zwischen Grad der Niereninsuffizienz und CRP Wert. So lag der Wert in der Gruppe G1-2 bei 2 mg/l und bei Hämodialysepatienten bei 7 mg/l. Der Hämoglobin-Wert war bei den Gesunden sowie Patienten mit niedrigen CKD-Stadien am höchsten, jeweils bei 14,5 mg/dl. Bis hin zur Hämodialyse-Gruppe zeigte sich ein leicht abfallender Trend der Hämoglobinwerte. Neben den kardiovaskulären Risikofaktoren wurden ebenfalls die Blutfette Gesamtcholesterin, LDL-Cholesterin (LDL-C), HDL-Cholesterin (HDL-C) und die Triglyceride erfasst. Beim Gesamtcholesterin und dem LDL-C zeigten sich die höchsten Werte in der gesunden Kontrollgruppe. Generell zeigten sich bei allen Blutfetten jedoch nur geringe

Schwankungen zwischen den einzelnen Probandengruppen. Bei Diabetes mellitus als häufiger Komorbidität und CKD-Risikofaktor wurde, zur Erfassung der Blutzuckereinstellung, der HbA1c als Langzeitzuckerwert bestimmt. Hier zeigten sich, im Vergleich mit der gesunden Kontrollgruppe, alle weiteren Gruppen mit höheren Werten. Tabelle 19 zeigt einen Überblick über die Laborparameter in den verschieben Studiengruppen.

	<b>CKD G1-2 (n=15)</b>	<b>CKD G3 (n=28)</b>	<b>CKD G4-5 (n=20)</b>	<b>HD (n=25)</b>	<b>Transplant (n=16)</b>	<b>Gesund (n=38)</b>
<b>Kalium (mmol/l)</b>	4,4 ± 0,3	4,6 ± 0,6	4,8 ± 0,6	4,8 ± 0,7	4,4 ± 0,6	4,2 ± 0,4
<b>CRP (mg/l)</b>	3	2	7	7	2	1
<b>Leukozyten (10<sup>3</sup>/µl)</b>	7,4 ± 1,5	7,7 ± 2,4	7,5 ± 2	7,5 ± 3,3	9 ± 4,4	7,3 ± 2,3
<b>Hämoglobin (mg/dl)</b>	14,5 ± 1,4	13,4 ± 1,5	12 ± 1,2	11,2 ± 1,6	12,1 ± 3,7	14,5 ± 1,2
<b>Gesamcholesterin (mg/dl)</b>	181 ± 50	176 ± 28	175 ± 45	176 ± 45	189 ± 45	208 ± 43
<b>HDL- Cholesterin (mg/dl)</b>	52 ± 15	53 ± 16	47 ± 12	43	68 ± 27	59 ± 18
<b>LDL- Cholesterin (mg/dl)</b>	102 ± 48	98 ± 23	102 ± 40	104 ± 37	98 ± 29	124 ± 37
<b>Triglyceride (mg/dl)</b>	177 ± 88	141	163 ± 70	108	151 ± 67	114
<b>HbA1c (%)</b>	5,8 ± 0,6	6,1 ± 0,9	5,9 ± 0,6	6,3 ± 1,3	6,3 ± 1	5,3 ± 0,3

**Tabelle 19 Weitere Laborparameter der Studiengruppen:** Dargestellt sind Mittelwert ± Standardabweichung, Bei nicht normal verteilten Variablen erfolgte die Berechnung des IQR (Interquartal Range, Median).

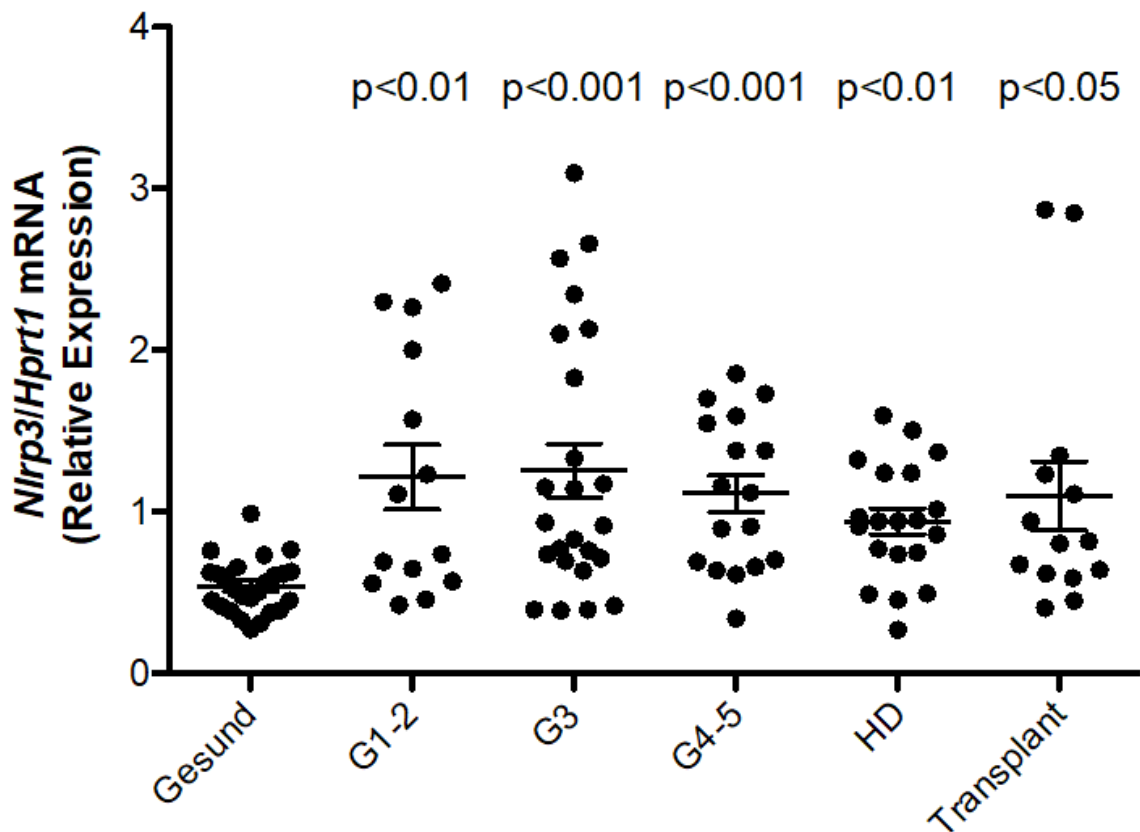
### 3.2. Expression von Inflammasom-Komponenten

Um zu bestimmen, ob in Monozyten von Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz die Inflammasom-Komponenten NLRP3, ASC und IL-1β stärker exprimiert werden, wurde die mRNA-Expression dieser Inflammasom-Komponenten untersucht. Hierzu wurden Monozyten



von Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz isoliert und die relative Genexpression der Gene NLRP3, ASC und IL1B mittels RT-qPCR (quantitativer Polymerasekettenreaktion) quantifiziert.

### 3.2.1. Expression von NLRP3

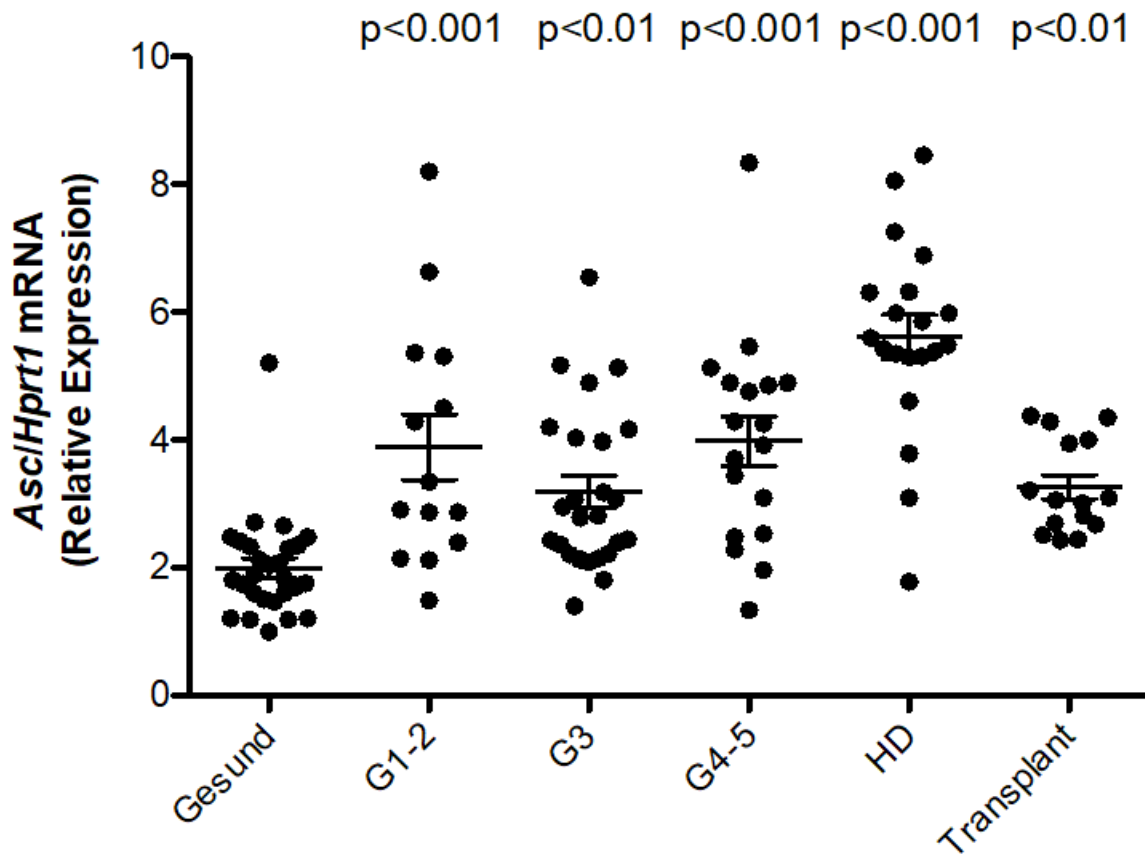


**Abbildung 7 NLRP3-Genexpression in humanen Monozyten von Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz im Vergleich zu Gesunden:** Die RNA wurde isoliert und die Genexpression mittels RT-qPCR quantifiziert. HPRT1 fungiert als Referenzgen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte und Standardfehler (engl. standard error of the mean, SEM). Jeder Punkt stellt eine Patientenprobe dar.

Wie in Abbildung 7 dargestellt, zeigte sich bereits in Monozyten von Patienten mit nur leichtgradig eingeschränkter Nierenfunktion (CKD G1-2) eine signifikant höhere NLRP3-mRNA Expression im Vergleich zu den gesunden Probanden. Diese persistierte auch bei schwerer eingeschränkter Nierenfunktion und war bei Patienten in allen Krankheitsstadien nachweisbar.

### 3.2.2. Expression von ASC

ASC stellt einen weiteren essenziellen Bestandteil des NLRP3-Inflammasoms dar. Abbildung 8 zeigt die mRNA-Expression von ASC in Monozyten der verschiedenen Patientengruppen und gesunden Probanden.

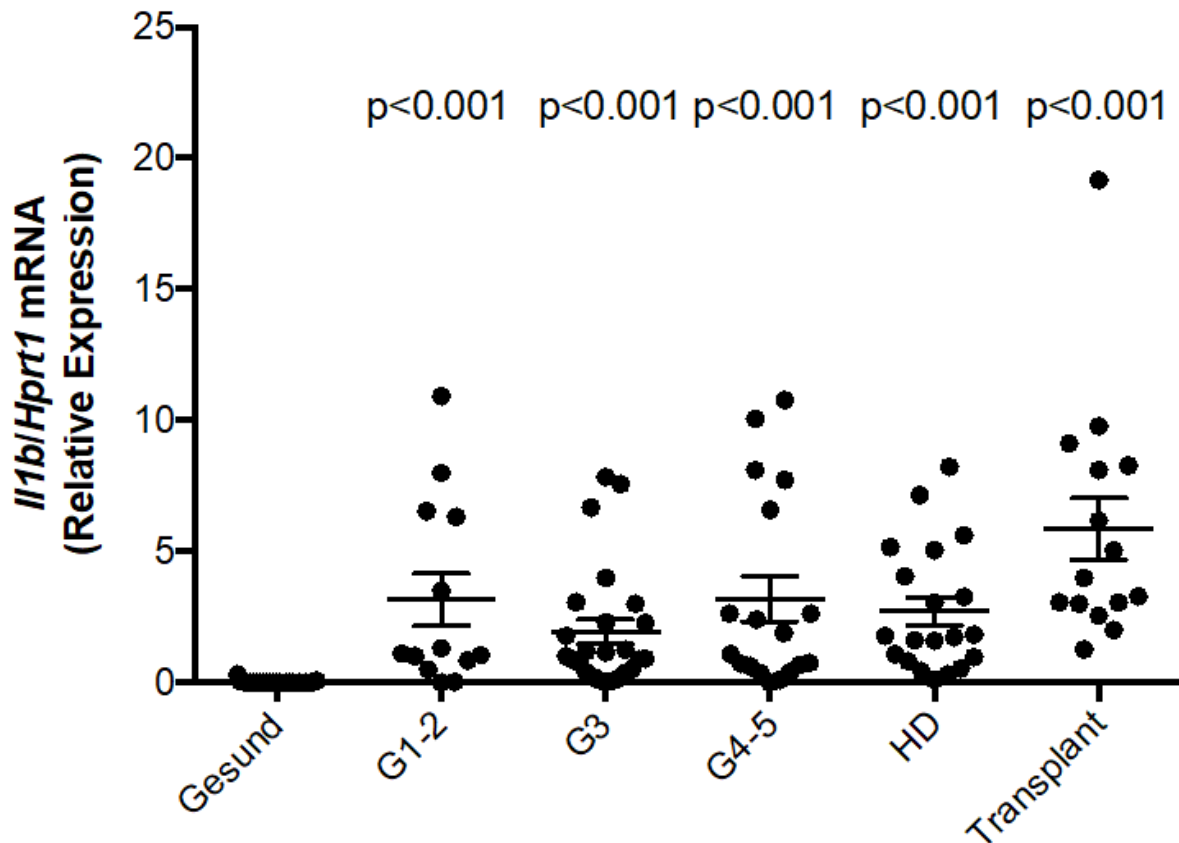


**Abbildung 8 ASC-Genexpression in humanen Monozyten von Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz im Vergleich zu Gesunden:** Die RNA wurde isoliert und die Genexpression mittels RT-qPCR quantifiziert. HPRT1 fungiert als Referenzgen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte und Standardfehler (engl. standard error of the mean, SEM). Jeder Punkt stellt eine Patientenprobe dar.

Wie bei NLRP3 lässt sich auch für ASC in allen Patientengruppen eine signifikant höhere mRNA-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe nachweisen. Diese war bereits in der Gruppe CKD G1-2 signifikant höher als im Vergleich zu gesunden Probanden. Die höchste Expression ließ sich in Monozyten von Hämodialysepatienten nachweisen.

### 3.2.3. Expression von IL1B

IL-1 $\beta$  ist das Schlüssel-Effektorzytokin des NLRP3-Inflammasoms. Aus diesem Grund wurde auch die mRNA-Expression von IL1B quantifiziert. Abbildung 9 zeigt die mRNA Expression von IL1B.



**Abbildung 9 IL1B-Genexpression in humanen Monozyten von Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz im Vergleich zu Gesunden:** Die RNA wurde isoliert und die Genexpression mittels RT-qPCR quantifiziert. HPRT1 fungiert als Referenzgen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte und Standardfehler (engl. standard error of the mean, SEM). Jeder Punkt stellt eine Patientenprobe dar.

In allen Patientengruppen zeigt sich im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe eine signifikant erhöhte IL1B-mRNA-Expression. Die stärkste Expression zeigt sich in Monozyten von Patienten nach Nierentransplantation.

### 3.3. Sekretion von IL-1 $\beta$

Neben der Bestimmung der relativen Genexpression von NLRP3-Inflammasombestandteilen und IL1B in Monozyten von Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz war es Ziel dieser Arbeit, die Sekretion von IL-1 $\beta$  nach Stimulation mit den bekannten NLRP3-Aktivatoren LPS, ATP, Nigericin und Alum zu untersuchen. In dieser Arbeit wurde die Konzentration von IL-1 $\beta$  im Zellkulturüberstand der entsprechend stimulierten Monozyten quantifiziert.

#### 3.3.1. Stimulation mit LPS

Im ersten Teil des Experimentes wurden die Monozyten mit LPS allein stimuliert. Dies diente zur Untersuchung der basalen Sekretion von IL-1 $\beta$  ohne weitere Stimuli.

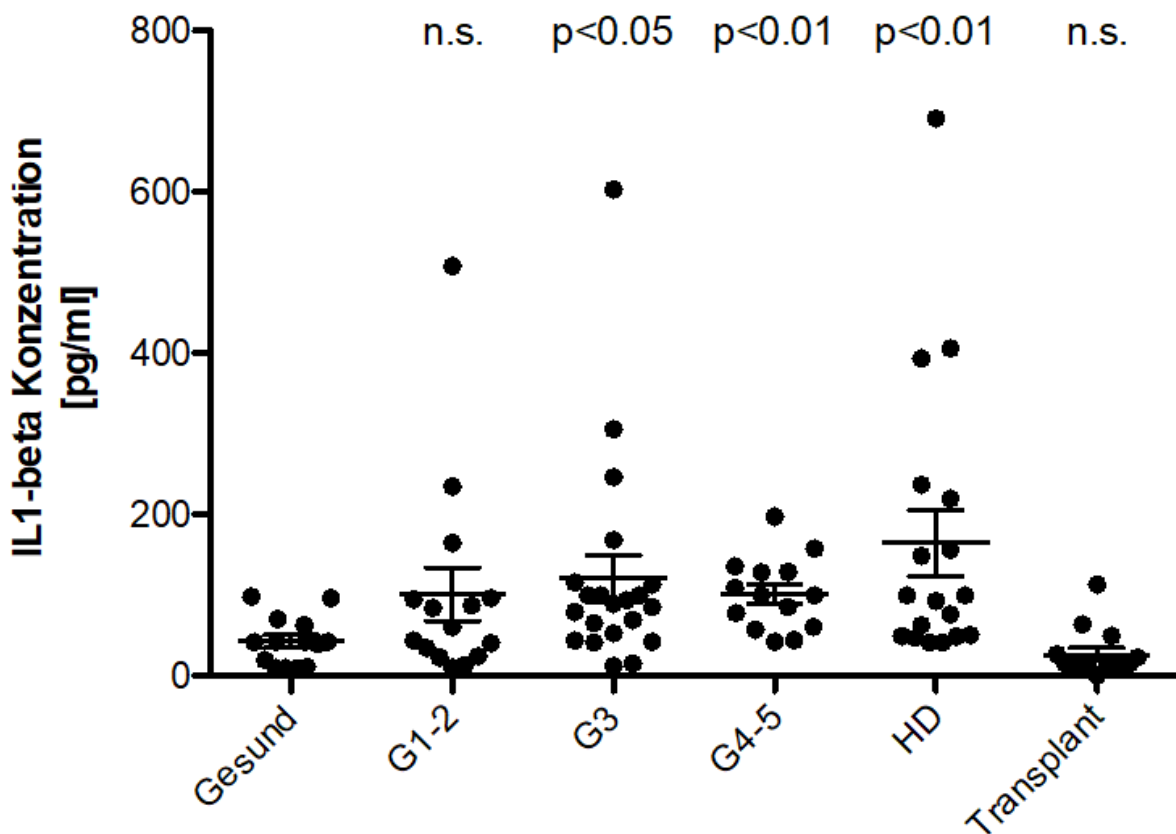
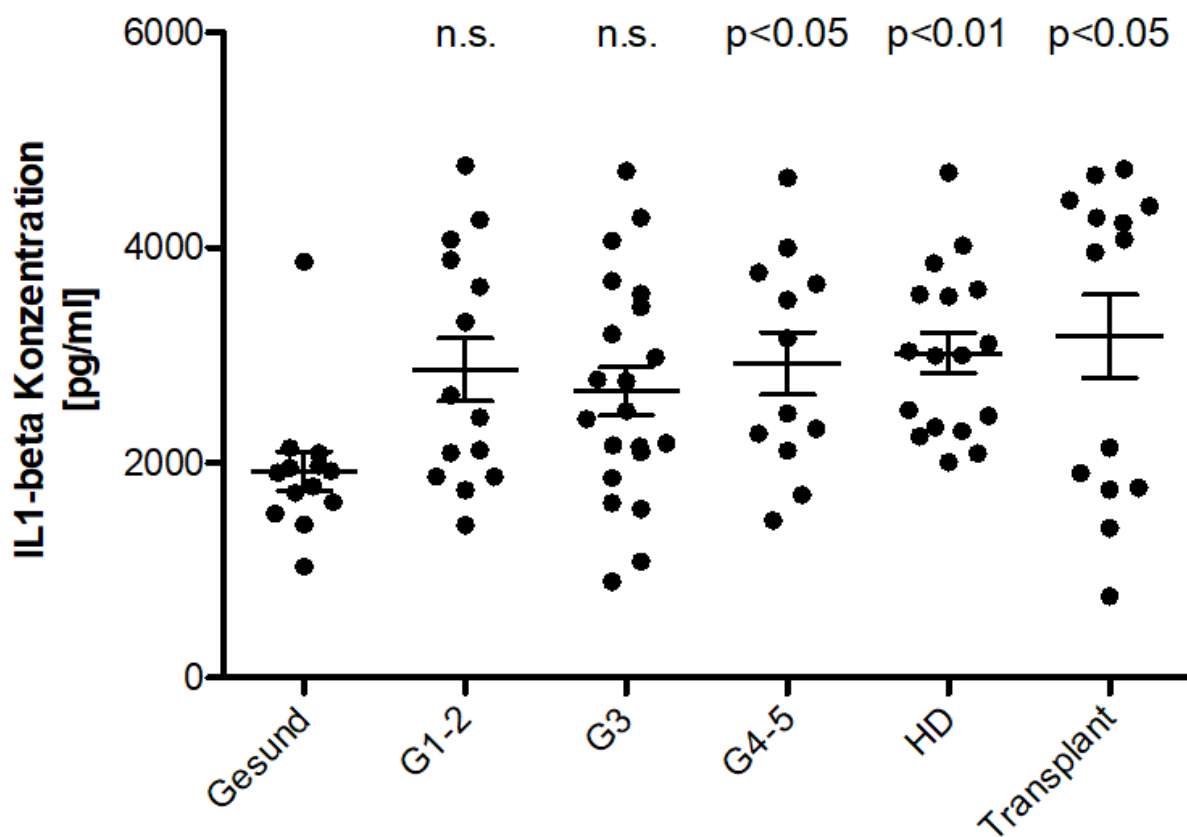


Abbildung 10 IL-1 $\beta$ -Konzentration im Zellkulturüberstand humaner Monozyten von Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz im Vergleich zu Gesunden, nach Stimulation mit LPS (100 ng/ml, 3h): Die IL-1 $\beta$ -Konzentration im Überstand wurde mittels ELISA gemessen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte und Standardfehler (engl. standard error of the mean, SEM). Jeder Punkt stellt eine Patientenprobe dar.

Wie in Abbildung 10 dargestellt, zeigte sich bei den Patienten in den Gruppen CKD G3, G4-5 und bei Hämodialysepatienten eine signifikant erhöhte IL-1 $\beta$ -Konzentration, im Überstand von LPS stimulierten Monozyten, im Gegensatz zu gesunden Patienten. Die stärkste Expression von IL-1 $\beta$  zeigte die Gruppe der Hämodialysepatienten. Insgesamt ließ sich mit zunehmendem Stadium der chronischen Niereninsuffizienz eine Zunahme der IL-1 $\beta$ -Sekretion nachweisen.

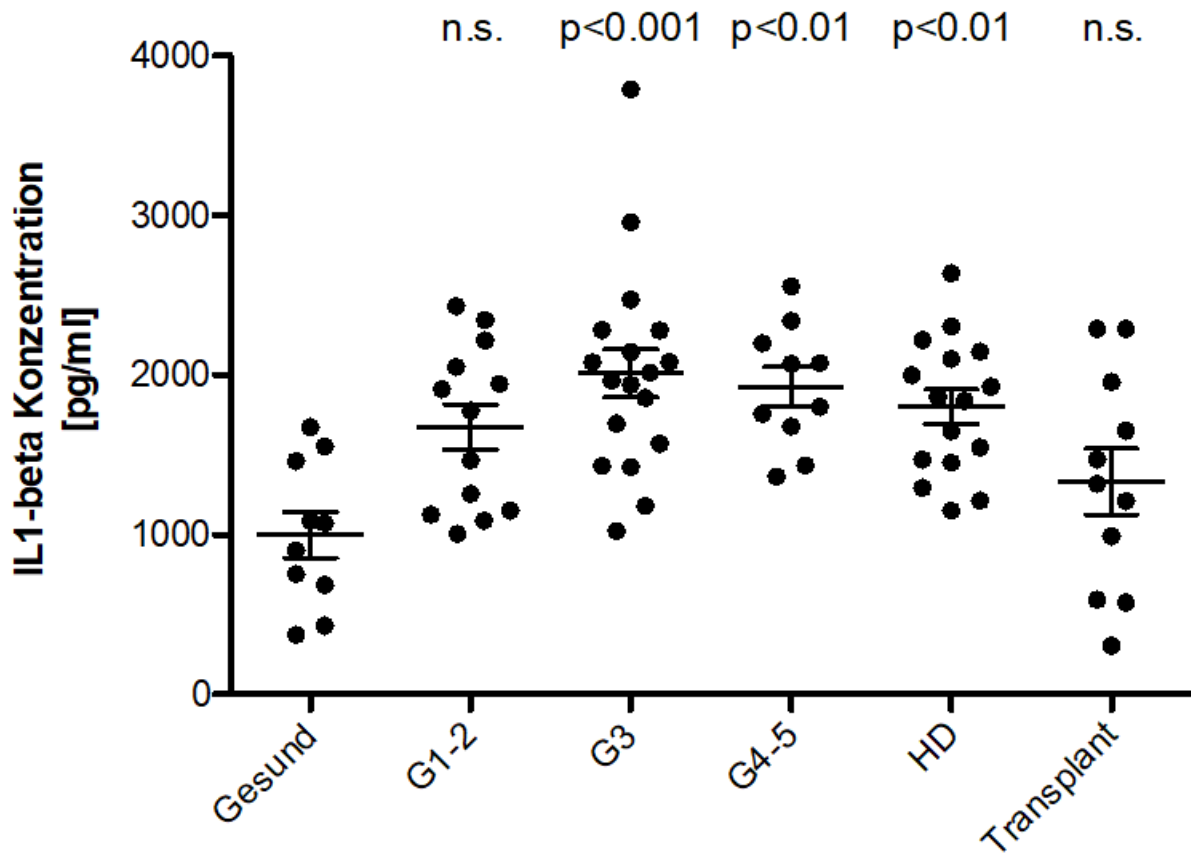
### 3.3.2. Stimulation mit LPS + ATP



**Abbildung 11 IL-1 $\beta$ -Konzentration im Zellkulturüberstand humaner Monozyten von Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz im Vergleich zu Gesunden, nach Stimulation mit LPS (100 ng/ml, 3h) und ATP (2 nM, 1h):** Die IL-1 $\beta$ -Konzentration im Überstand wurde mittels ELISA gemessen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte und Standardfehler (engl. standard error of the mean, SEM). Jeder Punkt stellt eine Patientenprobe dar.

In Abbildung 11 ist die IL-1 $\beta$ -Konzentration im Zellkulturüberstand nach Stimulation mit LPS und ATP dargestellt. Die höchste Expression zeigte sich hier bei Patienten nach Nierentransplantation. Insgesamt waren die Ergebnisse in den Gruppen G4-5, HD sowie Transplant signifikant höher als im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe.

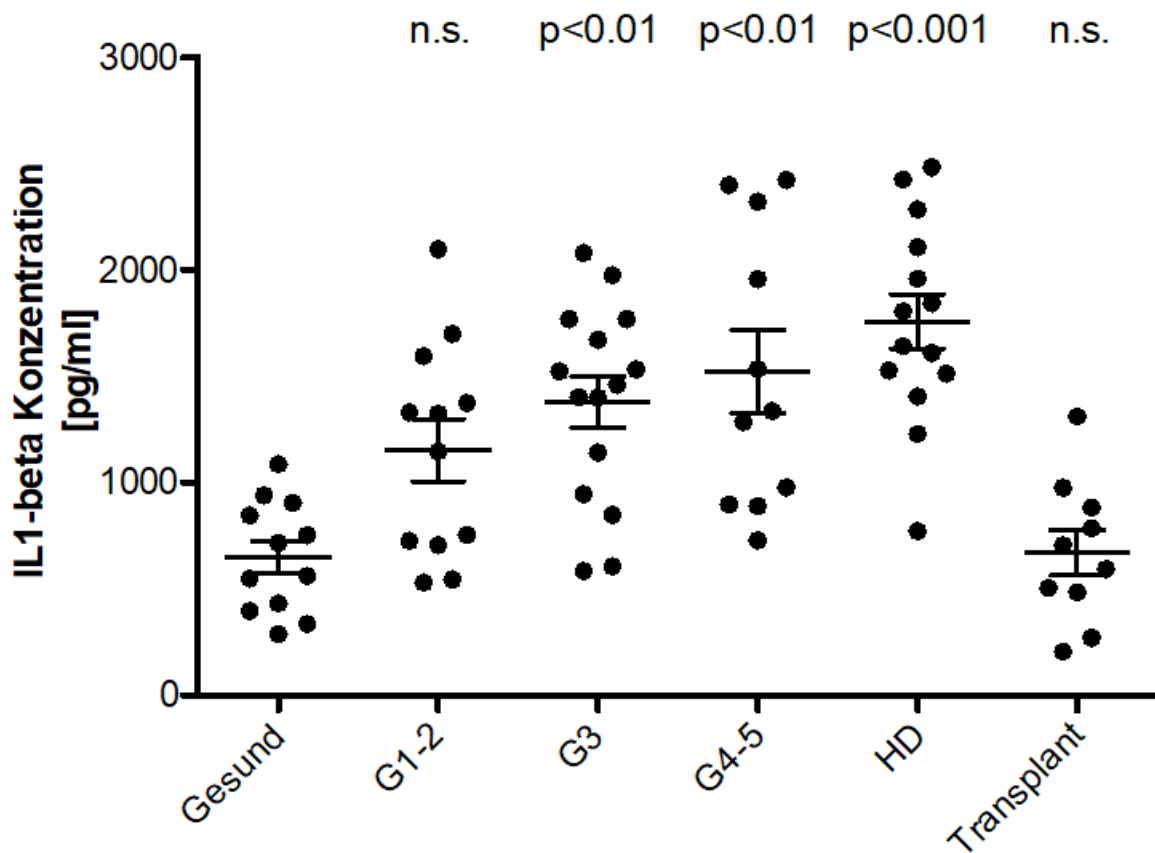
### 3.3.3. Stimulation mit LPS + Nigericin



**Abbildung 12 IL-1 $\beta$ -Konzentration im Zellkulturüberstand humaner Monozyten von Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz im Vergleich zu Gesunden, nach Stimulation mit LPS (100 ng/ml, 3h) und Nigericin (10  $\mu$ M, 1h):** Die IL-1 $\beta$ -Konzentration im Überstand wurde mittels ELISA gemessen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte und Standardfehler (engl standard error of the mean, SEM). Jeder Punkt stellt eine Patientenprobe dar.

Abbildung 12 zeigt die IL-1 $\beta$ -Konzentration nach Stimulation mit LPS und Nigericin. In den Gruppen G3, G4-5 sowie bei Hämodialysepatienten konnte eine signifikante Erhöhung der IL-1 $\beta$ -Konzentration im Zellkulturüberstand der entsprechend stimulierten Monozyten im Vergleich zu Monozyten von Gesunden nachgewiesen werden.

### 3.3.4. Stimulation mit LPS + Alum



**Abbildung 13 IL-1 $\beta$ -Konzentration im Zellkulturüberstand humaner Monozyten von Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz im Vergleich zu Gesunden, nach Stimulation mit LPS (100 ng/ml, 3h) und Alum (200  $\mu$ l/ml, 3h):** Die IL-1 $\beta$ -Konzentration im Überstand wurde mittels ELISA gemessen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte und Standardfehler (engl standard error of the mean, SEM). Jeder Punkt stellt eine Patientenprobe dar.

Wie in Abbildung 13 dargestellt, konnten in den Gruppen G3, G4-5 und HD im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe signifikant höhere IL-1 $\beta$ -Konzentrationen im Zellkulturüberstand der entsprechend stimulierten Monozyten nachgewiesen werden. In den Gruppen G1-2 sowie Transplant ließ sich keine signifikant erhöhte IL-1 $\beta$ -Konzentration nachweisen. Insgesamt zeigt sich mit Schweregradzunahme der chronischen Niereninsuffizienz eine Zunahme der IL-1 $\beta$ -Konzentration mit den durchschnittlich höchsten Werten bei Dialysepatienten.

## **4. Diskussion**

Diese Studie konnte erstmals belegen, dass die Komponenten des NLRP3-Inflammasoms ASC, NLRP3 und IL-1 $\beta$  in Monozyten von Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz im Vergleich zu gesunden Probanden signifikant stärker exprimiert werden. Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, dass Monozyten von Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz im Vergleich zu gesunden Probanden signifikant mehr IL-1 $\beta$  nach Stimulation mit bekannten NLRP3-Aktivatoren sezernieren. Diese Ergebnisse zeigen, dass das NLRP3-Inflammasom bei CKD-Patienten stärker aktiviert ist und deuten auf eine wichtige pathophysiologische Rolle des NLRP3-Inflammasoms bei der CKD-assoziierten sterilen Inflammation hin.

### **4.1. IL-1 $\beta$ - ein Schlüsselzytokin**

IL-1 $\beta$  ist ein potentes, pro-inflammatorisches Zytokin der Interleukin-1-Superfamilie. Es handelt sich hierbei um einen wichtigen Vermittler von Entzündungsreaktionen (57). Gleichsam ist IL-1 $\beta$  unentbehrlich für Abwehrreaktionen gegen Krankheitserreger und spielt eine Rolle bei autoinflammatorischen Erkrankungen (58).

#### **4.1.1 Biologische Wirkungen**

Diese Studie konnte eine vermehrte IL-1 $\beta$ -Sekretion von Monozyten vor und nach Stimulation mit verschiedenen, bekannten NLRP3-Aktivatoren nachweisen. Dies legt nahe, dass eine NLRP3-abhängige IL-1 $\beta$ -Sekretion eine Rolle bei der Entstehung einer CKD-assoziierten sterilen Inflammation zu spielen scheint.

Die Wirkungen von IL-1 $\beta$  sind dabei sehr vielfältig. IL-1 $\beta$  weist durch eine Interaktion mit Interleukin-1-Rezeptoren zum einen direkte Effekte auf verschiedene Effektorzellen auf. Zum anderen stimuliert IL-1 $\beta$  die Sekretion weiterer proinflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IL-6, was somit eine Inflammationsreaktion amplifiziert (59). TNF- $\alpha$  und IL-6 sind Mediatoren akuter und chronischer Entzündungsreaktionen (60), wie es bei der chronischen Niereninsuffizienz der Fall ist. Gleichzeitig konnten epidemiologische Studien nachweisen, dass die Serumspiegel dieser beiden Zytokine sowohl mit der Prävalenz als auch mit dem Schweregrad chronischer Nierenerkrankungen assoziiert sind (61). Erhöhte IL-6-Serumspiegel gelten als Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen in der Gesamtpopulation und werden unabhängig davon, mit einer erhöhten Mortalität bei niereninsuffizienten Patienten assoziiert (62, 63).



Die gesteigerte Sekretion von IL-1 $\beta$  durch Monozyten von chronisch Nierenerkrankten könnte also indirekt an den erhöhten Serumspiegeln von TNF $\alpha$ - und IL-6 beteiligt sein.

Neben einer indirekten Aktivierung des angeborenen Immunsystems übt IL-1 $\beta$ , bei akuten und chronischen Nierenerkrankungen, ebenfalls verschiedenste direkte Effekte aus (59). So induziert IL-1 $\beta$  die Expression und Aktivierung von verschiedenen Akut-Phase-Proteinen wie COX-2 (Cyclooxygenase-2), induzierbarer Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS), verschiedensten Oxidasen und Phospholipase A<sub>2</sub>. IL-1 $\beta$  führt so zur Produktion von Stickstoffmonoxid (NO), reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), Prostaglandinen und plättchenaktivierendem Faktor (PAF), welche an der Entstehung einer systemischen Inflammationsreaktion beteiligt sind (64). Darüber hinaus ist IL-1 $\beta$  ein potenter Induktor von Chemokinen und endothelialen Adhäsionsmolekülen. Wodurch es zur Gewebsinfiltration von Leukozyten und der Adhäsion neutrophiler Granulozyten an Endothelzellen führt (65). Hierbei handelt es sich um einen zentralen pathogenetischen Prozess bei der Entstehung und Progression chronischer Nierenerkrankungen sowie CKD-assoziierten atherosklerotischen (kardio-) vaskulären Erkrankungen (66).

Unsere Ergebnisse zeigen eine Zunahme der IL-1 $\beta$ -Expression und Sekretion mit zunehmender Schwere der CKD. Dies legt nahe, dass IL-1 $\beta$  und seine inflammatorischen Effekte auch an der Progression einer chronischen Niereninsuffizienz beteiligt sein könnten.

Zuletzt führt IL-1 $\beta$  zur Mobilisation von Neutrophilen aus dem Knochenmark und aktiviert verschiedenste Leukozytensubpopulationen sowie verschiedene Zelltypen in der Niere selbst (65). Die entzündliche Zellrekrutierung trägt, unter anderem, zur Nierenschädigungen bei. Beispielsweise konnte im Ischämie-Reperfusionmodell der Maus eine IL-1 $\beta$ -medierte Förderung der Nierenschädigung durch Rekrutierung von Neutrophilen und Makrophagen nachgewiesen werden (66, 67).

#### **4.1.2. Prozessierung und Aktivierung**

Die Sekretion von biologisch aktivem IL-1 $\beta$  durch das NLRP3-Inflammasom ist streng reguliert. Bei der klassischen Inflammasom-Aktivierung werden zwei Signale für die Aktivierung benötigt. Der erste Aktivierungsschritt führt zu einer vermehrten Expression der Inflammasom-Bestandteile NLRP3, ASC, Caspase-1 und Pro-IL-1 $\beta$ . Ein zweiter Aktivierungsschritt führt schließlich zu einer proteolytischen Prozessierung des inaktiven Pro-IL-1 $\beta$  durch Caspase-1 in reifes, also biologisch aktives, IL-1 $\beta$  (17 kDa) (46).

Eine Aktivierung von Mustererkennungsrezeptoren durch verschiedenste, exogene PAMPs oder endogene DAMPs führt unter anderem zur Expression des inaktiven Pro-IL-1 $\beta$  (31 kDa),

welches zunächst im Zytosol akkumuliert (58, 68). Zu den Pro-IL-1 $\beta$  bildenden Zellen gehören unter anderem Monozyten (69), Makrophagen (69), B-Lymphozyten (70), natürliche Killerzellen (70) und dendritischen Zellen (71). Die Induktion der Pro-IL-1 $\beta$ -Expression wird als Priming-Schritt bezeichnet.

In unserer Studie konnten wir in Monozyten von CKD-Patienten eine erhöhte Expression der Inflammasom-Bestandteile NLRP3, ASC und IL-1 $\beta$  nachweisen. Dies legt nahe, dass endogene, bei der Niereninsuffizienz akkumulierende Mediatoren zu einem Priming der Monozyten führen. Um nun die biologisch aktive Form des Interleukins zu erhalten, muss Pro-IL-1 $\beta$  durch die Protease Caspase-1 prozessiert werden (72). Auch Caspase-1 liegt zunächst in einer inaktiven Pro-Form (Pro-Caspase-1) vor. Erst eine Aktivierung des NLRP3-Inflammasom führt zu Aktivierung von Caspase-1, welche dann Pro-IL-1 $\beta$  in seine aktive Form prozessieren kann (47). Die Inflammasom-Aktivierung erfolgt dabei wie bereits in Abschnitt 1.8.2. ausführlich beschrieben.

Interessanterweise konnten wir nachweisen, dass Monozyten von Nierenkranken bereits basal, das heißt nur nach Stimulation mit LPS, ohne Stimulation mit bekannten NLRP3-Aktivatoren, vermehrt IL-1 $\beta$  sezernieren. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Monozyten Nierenkranker nicht nur „geprimed“ sind, sondern endogene Mediatoren auch eine direkte Inflammasom-Aktivierung induzieren.

### **4.1.3. Sekretion**

Aufgrund der Vielfalt der Sekretionsreize und den unterschiedlichen Zelltypen, die IL-1 $\beta$  sezernieren, sind die genauen Mechanismen der IL-1 $\beta$  Sekretion bislang nicht vollständig geklärt. Da IL-1 $\beta$  keine Signalsequenz für die Kompartimentierung innerhalb des Golgi-Apparats und die Freisetzung durch klassische sekretorische Vesikel besitzt, sind für seine Sekretion nicht-klassische Mechanismen erforderlich (73). Zu möglichen Sekretionswegen gehören:

- (I) Die Exozytose von sekretorischen Lysosomen, in denen zytosolisches IL-1 $\beta$  mittels undefinierten Proteintransportern akkumuliert (74);
- (II) Die Freisetzung membranbegrenzter Mikrovesikel aus Plasmamembranbläschen, die durch Evaginationen der Oberflächenmembran gebildet werden und zytosolisches IL-1 $\beta$  einschließen (75);
- (III) Die Freisetzung membranbegrenzter Exosomen infolge von Exozytose multivesikulärer Körper, die durch Invaginationen von Recycling-Endosomen entstehen, welche zytosolisches IL-1 $\beta$  einschließen (76);

- (IV) Die Exozytose von Autophagosomen oder Autophagolysosomen, die zytosolisches IL-1 $\beta$ , durch Einschließung während der Bildung der initialen Isolationsmembran, akkumulieren (77);
- (V) Die direkte Freisetzung von zytosolischem IL-1 $\beta$  durch Zelltod, Pyroptose oder Nekroptose (78).

## **4.2. Zell-spezifische Aktivierungswege des NLRP-Inflammasoms**

NLRP3 sowie IL-1 $\beta$  konnten bisher in unterschiedlichsten Zelltypen nachgewiesen werden. Von besonderer Bedeutung für die Entstehung und Progression von Nierenschäden ist die Expression und Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms in Monozyten (79), Makrophagen (79), dendritischen Zellen (80) sowie Endothel- und Epithelzellen (81).

### **4.2.1. Monozyten**

Die vorliegende Studie untersuchte die Expression und Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms in direkt aus dem Blut isolierten Monozyten. Es handelt sich hierbei um die bislang erste Studie, in der die Inflammasom-Aktivierung bei CKD-Patienten direkt, in aus Patienten gewonnenen Zellen, untersucht wurde. Die meisten publizierten Studien zur Rolle von NLRP3 bei chronischen Nierenerkrankungen wurden bisher *in vitro* an Makrophagen in verschiedenen Mausmodellen durchgeführt.

Monozyten stellen eine wichtige im Blut zirkulierende Zellpopulation dar, welche in direkten Kontakt mit DAMPs treten (82, 83). Eine Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms spielt eine bedeutende Rolle bei der Aktivierung von Monozyten. Eine Aktivierung führt zu einer trans-endothelialen Migration der Monozyten und induziert schließlich deren Differenzierung in Makrophagen (83). Bezogen auf die Oberflächenexpression von CD14 und CD16 lassen sich drei Monozyten-Populationen unterscheiden: klassische (CD14 $^{++}$  CD16 $^{-}$ ), intermediäre (CD14 $^{++}$ , CD16 $^{+}$ ) und nicht-klassische Monozyten (CD14 $^{+}$ , CD16 $^{++}$ ) (84). Bei Patienten mit CKD sind im Gegensatz zu Gesunden vermehrt CD14 $^{+}$  und CD16 $^{+}$  Monozyten im peripheren Blut nachweisbar. Hierbei handelt es sich um eine Population von insbesondere pro-inflammatorischen Monozyten (84). Eine weitere Studie konnte eine signifikante Assoziation zwischen der Monozytenzahl und dem Risiko für chronische Nierenerkrankungen nachweisen und hat auch gezeigt, dass die Monozytenzahl per se einen signifikanten Prädiktor für das Outcome bei chronisch Nierenkranken darstellt (85). Der genaue Mechanismus, welcher der

Assoziation von Monozyten und Niereninsuffizienz zugrunde liegt, konnte bisher jedoch nicht eindeutig geklärt werden.

Somit liegen in Zusammenschau der Befunde bei CKD-Patienten nicht nur erhöhte Monozytenzahlen vor, sondern – so zeigen es unsere Ergebnisse – weisen diese Monozyten auch eine erhöhte Inflammasom-Aktivität auf, was in einer gesteigerten Sekretion von IL-1 $\beta$  nach Stimulation resultiert. Monozyten spielen demnach eine wichtige Rolle bei der Entstehung einer CKD-assoziierten Inflammationsreaktion.

#### **4.2.2. Makrophagen**

Wie bereits dargestellt, erfolgten die meisten bisher durchgeführten Studien zur Rolle von NLRP3 bei chronischen Nierenerkrankungen an murinen Makrophagen (86, 87). Makrophagen sind sowohl in der gesunden Niere als auch bei verschiedenen Nierenerkrankungen histologisch nachweisbar (88). Bei nahezu allen Niereninsuffizienzmodellen der Maus sowie in humanen Biopsiepräparaten, lassen sich deutlich höhere Makrophagenzahlen nachweisen als in gesunden Nieren. Dies führt zur Spekulation, dass Makrophagen eine zentrale Rolle bei renalen Entzündungsprozessen und bei der Progression einer Niereninsuffizienz spielen (88, 89).

Im Gegensatz zu Monozyten können Makrophagen IL-1 $\beta$  nicht allein durch Bindung von TLR-Liganden prozessieren und freisetzen, sondern benötigen einen zweiten Stimulus wie beispielsweise ATP (90). Ebenfalls konnte in unstimulierten Makrophagen im Gegensatz zu Monozyten kaum Caspase-1 Aktivität nachgewiesen werden (91, 92).

#### **4.2.3. Dendritische Zellen**

Neben Monozyten und Makrophagen spielen auch dendritische Zellen eine wichtige Rolle bei Nierenerkrankungen (93, 94). Mittels Lasermikroskopie konnte gezeigt werden, dass renale, dendritische Zellen ein umfassendes Netzwerk bilden, welches das gesamte Tubulointerstitium und alle Nephrone umspannt (95). In einer an, von Monozyten abstammenden, dendritischen Zellen durchgeführten Studie konnte nachgewiesen werden, dass die Differenzierung der Monozyten in dendritische Zellen bei CKD-Patienten deutlich eingeschränkt war. Auch in dendritischen Zellen werden die verschiedenen Inflammasom-Komponenten exprimiert. Im Vergleich zu Makrophagen scheinen dendritische Zellen allerdings eine geringere Schwelle zur Inflammasomaktivierung aufzuweisen (80), das heißt, dass niedrigere Konzentrationen von PAMPs und DAMPs bereits eine Inflammasom-Aktivierung induzieren können.

Neben den klassischen Immunzellen exprimieren auch verschiedene andere renale Zelltypen wie Endothelzellen (81, 96), Epithelzellen (97, 98), Podozyten (96) und Mesangialzellen (99) die verschiedenen Inflammasom-Komponenten und sind in der Lage nach Aktivierung IL-1 $\beta$  zu sezernieren.

Die Tatsache, dass nahezu alle Zelltypen der Niere ein funktionales NLRP3-Inflammasom aufweisen, deutet auf eine besondere Bedeutung des NLRP3-Inflammasoms hin und legt nahe, dass systemische Inflammasom-Aktivatoren, wie sie bei der Niereninsuffizienz vermehrt akkumulieren oder vermehrt gebildet werden, zu einer ausgeprägten Inflammationsreaktion der Niere mit Beteiligung nahezu aller renalen Zelltypen führen.

### **4.3. Endogene Aktivatoren des NLRP3-Inflammasoms bei Nierenerkrankungen**

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass Monozyten von CKD-Patienten eine erhöhte mRNA-Expression der verschiedenen Inflammasom-Komponenten aufweisen und nach Stimulation mehr IL-1 $\beta$  sezernieren als Monozyten von gesunden Probanden. Diese Ergebnisse legen nahe, dass endogene Mediatoren bei der Niereninsuffizienz eine Inflammasom-Aktivierung induzieren. Hier kommen verschiedene DAMPs in Frage.

#### **4.3.1 ATP**

Das in dieser Studie verwendete ATP ist ein bekannter NLRP3-Aktivator (100). Neben der Inflammasom-Aktivierung fungiert ATP auch als Chemotaxis-Mediator, was zur Rekrutierung von Makrophagen und Phagozytose der apoptotischen Zellen führt (101). Extrazelluläres ATP scheint eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Nierenschäden und bei chronischen Erkrankungen wie Diabetes mellitus, arterieller Hypertension sowie hereditären Nierenerkrankungen, wie der polyzystischen Nierenerkrankung, zu spielen (102, 103). Dies suggeriert, dass ATP möglicherweise einen endogenen Inflammasom-Aktivator bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung darstellt. In der Zelle fungiert mitochondriales ATP als universelle Energiequelle für Zellreaktionen und Stoffwechsel (104). Bei Zellschädigung oder Zell-Stress werden ATP und andere Nukleotide passiv von toten Zellen freigesetzt oder auch aktiv von gestressten Zellen sezerniert. ATP bindet an P2X-Rezeptoren (P2XR), Nukleotid-gesteuerte Ionenkanäle und ermöglicht den Einstrom von Natrium und Calcium sowie den Ausstrom von Kalium aus der Zelle (105). Die so erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration führt zur Aktivierung von MAP-Kinasen wie p38 und Phospholipase A2-abhängiger

Signalwege (104). Daneben führt der Kaliumausstrom aus der Zelle zur Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms (104).

#### **4.3.2. HMGB1**

Ein weiteres gut charakterisiertes DAMP bei Patienten mit chronischen Nierenerkrankungen stellt das High mobility group box 1 Protein (HMGB1) dar. Verschiedene Krankheitsbilder wie Atherosklerose, Adipositas, Insulinresistenz, Diabetes mellitus und auch die chronische Niereninsuffizienz sind mit einer erhöhten HMGB1-Expression assoziiert (106). So weisen Patienten mit CKD erhöhte HMGB1-Konzentrationen in Blut und Urin auf. Gleichzeitig wird auch in geschädigten Nieren signifikant mehr HMGB1 exprimiert (107). Bei HMGB1 handelt es sich um ein ubiquitär exprimiertes DNA-bindendes Protein, das die Nukleosomen stabilisiert und die Transkription reguliert (108, 109). HMGB1 ist ein Späte-Phase-Protein und wirkt als proinflammatorischer Mediator bei Sepsis sowie steriler Infektion (110). Es induziert die Chemotaxis von Immunzellen und stimuliert die Reifung und Migration dendritischer Zellen (111). Ferner bindet es an den Rezeptor für 'Advanced glycation end products', (RAGE) und stimuliert die NF $\kappa$ B-abhängige Proteinexpression von beispielsweise NLRP3, Caspase-1 und Pro-IL-1 $\beta$  durch eine direkte Interaktion mit TLR2, TLR4 und RAGE (112, 113).

#### **4.3.3. S100**

Die S100-Proteine bilden eine große Gruppe Calcium-bindender Proteine und sind an Entzündungen und Fibrosen im Zusammenhang mit Krebs oder Erkrankungen der Nieren, des Herzens, der Gelenke und der Lunge beteiligt (114). Die Konzentration von S100A12 korreliert mit der Gesamt- und kardiovaskulären Mortalität bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz. Zudem sind bei Nierenkranken die Plasmakonzentrationen von S100A12 bereits in früheren Erkrankungsstadien erhöht und erreichen ihr Maximum bei Dialysebehandlungen (115). S100-Proteine werden nach Zellstress aus Phagozyten in den Extrazellularraum sezernieren und führen über eine Interaktion mit RAGE und anderen Rezeptoren zur Entstehung einer Inflammationsreaktion (116–118). Die S100A8 und S100A9-Freisetzung aus aktivierten Phagozyten aktiviert TLR4 und somit die Expression der verschiedenen Inflammasom-Komponenten und Pro-IL-1 $\beta$ -Induktion (116).

#### **4.3.4. Harnsäure**

Lösliche Harnsäure wird von geschädigten und apoptotischen Zellen freigesetzt und fungiert als endogener Inflammasom-Aktivator (119). Die Serum-Harnsäure-Konzentrationen sind bei

Patientin mit chronischer Niereninsuffizienz häufig erhöht (3). Viele Studien konnten dokumentieren, dass erhöhte Serum-Harnsäure-Spiegel ein unabhängiger Prädiktor für die Progression einer CKD darstellen (120, 121). Im Tiermodell induzierte Harnsäure eine glomeruläre Hypertonie sowie eine progrediente Nierenschädigung (122). Zudem legen Pilotstudien nahe, dass eine Senkung der Serum-Harnsäure-Konzentration die Progression einer chronischen Niereninsuffizienz verlangsamen könnte (3). Mononatriumuratkristalle wurden mit als erste NLRP3-Inflammasom-Aktivatoren identifiziert und fungieren als „Signal 2“ bei der NLRP3-Aktivierung. Sie benötigen demnach die Anwesenheit eines „Priming agent“ wie z.B. LPS, um die Inflammasom-abhängige IL-1 $\beta$ -Sekretion zu induzieren (123).

#### **4.3.5. Hitzeschockproteine (HSP)**

Hitzeschockproteine (HSP) fungieren als intrazelluläre „Chaperon“-Proteine, die neu synthetisierte Polypeptidketten leiten, um eine Aggregation und Fehlfaltung zu verhindern und somit lebenswichtige Funktionen der Proteine erhalten (124, 125). Sie werden nach ihrem Molekulargewicht in fünf Gruppen eingeteilt: kleines HSP (inkl. Hsp27), HSP60, HSP70, HSP90 und HSP110 (126). Bei Zellschädigung und Nekrose freigesetzte, extrazelluläre HSP spielen eine zentrale Rolle bei der angeborenen und adaptiven Immunantwort (127). Intrazelluläre HSP, vor allem HSP70, verzögern, durch antipoptotische Aktivität und Zytoprotektion, ein Fortschreiten der CKD (127). In murinen Studien führte ein HSP70-Mangel zu einer vermehrten NLRP3-Inflammasom-Aktivität mit erhöhter Caspase-1-Aktivierung und IL-1 $\beta$ -Reifung, ebenfalls hemmte HSP70 die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms durch direkte Interaktion mit NLRP3 (128).

#### **4.3.6. Extrazelluläre Matrix (ECM)-Glykoproteine**

Ferner führen Zellstress sowie Apoptose zur Akkumulation von Spaltprodukten der extrazellulären Matrix (ECM) (129). Hierbei handelt es sich unter anderem um Spaltprodukte von Fibronectin, Fibrinogen sowie von Proteoglykanen wie Hyaluron, Biglycan und Versican. Diese können über TLRs die Expression der NLRP-Inflammasom-Komponenten steigern und spielen deshalb eine Rolle bei der Inflammasom-Aktivierung (130–132). Im Rahmen einer Nierenfibrose kommt es zu einer übermäßigen Akkumulation extrazellulärer Matrix, welche die Niere zerstört und das Parenchym ersetzt. Infolgedessen kommt es zu einem fortschreitenden Verlust der Nierenfunktion (133). Die Nierenfibrose ist, unabhängig von der Ätiologie der Grunderkrankung, ein pathologisches Hauptmerkmal der CKD und maßgeblich an der Progression dieser beteiligt (134).

Daneben können bei der Niereninsuffizienz eine Vielzahl weiterer Substanzen als DAMPs fungieren. Dazu gehören Galectine (135), Adenosin (136) sowie Tamm-Horsfall-Protein (THP). THP ist ein, im dicken, aufsteigenden Teil der Henle-Schleife exprimiertes, Glykoprotein, das nach proteolytischer Spaltung im Urin ausgeschieden wird (137). Die THP-Ausscheidung im Urin korreliert mit der eGFR und ist bei verschiedenen Nierenfunktionsstörungen einschließlich Glomerulonephritis, diabetischer Nephropathie, Lupusnephritis und polyzystischen Nierenerkrankungen verringert. Möglicherweise entsteht die verringerte Ausscheidung durch eine fortschreitende tubuläre Schädigung, die zu einer verringerten Menge an THP-sezernierenden Zellen führt (138). THP-Nanopartikel aktivieren das NLRP3-Inflammasom in humanen Monozyten, mit konsekutiver IL-1 $\beta$ -Freisetzung (139). Ein Vergleich zwischen THP-Serumkonzentration von Gesunden und erhöhten Konzentrationen bei CKD-Patienten in Korrelation mit entzündungsfördernden Zytokinen zeigt, dass IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-8 positiv mit dem Serum-THP korrelieren. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass eine signifikante Verschiebung von löslichem THP vom Lumen in das Interstitium erfolgt, wo es eine, unter anderem NLRP3-abhängige, Immunreaktion auslöst und so zu einer CKD-Progression beiträgt (140). Eine kürzlich veröffentlichte Studie identifizierte ebenfalls Apolipoprotein C3 (ApoC3) als endogenen NLRP3-Aktivator. Mittels Bildung eines Heterotrimeres zwischen TLR2, TLR4 und SCIMP wird eine IL-1 $\beta$ -Freisetzung in menschlichen Monozyten induziert. Bei Patienten mit CKD zeigten sich im Gegensatz zu gesunden Probanden signifikant erhöhte ApoC3-Plasmakonzentrationen, welche mit einer erhöhten Gesamtmortalität assoziiert sind (141).

Zusammenfassend kommen bei der chronischen Nierenerkrankung verschiedene, endogene Inflammasom-Aktivierungen in Betracht. Insbesondere scheint das gesamte urämische Mikromilieu und somit die Summe an verschiedenen DAMPs in einem multifaktoriellen Prozess, sowohl die Expression der verschiedenen Komponenten des NLRP3-Inflammasoms, als auch dessen Aktivierung zu induzieren.

#### **4.4. Rolle des NLRP3-Inflammasoms bei der Entstehung und Progression von Nierenerkrankungen**

In der vorliegenden Studie konnte erstmals gezeigt werden, dass Monozyten von Nierenkranke im Vergleich zu Nierengesunden eine signifikant erhöhte Expression



verschiedener Inflammasom-Komponenten aufweisen. Gleichzeitig sezernieren diese nach Stimulation mehr IL-1 $\beta$  als Zellen gesunder Probanden.

Die vermehrte IL-1 $\beta$  Sekretion könnte eine wichtige Rolle bei der Progression chronischer Nierenerkrankung spielen. Verschiedene Studien konnten tierexperimentell nachweisen, dass IL-1 $\beta$  zu einer renalen Inflammation sowie der Entstehung einer Fibrose führt (142, 143). Die Progression einer chronischen Nierenerkrankung bis hin zur terminalen Niereninsuffizienz ist ein komplexer Prozess. Die Akkumulation und Aktivierung von Entzündungszellen im geschädigten Niereninterstitium stellt einen universellen Befund beim Nierenversagen, unabhängig von dessen Ätiologie, dar und korreliert umgekehrt mit der Nierenfunktion (144–146). Eine sterile Inflammation ist also eine zentrale Komponente vieler akuter und chronischer Nierenerkrankungen (89). Die genauen molekularen Mechanismen, welche die Entzündungsprozesse bei der Niereninsuffizienz regulieren, bleiben jedoch bis dato unklar. Hier könnte sowohl eine Inflammasom-Aktivierung in zirkulierenden Leukozytenpopulationen, als auch in ortsständigen Zellen der Niere eine wichtige Rolle spielen. In verschiedenen tierexperimentellen Studien wurde deshalb die Rolle des NLRP3-Inflammasoms bei unterschiedlichen Nierenerkrankungen untersucht.

#### **4.4.1. Diabetische Nephropathie**

Die diabetische Nephropathie stellt, neben der hypertensiven Nephropathie, eine der Hauptursachen der chronischen Niereninsuffizienz dar (147). Hierbei ist eine sterile Inflammation ein treibender Faktor für die Progression der diabetischen Nephropathie (148). Das, durch dauerhaft erhöhte Glucosespiegel, aktivierte NLRP3-Inflammasom ist durch Vermittlung einer Entzündungsreaktion an Entstehung und Progression der diabetischen Nephropathie beteiligt (149). Eine intrarenale Inflammation ist sowohl bei Leptinrezeptor-defizienten Mäusen (db/db- Mäusen; Modulierung Typ-2-Diabetes), als auch bei, durch Streptozotocin (spezifisch toxisch für die insulinproduzierenden Betazellen in den Langerhans'schen Inseln) induzierten, Typ-1-Diabetes der Maus nachweisbar. Gleichzeitig lässt sich intrarenal eine erhöhte IL-1 $\beta$ - und NLRP3-mRNA-Expression nachweisen (96). Im Streptozotocin-Mausmodell ließ sich in Caspase-1-defizienten Mäusen eine deutlich geringere renale Schädigung nachweisen als in Wildtyp-Mäusen (96). Bei NLRP3-Knockout-Mäusen mit diabetischer Nephropathie zeigte sich eine verbesserte Nierenfunktion, verminderte glomeruläre Hypertrophie, Glomerulosklerose und interstitielle Fibrose (150). Auch epidemiologische Studien am Menschen haben die Rolle von IL-1 $\beta$  und IL-18 im Rahmen der diabetischen Nephropathie hervorgehoben. Die Serumspiegel beider Zytokine waren bei

Patienten mit Albuminurie signifikant erhöht, wobei die Höhe der Serumspiegel mit dem Ausmaß der Albuminurie korrelierte (96). Bei neu-diagnostizierten Typ-2-Diabetikern ließen sich darüber hinaus deutlich erhöhte NLRP3-, ASC- und Caspase-1-Serumlevel nachweisen (151).

#### **4.4.2. Renales Ischämie-Reperfusionsschädigungsmodell (IRI)**

Experimentelle Ischämie-Reperfusionsschädigungsmodelle (IRI) konnten eine Rolle von IL-1 $\beta$  und IL-18 bei der Auslösung einer renalen Entzündungskaskade nachweisen, die zur Rekrutierung von Neutrophilen und Makrophagen in der Niere führt (67). Durch akuten nekrotischen Zelltod im Rahmen der IRI kommt es zu einer NLRP3-vermittelten, sterilen Entzündungsreaktion (152). Es konnte gezeigt werden, dass eine NLRP3-Defizienz Mäuse vor tödlichen renalen IRI schützt. Hierbei überlebten 86 % der NLRP3-defizienten Mäuse eine IRI-Belastung, im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen, bei denen nur 10 % überlebten. Zusätzlich ist ein Mangel an NLRP3 und ASC mit reduzierten neutrophilen Infiltraten und geringeren IL-1 $\beta$  Serumwerten assoziiert (153). IL-18 ist ein zentraler Mediator bei der IRI. Caspase-1-defiziente Mäuse, IL-18-defiziente Mäuse und mit IL-18 inhibierenden Antikörpern behandelte Mäuse zeigten eine signifikant verbesserte Nierenfunktion und histologisch signifikant weniger Nierenschädigung nach IRI (154, 155). Zudem konnte bei Patienten mit einer akuten Niereninsuffizienz IL-18 im Urin als Marker für tubuläre Entzündungen und frühe akute tubuläre Nekrosen identifiziert werden. Hierbei korrelierten die IL-18 Konzentrationen im Urin mit einem erhöhten Schweregrad des akuten Nierenversagens (156).

#### **4.4.3. Unilaterale Ureterobstruktion (UUO)**

Eine weitere Studie konnte zeigen, dass das NLRP3-Inflammasom die Nierenentzündung und Fibrose bei einseitiger Ureterobstruktion (UUO) über 14 Tage bei Mäusen reguliert. Nach UUO war in der Niere eine erhöhte Expression von IL-1 $\beta$ , IL-18 sowie von aktiver Caspase-1 nachweisbar. Das Fehlen von NLRP3 führte zu einer Abschwächung der tubulären Schädigung, einer reduzierten Leukozyteninfiltration und einer geringeren Nierenfibrose. Da IL-1 $\beta$  und IL-18 an der Nierenschädigung und Fibrose beteiligt sind, trug am ehesten eine verringerte inflammasomabhängige Zytokinmaturation zu dem verbesserten Outcome bei NLRP3-defizienten Mäusen bei (146). Diese Ergebnisse konnten in einigen weiteren Studien bestätigt werden (152, 157, 158).

#### **4.4.4. Kristall-induzierte Erkrankungen**

Kristallinduzierte, Inflammasom-vermittelte Entzündungen bieten eine Erklärung für Nierenschäden im Rahmen von kristallbedingten Nephropathien. Verschiedene kristalline Substanzen wie Mononatriumurat (159) und Calciumoxalat (160), sind gut charakterisierte Aktivatoren des NLRP3-Inflammasoms. Mononatriumkristalle sind relevant bei akuter sowie chronischer Niereninsuffizienz (161). In epidemiologischen Studien sind erhöhte Serumharnsäurespiegel mit der Progression einer chronischen Niereninsuffizienz assoziiert (162, 163). Experimentelle Daten konnten eine Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms bei Harnsäure-induzierten Nierenschäden nachweisen. Vice versa zeigten NLRP3-defiziente Mäuse deutlich geringe renale Schädigungen nach Applikation von Calciumoxalat (161, 164).

#### **4.4.5. Autoimmunologische Nierenerkrankungen**

Auch bei autoinflammatorischen Erkrankungen wird zunehmend eine Rolle des NLRP3-Inflammasoms diskutiert. So konnte in einem murinen EAE (experimentale autoimmun Encephalomyelitis) Modell gezeigt werden, dass durch gesteigerte IL-1 $\beta$  und IL-18 Sekretion, NLRP3 die Differenzierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen beeinflusst wird (165, 166). Autoreaktive CD4<sup>+</sup> T-Zellen sind wichtige Mediatoren in der Pathogenese autoimmunologischer Nierenerkrankungen wie der ANCA (antineutrophile zytoplasmatische Antikörper)-assoziierten Vaskulitis (AAV), der Lupusnephritis sowie dem Goodpasture Syndrom (167–169). Die Schlussfolgerung, dass NLRP3 auch bei renalen autoinflammatorischen Erkrankungen eine wichtige Rolle spielen könnte liegt demnach nahe. Hier benötigt es jedoch weiterer Studien in der Zukunft.

Diese tierexperimentellen und epidemiologischen Ergebnisse zeigen, dass eine Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms eine zentrale Rolle bei akuten und chronischen Nierenerkrankungen spielt. Genetisch in unterschiedlichen Inflammasom-Komponenten defiziente Mäuse (z.B. NLRP3, IL-1 $\beta$ , Caspase-1) wiesen in unterschiedlichen Tiermodellen eine deutlich geringere Schädigung der Niere auf. In unserer Studie zeigt sich, dass die Inflammasom-Aktivierung in humanen Monozyten mit zunehmender Einschränkung der Nierenfunktion deutlich zunahm. Dies legt nahe, dass es eine progrediente chronische Nierenerkrankung mit einer zunehmenden Inflammasom-Aktivierung assoziiert ist. Allerdings lässt sich nicht klären, ob der Grad der Inflammasom-Aktivierung in zirkulierenden Monozyten auch mit dem Grad der Inflammasom-Aktivierung in der Niere selbst assoziiert ist.

## **4.5. Rolle des NLRP3-Inflammasoms bei der Entstehung CKD-assoziiierter kardiovaskulärer Erkrankungen**

Das NLRP3-Inflammasom spielt nicht nur eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Progression von Nierenschäden selbst, sondern ebenfalls bei der Entstehung und Progression kardiovaskulärer Erkrankungen, als wichtige Komorbiditäten und Komplikationen chronischer Nierenerkrankungen. Hierzu zählen atherosklerotische Gefäßerkrankungen und arterielle Hypertonie.

### **4.5.1. Atherosklerose**

Atherosklerose entsteht durch Umbauprozesse der Arterienwand, welche letztlich zur Bildung atherosklerotischer Plaques führen. Dabei können Plaqueruptur, oder -erosion zu akuten kardiovaskulären Ereignissen wie Myokardinfarkt oder Schlaganfall führen. Eine sterile Entzündung der Gefäßwand spielt eine wichtige Rolle sowohl bei der Entstehung als auch bei den Komplikationen der Atherosklerose (170, 171). In verschiedenen Mausmodellen konnte nachgewiesen werden, dass das Fehlen von TLR2, TLR4 sowie des TLR Adapterproteins MyD88 zu verminderten atherosklerotischen Läsionen führte (172–174). Neben TLRs ist auch das NLRP3-Inflammasom in die Pathogenese der Atherosklerose involviert. So begünstigt eine Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms in Endothelzellen die Entstehung atherosklerotischer Läsionen (175). Patienten mit koronarer Atherosklerose wiesen eine vermehrte NLRP3-Expression in den Koronararterien auf, welche mit der Schwere von Koronarstenosen korrelierte (176). Ebenfalls konnte nachgewiesen werden, dass Cholesterinsteine, welche im Rahmen der Atherosklerose in der Gefäßwand akkumulieren, einen direkten NLRP3-Aktivator darstellen. Entsprechend konnte in NLRP3- und IL- $\beta$ -Knockout-Mäusen eine verringerte Atherosklerose nachgewiesen werden (177). Auch wurde gezeigt, dass das Vorhandensein von Risikofaktoren (Rauchen, Bluthochdruck, Diabetes mellitus, hohes Gesamt- oder LDL-Cholesterin, niedriges HDL- Cholesterin) mit einer erhöhten NLRP3-Proteinexpression in der Aorta von Patienten mit manifester koronarer Herzkrankheit korreliert (176).

### **4.5.2. Arterielle Hypertonie**

Die arterielle Hypertonie stellt eine wichtige Ursache und gleichzeitige Folge einer chronischen Niereninsuffizienz dar. In den letzten Jahren wurde gezeigt, dass die adaptive und die angeborene Immunität eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der arteriellen Hypertonie sowie bei Hypertonie-assoziierten Endorganschäden spielen (16). Bei Patienten mit arterieller Hypertonie zeigten sich erhöhte Serumspiegel des NLRP3-abhängigen Zytokins IL-1 $\beta$  (178).

Ebenfalls wird vermutet, dass IL-1 $\beta$  direkt den Gefäßtonus moduliert. Es wurde beobachtet, dass eine *ex vivo* Inkubation von Aortenringen hypertensiver Ratten mit IL-1 $\beta$  zu einer verstärkten Vasokonstriktion führt, im Vergleich zu aortalem Gewebe von normotensiven Ratten (179). Angiotensin-II ist ein vasokonstriktorisches Peptid, welches durch Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems generiert wird. Es wird lokal in der Niere gebildet, ist ein wichtiger Mediator der arteriellen Hypertension und hat im Rahmen dieser eine Schlüsselrolle in der Regulation entzündlicher Prozesse (180, 181). Es konnte gezeigt werden, dass eine systemische IL-1 $\beta$ -Inhibition eine Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems reduziert, die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) verringert und dadurch, durch Hypertonie verursachte, vaskuläre Schäden verzögert (182). Eine an Mäuseherzen durchgeführte Studie konnte nachweisen, dass eine systemische Angiotensin-II-Applikation zu einer verstärkten NLRP3-Inflammasom-Aktivität und IL-1 $\beta$ -Expression im Herzen führt. Die gleiche Arbeitsgruppe wies auch eine deutlich verminderte Angiotensin-II induzierte myokardiale Fibrose durch Blockade des NLRP3-Inflammasoms nach (183). Die 2015 durchgeführte TAMRISK Studie konnte zudem belegen, dass der Single Nucleotide Polymorphism rs7512998 im NLRP3-Genpolymorphismus mit erhöhten systolischen und diastolischen Blutdruckwerten verbunden ist und einen altersbedingten Blutdruckanstieg voraussagen konnte (184).

### **4.5.3. Herzinsuffizienz**

Unter den potenziellen kardiovaskulären Komplikationen der Niereninsuffizienz stellt die Herzinsuffizienz eine der führenden dar. Ihre Prävalenz korreliert mit einem Abfall der Nierenfunktion (185).

Kardiomyozyten und Myokardfibroblasten exprimieren alle benötigten Bestandteile zur NLRP3-Inflammasombildung und Aktivierung. (186, 187). Das NLRP3-Inflammasom in Myokardfibroblasten ist der erste Sensor für DAMPs nach einer Myokardverletzung und ist daher primär für die Auslösung der Entzündungsreaktion in verletztem Herzgewebe verantwortlich (188). Auch IL-1 $\beta$  wird bei Herzinsuffizienz vermehrt exprimiert und ist mit einer schlechten Belastungstoleranz und Umbau nach Ischämie-Reperfusionverletzungen assoziiert (188, 189). In einer murinen Versuchsreihe konnte nachgewiesen werden, dass das NLRP3-Inflammasom zur Entwicklung einer Herzinsuffizienz nach Myokardinfarkt beiträgt (190).

Basierend auf diesen wissenschaftlichen Grundlagen zeigt sich ein klarer Effekt einer Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms auf die Entstehung unterschiedlicher kardiovaskulärer

Erkrankungen. Die von uns beobachtete gesteigerte NLRP3-Aktivität in Monozyten Nierenkranker mit daraus resultierender gesteigerter Sekretion von IL-1 $\beta$  legt nahe, dass diese Inflammasom-Aktivierung nicht nur mit einer Progression der Niereninsuffizienz selbst assoziiert ist, sondern auch eine wichtige Rolle bei der Entstehung CKD-assoziiierter kardiovaskulärer Erkrankungen spielt.

#### **4.6. Therapeutische Ansätze einer antiinflammatorischen Therapie**

Die Biologie von Monozyten, Rezeptoren des angeborenen Immunsystems sowie Zytokinen bei Nierenerkrankungen ist aufgrund der Fähigkeit sowohl Verletzungs- als auch Reparaturprozesse auszulösen sehr komplex, was die Identifizierung von spezifischen Therapiemöglichkeiten schwierig macht (191). Entsprechend mangelt es bisher an spezifischen Therapien, um die Progression chronischer Nierenerkrankungen zu verlangsamen oder gar zu verhindern (192). Da Entzündungsprozesse eine entscheidende Rolle bei der Entstehung und Progression einer chronischen Niereninsuffizienz spielen, stellen sie ein potenzielles therapeutisches Target dar. Der Nachweis der erhöhten Expression von NLRP3 und anderen Inflammasom-Bestandteilen bei CKD-Patienten, zusammen mit den oben dargestellten *in vivo* Ergebnissen unterschiedlicher Nierenschädigungsmodelle, legt nahe, dass auch eine therapeutische Modulation des NLRP3-Inflammasoms ein potenzielles therapeutisches Target darstellen könnte. Mögliche Ansatzpunkte für die Therapie von Inflammasom-vermittelten Erkrankungen sind eine Modulation der Inflammasom-Komponenten wie ASC und NLRP3, sowie deren Downstream-Targets Caspase-1, IL-1 $\beta$  und IL-18.

##### **4.6.1. NLRP3-Inhibitoren**

Das direkte Targeting von NLRP3 durch kleine Moleküle ist spezifisch, kostengünstig und weniger invasiv als die Blockade von Zytokinen mittels Antikörpern (193). Bisher wurden mehrere solcher Inhibitoren identifiziert. Ein möglicher Vorteil von spezifischen NLRP3-Inflammasom-Blockern gegenüber IL-1 $\beta$ -suppressiven Therapien besteht darin, dass NLRP3-spezifische Wirkstoffe ebenfalls die Expression von IL-18 beeinflussen könnten, aber dennoch die IL-1 $\beta$ -Aktivierung durch andere Inflammasome zulassen würden, was wichtig für die Reaktion auf Infektionen und andere zelluläre Prozesse ist (194).

###### **4.6.1.1. MCC950**

Die Diarylsulfonylharnstoff-Verbindung MCC950 ist der potenteste, der selektiven NLRP3-Inhibitoren (195, 196). MCC950 inhibiert spezifisch die kanonische und nicht-kanonische

Aktivierung von NLRP3-Inflammasomen in Makrophagen von Mäusen und Menschen *in vitro*, ohne die NLRP1-, NLRC4- und AIM2-Inflammasome oder TLR-vermittelten Signalwege zu beeinflussen. MCC950 reduziert die IL-1 $\beta$ -Produktion *in vivo* und reduzierte in einer Studie an Mäusen die Schwere einer Autoimmun-Enzephalomyelitis, sowie Letalität von Mäusen mit Kryopyrin-assoziiertem periodischem Syndrom (196). MCC950 ist nicht in der Lage, die Freisetzung von IL-1 $\alpha$  zu hemmen und den Zelltod als Reaktion auf partikuläre Stimuli zu verhindern, da diese Ereignisse NLRP3 unabhängig sind (197). Auch wenn der genaue Mechanismus der MCC950-vermittelten NLRP3-Hemmung nicht abschließend geklärt wurde, konnte in verschiedenen präklinischen Modellen eine therapeutische Wirksamkeit festgestellt werden; Hierzu gehören Atherosklerose, Diabetes mellitus und Myokardinfarkt (197–199). Obwohl diese Studien überzeugende Nachweise für die Wirksamkeit gegen NLRP3 liefern, wurde eine klinische Phase-II-Studie zu MCC950 bei Patienten mit rheumatoider Arthritis aufgrund von Lebertoxizität ausgesetzt (200). Aktuelle Studien untersuchen MCC950 ebenfalls in präklinischen Modellen der akuten und chronischen Niereninsuffizienz. In einem Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die Fibrose im Rahmen einer diätinduzierten Oxalatkristall-Nephropathie durch MCC950 abgeschwächt wurde (201). Darüber hinaus reduzierte es Nierenschäden und verbesserte den systemischen Blutdruck von Mäusen mit Deoxycortison-induzierter arterieller Hypertonie (202).

#### **4.6.1.2. C172**

C172, ein Inhibitor des Transmembran-Leitfähigkeitsregulierungskanals für Mukoviszidose (CFTR) und sein Analogon CY-09 wurden kürzlich als weitere NLRP3-Inhibitoren identifiziert (203). CY-09 hemmt spezifisch das NLRP3-Inflammasom, indem es an die ATP-bindende NACHT-Domäne von NLRP3 bindet und dessen ATPase-Aktivität und Oligomerisierung hemmt (203, 204). Da CY-09 keine CFTR-hemmende Aktivität aufweist und somit das Risiko für Nebenwirkungen verringert ist, sind klinische Studien in Planung (203, 205). In Mausmodellen des Kryopyrin-assoziierten autoinflammatorischen Syndroms (CAPS), Gicht und bei Typ-2-Diabetes zeigte CY-09 eine signifikante reduzierte NLRP3-Inflammasom-Aktivität (203). Spezifische Studien zu CY-09 bei chronischer Niereninsuffizienz gibt es bisher keine.

#### **4.6.1.3. Tranilast**

Tranilast, ein Tryptophan-Metaboliten Analogon, welches seit langer Zeit in verschiedenen asiatischen Ländern zur Behandlung von Allergien, Asthma und hypertrophen Narben

zugelassen ist, wurde ebenfalls kürzlich als NLRP3-Inhibitor beschrieben (206). Tranilast bindet wie CY-09 an die NACHT-Domäne von NLRP3 und hebt die NLRP3-NLRP3-Interaktion und damit eine NLRP3-Oligomerisierung auf, ohne jedoch dabei die ATPase-Aktivität zu beeinträchtigen. Hierdurch hemmt es spezifisch NLRP-Inflammasome, nicht jedoch AIM2- oder NLRC4-Inflammasome (207). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Tranilast auch die LPS-induzierte Freisetzung von Pro-IL-1 $\beta$  sowie IL-6 unterdrückt (208).

#### **4.6.1.4. Colchicin**

Colchicin ist ein pflanzliches Alkaloid, das seit Jahrhunderten zur Behandlung entzündlicher Erkrankungen wie Gicht eingesetzt wird (209). Es stört die Mikrotubuli-Polymerisation und beeinträchtigt dadurch die Neutrophilenfunktion (Adhäsion, Rekrutierung, Adhäsion) was zu einer Entzündungshemmung führt (210). Darüber hinaus besitzt Colchicin anti-fibrotische Eigenschaften (211). Es hat sich gezeigt, dass Colchicin die NLRP3-Inflammasom-Aktivität sowohl in tierexperimentellen, als auch in humanen Studien wirksam blockiert (212–214), teilweise indem es den intrazellulären Transport und die räumliche Anordnung von NLRP3 und ASC behindert (213). Colchicin bietet somit ein potenzielles therapeutisches Target bei CKD und Atherosklerose. In murinen Modellen konnte bei chronischer Cyclosporin-Nephrotoxizität eine Nephroprotektion durch Colchicin nachgewiesen werden (215, 216). Ebenfalls zeigte sich eine verringerte interstitielle Fibrose und Serum-Kreatinin beim Goodpasture-Syndrom (217). Weitere Studien belegten eine Vorbeugung einer chronischen Niereninsuffizienz bei Patienten mit Amyloid-Nephropathie im Rahmen eines familiären Mittelmeerfiebers (218), sowie verringerte interstitielle Fibrose nach Nieren-Allotransplantation (219). Es fehlen jedoch Studien zur genauen Wirkung von Colchicin auf das NLRP3-Inflammasom spezifisch bei CKD Patienten. Die kürzlich veröffentlichte COLCOT (Colchicin cardiovascular outcome)-Studie zeigte eine signifikante Verringerung der wiederkehrenden kardialen Ereignisse bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit und Low-Dose-Colchicin-Therapie (220). Colchicin bietet also sowohl bei der CKD als auch der Atherosklerose aussichtsreiche Therapiemöglichkeiten.

Viele andere direkte Inhibitoren, einschließlich MNS (221), OLT1177 (222), BOT-4-on (223), Parthenolid (224) und INF39 (204) beeinflussen die NLRP3-Inflammasom-Aktivität, indem sie dessen ATPase-Aktivität inhibieren. Sie wurden bisher jedoch nur *in vitro* und nicht *in vivo* in NLRP3-abhängigen Modellen getestet (203).



Ein Schwerpunkt der zukünftigen Forschung besteht somit darin, die molekularen Mechanismen der Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms besser zu verstehen, um somit wirksame NLRP3-Inhibitoren oder Hemmpfade zu identifizieren und deren therapeutisches Potenzial zu bewerten. Es fehlen Studien speziell zur Wirkung der verschiedenen Therapeutika bei chronischen Nierenerkrankungen.

#### **4.6.2. Biologicals**

IL-1 $\beta$ , das Effektorzytokin, bietet neben NLRP3-Antagonisten ebenfalls einen möglichen Ansatzpunkt für spezifische Therapien bei chronischen Nierenerkrankungen. Verschiedene auf IL-1 abzielende Medikamente wie Canakinumab, Anakinra, und Rilonacept wurden bereits an Patienten mit Nierenerkrankungen getestet. Die Antagonisierung von IL-1 $\beta$  hat verschiedene anti-entzündliche Effekte, wie eine Verbesserung der endothelialen Dysfunktion und des vaskulären oxidativen Stresses sowie eine Unterdrückung, von weiteren entzündlichen Zytokinen, einschließlich TNF- $\alpha$  und IL-6, welche lokale Entzündungsreaktionen und Nierenschädigungen verursachen können (225).

##### **4.6.2.1. Canakinumab**

Canakinumab ist ein humaner monoklonaler Antikörper mit hoher Affinität gegenüber IL-1 $\beta$  (226). Die 2018 veröffentlichte Canakinumab Anti-Inflammatory Thrombosis Outcome Studie (CANTOS) zur Inhibierung von IL-1 $\beta$  durch Canakinumab zeigte, bei Patienten mit manifester koronarer Herzkrankheit und anhaltender Erhöhung der CRP-Werte, eine Senkung der Rezidivraten von Myokardinfarkt und Schlaganfall und eine verringerte Inzidenz im Rahmen kardiovaskulärer Todesfälle in der Gruppe der mit Canakinumab-behandelten Patienten (227). Das Patientenkollektiv umfasste insgesamt 17200 Patienten. Somit handelt es sich bei CANTOS um eine der bislang größten Studien zu spezifischen antiinflammatorischen Therapien. Insgesamt gab es keinen Unterschied in der Gesamtmortalität zwischen den beiden Behandlungsgruppen. Gleichzeitig war die Therapie mit Canakinumab im Vergleich zur Placebogruppe mit einer erhöhten Häufigkeit tödlicher Infektionen assoziiert. Patienten mit schwerer chronischer Niereninsuffizienz (eGFR <30 ml/min pro 1,73m<sup>2</sup>) waren von der Studie ausgeschlossen (62). Post-hoc Analysen konnten jedoch zeigen, dass Canakinumab bei Patienten in frühen CKD-Stadien sicher und gut verträglich war. Insgesamt ließ sich kein positiver Effekt auf eine CKD-Progression nachweisen. Die Auswertung der CKD-Progression war jedoch kein primäres Ziel der Studie, somit gab es kein spezielles Patientenkollektiv mit Einschränkungen der Nierenfunktion, um die Chancen auf die Erfassung renaler Endpunkte zu

maximieren. Obwohl die Ergebnisse von CANTOS das Vorhandensein einer signifikanten Nierenschutzwirkungen nicht unterstützen, schließen sie diese aber auch nicht aus (228).

Aktuell ist das Medikament bei verschiedenen rheumatologischen Autoimmunerkrankungen sowie bei gewissen Formen des periodischen Fiebers zugelassen (229, 230). In einer weiteren randomisierten, Placebo kontrollierten Phase-IIb-Studie, reduzierte Canakinumab die systemische Entzündung (CRP, IL-6, Fibrinogen) bei Diabetikern mit hohem kardiovaskulärem Risiko (231).

#### **4.6.2.2. Anakinra**

Die Wirkung von IL-1 $\beta$  wird teilweise durch IL-1Ra reguliert. Es handelt sich hierbei um einen Glykoprotein-Inhibitor, der den IL-1-Rezeptor der Zelloberfläche mit hoher Affinität bindet, ohne ihn dabei zu aktivieren. Er konkurriert also mit dem IL-1 $\beta$ -Molekül um die Bindungsstelle (232). Bisher ist Anakinra der im klinischen Alltag am häufigsten verwendete IL-1R-Antagonist (233). Er ist zugelassen für die Therapie der rheumatoiden Arthritis und verbessert hier zusätzlich die linksventrikuläre sowie die vaskuläre Funktion (234). Anakinra verbessert ebenfalls die Glykämie und die Betazellsekretionsfunktion, zusätzlich verringert es die systemische Entzündung bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 (235). Da Anakinra hauptsächlich renal eliminiert wird, ist eine Dosisanpassung für Patienten mit schwerer Niereninsuffizienz notwendig (236). Eine Studie an 14 Hämodialysepatienten, konnte eine deutliche CRP- sowie IL-6-Reduktion bei Patienten nach Therapie mit Anakinra im Gegensatz zur Placebo-Kontrollgruppe feststellen (237).

#### **4.6.2.3. Rilonacept**

Rilonacept ist eine rekombinante Form des IL-1-Rezeptorkomplexes, welche durch das retikuloendotheliale System und renal eliminiert wird (238). In einer Studie konnte gezeigt werden, dass eine zwölfwöchige Therapie mit Rilonacept die systemische Entzündungsreaktion bei Patienten mit CKD G3-4 reduzierte und die vaskuläre Endothelfunktion verbesserte (239, 240).

Andere Wirkstoffe, darunter Gevokizumab (241), ein Anti-IL-1 $\beta$  monoklonaler Antikörper, GSK1070806 (242), ein IL-18-blockierender Antikörper und MABp1 (243), ein IL-1 $\alpha$ -neutralisierender Antikörper, befinden sich aktuell in der frühen Entwicklung (244).

Die bisherige Forschung hat gezeigt, dass Therapien welche auf IL-1 $\beta$  sowie anderen Zytokine der IL-1-Familie abzielen, ein großes Potential bei der Therapie von chronischen Nierenerkrankungen haben. Unsere Daten mit einer zunehmenden Inflammasom-Aktivierung bei bereits nur leichtgradig eingeschränkter Nierenfunktion zeigen, dass möglicherweise gerade Patienten in frühen Krankheitsstadien von einer die Inflammasom-Aktivität modulierenden Therapie profitieren könnten und sich so möglicherweise auch eine Reduktion der CKD-Progression erzielen lassen könnte.

#### **4.7. Limitationen**

Die vorliegende Studie erfolgte an kaukasischen Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz und gesunden Probanden. Deshalb lassen sich die Ergebnisse nicht auf andere ethnische Gruppen übertragen. Allerdings zeichnete sich das Patientenkollektiv durch das Vorliegen typischer Risikofaktoren und Begleiterkrankungen der chronischen Niereninsuffizienz in den Industrieländern aus und stellt damit eine repräsentative Studienpopulation dar. Die Daten zeigen erstmals, dass in Monozyten von Patienten mit Niereninsuffizienz eine Inflammasom-Aktivierung vorliegt. Die zugrundeliegenden Mechanismen wurden im Rahmen der Studie nicht geklärt. Die Stimulation der isolierten Monozyten erfolgte mit bekannten Inflammasom-Aktivatoren. Welche endogenen DAMPs bei Niereninsuffizienz hierfür verantwortlich sind, war nicht Gegenstand der aktuellen Studie und bleibt nachfolgenden Studien vorbehalten. Die Studie war als Querschnittsstudie angelegt, deshalb können die gewonnen Daten nicht nachweisen, ob die Inflammasom-Aktivität mit der Progression der Niereninsuffizienz oder dem Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse bei diesen Patienten assoziiert ist. Bei Patienten im Stadium G1-2 der Niereninsuffizienz zeigte sich nach Stimulation der Monozyten mit den Inflammasom-Aktivatoren ein Trend hin zu einer erhöhten IL-1 $\beta$ -Sekretion. Allerdings war dieser Unterschied aufgrund einer zu geringen Patientenzahl in dieser Gruppe nicht signifikant.

#### **4.8. Ausblick und Zusammenfassung**

Verschiedene Faktoren können zu einer Dysregulation des Immunsystems und einer entzündlichen Aktivierung im Rahmen chronischer Nierenerkrankungen beitragen. Das NLRP3-Inflammasom wird zunehmend als integraler Bestandteil der Pathogenese solcher Nierenerkrankungen und ihrer Komplikationen erkannt. Diese Studie konnte zeigen, dass Monozyten von Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz vermehrt IL-1 $\beta$  und die Inflammasom-Komponenten NLRP3 und ASC exprimieren. Gleichzeitig sezernieren diese nach Stimulation mit bekannten NLRP3-Aktivatoren im Vergleich zu einer gesunden

Kontrollgruppe vermehrt IL-1 $\beta$ . Es handelt sich hierbei um die erste Studie an Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz, die einen Zusammenhang zwischen der Nierenfunktion und einer NLRP3-Inflammasom-Aktivierung zeigt. Diese Arbeit leistet somit einen wichtigen Beitrag für weitere Studien zur Inflammasom-Biologie in der Nephrologie. Von entscheidender Bedeutung wird es sein, DAMPs und die zugrundeliegenden zellulären Signalwege zu identifizieren, die bei der Niereninsuffizienz zur Inflammasom-Aktivierung führen. Das therapeutische Targeting spezifischer Zytokine bei chronischen Nierenerkrankungen stellt ein attraktives Ziel dar, insbesondere da spezifische Anti-IL-1 $\beta$ -Therapien bereits unter anderen Bedingungen entwickelt und getestet wurden und im klinischen Alltag im Rahmen verschiedener Erkrankungen Anwendung finden. Neben IL-1 $\beta$  als möglichem Therapieansatz könnte auch eine direkte Inhibition von NLRP3 als neue gezielte anti-inflammatorische Therapie bei Nierenkranken erfolgsversprechend sein.

## 5. Literaturverzeichnis

1. Levey AS, Coresh J. Chronic kidney disease. *The Lancet* 2012; 379(9811):165–80.
2. Eknoyan G, Lameire N, Barsoum R, Eckardt K-U, Levin A, Levin N et al. The burden of kidney disease: Improving global outcomes. *Kidney Int* 2004; (66):1310–4.
3. Johnson RJ, Nakagawa T, Jalal D, Sánchez-Lozada LG, Kang D-H, Ritz E. Uric acid and chronic kidney disease: Which is chasing which? *Nephrol Dial Transplant* 2013; 28(9):2221–8.
4. Levey AS, Eckardt K-U, Tsukamoto Y, Levin A, Coresh J, Rossert J et al. Definition and classification of chronic kidney disease: A position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int* 2005; 67(6):2089–100.
5. Polkinghorne K. *Controversies in Chronic Kidney Disease Staging*: Monash University; 2011.
6. Levey AS, Coresh J, Balk E, Kausz AT, Levin A, Steffes MW et al. National Kidney Foundation practice guidelines for chronic kidney disease: Evaluation, classification, and stratification. *Ann Intern Med* 2003; 139(2):137–47.
7. Stevens LA, Coresh J, Greene T, Levey AS. Assessing kidney function--measured and estimated glomerular filtration rate. *N Engl J Med* 2006; 354(23):2473–83.
8. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney Int Suppl* 2013.
9. Lewerin C, Ljungman S, Nilsson-Ehle H. Glomerular filtration rate as measured by serum cystatin C is an important determinant of plasma homocysteine and serum methylmalonic acid in the elderly. *J Intern Med* 2007; 261(1):65–73.
10. Bommer J. Prevalence and socio-economic aspects of chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17 Suppl 11:8–12.
11. Snively CS, Gutierrez C. Chronic kidney disease: Prevention and treatment of common complications. *Am Fam Physician* 2004; 70(10):1921–8.
12. Eriksen BO, Ingebretsen OC. The progression of chronic kidney disease: A 10-year population-based study of the effects of gender and age. *Kidney Int* 2006; 69(2):375–82.
13. Lysaght MJ. Maintenance dialysis population dynamics: Current trends and long-term implications. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13 Suppl 1:S37-40.
14. Jain P, Cockwell P, Little J, Ferring M, Nicholas J, Richards N et al. Survival and transplantation in end-stage renal disease: A prospective study of a multiethnic population. *Nephrol Dial Transplant* 2009; 24(12):3840–6.
15. Clinical Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification and Stratification Part 2. Background. *American Journal of Kidney Diseases* 2002; 39(2):S32-S36.
16. Zewinger S, Schumann T, Fliser D, Speer T. Innate immunity in CKD-associated vascular diseases. *Nephrol Dial Transplant* 2016; 31(11):1813–21.
17. Sarnak MJ, Levey AS, Schoolwerth AC, Coresh J, Culeton B, Hamm LL et al. Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular disease: A statement from the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention. *Hypertension* 2003; 42(5):1050–65.

18. Mann JFE, Gerstein HC, Pogue J, Bosch J, Yusuf S. Renal Insufficiency as a Predictor of Cardiovascular Outcomes and the Impact of Ramipril: The HOPE Randomized Trial. *Ann Intern Med* 2001; 134(8):629.
19. O'Donnell CJ, Elosua R. Cardiovascular Risk Factors. Insights From Framingham Heart Study. *Revista Española de Cardiología (English Edition)* 2008; 61(3):299–310.
20. Anderson KM, Wilson PW, Odell PM, Kannel WB. An updated coronary risk profile. A statement for health professionals. *Circulation* 1991; 83(1):356–62.
21. Ulmer H, Kelleher C, Diem G, Concin H. Long-term tracking of cardiovascular risk factors among men and women in a large population-based health system: The Vorarlberg Health Monitoring & Promotion Programme. *Eur Heart J* 2003; 24(11):1004–13.
22. Süleymanlar G, Utaş C, Arinsoy T, Ateş K, Altun B, Altıparmak MR et al. A population-based survey of Chronic REnal Disease In Turkey--the CREDIT study. *Nephrol Dial Transplant* 2011; 26(6):1862–71.
23. McClellan WM, Flanders WD. Risk factors for progressive chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14(7 Suppl 2):S65-70.
24. Vikse BE, Irgens LM, Leivestad T, Skjaerven R, Iversen BM. Preeclampsia and the risk of end-stage renal disease. *N Engl J Med* 2008; 359(8):800–9.
25. Falodia J, Singla MK. CKD epidemiology and risk factors. *Clinical Queries: Nephrology* 2012; 1(4):249–52.
26. Mirrakhimov AE. Obstructive sleep apnea and kidney disease: Is there any direct link? *Sleep Breath* 2012; 16(4):1009–16.
27. Tsai W-C, Wu H-Y, Peng Y-S, Ko M-J, Wu M-S, Hung K-Y et al. Risk Factors for Development and Progression of Chronic Kidney Disease: A Systematic Review and Exploratory Meta-Analysis. *Medicine* 2016; 95(11):e3013.
28. Prunotto M, Moll S. The emerging concept of a fibrotic microenvironment in CKD. *Kidney Int* 2011; 79(1):135; author reply 135.
29. Kanbay M, Yerlikaya A, Sag AA, Ortiz A, Kuwabara M, Covic A et al. A journey from microenvironment to macroenvironment: The role of metaflammation and epigenetic changes in cardiorenal disease. *Clin Kidney J* 2019; 12(6):861–70.
30. Groß U. *Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2009.
31. Anders H-J, Banas B, Schlöndorff D. Signaling danger: Toll-like receptors and their potential roles in kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15(4):854–67.
32. Fearon DT, Locksley RM. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* 1996; 272(5258):50–3.
33. Iwasaki A, Medzhitov R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science* 2010; 327(5963):291–5.
34. Janeway CA, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002; 20:197–216.
35. Breedveld A, Groot Kormelink T, van Egmond M, Jong EC de. Granulocytes as modulators of dendritic cell function. *J Leukoc Biol* 2017.
36. Tosi MF. Innate immune responses to infection. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116(2):241-9; quiz 250.

37. Smyth MJ, Cretney E, Kelly JM, Westwood JA, Street SEA, Yagita H et al. Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol Immunol* 2005; 42(4):501–10.
38. Bonavia A, Singbartl K. A review of the role of immune cells in acute kidney injury. *Pediatr Nephrol* 2017.
39. Takeuchi O, Akira S. Pattern Recognition and Inflammation. *Cell* 2010; 140(6):805–20.
40. Leemans JC, Kors L, Anders H-J, Florquin S. Pattern recognition receptors and the inflammasome in kidney disease. *Nat Rev Nephrol* 2014; 10(7):398–414.
41. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006; 124(4):783–801.
42. Lamkanfi M, Dixit VM. Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell* 2014; 157(5):1013–22.
43. Chu J-Q, Shi G, Fan Y-M, Choi I-W, Cha G-H, Zhou Y et al. Production of IL-1 $\beta$  and Inflammasome with Up-Regulated Expressions of NOD-Like Receptor Related Genes in *Toxoplasma gondii*-Infected THP-1 Macrophages. *Korean J Parasitol* 2016; 54(6):711–7.
44. Latz E, Xiao TS, Stutz A. Activation and regulation of the inflammasomes. *Nat Rev Immunol* 2013; 13(6):397–411.
45. Yiu WH, Lin M, Tang SCW. Toll-like receptor activation: From renal inflammation to fibrosis. *Kidney Int Suppl (2011)* 2014; 4(1):20–5.
46. Sutterwala FS, Haasken S, Cassel SL. Mechanism of NLRP3 inflammasome activation. *Ann N Y Acad Sci* 2014; 1319:82–95.
47. Franchi L, Eigenbrod T, Muñoz-Planillo R, Nuñez G. The inflammasome: A caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis. *Nat Immunol* 2009; 10(3):241–7.
48. Shaw PJ, Lamkanfi M, Kanneganti T-D. NOD-like receptor (NLR) signaling beyond the inflammasome. *Eur J Immunol* 2010; 40(3):624–7.
49. Tang D, Kang R, Coyne CB, Zeh HJ, Lotze MT. PAMPs and DAMPs: Signal Os that spur autophagy and immunity. *Immunol Rev* 2012; 249(1):158–75.
50. Vanaja SK, Rathinam VAK, Fitzgerald KA. Mechanisms of inflammasome activation: Recent advances and novel insights. *Trends Cell Biol* 2015; 25(5):308–15.
51. Darisipudi MN, Knauf F. An update on the role of the inflammasomes in the pathogenesis of kidney diseases. *Pediatr Nephrol* 2016; 31(4):535–44.
52. Latz E. The inflammasomes: Mechanisms of activation and function. *Curr Opin Immunol* 2010; 22(1):28–33.
53. Anders H-J, Muruve DA. The inflammasomes in kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2011; 22(6):1007–18.
54. Zoete MR de, Palm NW, Zhu S, Flavell RA. Inflammasomes. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2014; 6(12):a016287.
55. Jo E-K, Kim JK, Shin D-M, Sasakawa C. Molecular mechanisms regulating NLRP3 inflammasome activation. *Cell Mol Immunol* 2016; 13(2):148–59.
56. Tózsér J, Benkő S. Natural Compounds as Regulators of NLRP3 Inflammasome-Mediated IL-1 $\beta$  Production. *Mediators Inflamm* 2016; 2016:5460302.

57. Garlanda C, Dinarello CA, Mantovani A. The interleukin-1 family: Back to the future. *Immunity* 2013; 39(6):1003–18.
58. Lopez-Castejon G, Brough D. Understanding the mechanism of IL-1 $\beta$  secretion. *Cytokine Growth Factor Rev* 2011; 22(4):189–95.
59. Anders H-J. Of Inflammasomes and Alarmins: IL-1 $\beta$  and IL-1 $\alpha$  in Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol* 2016; 27(9):2564–75.
60. Feghali CA, Wright TM. Cytokines in acute and chronic inflammation. *Front Biosci* 1997; 2:d12-26.
61. Lee BT, Ahmed FA, Hamm LL, Teran FJ, Chen C-S, Liu Y et al. Association of C-reactive protein, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-6 with chronic kidney disease. *BMC Nephrol* 2015; 16:77.
62. Ridker PM, MacFadyen JG, Glynn RJ, Koenig W, Libby P, Everett BM et al. Inhibition of Interleukin-1 $\beta$  by Canakinumab and Cardiovascular Outcomes in Patients With Chronic Kidney Disease. *J Am Coll Cardiol* 2018; 71(21):2405–14.
63. Su H, Lei C-T, Zhang C. Interleukin-6 Signaling Pathway and Its Role in Kidney Disease: An Update. *Front Immunol* 2017; 8:405.
64. Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol* 2009; 27:519–50.
65. Dinarello CA. The role of the interleukin-1-receptor antagonist in blocking inflammation mediated by interleukin-1. *N Engl J Med* 2000; 343(10):732–4.
66. Furuichi K, Wada T, Iwata Y, Kokubo S, Hara A, Yamahana J et al. Interleukin-1-dependent sequential chemokine expression and inflammatory cell infiltration in ischemia-reperfusion injury. *Crit Care Med* 2006; 34(9):2447–55.
67. Haq M, Norman J, Saba SR, Ramirez G, Rabb H. Role of IL-1 in renal ischemic reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9(4):614–9.
68. Ratsimandresy RA, Dorfleutner A, Stehlik C. An Update on PYRIN Domain-Containing Pattern Recognition Receptors: From Immunity to Pathology. *Front Immunol* 2013; 4:440.
69. Dinarello CA. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood* 2011; 117(14):3720–32.
70. Stoffels M, Zaal R, Kok N, van der Meer JWM, Dinarello CA, Simon A. ATP-Induced IL-1 $\beta$  Specific Secretion: True Under Stringent Conditions. *Front Immunol* 2015; 6:54.
71. Gardella S, Andrei C, Costigliolo S, Olcese L, Zocchi MR, Rubartelli A. Secretion of bioactive interleukin-1beta by dendritic cells is modulated by interaction with antigen specific T cells. *Blood* 2000; 95(12):3809–15.
72. Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, Chapman KT, Howard AD, Kostura MJ et al. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* 1992; 356(6372):768–74.
73. Dubyak GR. P2X7 receptor regulation of non-classical secretion from immune effector cells. *Cell Microbiol* 2012; 14(11):1697–706.
74. Carta S, Tassi S, Semino C, Fossati G, Mascagni P, Dinarello CA et al. Histone deacetylase inhibitors prevent exocytosis of interleukin-1beta-containing secretory lysosomes: Role of microtubules. *Blood* 2006; 108(5):1618–26.



75. MacKenzie A, Wilson HL, Kiss-Toth E, Dower SK, North RA, Surprenant A. Rapid Secretion of Interleukin-1 $\beta$  by Microvesicle Shedding. *Immunity* 2001; 15(5):825–35.
76. Qu Y, Franchi L, Nunez G, Dubyak GR. Nonclassical IL-1 beta secretion stimulated by P2X7 receptors is dependent on inflammasome activation and correlated with exosome release in murine macrophages. *J Immunol* 2007; 179(3):1913–25.
77. Dupont N, Jiang S, Pilli M, Ornatowski W, Bhattacharya D, Deretic V. Autophagy-based unconventional secretory pathway for extracellular delivery of IL-1 $\beta$ . *EMBO J* 2011; 30(23):4701–11.
78. Brough D, Rothwell NJ. Caspase-1-dependent processing of pro-interleukin-1beta is cytosolic and precedes cell death. *J Cell Sci* 2007; 120(Pt 5):772–81.
79. Awad F, Assrawi E, Jumeau C, Georgin-Lavialle S, Cobret L, Duquesnoy P et al. Impact of human monocyte and macrophage polarization on NLR expression and NLRP3 inflammasome activation. *PLoS ONE* 2017; 12(4):e0175336.
80. Verkade MA, van Druningen CJ, Vaessen LMB, Hesselink DA, Weimar W, Betjes MGH. Functional impairment of monocyte-derived dendritic cells in patients with severe chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 2007; 22(1):128–38.
81. Xia M, Boini KM, Abais JM, Xu M, Zhang Y, Li P-L. Endothelial NLRP3 inflammasome activation and enhanced neointima formation in mice by adipokine visfatin. *Am J Pathol* 2014; 184(5):1617–28.
82. Mirjam K, Broos CE. Immunological Manifestations in Sarcoidosis. In: Kohl B, editor. *Sarcoidosis*: Elsevier; 2019. p. 37–54.
83. Guermonprez P, Helft J. Inflammasome activation: A monocyte lineage privilege. *Nat Immunol* 2019; 20(4):383–5.
84. Ramírez R, Carracedo J, Merino A, Soriano S, Ojeda R, Alvarez-Lara MA et al. CD14+CD16+ monocytes from chronic kidney disease patients exhibit increased adhesion ability to endothelial cells. *Contrib Nephrol* 2011; 171:57–61.
85. Bowe B, Xie Y, Xian H, Li T, Al-Aly Z. Association between Monocyte Count and Risk of Incident CKD and Progression to ESRD. *Clin J Am Soc Nephrol* 2017; 12(4):603–13.
86. Cao Q, Wang Y, Harris DCH. Pathogenic and protective role of macrophages in kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 2013; 305(1):F3-11.
87. Guiteras R, Flaquer M, Cruzado JM. Macrophage in chronic kidney disease. *Clin Kidney J* 2016; 9(6):765–71.
88. Atkins R, Glasgow E, Holdsworth S, Matthews F. THE MACROPHAGE IN HUMAN RAPIDLY PROGRESSIVE GLOMERULONEPHRITIS. *The Lancet* 1976; 307(7964):830–2.
89. Ricardo SD, van Goor H, Eddy AA. Macrophage diversity in renal injury and repair. *J Clin Invest* 2008; 118(11):3522–30.
90. Netea MG, Nold-Petry CA, Nold MF, Joosten LAB, Opitz B, van der Meer JHM et al. Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1beta in monocytes and macrophages. *Blood* 2009; 113(10):2324–35.
91. Wang X, Gong P, Zhang X, Wang J, Tai L, Wang X et al. NLRP3 inflammasome activation in murine macrophages caused by *Neospora caninum* infection. *Parasit Vectors* 2017; 10(1):266.
92. Carvalho RVH de, Silva ALN, Santos LL, Andrade WA, Sá KSG de, Zamboni DS. Macrophage priming is dispensable for NLRP3 inflammasome activation and restriction of *Leishmania amazonensis* replication. *J Leukoc Biol* 2019; 106(3):631–40.

93. Kim JU, Kim M, Kim S, Nguyen TT, Kim E, Lee S et al. Dendritic Cell Dysfunction in Patients with End-stage Renal Disease. *Immune Netw* 2017; 17(3):152–62.
94. Hochheiser K, Tittel A, Kurts C. Kidney dendritic cells in acute and chronic renal disease. *Int J Exp Pathol* 2011; 92(3):193–201.
95. Soos TJ, Sims TN, Barisoni L, Lin K, Littman DR, Dustin ML et al. CX3CR1+ interstitial dendritic cells form a contiguous network throughout the entire kidney. *Kidney Int* 2006; 70(3):591–6.
96. Shahzad K, Bock F, Dong W, Wang H, Kopf S, Kohli S et al. Nlrp3-inflammasome activation in non-myeloid-derived cells aggravates diabetic nephropathy. *Kidney Int* 2015; 87(1):74–84.
97. Wang J, Wen Y, Lv L-l, Liu H, Tang R-n, Ma K-l et al. Involvement of endoplasmic reticulum stress in angiotensin II-induced NLRP3 inflammasome activation in human renal proximal tubular cells in vitro. *Acta Pharmacol Sin* 2015; 36(7):821–30.
98. Lichtnekert J, Kulkarni OP, Mulay SR, Rupanagudi KV, Ryu M, Allam R et al. Anti-GBM glomerulonephritis involves IL-1 but is independent of NLRP3/ASC inflammasome-mediated activation of caspase-1. *PLoS ONE* 2011; 6(10):e26778.
99. Gauer S, Sichler O, Obermüller N, Holzmann Y, Kiss E, Sobkowiak E et al. IL-18 is expressed in the intercalated cell of human kidney. *Kidney Int* 2007; 72(9):1081–7.
100. Duncan JA, Bergstralh DT, Wang Y, Willingham SB, Ye Z, Zimmermann AG et al. Cryopyrin/NALP3 binds ATP/dATP, is an ATPase, and requires ATP binding to mediate inflammatory signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104(19):8041–6.
101. Chen Y, Corriden R, Inoue Y, Yip L, Hashiguchi N, Zinkernagel A et al. ATP release guides neutrophil chemotaxis via P2Y2 and A3 receptors. *Science* 2006; 314(5806):1792–5.
102. Birch RE, Schwiebert EM, Peppiatt-Wildman CM, Wildman SS. Emerging key roles for P2X receptors in the kidney. *Front Physiol* 2013; 4:262.
103. Solini A, Uselli V, Fiorina P. The dark side of extracellular ATP in kidney diseases. *J Am Soc Nephrol* 2015; 26(5):1007–16.
104. Vénéreau E, Ceriotti C, Bianchi ME. DAMPs from Cell Death to New Life. *Front Immunol* 2015; 6:422.
105. Idzko M, Ferrari D, Eltzschig HK. Nucleotide signalling during inflammation. *Nature* 2014; 509(7500):310–7.
106. Leurs P, Lindholm B. The AGE-RAGE pathway and its relation to cardiovascular disease in patients with chronic kidney disease. *Arch Med Res* 2013; 44(8):601–10.
107. Chen Q, Guan X, Zuo X, Wang J, Yin W. The role of high mobility group box 1 (HMGB1) in the pathogenesis of kidney diseases. *Acta Pharm Sin B* 2016; 6(3):183–8.
108. Bianchi ME. HMGB1 loves company. *J Leukoc Biol* 2009; 86(3):573–6.
109. Yang H, Tracey KJ. Targeting HMGB1 in inflammation. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1799(1-2):149–56.
110. Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, Che J et al. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science* 1999; 285(5425):248–51.
111. Yang D, Chen Q, Yang H, Tracey KJ, Bustin M, Oppenheim JJ. High mobility group box-1 protein induces the migration and activation of human dendritic cells and acts as an alarmin. *J Leukoc Biol* 2007; 81(1):59–66.

112. Park JS, Gamboni-Robertson F, He Q, Svetkauskaite D, Kim J-Y, Strassheim D et al. High mobility group box 1 protein interacts with multiple Toll-like receptors. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006; 290(3):C917-24.
113. Hori O, Brett J, Slattery T, Cao R, Zhang J, Chen JX et al. The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a cellular binding site for amphotericin. Mediation of neurite outgrowth and co-expression of RAGE and amphotericin in the developing nervous system. *J Biol Chem* 1995; 270(43):25752-61.
114. Schneider M, Hansen JL, Sheikh SP. S100A4: A common mediator of epithelial-mesenchymal transition, fibrosis and regeneration in diseases? *J Mol Med* 2008; 86(5):507-22.
115. Lindholm B. Serum S100A12: A Risk Marker or Risk Factor of Vascular Calcification in Chronic Kidney Disease. *Am J Nephrol* 2015; 42(1):1-3.
116. Ehrchen JM, Sunderkötter C, Foell D, Vogl T, Roth J. The endogenous Toll-like receptor 4 agonist S100A8/S100A9 (calprotectin) as innate amplifier of infection, autoimmunity, and cancer. *J Leukoc Biol* 2009; 86(3):557-66.
117. Foell D, Wittkowski H, Vogl T, Roth J. S100 proteins expressed in phagocytes: A novel group of damage-associated molecular pattern molecules. *J Leukoc Biol* 2007; 81(1):28-37.
118. Hofmann MA, Drury S, Fu C, Qu W, Taguchi A, Lu Y et al. RAGE mediates a novel proinflammatory axis: A central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell* 1999; 97(7):889-901.
119. Shi Y, Evans JE, Rock KL. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature* 2003; 425(6957):516-21.
120. Shi Y, Chen W, Jalal D, Li Z, Chen W, Mao H et al. Clinical outcome of hyperuricemia in IgA nephropathy: A retrospective cohort study and randomized controlled trial. *Kidney Blood Press Res* 2012; 35(3):153-60.
121. Altemtam N, Russell J, El Nahas M. A study of the natural history of diabetic kidney disease (DKD). *Nephrol Dial Transplant* 2012; 27(5):1847-54.
122. Sánchez-Lozada LG, Tapia E, Santamaría J, Avila-Casado C, Soto V, Nepomuceno T et al. Mild hyperuricemia induces vasoconstriction and maintains glomerular hypertension in normal and remnant kidney rats. *Kidney Int* 2005; 67(1):237-47.
123. Martinon F, Pétrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* 2006; 440(7081):237-41.
124. Calderwood SK, Mambula SS, Gray PJ. Extracellular heat shock proteins in cell signaling and immunity. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1113:28-39.
125. Henderson B. Integrating the cell stress response: A new view of molecular chaperones as immunological and physiological homeostatic regulators. *Cell Biochem Funct* 2010; 28(1):1-14.
126. Joly A-L, Wettstein G, Mignot G, Ghiringhelli F, Garrido C. Dual role of heat shock proteins as regulators of apoptosis and innate immunity. *J Innate Immun* 2010; 2(3):238-47.
127. Musiał K, Zwolińska D. Heat shock proteins in chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol* 2011; 26(7):1031-7.
128. Martine P, Chevriaux A, Derangère V, Apetoh L, Garrido C, Ghiringhelli F et al. HSP70 is a negative regulator of NLRP3 inflammasome activation. *Cell Death Dis* 2019; 10(4):256.

129. Freedman BR, Bade ND, Riggin CN, Zhang S, Haines PG, Ong KL et al. The (dys)functional extracellular matrix. *Biochim Biophys Acta* 2015; 1853(11 Pt B):3153–64.
130. Schaefer L. Extracellular matrix molecules: Endogenous danger signals as new drug targets in kidney diseases. *Curr Opin Pharmacol* 2010; 10(2):185–90.
131. Kono H, Rock KL. How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunol* 2008; 8(4):279–89.
132. Babelova A, Moreth K, Tsalastra-Greul W, Zeng-Brouwers J, Eickelberg O, Young MF et al. Biglycan, a danger signal that activates the NLRP3 inflammasome via toll-like and P2X receptors. *J Biol Chem* 2009; 284(36):24035–48.
133. Djurdjaj S, Boor P. Cellular and molecular mechanisms of kidney fibrosis. *Mol Aspects Med* 2019; 65:16–36.
134. Barnes JL, Glass li WF. Renal interstitial fibrosis: A critical evaluation of the origin of myofibroblasts. *Contrib Nephrol* 2011; 169:73–93.
135. Sano H, Hsu DK, Yu L, Apgar JR, Kuwabara I, Yamanaka T et al. Human galectin-3 is a novel chemoattractant for monocytes and macrophages. *J Immunol* 2000; 165(4):2156–64.
136. Fredholm BB. Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair. *Cell Death Differ* 2007; 14(7):1315–23.
137. Serafini-Cessi F, Malagolini N, Cavallone D. Tamm-Horsfall glycoprotein: Biology and clinical relevance. *Am J Kidney Dis* 2003; 42(4):658–76.
138. Vyletal P, Bleyer AJ, Kmoch S. Uromodulin biology and pathophysiology--an update. *Kidney Blood Press Res* 2010; 33(6):456–75.
139. Darisipudi MN, Thomasova D, Mulay SR, Brech D, Noessner E, Liapis H et al. Uromodulin triggers IL-1 $\beta$ -dependent innate immunity via the NLRP3 inflammasome. *J Am Soc Nephrol* 2012; 23(11):1783–9.
140. Prajczek S, Heidenreich U, Pfaller W, Kotanko P, Lhotta K, Jennings P. Evidence for a role of uromodulin in chronic kidney disease progression. *Nephrol Dial Transplant* 2010; 25(6):1896–903.
141. Zewinger S, Reiser J, Jankowski V, Alansary D, Hahm E, Triem S et al. Apolipoprotein C3 induces inflammation and organ damage by alternative inflammasome activation. *Nat Immunol* 2020; 21(1):30–41.
142. Vesey DA, Cheung CWY, Cuttle L, Endre ZA, Gobé G, Johnson DW. Interleukin-1beta induces human proximal tubule cell injury, alpha-smooth muscle actin expression and fibronectin production. *Kidney Int* 2002; 62(1):31–40.
143. Jones LK, O'Sullivan KM, Semple T, Kuligowski MP, Fukami K, Ma FY et al. IL-1RI deficiency ameliorates early experimental renal interstitial fibrosis. *Nephrol Dial Transplant* 2009; 24(10):3024–32.
144. Johnson RJ. Cytokines, growth factors and renal injury: Where do we go now? *Kidney Int Suppl* 1997; 63:S2-6.
145. Mezzano SA, Droguett MA, Burgos ME, Ardiles LG, Aros CA, Caorsi I et al. Overexpression of chemokines, fibrogenic cytokines, and myofibroblasts in human membranous nephropathy. *Kidney Int* 2000; 57(1):147–58.
146. Vilaysane A, Chun J, Seamone ME, Wang W, Chin R, Hirota S et al. The NLRP3 inflammasome promotes renal inflammation and contributes to CKD. *J Am Soc Nephrol* 2010; 21(10):1732–44.

147. Noble R, Taal MW. Epidemiology and causes of chronic kidney disease. *Medicine* 2019; 47(9):562–6.
148. Nguyen D, Ping F, Mu W, Hill P, Atkins RC, Chadban SJ. Macrophage accumulation in human progressive diabetic nephropathy. *Nephrology (Carlton)* 2006; 11(3):226–31.
149. Fu Y, Wu N, Zhao D. Function of NLRP3 in the Pathogenesis and Development of Diabetic Nephropathy. *Med Sci Monit* 2017; 23:3878–84.
150. Wu M, Han W, Song S, Du Y, Liu C, Chen N et al. NLRP3 deficiency ameliorates renal inflammation and fibrosis in diabetic mice. *Mol Cell Endocrinol* 2018; 478:115–25.
151. Lee H-M, Kim J-J, Kim HJ, Shong M, Ku BJ, Jo E-K. Upregulated NLRP3 inflammasome activation in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 2013; 62(1):194–204.
152. Iyer SS, Pulsikens WP, Sadler JJ, Butter LM, Teske GJ, Ulland TK et al. Necrotic cells trigger a sterile inflammatory response through the Nlrp3 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106(48):20388–93.
153. Leemans JC, Cassel SL, Sutterwala FS. Sensing damage by the NLRP3 inflammasome. *Immunol Rev* 2011; 243(1):152–62.
154. Wu H, Craft ML, Wang P, Wyburn KR, Chen G, Ma J et al. IL-18 Contributes to Renal Damage after Ischemia-Reperfusion. *J Am Soc Nephrol* 2008; 19(12):2331–41.
155. Melnikov VY, Ecder T, Fantuzzi G, Siegmund B, Lucia MS, Dinarello CA et al. Impaired IL-18 processing protects caspase-1-deficient mice from ischemic acute renal failure. *J Clin Invest* 2001; 107(9):1145–52.
156. Coca SG, Yalavarthy R, Concato J, Parikh CR. Biomarkers for the diagnosis and risk stratification of acute kidney injury: A systematic review. *Kidney Int* 2008; 73(9):1008–16.
157. Kim H-J, Lee DW, Ravichandran K, O Keys D, Akcay A, Nguyen Q et al. NLRP3 inflammasome knockout mice are protected against ischemic but not cisplatin-induced acute kidney injury. *J Pharmacol Exp Ther* 2013; 346(3):465–72.
158. Gonçalves RG, Gabrich L, Rosário A, Takiya CM, Ferreira MLL, Chiarini LB et al. The role of purinergic P2X7 receptors in the inflammation and fibrosis of unilateral ureteral obstruction in mice. *Kidney Int* 2006; 70(9):1599–606.
159. Harper SN, Leidig PD, Hughes Jr FM, Jin H, Purves JT. <p>Calcium Pyrophosphate And Monosodium Urate Activate The NLRP3 Inflammasome Within Bladder Urothelium Via Reactive Oxygen Species And TXNIP</p>. *RRU* 2019; Volume 11:319–25.
160. Mulay SR, Kulkarni OP, Rupanagudi KV, Migliorini A, Darisipudi MN, Vilaysane A et al. Calcium oxalate crystals induce renal inflammation by NLRP3-mediated IL-1 $\beta$  secretion. *J Clin Invest* 2013; 123(1):236–46.
161. Isaka Y, Takabatake Y, Takahashi A, Saitoh T, Yoshimori T. Hyperuricemia-induced inflammasome and kidney diseases. *Nephrol Dial Transplant* 2016; 31(6):890–6.
162. Obermayr RP, Temml C, Gutjahr G, Knechtelsdorfer M, Oberbauer R, Klausner-Braun R. Elevated uric acid increases the risk for kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2008; 19(12):2407–13.
163. Sánchez-Lozada LG, Tapia E, Avila-Casado C, Soto V, Franco M, Santamaría J et al. Mild hyperuricemia induces glomerular hypertension in normal rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002; 283(5):F1105–10.

164. Knauf F, Asplin JR, Granja I, Schmidt IM, Moeckel GW, David RJ et al. NALP3-mediated inflammation is a principal cause of progressive renal failure in oxalate nephropathy. *Kidney Int* 2013; 84(5):895–901.
165. Gris D, Ye Z, Iocca HA, Wen H, Craven RR, Gris P et al. NLRP3 plays a critical role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis by mediating Th1 and Th17 responses. *J Immunol* 2010; 185(2):974–81.
166. Joosten LAB, Netea MG, Dinarello CA. Interleukin-1 $\beta$  in innate inflammation, autophagy and immunity. *Semin Immunol* 2013; 25(6):416–24.
167. Ooi JD, Chang J, O'Sullivan KM, Pedchenko V, Hudson BG, Vandenberg AA et al. The HLA-DRB1\*15:01-restricted Goodpasture's T cell epitope induces GN. *J Am Soc Nephrol* 2013; 24(3):419–31.
168. Ooi JD, Chang J, Hickey MJ, Borza D-B, Fugger L, Holdsworth SR et al. The immunodominant myeloperoxidase T-cell epitope induces local cell-mediated injury in antimyeloperoxidase glomerulonephritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109(39):E2615-24.
169. Okamoto A, Fujio K, Tsuno NH, Takahashi K, Yamamoto K. Kidney-infiltrating CD4+ T-cell clones promote nephritis in lupus-prone mice. *Kidney Int* 2012; 82(9):969–79.
170. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012; 32(9):2045–51.
171. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002; 420(6917):868–74.
172. Mullick AE, Tobias PS, Curtiss LK. Modulation of atherosclerosis in mice by Toll-like receptor 2. *J Clin Invest* 2005; 115(11):3149–56.
173. Michelsen KS, Wong MH, Shah PK, Zhang W, Yano J, Doherty TM et al. Lack of Toll-like receptor 4 or myeloid differentiation factor 88 reduces atherosclerosis and alters plaque phenotype in mice deficient in apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(29):10679–84.
174. Björkbacka H, Kunjathoor VV, Moore KJ, Koehn S, Ordija CM, Lee MA et al. Reduced atherosclerosis in MyD88-null mice links elevated serum cholesterol levels to activation of innate immunity signaling pathways. *Nat Med* 2004; 10(4):416–21.
175. Xiao H, Lu M, Lin TY, Chen Z, Chen G, Wang W-C et al. Sterol regulatory element binding protein 2 activation of NLRP3 inflammasome in endothelium mediates hemodynamic-induced atherosclerosis susceptibility. *Circulation* 2013; 128(6):632–42.
176. Zheng F, Xing S, Gong Z, Xing Q. NLRP3 inflammasomes show high expression in aorta of patients with atherosclerosis. *Heart Lung Circ* 2013; 22(9):746–50.
177. Duewell P, Kono H, Rayner KJ, Sirois CM, Vladimer G, Bauernfeind FG et al. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature* 2010; 464(7293):1357–61.
178. Dalekos GN, Elisaf M, Bairaktari E, Tsolas O, Siamopoulos KC. Increased serum levels of interleukin-1 $\beta$  in the systemic circulation of patients with essential hypertension: Additional risk factor for atherogenesis in hypertensive patients? *J Lab Clin Med* 1997; 129(3):300–8.
179. Dorrance AM. Interleukin 1- $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) enhances contractile responses in endothelium-denuded aorta from hypertensive, but not normotensive, rats. *Vascul Pharmacol* 2007; 47(2-3):160–5.
180. Wang X, Phillips MI, Mehta JL. LOX-1 and angiotensin receptors, and their interplay. *Cardiovasc Drugs Ther* 2011; 25(5):401–17.

181. Lin L, Phillips WE, Manning RD. Intrarenal Angiotensin ii is associated with inflammation, renal damage and dysfunction in dahl salt-sensitive hypertension. *J Am Soc Hypertens* 2009; 3(5):306–14.
182. Su Q, Qin D-N, Wang F-X, Ren J, Li H-B, Zhang M et al. Inhibition of reactive oxygen species in hypothalamic paraventricular nucleus attenuates the renin-angiotensin system and proinflammatory cytokines in hypertension. *Toxicol Appl Pharmacol* 2014; 276(2):115–20.
183. Gan W, Ren J, Li T, Lv S, Li C, Liu Z et al. The SGK1 inhibitor EMD638683, prevents Angiotensin II-induced cardiac inflammation and fibrosis by blocking NLRP3 inflammasome activation. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2018; 1864(1):1–10.
184. Kunnas T, Määttä K, Nikkari ST. NLR family pyrin domain containing 3 (NLRP3) inflammasome gene polymorphism rs7512998 (CT) predicts aging-related increase of blood pressure, the TAMRISK study. *Immun Ageing* 2015; 12:19.
185. Bagshaw SM, Cruz DN, Aspromonte N, Daliento L, Ronco F, Sheinfeld G et al. Epidemiology of cardio-renal syndromes: Workgroup statements from the 7th ADQI Consensus Conference. *Nephrol Dial Transplant* 2010; 25(5):1406–16.
186. Mezzaroma E, Toldo S, Farkas D, Seropian IM, van Tassell BW, Salloum FN et al. The inflammasome promotes adverse cardiac remodeling following acute myocardial infarction in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108(49):19725–30.
187. Yao C, Veleva T, Scott L, Cao S, Li L, Chen G et al. Enhanced Cardiomyocyte NLRP3 Inflammasome Signaling Promotes Atrial Fibrillation. *Circulation* 2018; 138(20):2227–42.
188. Kawaguchi M, Takahashi M, Hata T, Kashima Y, Usui F, Morimoto H et al. Inflammasome activation of cardiac fibroblasts is essential for myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation* 2011; 123(6):594–604.
189. van Tassell BW, Arena RA, Toldo S, Mezzaroma E, Azam T, Seropian IM et al. Enhanced interleukin-1 activity contributes to exercise intolerance in patients with systolic heart failure. *PLoS ONE* 2012; 7(3):e33438.
190. Abbate A. The heart on fire: Inflammasome and cardiomyopathy. *Exp Physiol* 2013; 98(2):385.
191. Chung ACK, Lan HY. Chemokines in renal injury. *J Am Soc Nephrol* 2011; 22(5):802–9.
192. Drawz PE, Rosenberg ME. Slowing progression of chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl* (2011) 2013; 3(4):372–6.
193. Fautrel B. Economic benefits of optimizing anchor therapy for rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2012; 51 Suppl 4:iv21-6.
194. Levy M, Thaiss CA, Elinav E. Taming the inflammasome. *Nat Med* 2015; 21(3):213–5.
195. Laliberte RE, Perregaux DG, Hoth LR, Rosner PJ, Jordan CK, Peese KM et al. Glutathione s-transferase omega 1-1 is a target of cytokine release inhibitory drugs and may be responsible for their effect on interleukin-1beta posttranslational processing. *J Biol Chem* 2003; 278(19):16567–78.
196. Coll RC, Robertson AAB, Chae JJ, Higgins SC, Muñoz-Planillo R, Inerra MC et al. A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases. *Nat Med* 2015; 21(3):248–55.
197. van Hout GPJ, Bosch L, Ellenbroek GHJM, Haan JJ de, van Solinge WW, Cooper MA et al. The selective NLRP3-inflammasome inhibitor MCC950 reduces infarct size and preserves cardiac function in a pig model of myocardial infarction. *Eur Heart J* 2017; 38(11):828–36.

198. van der Heijden T, Kritikou E, Venema W, van Duijn J, van Santbrink PJ, Slütter B et al. NLRP3 Inflammasome Inhibition by MCC950 Reduces Atherosclerotic Lesion Development in Apolipoprotein E-Deficient Mice-Brief Report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2017; 37(8):1457–61.
199. Zhai Y, Meng X, Ye T, Xie W, Sun G, Sun X. Inhibiting the NLRP3 Inflammasome Activation with MCC950 Ameliorates Diabetic Encephalopathy in db/db Mice. *Molecules* 2018; 23(3).
200. Mangan MSJ, Olhava EJ, Roush WR, Seidel HM, Glick GD, Latz E. Targeting the NLRP3 inflammasome in inflammatory diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2018; 17(8):588–606.
201. Ludwig-Portugall I, Bartok E, Dhana E, Evers BDG, Primiano MJ, Hall JP et al. An NLRP3-specific inflammasome inhibitor attenuates crystal-induced kidney fibrosis in mice. *Kidney Int* 2016; 90(3):525–39.
202. Krishnan SM, Ling YH, Huuskes BM, Ferens DM, Saini N, Chan CT et al. Pharmacological inhibition of the NLRP3 inflammasome reduces blood pressure, renal damage, and dysfunction in salt-sensitive hypertension. *Cardiovasc Res* 2019; 115(4):776–87.
203. Jiang H, He H, Chen Y, Huang W, Cheng J, Ye J et al. Identification of a selective and direct NLRP3 inhibitor to treat inflammatory disorders. *J Exp Med* 2017; 214(11):3219–38.
204. Cocco M, Pellegrini C, Martínez-Banaclocha H, Giorgis M, Marini E, Costale A et al. Development of an Acrylate Derivative Targeting the NLRP3 Inflammasome for the Treatment of Inflammatory Bowel Disease. *J Med Chem* 2017; 60(9):3656–71.
205. Sonawane ND, Verkman AS. Thiazolidinone CFTR inhibitors with improved water solubility identified by structure-activity analysis. *Bioorg Med Chem* 2008; 16(17):8187–95.
206. Darakhshan S, Pour AB. Tranilast: A review of its therapeutic applications. *Pharmacol Res* 2015; 91:15–28.
207. Huang Y, Jiang H, Chen Y, Wang X, Yang Y, Tao J et al. Tranilast directly targets NLRP3 to treat inflammasome-driven diseases. *EMBO Mol Med* 2018; 10(4).
208. Perera AP, Fernando R, Shinde T, Gundamaraju R, Southam B, Sohal SS et al. MCC950, a specific small molecule inhibitor of NLRP3 inflammasome attenuates colonic inflammation in spontaneous colitis mice. *Sci Rep* 2018; 8(1):8618.
209. Nuki G. Colchicine: Its mechanism of action and efficacy in crystal-induced inflammation. *Curr Rheumatol Rep* 2008; 10(3):218–27.
210. Fernandez MV, Miller EA, Bhardwaj N. Activation and measurement of NLRP3 inflammasome activity using IL-1 $\beta$  in human monocyte-derived dendritic cells. *J Vis Exp* 2014; (87).
211. Entzian P, Schlaak M, Seitzer U, Bufe A, Acil Y, Zabel P. Antiinflammatory and antifibrotic properties of colchicine: Implications for idiopathic pulmonary fibrosis. *Lung* 1997; 175(1):41–51.
212. Robertson S, Martínez GJ, Payet CA, Barraclough JY, Celermajer DS, Bursill C et al. Colchicine therapy in acute coronary syndrome patients acts on caspase-1 to suppress NLRP3 inflammasome monocyte activation. *Clin Sci* 2016; 130(14):1237–46.
213. Misawa T, Takahama M, Kozaki T, Lee H, Zou J, Saitoh T et al. Microtubule-driven spatial arrangement of mitochondria promotes activation of the NLRP3 inflammasome. *Nat Immunol* 2013; 14(5):454–60.
214. Otani K, Watanabe T, Shimada S, Takeda S, Itani S, Higashimori A et al. Colchicine prevents NSAID-induced small intestinal injury by inhibiting activation of the NLRP3 inflammasome. *Sci Rep* 2016; 6:32587.



215. Li C, Yang CW, Ahn HJ, Kim WY, Park CW, Park JH et al. Colchicine suppresses osteopontin expression and inflammatory cell infiltration in chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Nephron* 2002; 92(2):422–30.
216. Disel U, Paydas S, Dogan A, Gulfiliz G, Yavuz S. Effect of colchicine on cyclosporine nephrotoxicity, reduction of TGF-beta overexpression, apoptosis, and oxidative damage: An experimental animal study. *Transplant Proc* 2004; 36(5):1372–6.
217. McClurkin C, Phan SH, Hsu CH, Patel SR, Spicker JK, Kshirsagar AM et al. Moderate protection of renal function and reduction of fibrosis by colchicine in a model of anti-GBM disease in the rabbit. *J Am Soc Nephrol* 1990; 1(3):257–65.
218. Oner A, Erdoğan O, Demircin G, Bülbül M, Memiş L. Efficacy of colchicine therapy in amyloid nephropathy of familial Mediterranean fever. *Pediatr Nephrol* 2003; 18(6):521–6.
219. Ozdemir BH, Ozdemir FN, Sezer S, Sar A, Haberal M. Does colchicine have an antifibrotic effect on development of interstitial fibrosis in renal allografts of recipients with familial Mediterranean fever? *Transplant Proc* 2006; 38(2):473–6.
220. Tardif J-C, Kouz S, Waters DD, Bertrand OF, Diaz R, Maggioni AP et al. Efficacy and Safety of Low-Dose Colchicine after Myocardial Infarction. *N Engl J Med* 2019.
221. He Y, Varadarajan S, Muñoz-Planillo R, Burberry A, Nakamura Y, Núñez G. 3,4-methylenedioxy- $\beta$ -nitrostyrene inhibits NLRP3 inflammasome activation by blocking assembly of the inflammasome. *J Biol Chem* 2014; 289(2):1142–50.
222. Marchetti C, Swartzwelter B, Gamboni F, Neff CP, Richter K, Azam T et al. OLT1177, a  $\beta$ -sulfonyl nitrile compound, safe in humans, inhibits the NLRP3 inflammasome and reverses the metabolic cost of inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2018; 115(7):E1530-E1539.
223. Shim D-W, Shin W-Y, Yu S-H, Kim B-H, Ye S-K, Koppula S et al. BOT-4-one attenuates NLRP3 inflammasome activation: NLRP3 alkylation leading to the regulation of its ATPase activity and ubiquitination. *Sci Rep* 2017; 7(1):15020.
224. Juliana C, Fernandes-Alnemri T, Wu J, Datta P, Solorzano L, Yu J-W et al. Anti-inflammatory compounds parthenolide and Bay 11-7082 are direct inhibitors of the inflammasome. *J Biol Chem* 2010; 285(13):9792–802.
225. Peiró C, Lorenzo Ó, Carraro R, Sánchez-Ferrer CF. IL-1 $\beta$  Inhibition in Cardiovascular Complications Associated to Diabetes Mellitus. *Front Pharmacol* 2017; 8:363.
226. Ridker PM, Libby P, MacFadyen JG, Thuren T, Ballantyne C, Fonseca F et al. Modulation of the interleukin-6 signalling pathway and incidence rates of atherosclerotic events and all-cause mortality: Analyses from the Canakinumab Anti-Inflammatory Thrombosis Outcomes Study (CANTOS). *Eur Heart J* 2018; 39(38):3499–507.
227. Ridker PM, MacFadyen JG, Thuren T, Libby P. Residual inflammatory risk associated with interleukin-18 and interleukin-6 after successful interleukin-1 $\beta$  inhibition with canakinumab: Further rationale for the development of targeted anti-cytokine therapies for the treatment of atherothrombosis. *Eur Heart J* 2019.
228. Cherney DZI, Lytvyn Y, McCullough PA. Cardiovascular Risk Reduction in Patients With Chronic Kidney Disease: Potential for Targeting Inflammation With Canakinumab. *J Am Coll Cardiol* 2018; 71(21):2415–8.
229. Lachmann HJ, Kone-Paut I, Kuemmerle-Deschner JB, Leslie KS, Hachulla E, Quartier P et al. Use of canakinumab in the cryopyrin-associated periodic syndrome. *N Engl J Med* 2009; 360(23):2416–25.

230. Ruperto N, Brunner HI, Quartier P, Constantin T, Wulffraat N, Horneff G et al. Two randomized trials of canakinumab in systemic juvenile idiopathic arthritis. *N Engl J Med* 2012; 367(25):2396–406.
231. Ridker PM, Howard CP, Walter V, Everett B, Libby P, Hensen J et al. Effects of interleukin-1 $\beta$  inhibition with canakinumab on hemoglobin A1c, lipids, C-reactive protein, interleukin-6, and fibrinogen: A phase IIb randomized, placebo-controlled trial. *Circulation* 2012; 126(23):2739–48.
232. Arend WP. Interleukin-1 receptor antagonist. *Adv Immunol* 1993; 54:167–227.
233. Mertens M, Singh JA. Anakinra for rheumatoid arthritis: A systematic review. *J Rheumatol* 2009; 36(6):1118–25.
234. Ikonomidis I, Lekakis JP, Nikolaou M, Paraskevaidis I, Andreadou I, Kaplanoglou T et al. Inhibition of interleukin-1 by anakinra improves vascular and left ventricular function in patients with rheumatoid arthritis. *Circulation* 2008; 117(20):2662–9.
235. Larsen CM, Faulenbach M, Vaag A, Vølund A, Ehses JA, Seifert B et al. Interleukin-1-receptor antagonist in type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 2007; 356(15):1517–26.
236. Yang B. Pharmacokinetics of anakinra in subjects with different levels of renal function. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 2003; 74(1):85–94.
237. Hung AM, Ellis CD, Shintani A, Booker C, Ikizler TA. IL-1 $\beta$  receptor antagonist reduces inflammation in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 2011; 22(3):437–42.
238. Hoffman HM, Yasothan U, Kirkpatrick P. Riloncept. *Nat Rev Drug Discov* 2008; 7(5):385–6.
239. Radin A, Marbury T, Osgood G, Belomestnov P. Safety and pharmacokinetics of subcutaneously administered riloncept in patients with well-controlled end-stage renal disease (ESRD). *J Clin Pharmacol* 2010; 50(7):835–41.
240. Nowak KL, Hung A, Ikizler TA, Farmer-Bailey H, Salas-Cruz N, Sarkar S et al. Interleukin-1 inhibition, chronic kidney disease-mineral and bone disorder, and physical function. *Clin Nephrol* 2017; 88(9):132–43.
241. Knickelbein JE, Tucker WR, Bhatt N, Armbrust K, Valent D, Obiyor D et al. Gevokizumab in the Treatment of Autoimmune Non-necrotizing Anterior Scleritis: Results of a Phase I/II Clinical Trial. *Am J Ophthalmol* 2016; 172:104–10.
242. Ali Z, Laurijssens B, Ostenfeld T, McHugh S, Stylianou A, Scott-Stevens P et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic profiling of a P2X7 receptor allosteric modulator GSK1482160 in healthy human subjects. *Br J Clin Pharmacol* 2013; 75(1):197–207.
243. Wu T-C, Xu K, Martinek J, Young RR, Banchereau R, George J et al. IL1 Receptor Antagonist Controls Transcriptional Signature of Inflammation in Patients with Metastatic Breast Cancer. *Cancer Res* 2018; 78(18):5243–58.
244. Ozaki E, Campbell M, Doyle SL. Targeting the NLRP3 inflammasome in chronic inflammatory diseases: Current perspectives. *J Inflamm Res* 2015; 8:15–27.

## 6. Eigene Publikationen

Zewinger S, Jennings RT, Jankowski V, Alansary D, Klug M, Triem S, Petrakis I, Selejan S, Paschen A, Herter T, Maack C, Sester M, Sester U, Jahnen-Dechent W, Rohrer L, März W, Jankowski J, Kopf M, Latz E, Niemeyer BA, Fliser D, Laufs U, Speer T. Apolipoprotein C3 induces inflammation and organ damage by alternative inflammasome activation. *Nat Immunol* 21, 30–41 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0548-1>

## 7. Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Prof. Dr. Danilo Fliser für die Vergabe des Themas und der Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe mitzuarbeiten.

Besonderer Dank gilt meinem Betreuer Dr. Dr. Timotheus Speer für die viele Geduld, die er mir, trotz seiner Belastung in Klinik und Forschung, entgegenbrachte, sowie für die intensive und kompetente Unterstützung und kritische Korrektur. Ohne ihn wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Des Weiteren danke ich den Biologinnen und der MTA des Laborteams, M.Sc. Mira Klug, M. Sc. Sarah Triem sowie Claudia Noll für die Einarbeitung und Unterstützung bei der experimentellen Arbeit und die geduldige Hilfe.

Großer Dank geht auch an meine Eltern Heiner und Lenore Paschen, meinen Bruder Botho Paschen, meine Großmutter Ute von Hülsen, meinen Partner Veith Wollschläger und allen Freunden die mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

Meine Großeltern Hans-Viggo von Hülsen sowie Hans und Heidrun Paschen konnten den Abschluss der Arbeit leider nicht mehr miterleben. Sie haben von Beginn an stets mit großelterlichem Enthusiasmus die Fortschritte der Arbeit verfolgt und mit kritischem Blick hinterfragt, wann man denn endlich fertig werde. In tiefer Dankbarkeit widme ich insbesondere ihnen diese Arbeit.