

Aus der Klinik für Nephrologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. L. C. Rump

**Die Rolle des P2X7-Rezeptors bei der Progredienz der chronischen  
Niereninsuffizienz am Mausmodell mit subtotaler Nephrektomie**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Marcel Tiedge

2022

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Oliver Vonend

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Matthias Schott

Für meine Eltern, in Dankbarkeit

## Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde an einem Mausmodell der chronischen Niereninsuffizienz untersucht, ob eine P2X7-Rezeptordefizienz Einfluss auf die Progredienz der Erkrankung nehmen kann. Am Modell der subtotalen Nephrektomie wird die Entwicklung einer chronischen Niereninsuffizienz und deren spezifischen Umbauprozesse im Bereich der Niere mit Ausbildung von Fibrose durch insbesondere chronische Inflamationsprozesse untersucht. Purinerge Rezeptoren wie der hier untersuchte P2X7-Rezeptor und dessen rezeptorvermittelte Signalkaskaden auf humanen Makrophagen sind über die Ausschüttungen von pro-inflammatorischem Interleukin 1 $\beta$  (IL1 $\beta$ ) hieran beteiligt. Nach subtotaler Nephrektomie bei P2X7-KO- sowie Wildtyp-Tieren erfolgte die Untersuchung physiologischer und laborchemischer Parameter. Darüber hinaus wurde das Nierengewebe histologisch aufgearbeitet sowie mRNA- und Protein-Expressionsanalysen mittels Real-time PCR sowie Western Blot zur Evaluation maladaptiver Umbauprozesse angefertigt. So konnte gezeigt werden, dass es bei P2X7 Defizienz in einem geringen Maß zu histologisch darstellbarer Glomerulosklerose sowie Ablagerung von extrazellulärer, collagener Matrix kommt. Auch war bei der P2X7-KO-Gruppe eine verbesserte Cystatin C-Clearance mit geringerer Albuminurie zu beobachten. In der mRNA-Expressionsanalyse zeigte sich eine geringere Expression pro-inflammatorischer sowie pro-fibrotischer Parameter. So wurden eine tendenziell erniedrigte Expression des Zytokins Transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ), welches u.a. an der Signaltransduktion zur Regulation extrazellulärer Matrix beteiligt ist, und eine signifikant verringerte Expression von Collagen1 beobachtet. Durch Western Blot Analyse konnte dieses Ergebnis auf Proteinebene bestätigt werden. Zusätzlich wurde bei P2X7-KO-Tieren eine Reduktion der Makrophagen-chemotaktischen Zytokine wie dem Monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) und dem Nuclear factor  $\kappa$ -light-chain-enhancer of activated B-cells (NF $\kappa$ B), die kritisch für die Entstehung und Aufrechterhaltung einer Inflamationsreaktion sind, gezeigt. Zusammenfassend schützt die P2X7-Rezeptordefizienz nach subtotaler Nephrektomie vor fortschreitender Nierenfunktionseinschränkung im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren.

## **Abstract**

In the present work, in a mouse model of chronic renal failure it was investigated whether P2X7 receptor deficiency can influence the progression of the renal disease. Using the subtotal nephrectomy model, the development of chronic kidney disease and its specific renal remodeling processes with development of fibrosis through inflammation processes were examined. Purinergic receptors, especially the P2X7 receptor, are able to trigger signal cascades in macrophages that are involved in mediating the release of pro-inflammatory interleukin 1 $\beta$  (IL1 $\beta$ ). After subtotal nephrectomy in P2X7-KO and wild-type animals, physiological and laboratory parameters were examined. In addition, kidney tissue was histologically processed, and mRNA and protein expression analyses were carried out using real-time PCR and Western blot in order to evaluate maladaptive remodeling processes. It could be shown that with P2X7 deficiency there was a reduction in glomerulosclerosis and deposition of extracellular, collagenous matrix. An improved cystatin C clearance with lower albuminuria was also observed in the P2X7-KO group. The mRNA expression analysis showed a lower expression of pro-inflammatory and pro-fibrotic parameters. A tendency towards a decreased expression of the cytokine transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ) was found, which among others is involved in signal transduction for regulation of the extracellular matrix. A significantly decreased expression of collagen1 was observed using mRNA and western blot analysis. In addition, a reduction in the macrophage chemotactic cytokines such as the monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1) and the nuclear factor  $\kappa$ -light-chain-enhancer of activated B-cells (NF $\kappa$ B) was shown in P2X7-KO animals, which are critical for the development and maintenance of an inflammatory reaction. In summary, in an animal model of chronic renal failure the P2X7 receptor deficiency protected against progression of kidney function impairment compared to wild-type animals.

## Abkürzungsverzeichnis

APS	<i>Ammonium persuphate solution</i>
ATP	Adenosintriphosphat
AKR	Albumin-Kreatinin-Ratio
ASC	<i>Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD</i>
cDNA	<i>Complementary deoxyribonucleic acid</i>
CRP	C-reaktives Protein
CCL5	<i>CC-chemokine ligand 5</i>
DAMP	<i>Damage-associated molecular pattern</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ENac	Epithelialer Natriumkanal
ERK1	<i>Extracellular-signal regulated kinase 1</i>
ERK2	<i>Extracellular-signal regulated kinase 2</i>
ECM	<i>Extracellular matrix</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GBM	Glomeruläre Basalmembran
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i>
IL1	Interleukin 1
IL1 $\alpha$	Interleukin 1 $\alpha$
IL1 $\beta$	Interleukin 1 $\beta$
IL6	Interleukin 6
IL18	Interleukin 18
IL1-RA	Interleukin 1 Rezeptorantagonist
IL1RII	Interleukin 1 Rezeptor Typ II
JNK	C-Jun-N-terminale-Kinase
KDIGO	<i>Kidney Disease: Improving Global Outcomes</i>
LAP	<i>Latency-associated peptide</i>
LTBP	<i>Latent TGF<math>\beta</math>-binding protein</i>
LPS	Lipopolysaccharid
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
MCP-1	<i>Monocyte chemotactic protein 1</i>
MMP	Matrix-Metallo-Proteinase
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
NLR	<i>Nucleotide-binding domain, leucine-rich repeat</i>
NLRP3	<i>NLR family pyrin domain containing 3</i>
NF $\kappa$ B	<i>Nuclear factor <math>\kappa</math>-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PPR	<i>Pattern recognition receptor</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
PAI1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1
PAS	<i>Periodic-acid-Schiff</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>

qPCR	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i>
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RANTES	<i>Regulated and normal t cell expressed and secreted</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
Tris	Trishydroxymethylaminoethan
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF $\beta$	<i>Transforming growth factor <math>\beta</math></i>
TNF $\alpha$	Tumornekrose Faktor $\alpha$
TLR	Toll-like Rezeptor
T $\beta$ RI	TGF $\beta$ Rezeptor Typ I
T $\beta$ RII	TGF $\beta$ Rezeptor Typ II
TIMP	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinases</i>
tPA	<i>Tissue plasminogen activator</i>
uPA	<i>Urokinase plasminogen activator</i>
UUO	Unilaterale Ureterobstruktion

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Anatomie, Funktion und Physiologie der Niere</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 Chronische Niereninsuffizienz</b> .....	<b>4</b>
<b>1.3 Purinerge Rezeptoren</b> .....	<b>8</b>
<b>1.4 Rolle der P2X7 Rezeptoren bei der chronischen Niereninsuffizienz</b> .....	<b>10</b>
<b>1.5 Ziel dieser Arbeit</b> .....	<b>11</b>
<b>2 Methoden</b> .....	<b>12</b>
<b>2.1 Versuchstiere und Versuchstierhaltung</b> .....	<b>12</b>
<b>2.2 Subtotale Nephrektomie</b> .....	<b>12</b>
<b>2.3 Stoffwechsellkäfige und Sammelurin</b> .....	<b>13</b>
<b>2.4 Blutentnahme</b> .....	<b>13</b>
<b>2.5 Blutdruckmessung</b> .....	<b>14</b>
<b>2.6 Quantitative Messung einzelner Parameter im Urin</b> .....	<b>14</b>
<b>2.7 Quantitative Albuminbestimmung im Urin</b> .....	<b>15</b>
<b>2.8 Quantitative Cystatin C-Bestimmung im Serum</b> .....	<b>15</b>
<b>2.9 Organentnahme</b> .....	<b>15</b>
<b>2.10 Quantitative Real-time-PCR (qPCR)</b> .....	<b>16</b>
<b>2.11 Proteinanalyse</b> .....	<b>17</b>
2.11.1 Proteinisolierung .....	17
2.11.2 Proteinbestimmung .....	18
2.11.3 Herstellung der Trenn- und Sammelgele.....	18
2.11.4 Elektrophorese und Western Blot .....	18
<b>2.12 Herstellung der Paraffinblöcke und -schnitte</b> .....	<b>19</b>
<b>2.13 PAS-Färbung</b> .....	<b>20</b>
<b>2.14 Masson-Trichrome-Färbung</b> .....	<b>21</b>
<b>2.15 Statistik</b> .....	<b>22</b>
<b>3 Ergebnisse</b> .....	<b>23</b>
<b>3.1 Physiologische Daten</b> .....	<b>23</b>

3.1.1 Körpergewicht.....	23
3.1.2 Nierengewicht zum Zeitpunkt der OP (Beginn Versuchszeitraum Tag 0) .....	24
3.1.3 Nierengewicht zum Zeitpunkt der Organentnahme (Beginn Versuchszeitraum Tag 35).....	25
3.1.4 Herzgewicht und Blutdruck .....	26
<b>3.2 Urinalysen .....</b>	<b>26</b>
3.2.1 Harnstoff-Messungen .....	26
3.2.2 Kreatinin-Messungen .....	27
3.2.3 Albumin-Kreatinin-Ratio .....	28
<b>3.3 Serumanalysen .....</b>	<b>29</b>
3.3.1 Cystatin C .....	29
<b>3.4 Genexpressionsanalyse .....</b>	<b>31</b>
3.4.1 Real-time PCR.....	31
3.4.2 Fibrosemarker.....	31
3.4.3 Entzündungsmarker.....	32
<b>3.5 Proteinanalyse .....</b>	<b>32</b>
3.5.1 Collagen1-Blot .....	32
<b>3.6 Histologie.....</b>	<b>34</b>
3.6.1 PAS-Färbung.....	34
3.6.2 Masson-Trichrome-Färbung .....	35
<b>4 Diskussion .....</b>	<b>38</b>
<b>4.1 Verlauf der chronischen Niereninsuffizienz am Modell der subtotalen Nephrektomie .....</b>	<b>38</b>
<b>4.2 Unterschiede in der Nierenfunktion .....</b>	<b>39</b>
<b>4.3 Einfluss des P2X7-Rezeptors auf Inflammation.....</b>	<b>41</b>
<b>4.4 Einfluss von Inflammation auf chronische Niereninsuffizienz, interstitielle Fibrose und Proteinurie .....</b>	<b>43</b>
<b>4.5 P2X7-Rezeptor und Blutdruck .....</b>	<b>49</b>
<b>4.6 Relevanz der Untersuchung und Ausblick auf mögliche Folgearbeiten ..</b>	<b>50</b>
<b>5 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>51</b>

## **1 Einleitung**

### 1.1 Anatomie, Funktion und Physiologie der Niere

Die Niere ist ein paarig angelegtes, parenchymatöses Organ mit einer retroperitonealen Lage und einem Einzelgewicht von circa 120 bis 200 g beim Menschen, das der Eliminierung bestimmter Stoffwechselprodukte und der Regulation des Elektrolyt-, Wasser- und Säure-Basenhaushaltes dient. Überdies erfüllt sie endokrinologische Funktionen. Sie ist beispielsweise beteiligt an der Synthese des Glykoprotein-Hormons Erythropoetin, das stimulierend auf die Erythropoese wirkt, an der Biosynthese von Vitamin D<sub>3</sub>, das eine wesentliche Rolle in der Regulation des Calciumstoffwechsels spielt, sowie an der Regulation des Blutdrucks über das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System. Um diese Funktionen zu gewährleisten, wird die Niere von ca. 20% des Herzzeitvolumens perfundiert. Die funktionelle Grundeinheit der Niere ist das Nephron bestehend aus Glomerulus, Tubulussystem und Sammelrohr.

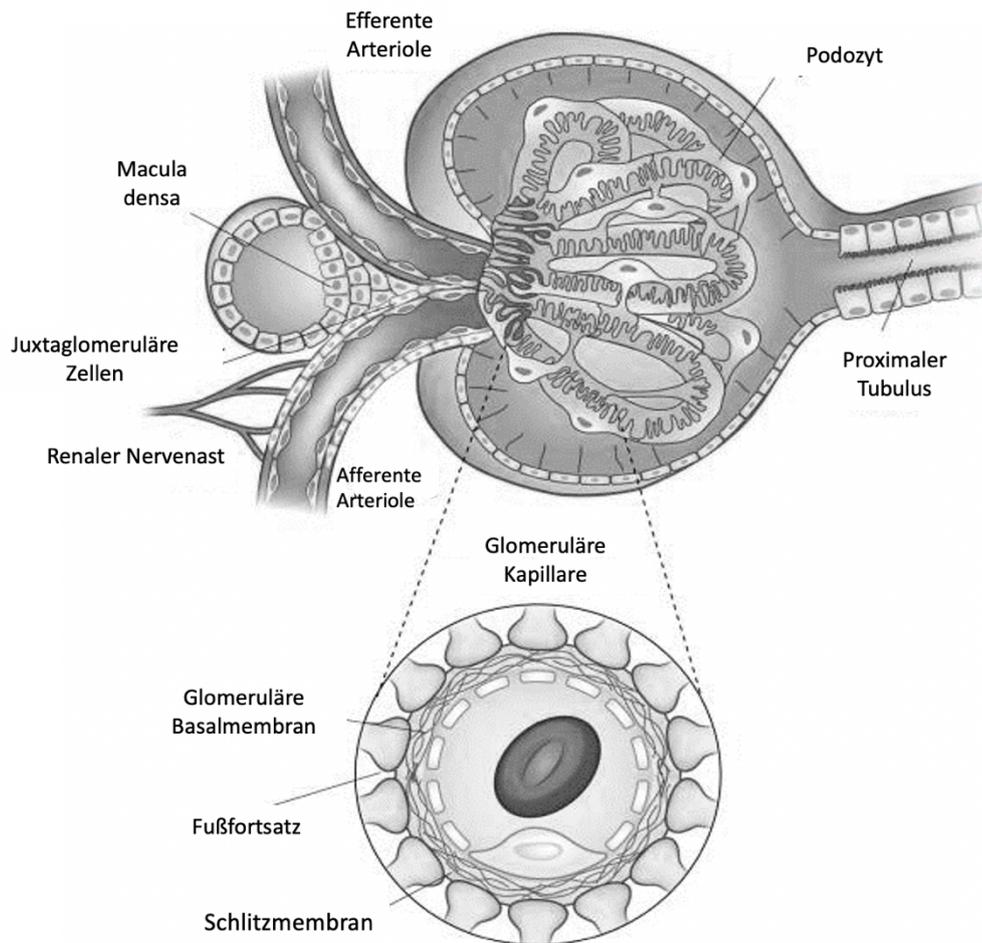


Abb. 1: Schematische Struktur eines Glomerulus modifiziert nach Pollak et al. (Pollak, Quaggin, Hoenig, & Dworkin, 2014) mit Genehmigung der American Society of Nephrology

Das Glomerulus ist die Filtrationseinheit der Niere, das aus Gefäßpol, Endothelzellen, Mesangiumzellen, viszeralen und parietalen Epithelzellen und der Basalmembran besteht, sowie einen Durchmesser von circa 150  $\mu\text{m}$  hat. Am Gefäßpol finden sich das Vas afferens und efferens, die der Blutversorgung des Glomerulus dienen. Aus ihnen entspringt das Kapillarschlingennetz des Glomerulus. Die glomeruläre Filtereinheit besteht aus drei Schichten: den Endothelzellen, die eine fenestrierte Endothelzellschicht bilden, der Basalmembran und den Podozyten. Hierdurch wird eine Porenfunktion erfüllt, welche Grundlage der Filtration darstellt. Durch ihre anatomische Lage tritt sie in direkte Interaktion mit den Bestandteilen des Blutes. Das Mesangium wird gebildet durch die Mesangiumzellen und die mesangiale Matrix. Es besitzt kontraktile Eigenschaften und kann neben der

Collagensynthese, immunologische Eigenschaften wie die Phagozytose von Pathogenen erfüllen. Viszerale und parietale Epithelzellen bilden gemeinsam die sogenannte Bowman-Kapsel. Der viszerale Teil der Bowman-Kapsel wird durch Podozyten gebildet, die sowohl mit der Basalmembran als auch über die podozytären Fußfortsätze miteinander in Verbindung stehen. Zwischen den interdigitierenden Fußfortsätzen spannt sich die podozytäre Schlitzmembran zur Filtration auf. Parietale Epithelzellen sind dicht gelagerte polygonale Zellen, die bei bestimmten glomerulären Erkrankungen wie der fokal segmentalen Glomerulonephritis ausgeprägte Proliferationen zeigen können (Smeets et al., 2011). Die Basalmembran fungiert als Trennschicht zwischen den viszeralen Podozyten der Bowman-Kapsel und den glomerulären Endothelzellen und ist eine größen- und ladungsselektive Diffusions- und Filtrationsbarriere. Auf das Glomerulus folgt nachgeschaltet das komplexe Tubulussystem des Nephrons, bestehend aus proximalem Tubulus, der Henle-Schleife und dem distalen Tubulus. Im proximalen Tubulus finden sich durch einen Bürstensaum gekennzeichnetes Epithel. Hier findet circa 60 % der isotonischen Rückresorption des im Glomerulus filtrierte Primärharnes statt. Die Henle-Schleife besteht aus einem dünnen absteigenden, einem dünnen aufsteigenden und einem dicken aufsteigenden Teil. In ersterem findet sich das membranständige Aquaporin 1, das eine gute Durchlässigkeit für Wasser gewährleistet. Der dann folgende dünne aufsteigende Teil hingegen zeigt eine gute Permeabilität für Ionen, allerdings keine Expression von Aquaporin 1. Im letzten, ebenfalls wasserundurchlässigen Teil der Henle-Schleife findet vermehrt Natriumchlorid-Rückresorption statt. Anschließend folgt der distale Tubulus, der eine Kontaktstelle mit dem Glomerulus an der Macula densa des Gefäßpols aufweist, den sogenannten juxtaglomerulären Apparat. Dieser trägt entscheidend zur renalen Regulation des Elektrolythaushaltes und des Blutdrucks bei. Im Bereich der Macula densa kann über einen chemosensitiven Natrium-Kalium-Chlorid-Symporter die Konzentration dieser Elektrolyte im Harn des distalen Tubulus gemessen werden und so der Konzentrationsgradient zum Vas afferens detektiert werden. Zeigt sich der Urin beispielsweise hyperosmolar, so kann durch Sekretion von Adenosin aus den Macula densa Zellen eine Vasokonstriktion in der glatten Muskulatur der Vasa afferentes bewirkt werden. Der hierüber reduzierte Harnfluss im Bereich der Henle-Schleife begünstigt eine vermehrte Rückresorption von Ionen aus dem Harn aufgrund einer verlängerten Latenz, damit die

Ionenkonzentration im distalen Tubulus abnimmt. Im Falle eines hypoosmolaren Urins kommt es zur Sekretion von Renin aus der epitheloiden Myozyten im Bereich der Wand des Vas afferens in den Blutkreislauf, was zu einer Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS-System) führt und über eine Vasokonstriktion einen Anstieg des Blutdrucks bewirkt. Renal erfolgt dies vor allem im Bereich des Vas efferens, wodurch der Druck im Glomerulus und die glomeruläre Filtrationsrate steigen und nachfolgend die Natriumexkretion angepasst wird. Zusätzlich existiert am juxtaglomerulärem Apparat ein Feedbackmechanismus, der über Messung von Elektrolytkonzentrationen Einfluss auf den Tonus der afferenten Arteriole nehmen kann. Hierbei sind zwei Mechanismen relevant, zum einen die myogene Kontrolle des Gefäßtonus durch schnelle Änderung des Perfusionsdruckes in einem Gefäß und zum anderen die Kontrolle durch die vasoaktive Substanz Adenosin. Der distale Tubulus mündet in das Sammelrohr als letzten Teil des Nephrons. Das Sammelrohr kann über verschiedene Hormone stimuliert werden. So induziert das Antidiuretische Hormon den Einbau von Aquaporin 2, das eine erhöhte Permeabilität des Sammelrohrs für Wasser bewirkt und so dessen Rückresorption verstärkt. Das Hormon Aldosteron induziert hier den Einbau luminaler Natriumkanäle (ENaC) und Natrium-Kalium-ATPasen in die apikale Plasmamembran der Hauptzellen zur vermehrten Rückresorption von Natrium und dadurch osmotisch verstärkter Wasserrückresorption (Koushanpour, 2013; Schrier & Schrier, 1997).

Die Aufrechterhaltung des renalen Blutflusses ist essenziell, damit die Niere ihre regulatorische Funktion suffizient erfüllen kann. Intrarenal ist der Cortex am dichtesten perfundiert. Der renale Blutfluss wird grundsätzlich aber durch den Druck in Arteria und Vena renalis und den Gefäßwiderstand bestimmt. Die afferenten und efferenten Arteriolen können durch Tonusänderung in den Gefäßwänden eine sensible Aufrechterhaltung des notwendigen Mitteldruckes gewährleisten, so dass eine Autoregulation der renalen Durchblutung entsteht (Siegenthaler, 2006).

## 1.2 Chronische Niereninsuffizienz

Die chronische Niereninsuffizienz wird definiert als Abweichungen von der normalen Nierenstruktur und/oder -funktion, die länger als 3 Monate bestehen und negative Auswirkungen auf den allgemeinen Gesundheitszustand haben. Die Klassifikation nach KDIGO (The Kidney Disease: Improving Global Outcomes) erfolgt anhand der

Grunderkrankung des Patienten, der glomerulären Filtrationsrate und dem Grad der Albuminurie (Levin, 2013a). Turin et al. konnten diesbezüglich zeigen, dass bereits kurzfristige, aber auch jährliche, geringgradige Änderungen der zuvor genannten Nierenfunktionsparameter einen negativen Einfluss auf die Gesamtmortalität eines Patienten haben können (Turin et al., 2012a, 2012b, 2013).

Tabelle 1: Progredienzrisiko der chronischen Niereninsuffizienz nach Farbintensität (modifiziert nach KDIGO (Levin, 2013b)). Steigendes Risiko von grün nach rot. Grün: jährliche Kontrolluntersuchung notwendig (wenn keine zusätzlichen krankheitsrelevanten Auffälligkeiten vorliegen), gelb: jährliche Kontrolluntersuchung notwendig, orange: 2-mal jährliche Kontrolluntersuchung notwendig, rot: mindestens 4-mal jährliche Kontrolluntersuchung notwendig; GFR = glomeruläre Filtrationsrate, AKR = Albumin-Kreatinin-Ratio.

Chronische Niereninsuffizienz nach Albuminurie- und GFR-Kategorien				Albuminurie-Kategorie (mg/g)		
				A1	A2	A3
				Normal bis leicht erhöht	Moderat erhöht	Stark erhöht
				AKR <30 mg/g	AKR 30 – 300 mg/g	AKR >300 mg/g
GFR-Kategorie (ml/min/1,73m <sup>2</sup> )	G1	Normal oder hoch	≥90	1	1	2
	G2	Mild eingeschränkt	60 – 89	1	1	2
	G3a	Mild bis moderat eingeschränkt	45 – 59	1	2	4+
	G3b	Moderat bis schwer eingeschränkt	30 – 44	2	4+	4+
	G4	Schwer eingeschränkt	15 – 29	4+	4+	4+
	G5	Nierenversagen	<15	4+	4+	4+

Im europäischen Durchschnitt liegt die Inzidenz der terminalen Niereninsuffizienz bei etwa 135 pro 1.000.000 Einwohner pro Jahr, die Prävalenz bei circa 700 pro 1.000.000. Im US-amerikanischen Raum zeigt sich im Vergleich eine Inzidenz von 336 pro 1.000.000 Einwohner pro Jahr und eine Prävalenz von 1403 pro 1.000.000 (Meguid El Nahas & Bello, 2005), bedingt durch höhere Inzidenzen sowie Prävalenzen der ursächlichen Grunderkrankungen.

Die Behandlungsoptionen chronischer Niereninsuffizienz umfassen zunächst die Behandlung der Grunderkrankung und der Risikofaktoren, sowie die Behandlung der sekundären Folgeerkrankungen wie z.B. renaler Anämie, metabolischer

Azidose, Störungen der Vitamin D-, Calcium- und Phosphathomöostase, einer Hypertonie und Störungen des Volumenstatus. Im Falle einer terminalen Niereninsuffizienz kommen Nierenersatzverfahren (Hämodialyse, die Peritonealdialyse oder die Nierentransplantation) zum Einsatz. Die Inzidenz von Nierenersatzverfahren bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz lag 2012 in Europa in der Altersgruppe der 65 – 74-Jährigen bei 25%, die Prävalenz bei 22%. Bezogen auf die Altersgruppe der über 75-Jährigen lagen die Inzidenz bei 30% und die Prävalenz bei 20% (Pippias et al., 2015). Führend für die Entwicklung und das Fortschreiten einer chronischen Niereninsuffizienz sind mit circa 45% der Diabetes mellitus Typ 2 und mit circa 20% die arterielle Hypertonie mit vaskulärer Nephropathie. Zusätzlich sind Glomerulonephritiden und Systemerkrankungen mit Nierenbeteiligung wie beispielsweise Vaskulitiden ätiologisch bedeutsam (Weiner, 2007).

Histologisch lassen sich verglichen mit einem Normalbefund Veränderungen an nahezu allen Strukturen der Niere beobachten. Im Rahmen einer vaskulären Nephropathie zeigen sich Veränderungen im Bereich der Gefäßarchitektur mit Zunahme von Hyalin- und Collagenfasern, die zu einer Arteriosklerose führen. Im Bereich der Glomeruli führt dies zu einer Sklerose mit Zunahme der mesangialen Matrix und Fibrosereaktion, was mit einem zunehmenden Funktionsverlust einhergeht (Seccia, Caroccia, & Calo, 2017). Bei der Entwicklung der tubulointerstitiellen Fibrose bei renalen Erkrankungen kommt dem Transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ) eine Schlüsselfunktion zu (Bottinger, 2007; W. Wang, Koka, & Lan, 2005). Tierexperimentelle Arbeiten mit transgenen Mäusen, die hohe Konzentrationen an TGF $\beta$  in Hepatozyten produzierten, zeigten deutliche histologische Veränderung wie beispielsweise Expansion des Mesangiums, tubulointerstitielle Fibrose und tubuläre Atrophie. Weiterhin entwickelten diese Tiere konsekutiv eine Proteinurie, die zu weiterer Nierenfunktionseinschränkung führte (Kopp et al., 1996; Sanderson et al., 1995). In einem Modell der unilateralen Ureterobstruktion haben Moon et. al gezeigt, dass durch selektive Inhibition des TGF $\beta$ -Signalweges signifikant geringere fibrotische Veränderungen in Rattennieren nachzuweisen waren, aber auch eine geringere Expression von TGF $\beta$  zu detektieren war (Moon, Kim, Cho, Sheen, & Kim, 2006). Stimuliert wird die TGF $\beta$  Exkretion durch das pro-inflammatorische Zytokin Interleukin 1 (IL1) (Gabay,

Lamacchia, & Palmer, 2010). In Mausmodellen mit ischämischem Reperfusionsschaden konnte gezeigt werden, dass durch IL1 die renale Schädigung durch vermehrtes Auftreten von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten gesteigert wurde (Furuichi et al., 2006). Suppression der Interleukinwirkung zeigte eine Verbesserung der Progredienz experimenteller Glomerulonephritis. Lan et al. konnten hier zeigen, dass durch Einsatz von IL1-Rezeptor Antagonisten ein signifikant geringerer Grad an Proteinurie und eine insgesamt besser erhaltene Nierenfunktion erreicht werden konnten (Lan, Nikolic-Paterson, Zarama, Vannice, & Atkins, 1993). In chronisch geschädigten Nieren lassen sich histologisch vermehrt Makrophagen nachweisen, als Ausdruck einer chronischen Inflammationsreaktion (Y. Wang et al., 2007). Es liegen also eine eine Aktivierung des inflammatorischen Systems mit Zunahme der extrazellulären Matrix mit vermehrter Fibrosereaktion und nachfolgendem Funktionsverlust vor.

### 1.3 Purinerge Rezeptoren

Die Bedeutung der Signaltransduktion durch purinerge Nukleoside wie Adenosin und purinerge Nukleotide wie ATP wurde erstmals 1929 in der Literatur beschrieben (Drury & Szent-Gyorgyi, 1929). Eine erste kriterienorientierte Einteilung gelang Burnstock in 1970er Jahren. Er entwickelte ein Modell in dem er die relative Potenz der Nukleoside und Nukleotide, die selektive Möglichkeit zur Antagonisierung, die Modulation der Adenylat-cyclase und die daraus resultierenden Veränderungen und schließlich die Unterschiede in der Induktion der Synthese von Prostaglandinen am jeweiligen Rezeptortyp im Modell der Zellkultur zur Einteilung nutzte (Burnstock, 1978). In der Folge führte diese Forschung zu einer international anerkannten Klassifikation der purinergen Rezeptoren, die anhand ihrer Transmitter in P1-Adenosin-Rezeptoren mit den Subklassifikationen A1, A2, etc. und P2-ATP-Rezeptoren mit den Hauptrezeptorfamilien P2X und P2Y eingeteilt werden. Die Differenzierung erfolgt hier unter Berücksichtigung des Transduktionsmechanismus. Die Hauptfamilie der P2X-Rezeptoren besteht aus liganden-gesteuerten Kationkanälen; die der P2Y-Rezeptoren aus G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (Abbracchio MP, 1993). Die Signaltransduktion von ATP kann intra- oder extrazellulär erfolgen und sie kommt nahezu ubiquitär in fast allen Zellen des Organismus vor. Die intrazelluläre Signaltransduktion erfolgt beispielsweise als Co-Substrat von ATP-abhängigen Kinasen. Die extrazelluläre Signaltransduktion

beispielsweise als Agonismus an purinergen Rezeptoren (Oberhauser, Vonend, & Rump, 1999; Ralevic & Burnstock, 2003; Vonend et al., 2002). In Abhängigkeit des Rezeptortyps kommt es bei Aktivierung beispielsweise zu Zellproliferation und -migration, zu erhöhter Plättchenaggregation oder Mediation bei epithelialen Transportvorgängen. Nach heutigem Stand sind sieben P2X- (P2X1-7) und acht P2Y-Rezeptoren (P2Y1,2,4,6,11-14) bekannt (Burnstock, 2012). P2-Rezeptoren werden in fast allen Organsystem exprimiert, so zeigt auch die Niere ein heterogenes Verteilungsmuster (Burnstock & Knight, 2004; Turner, Vonend, Chan, Burnstock, & Unwin, 2003). P2X-Rezeptor Untereinheiten bestehen in der Regel aus unterschiedlich langen Aminosäuresequenzen mit je zwei hydrophoben Regionen innerhalb der Plasmamembran und der extrazellulär gelegenen ATP-Bindungsstelle. Die N- und C-Termini liegen auf cytoplasmatischer Seite. Je drei Rezeptoruntereinheiten sind in der Lage eine gemeinsame Pore zu bilden, die selektiv die Kanalfunktion erfüllt. Eine Heterotrimerisierung aus verschiedenen Rezeptoruntereinheiten kann ebenfalls auftreten. Die P2X-Rezeptoren unterscheiden sich untereinander zusätzlich in Aktivierungs- und Deaktivierungsverhalten in Abhängigkeit von der Konzentration an ATP und der Dauer der Exposition am Rezeptor, und zeigen Unterschiede in der Desensibilisierung hinsichtlich der Öffnungsdauer des Kanals (North, 2002; Ralevic & Burnstock, 1998).

Der P2X7-Rezeptor zeigt sowohl eine vermehrte Expression auf Zellen des Immunsystems wie Lymphozyten und Makrophagen, als auch auf Epithelien und Zellen der hämatopoetischen Zelllinie (Di Virgilio et al., 1998; Ferrari et al., 2006). Er kann keine Heteromere mit anderen Rezeptoren der P2X-Gruppe bilden und kommt daher nur als Homomer vor. Im Vergleich zu anderen P2X-Rezeptoren benötigt der P2X7-Rezeptor höhere Konzentration an ATP zur Aktivierung. Der Rezeptor desensibilisiert nicht, d.h. seine Öffnungsdauer entspricht der Bindungszeit des ATP. Durch Aktivierung kann daher ein größerer Kationeninflux an Natrium und Calcium-Ionen generiert werden (Anderson & Nedergaard, 2006; Ferrari et al., 2006; Surprenant, Rassendren, Kawashima, North, & Buell, 1996). Die Haupteffekte der rezeptorvermittelten Signalkaskaden des P2X7-Rezeptors auf humanen Makrophagen sind die Ausschüttungen von Interleukin 1 $\beta$  (IL1 $\beta$ ) und Interleukin 18, die Induktion von Makrophagenfusion, Lymphozytenproliferation und

Apoptose bzw. Nekrose (Di Virgilio et al., 1998; Ferrari et al., 1997; Ferrari et al., 2006). Durch die vermehrte Sekretion von IL1 $\beta$  werden weitere pro-inflammatorische Zytokine wie Interleukin 6 oder TNF $\alpha$  sekretiert, die zu einer weiteren Rekrutierung inflammatorischer Zellen wie Makrophagen führen und so eine lokale Entzündungsreaktion unterhalten (Chessell et al., 2005; Lammas et al., 1997). Bei medikamentös induziertem Diabetes mellitus und transgen induzierter arterieller Hypertonie konnte im Tierversuch eine vermehrte Expression des Rezeptors vor allem an den Podozyten, aber auch im Bereich des Endothels und den Mesangiumzellen detektiert werden. Diese vermehrte Expression ging einher mit einer Expansion der mesangiozellulären Matrix und einem gesteigerten Grad an interstitieller Fibrose (Solini et al., 2005; Vonend et al., 2004).

#### 1.4 Rolle der P2X7 Rezeptoren bei der chronischen Niereninsuffizienz

Bei der chronischen Niereninsuffizienz kommt es zu einem Verlust des funktionsfähigen Nierengewebes und damit zu einer Einschränkung der Nierenfunktion. Bei Aktivierung des P2X7-Rezeptors auf murinen Makrophagen und auf Isolaten vaskulärer Zellen muriner Aorta kommt es zu vermehrter Sekretion von IL1 $\beta$  und daraus resultierend zu einer Inflammationsreaktion sowie zu ATP-abhängiger Apoptose bzw. Nekrose (Chiao, Tostes, & Webb, 2008; Pelegrin, Barroso-Gutierrez, & Surprenant, 2008). Vonend et al. haben gezeigt, dass es in Modellen chronischer Nierenschädigung wie dem Streptozotizin-induziertem Diabetes mellitus oder eines transgen induziertem Hypertonus eine Veränderung im Verteilungsmuster des Rezeptors gibt. Es konnte gezeigt werden, dass unter physiologischen Bedingungen im Rattenmodell eine geringfügige Anzahl an Rezeptoren in den Golmeruli zu finden sind. Unter den induzierten pathologischen Bedingungen hingegen zeigte sich eine starke Hochregulation des Rezeptors im Bereich der Podozyten, des Endothels und der Mesangiumzellen (Vonend et al., 2004). Für das Modell der subtotalen Nephrektomie wurde ein ähnliches Verteilungsmuster angenommen (Hillman, Burnstock, & Unwin, 2005). Goncalves et al. haben in einem Modell der unilateralen Ureterobstruktion (UUO) mit P2X7-Rezeptor-defizienten Mäusen gezeigt, dass es zu einem geringeren Grad an inflammationsassoziiierter Fibrose in den defizienten Mäusen gekommen ist (Goncalves et al., 2006). Die Autoren beobachteten in der Gruppe der defizienten Mäuse einen geringeren Grad an Makrophageninfiltration, geringe

Myofibroblastenzahl, einen geminderten Collagenfaseranteil sowie geringere Expression von TGF $\beta$  im Interstitium. Daher wurde ein positiver Zusammenhang zwischen P2X7-Aktivierung und der Stimulation von Fibroblasten vermutet. Ein möglicher Erklärungsansatz könnte sein, dass IL1 $\beta$  die Fibroblastenproliferation und die Produktion von extrazellulärem Collagen in Makrophagen und epithelialen Zellen fördert. In einem in vitro Experiment haben Karmakar et. al den Einfluss von Lipopolysacchariden (LPS) als ein Induktor von Inflammation und ATP auf P2X7-defizienten neutrophilen Granulozyten untersucht. Hohe ATP-Konzentrationen führen zu einer Aktivierung des Rezeptors. Dies hat einen Kationeninflux in Form von Ca $^{2+}$  zur Folge. Es konnte gezeigt werden, dass gleichzeitige hohe LPS- und ATP-Stimulation eine hohe zytosolische Kalziumkonzentration zur Folge hatten, die eine Exozytose von Vesikeln, in diesem Falle, mit IL1 $\beta$  bewirkte. In den Rezeptor-defizienten neutrophilen Granulozyten kam es zu einer signifikant geringeren Ausschüttung von IL1 $\beta$  und daher zu einer verminderten Inflammationsreaktion (Karmakar, Katsnelson, Dubyak, & Pearlman, 2016).

#### 1.5 Ziel dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle des P2X7-Rezeptors im Rahmen der chronischen Niereninsuffizienz zu untersuchen. Am Knockout-Mausmodell wurde nach subtotaler Nephrektomie der Einfluss des purinergen P2X7-Rezeptors auf die Progredienz der Erkrankung untersucht, sowie die daran beteiligten inflammatorischen Mediatoren und die renale Organfibrose analysiert.

## **2 Methoden**

### 2.1 Versuchstiere und Versuchstierhaltung

Als Versuchstiere wurden ausschließlich 6-8 Wochen alte männliche P2X7-Rezeptor-Knockout Mäuse (Solle et al., 2001) verwendet. Als Vergleichsgruppe dienten entsprechende Tiere des Wildtyps. Es handelte sich um Tiere des FVB-Maus-Hintergrundes. Untergebracht waren die Tiere in der zentralen Tierversuchsanstalt der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Sie wurden in Typ III-Polycarbonat-Käfigen bei 45 % Luftfeuchtigkeit, 20 – 22° Celsius Raumtemperatur und einem 12-stündigen Tag-Nacht-Zyklus gehalten und hatten jederzeit freien Zugang zu Wasser und Futter. Das Aktenzeichen des Tierversuches lautete 84-02.04.2011.A268 mit der lokalen Nummer G268\_11.

### 2.2 Subtotale Nephrektomie

Das Operationsgebiet wurde steril abgedeckt. Die Operation erfolgte unter sterilen Bedingungen in der Tierversuchsanstalt des Universitätsklinikums Düsseldorf. Das Operationsbesteck stand vor den Operationen autoklaviert zur Verfügung. Vor dem Eingriff wurde der Bereich um die geplante Inzisionstelle am Versuchstier großzügig rasiert (Andis, Sturtevant, USA) und das Tier wurde gewogen. Die intraperitoneal injizierte Narkose der Tiere erfolgte mittels einer Mischung aus 0.168 mg/gKG Ketamin (10 mg/ml; Pfizer GmbH, Berlin, Deutschland) und 8 µg/gKG Xylazinhydrochlorid (2 mg/ml; AniMedica GmbH, Senden-Bösensell, Deutschland) in isotoner Kochsalzlösung (NaCl 0.9%) im Verhältnis 1:1:8. Zur Bestimmung einer ausreichenden Narkosetiefe wurde ein interdigitaler Schmerzreiz an den Hinterläufen der Tiere gesetzt und adäquat beurteilt. Prä-, peri- und postoperativ wurden die Tiere prophylaktisch mit einer Augensalbe behandelt (Polyspectran HC, Alcon). Die technische Ausführung der subtotalen (5/6) Nephrektomie wird im Folgenden beschrieben:

Nach atraumatischer Fixierung des Tieres erfolgte die Hautdesinfektion mit steriler Abdeckung des Operationsgebietes. Anschließend wurde eine dorsale, longitudinale, median-subcostale Hautinzision mittels chirurgischer Schere durchgeführt (feine Schere, gerade, 11.5 cm, Martin). Nach Mobilisierung der Haut und der darunter liegenden Faszie erfolgte die scharfe Durchtrennung der rechtsseitigen Bauchmuskulatur, um das Nierenlager frei zu legen. Nach vorsichtiger Luxation der rechten Niere nach außen wurde die Nierenkapsel

abpräpariert. Mittels eines sterilen Seidenfadens (PH-Seide 4-0) wurde der Nierenhilus ligiert, das Organ in toto reseziert und der Gefäßstumpf repositioniert. Das Gewicht des Organs wurde ermittelt. Nach Verschluss der Bauchmuskulatur mittels Einzelknopfnähten (Vicryl 3-0) erfolgte die subtotale Nephrektomie der linken Niere. Diese entsprach bis auf folgende Unterschiede der rechtsseitigen: Nach erfolgreicher Präparation der Nierenkapsel wurden mittels zweier steriler Seidenfäden der obere und untere Pol der linken Niere ligiert und reseziert, so dass circa 60 % des Nierengewebes entfernt wurden, was ca. 5/6 des totalen funktionellen Nierengewebes entspricht. Die Hautinzision wurde durch eine fortlaufende Naht (Prolene 3-0) verschlossen. Im Mittel betrug die Operationszeit 25 – 30 Minuten pro Tier.

Postoperativ erfolgte eine subkutane Flüssigkeitssubstitution mit 0.5 ml physiologischer Kochsalzlösung. Weiterhin wurden die Tiere analgetisch mit 0.05 – 0.1 mg/kgKG Buprenorphin behandelt und zwecks geeigneten Wärmemanagements bis zum Erwachen mit einer Infrarotlampe bestrahlt. In frischen Käfigen wurden die Tiere unter Versuchsbedingungen weiter versorgt. Das Nahtmaterial wurde in der Regel durch die Versuchstiere frühzeitig selbst entfernt. Verbliebenes Nahtmaterial wurde bei areaktiven Wundverhältnissen am 7. postoperativen Tag entfernt.

### 2.3 Stoffwechselkäfige und Sammelurin

Der geplante Versuchszeitraum betrug  $35 \pm 2$  Tage. Versuchstag 1 entspricht hierbei dem ersten postoperativen Tag. An den Tagen 5, 10, 20 und 35 wurde jeweils über Nacht ein Sammelurin angefertigt. Die mittlere Sammelzeit betrug in etwa 18 Stunden. Die Tiere wurden hierfür in Stoffwechselkäfigen (Techniplast GmbH, Hohenpreißenberg) gehalten und hatten freien Zugang zu Wasser und pelletierter Tiernahrung. Die Urinmenge wurde dokumentiert und in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt. Anschließend wurde der Urin bei 4° C und 3800 Umdrehungen/min zentrifugiert (Centrifuge 5417R, Eppendorf), ein Überstand aliquotiert und weiteren Analysen zugeführt.

### 2.4 Blutentnahme

An den Versuchstagen 20 und 35 wurde von den Versuchstieren nach vorangegangener Narkose (wie oben beschrieben) mittels retroorbitaler Punktion

des Venenplexus Blut gewonnen. Das Versuchstier wurde nach erfolgter Anästhesie zwischen Daumen und Zeigefinger fixiert. Durch Druck auf den kontralateralen wurde der ipsilaterale Bulbus leicht aus der Orbita luxiert, so dass über den medialen Augenwinkel mit Hilfe einer Pasteurpipette (230 mm lang, Assistent) der retroorbitale Venenplexus punktiert werden konnte. Pro Tier wurden maximal 500 µl Blut entnommen. Das Blut wurde in ein 1.5 ml Eppendorfgefäß überführt, welches zuvor mit 5 µl Heparin (10.000 I.E./ml, Firma Braun, Deutschland) versetzt wurde. Nach Zentrifugierung (Centrifuge 5417R, Eppendorf) bei 4° C und 3000 Umdrehungen/min wurde das Plasma abpipettiert, aliquotiert und weiteren Analysen zugeführt.

### 2.5 Blutdruckmessung

Die nicht-invasive systolische Blutdruckmessung erfolgte mittels einer Schwanzmanschetten-Plethysmografie unter Verwendung eines BP-98A Messgerätes (Softron, Japan) und wurde an Tag 32 ± 2 Tage durchgeführt. Den Messungen vorangestellt war eine Trainingsphase. Messungen fanden stets zur gleichen Tageszeit und unter gleichen Versuchsbedingungen statt. Dabei wurden die Tiere in einer Leinenmanschette fixiert und in einem beheizbaren Thermorohr gelagert (bei konstanten 37°C), der Schwanz wurde in der Druckmanschette positioniert. Es erfolgten konsekutiv 10 Einzelmessungen unter Berücksichtigung der Herzfrequenz.

### 2.6 Quantitative Messung einzelner Parameter im Urin

Aus den asservierten Urinproben wurden quantitativ die Harnstoff- und Kreatininkonzentrationen bestimmt. Die Analysen der Proben erfolgten im Zentrallabor des Universitätsklinikums Düsseldorf mittels Roche/Hitachi cobas c Analyzer in-vitro Testsystems (Roche Pharma AG, Basel, Schweiz) unter Nutzung eines UREAL-cobas in vitro Testkits (Bestellnr. 0105171873190c701V8.0, Roche Pharma AG, Basel, Schweiz) für die Harnstoffbestimmung als kinetischer Test mittels Urease und Glutamatdehydrogenase und eines CREP2-cobas in vitro Testkits (Bestellnr. 0005168589190c701V6.0, Roche Pharma AG, Basel, Schweiz) für die Kreatininbestimmung als enzymatische Methode über Umwandlung des Kreatinins mittels Kreatininase, Kreatinase und Sarcosinoxidase zu Glycin, Formaldehyd und Wasserstoffperoxid.

### 2.7 Quantitative Albuminbestimmung im Urin

Die quantitative Albuminbestimmung aus den asservierten Urinproben erfolgte in den Laboren der Firma CellTrend GmbH (Luckenwalde) durch einen ELISA unter Nutzung des CellTrend Albumin(Maus)-ELISA (Bestellnr. 50200, CellTrend GmbH, Luckenwalde).

### 2.8 Quantitative Cystatin C-Bestimmung im Serum

Die quantitative Cystatin C-Bestimmung aus den asservierten Serumproben erfolgte durch einen ELISA unter Nutzung eines Mouse/Rat Cystatin C Quantikine ELISA-Kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) entsprechend der Herstellervorgaben.

### 2.9 Organentnahme

Unter adäquater Anästhesie erfolgte über einen ventrale Medianlaparotomie, unter expliziter Schonung von Magen, Darm, Leber und Milz die Freilegung des Retroperitoneums. Zunächst wurde die Aorta abdominalis mit einer Ligatur kurz unterhalb des Zwerchfells angeschlungen, jedoch noch nicht ligiert. Anschließend wurde die Aorta abdominalis an der Bifurkation der Iliakalarterien ligiert und kurz unterhalb des Abgangs der linken Nierenarterie mit einer Strabismus-Federschere (gebogen, 11.5 cm, Martin) inzidiert. Durch die Inzision wurde von distal in proximale Richtung ein Polyethylen Schlauch (Aussendurchmesser 0.61 mm, Innendurchmesser 0.28 mm, neoLab, Heidelberg) eingeführt und vorgeschoben. Nach Ligatur der subphrenischen Aorta wurde die Niere über einen Perfusor (Harvard Pump 11 Plus Dual Syringe, Harvard Apparatus, MA, USA) mit einer Laufrate von 2 ml/min mit PBS perfundiert, bis sich die Nieren vollständig entfärbten (Blutleere). Zur Sicherstellung des Blutabflusses aus der perfundierten Restniere wurde die Nierenvene ebenfalls mit der Federschere inzidiert. An dieser Stelle erfolgte die Euthanasie mittels Dekapitation. Sodann wurde die linke Restniere der nephrektomierten Tiere entnommen und in eine Petrischale auf Eis überführt. Die narbigen Anteile der teil-nephrektomierten Niere wurden im Bereich des Ober- und Unterpols mit einem Skalpell entfernt. Von der entnommenen Niere wurde Teile für Protein- und Genexpressionsanalysen in gewebeschützenden Lösungsmitteln (100 µl Allprotect Tissue bzw. 100 µl RNeasy Lysis Buffer, Qiagen) in 0,5 ml Eppendorfgefäßen asserviert und für eine Nacht bei -20° C und danach bei -80° C konserviert. Das restliche Gewebe wurde für histologische Untersuchungen zur Herstellung von

Paraffinblöcken verwendet, in toto in eine Histo-Kassette gelegt und für eine Nacht in 10%-igem Formalin aufbewahrt (siehe Abschnitt Herstellung Paraffinblöcke- und Schnitte).

### 2.10 Quantitative Real-time-PCR (qPCR)

Das asservierte Nierengewebe aus dem P2X7-KO-Tieren und den Wildtyp-Tieren wurde mit dem Tissue Ruptor (Qiagen) gemäß Herstellervorgaben zerkleinert. Anschließend wurde die RNA mittels RNAeasy Plus Mini Kit (Qiagen) nach Herstellerprotokoll isoliert und mit dem QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) in cDNA umgeschrieben. Die eigentliche Real-time-PCR wurde mit Hilfe eines 7300 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems, Foster City, USA) unter Nutzung eines TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems) sowie 96-Well Platten (semi skirted, StarLab, Hamburg, Deutschland) mit dem entsprechenden vorgegebenen Assay-Protokoll durchgeführt. Das Ergebnis wird am Ende als mittlerer Zyklusschwellenwert angegeben (CT-Wert). Zur mRNA Quantifizierung wurde die relative Quantifizierung verwendet, bei der die Expression der zu untersuchenden Gene mit der eines „housekeeping genes“ normalisiert wird. Dabei werden nicht die absoluten Startkopienzahlen oder Startkonzentrationen bestimmt, sondern die Expression des untersuchten Gens wird auf ein konstitutiv exprimiertes Gen bezogen. Im Folgenden wurde dafür das housekeeping gene Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als Referenzpunkt verwendet. Die Berechnung des Expressionsunterschiedes erfolgte über die delta CT-Methode und wird im Folgenden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler angegeben. Für die graphische Darstellung des qPCR Ergebnisses wurde sowohl von den  $\Delta$ CT Behandlungsproben als auch von den  $\Delta$ CT Kontrollproben der  $\Delta$ CT Kontrollgruppenmittelwert subtrahiert und aus den entstandenen Werten jeweils ein Mittelwert für die Knock-Out und die Kontrollgruppe generiert. Aus der Formel  $2^{-\Delta\Delta CT}$  ergab sich dann für die Kontrollgruppe der Referenzwert 1 und für die Knock-Out-Gruppe die relativ vermehrte oder verminderte Expression der jeweiligen gemessenen mRNA.

TaqMan Primer:

- Col1a1 Mm00801666\_g1
- TGF $\beta$  Mm01178820\_m1

- PAI-1 Mm00435860\_m1
- Il-1 $\beta$  Mm00434228\_m1
- MCP-1 Mm0041242\_m1
- RANTES Mm01302427\_m1
- NF $\kappa$ B Mm01297400\_m1

## 2.11 Proteinanalyse

### *2.11.1 Proteinisolierung*

Das asservierte Nierengewebe wurde aus dem gewebeschützenden Lösungsmittel entnommen in 500  $\mu$ l kaltes (zuvor auf Eis gelagertes) PBS in einem Eppendorfgefäß überführt. Anschließend wurden die Proben aus dem PBS entnommen und, nach Abtupfen der PBS-Reste am Gewebe, in ein mit ca. 150 - 500  $\mu$ l Lysispuffer gefülltes Homogenisierungsröhrchen (FACS-Röhrchen) in einem Eiswasserbad überführt. Der (Triton-)Lysispuffer bestand aus folgenden Komponenten:

- 50 mM TrisHCL, pH 7.4
- 150 mM NaCl
- 1 mM EDTA
- 2% SDS
- 1% Triton
- cOmplete Mini, 1 Tablette pro 10 ml (Protease Inhibitor Cocktail Tablette, Roche Diagnostics, Rotkreuz, Schweiz)

Die Homogenisierung des Gewebes erfolgte unter Verwendung des Tissue Ruptors (Qiagen) im Eiswasserbad. Es folgte eine 30-minütige Inkubationsphase des Homogenisats auf Eis. Danach wurden die Lysate in 1.5 ml Eppendorfgefäße überführt und 15 Minuten bei maximaler Rotationsgeschwindigkeit und 4° C zentrifugiert. Vom so entstandenen Überstand wurden 100  $\mu$ l in ein 1.5 ml Eppendorfgefäß abpipettiert, mit 100  $\mu$ l 2-fach Laemmli versetzt, 5 Minuten bei 95° C erhitzt und letztlich bei -80° C eingefroren. Weiterhin wurden 5  $\mu$ l für die Proteinbestimmung entnommen, in ein 1.5 ml Eppendorfgefäß überführt und mit 30  $\mu$ l destilliertem Wasser versetzt. Der Restüberstand wurde zusätzlich bei -80° C asserviert.

### 2.11.2 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde mit Hilfe eines Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) nach Herstellervorgaben durchgeführt.

### 2.11.3 Herstellung der Trenn- und Sammelgele

Für die Elektrophorese wurden Polyacrylamid-Gele aus folgenden Komponenten mit Hilfe des Mini-PROTEAN Tetra Handcast Systems (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) hergestellt:

- Trenngel
  - 360 mM TrisHCl
  - 1.14 M Tris Base
  - 0.4% SDS
  - Rotiphorese Gel 30 (Verhältnis 37.5:1, Roth)
  - Wasser
  - 10% APS
  - TEMED (#2367, Roth)
- Sammelgel
  - 484 mM TrisHCl
  - 16 mM Tris Base
  - 0.4% SDS
  - Rotiphorese Gel 30 (Verhältnis 37.5:1, Roth)
  - Wasser
  - 10% APS
  - TEMED (#2367, Roth)

### 2.11.4 Elektrophorese und Western Blot

Für die Gelelektrophorese wurden 7%-ige Polyacrylamid-Gele verwendet. Jede Tasche wurde mit 30 µg Protein geladen. Für das Trenngel wurde eine Stromstärke von 15 mA für 1.5 Stunden fest- und für das Sammelgel eine Spannung von 70 V für 30 Minuten angelegt. Der Western Blot wurde in einer Mini-PROTEAN Tetra Vertical Elektrophoresis Cell (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) bei 200 mA und 2.75 Stunden Laufzeit durchgeführt.

Für die Färbung wurde die geblottete Membran über Nacht in einer 5%-igen Magermilchpulver-Waschpuffer-Lösung geblockt. Am Folgetag wurde die Membran zusammen mit dem ersten Antikörper anti-Collagen-1 (Collagen Type 1 *Antibody, anti mouse*, Catalog No. 203002, mdbioproducts) in einer Konzentration von 1:15000 und einer 1%-igen Magermilchpulver-Waschpuffer-Lösung über Nacht bei 4° C inkubiert. Anschließend wurde die Membran drei Mal je 5 Minuten mit Proteinwaschpuffer gewaschen und mit dem zweiten Antikörper anti-Kaninchen in einer Konzentration von 1:10000 eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Auch hiernach wurde drei Mal je 5 Minuten mit Proteinwaschpuffer gewaschen. Letztlich wurde die Membran unter Zugabe von superECL (Promega, Fitchburg, WI, USA) entwickelt und mittels Imager Fotos nach 1, 2 und 5 Minuten angefertigt. Im gleichen Zug wurde auch ein Auflichtbild für ein späteres Overlay aufgenommen.

Die Nachfärbung für eine Referenz erfolgte mit  $\beta$ -Actin. Hierfür wurde die Membran mit einem anti- $\beta$ -Actin Antikörper (Sigma-Aldrich) in einer Konzentration von 1:7500 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend drei Mal je 5 Minuten mit Proteinwaschpuffer gewaschen. Als zweiter Antikörper diente anti-Maus in einer Konzentration von 1:10000, hier wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem wie oben erläuterten Waschprozess mit Proteinwaschpuffer erfolgten auch hier die Bildentwicklung und Aufnahmen nach 30 Sekunden und 1 Minute. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte kolorimetrisch nach der Bradford-Methode. Anschließend erfolgte die Berechnung eines Mittelwertes des einzelnen Versuchstieres. In einem letzten Schritt wurde aus diesen Mittelwerten jeweils ein weiterer Mittelwert zum Vergleich der beiden Versuchsgruppen errechnet.

#### 2.12 Herstellung der Paraffinblöcke und -schnitte

Das entnommen Nierengewebe wurde über Nacht in 10% Formalinlösung fixiert. Entwässert wurde das Gewebe nach folgendem Protokoll:

1. 70% Ethanol, 1 Stunde
2. 80% Ethanol, 1 Stunde
3. 96% Ethanol, 1 Stunde
4. 100% Ethanol, über Nacht
5. Xylol, 2x je 1 Stunde

## 6. Paraffin, 2x je 1 Stunde

Anschließend wurde das Gewebe auf einer mit 65° C vorgeheizten Einbettungsform positioniert und diese mit flüssigem Paraffin aufgefüllt. Zur Aushärtung wurde der Paraffinblock auf eine 4° C kalte Platte gelegt und letztlich bei Raumtemperatur lichtgeschützt gelagert. Die Herstellung der Schnitte erfolgte mit Hilfe eines Mikrotoms (Jung Histoslides 2000, Leica). Hierbei betrug die Schnittdicke 1 µm. Die Schnitte wurden auf Objektträgern (Thermo Scientific) aufgenommen und über Nacht bei 37°C getrocknet und fixiert.

Zur Vorbereitung der histologischen Färbungen wurden die Schnitte in nachfolgender Weise entparaffiniert und in absteigender Alkoholreihe rehydratisiert:

- Xylol, 2x je 5 Minuten
- 100% Ethanol, 2x je 3 Minuten
- 96% Ethanol, 3 Minuten
- 80% Ethanol, 3 Minuten
- 70% Ethanol, 3 Minuten
- 50% Ethanol, 3 Minuten

### 2.13 PAS-Färbung

Die Periodic-Acid-Schiff-Färbung wurde nach untenstehendem Protokoll unter Verwendung eines PAS Staining Kit (Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt.

Die PAS-Reaktion färbt Aldehyde und Mykosubstanzen an und diente in diesem Fall als Übersichtsfärbung zur Beurteilung des Grades an Glomerulosklerose in den untersuchten Gruppen. Die angegebenen Werte geben die Anzahl der sklerosierten Glomeruli bezogen auf die Gesamtzahl der Glomeruli pro Schnitt für die einzelnen Experimente wieder (Glomerulosklerose Index).

Zunächst wurden die vorbereiteten Schnitte mit destilliertem Wasser gespült und in eine Perjodsäure-Lösung überführt, in der sie 5 Minuten inkubierten. Nach 3-minütigem Spülen unter fließendem Leitungswasser und Spülung mit destilliertem Wasser wurden die Schnitte in eine Lösung mit Schiff-Reagenz überführt und inkubierten 15 Minuten. Auch hieran schlossen sich eine 3-minütige Spülung unter fließendem Leitungswasser und Spülung mit destilliertem Wasser an. Nun wurden

die Schnitte eine Hämatoxylin Lösung (modifiziert nach Gill III) überführt, inkubierten 2 Minuten und wurden letztlich unter fließendem Leitungswasser erneut gespült. Im letzten Schritt durchliefen die gefärbten Schnitte folgende aufsteigende Alkoholreihe:

- 70% Ethanol, 2x je 1 Minute
- 96% Ethanol, 2x je 1 Minute
- 100% Ethanol, 2x je 1 Minute

Nach Lufttrocknung bei Raumtemperatur wurden die Präparate mit einem geeigneten permanenten Eindeckmedium (Roti-Mount #HP68.1, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) eingedeckt und so der Mikroskopie zugänglich gemacht. Die Mikroskopie der Schnitte erfolgte in Kooperation mit Herrn Dr. med. Clemens Brockmeyer (Nephropathologie, Universitätsklinikum Erlangen). Pro Schnitt wurden 10 High-Power-Fields (400-fache Vergrößerung) ausgewertet und dort jeweils die Zahl der sklerosierten Glomeruli bezogen auf die Gesamtzahl der Glomeruli angegeben. Anschließend erfolgte die Berechnung eines Mittelwertes pro Schnittserie des einzelnen Versuchstieres. In einem letzten Schritt wurde aus diesen Mittelwerten jeweils ein weiterer Mittelwert zum Vergleich der beiden Versuchsgruppen errechnet.

#### 2.14 Masson-Trichrome-Färbung

Die Masson-Trichrome-Färbung wurde nach untenstehendem Protokoll unter Verwendung eines Trichrome Stain (Masson) Kits (Sigma HT-15, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland), einer Hämatoxylin Lösung (Sigma HT10-79, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) und einer Bouins-Lösung (Sigma HT-1-32, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) durchgeführt.

Die Masson-Trichrome-Färbung wurde durchgeführt, um eine Quantifizierung des angefärbten Collagens in den Präparaten beider Gruppen vornehmen zu können. Pro Schnitt wurden 10 High-Power-Fields (400-fache Vergrößerung) ausgewertet und dort jeweils der sichtbar angefärbte prozentuale Anteil an Collagen bestimmt. Die Bestimmung erfolgte mittels dem Computerprogramm ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Anschließend erfolgte die Berechnung eines Mittelwertes pro Schnittserie des einzelnen

Versuchstieres. In einem letzten Schritt wurde aus diesen Mittelwerten jeweils ein weiterer Mittelwert zum Vergleich der beiden Versuchsgruppen errechnet.

Zu Beginn wurden die vorbereiteten Schnitte 15 Minuten lang in der auf 56° C erwärmten Bouins-Lösung inkubiert, dann unter fließendem Leitungswasser bis zum Entfärben der Spülflüssigkeit gespült und schließlich noch einmal mit destilliertem Wasser nachgespült. Darauf folgten eine 5-minütige Inkubation in einer Weigerts-Eisen-Lösung und eine erneute Spülung unter fließendem Leitungswasser und mit destilliertem Wasser. Im nächsten Schritt wurden die Schnitte 5 Minuten in einer Bierberich-Scharlachrot-Säurefuchsin-Lösung inkubiert und danach mit destilliertem Wasser gespült. Anschließend erfolgten eine 5-minütige Inkubation in einer Phosphomolybdänsäure-Phosphowolframsäure- und eine 5-minütige Inkubation in einer Anilinblau-Lösung. Letztlich inkubierten die Schnitte noch in einer 1%-igen Essigsäure und wurden mit destilliertem Wasser gespült.

Nach Lufttrocknung bei Raumtemperatur wurden die Präparate mit einem geeigneten permanenten Eindeckmedium (Roti-Mount #HP68.1, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) eingedeckt und so der Mikroskopie zugänglich gemacht. Die fertigen Präparate wurden digitalisiert und wie oben beschrieben ausgewertet.

### 2.15 Statistik

Die Anzahl der Experimente pro Gruppe ist stets mit n angegeben. Zur statistischen Auswertung wurde das Computerprogramm GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., CA, USA) genutzt. Für jede Gruppe wurde ein arithmetischer Mittelwert mit Standardfehler berechnet. Dargestellt sind die Ergebnisse als Mittelwert (MW) mit dem jeweiligen Standardfehler ( $\pm$  Standard Error of Mean; SEM). Für die Berechnung der statistischen Signifikanz wurde der Student's t-Test verwendet. Differenzen mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0.05$  werden als signifikant unterschiedlich angesehen.

### 3 Ergebnisse

Die Unterschiede im Bereich der angegebenen Versuchstierzahlen für die einzelnen nachfolgend dargestellten Ergebnisse erklärt sich dadurch, dass nicht für alle untersuchten Parameter die gleiche Anzahl an auswertbaren Ergebnissen bzw. Proben vorlagen.

#### 3.1 Physiologische Daten

##### 3.1.1 Körpergewicht

Präoperativ wurden die Versuchstiere gewogen, um das Körpergewicht zu ermitteln und Vergleichbarkeit sicher zu stellen. Die P2X7-KO-Tiere zeigten ein Gewicht von  $28.0 \pm 0.4$  g (n=18), die Wildtypiere ein Gewicht von  $27.6 \pm 0.5$  g (n=23). Damit ergab sich kein signifikanter Unterschied im Körpergewicht beider Gruppen (p=NS) (Abb. 2).

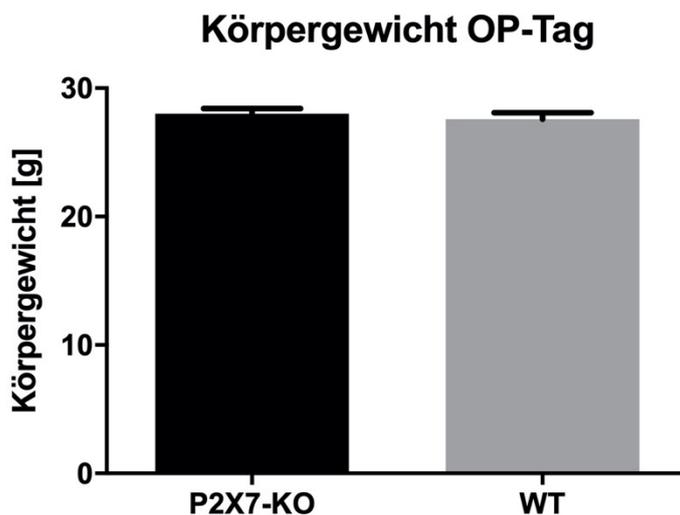


Abb. 2: Körpergewicht beider Versuchstiergruppen unmittelbar vor der subtotalen Nephrektomie an Versuchstag 0

Zusätzlich wurde das Körpergewicht am Tag der Organentnahme erhoben. Für die P2X7-KO-Tiere ergab sich ein Körpergewicht von  $28.6 \pm 0.3$  g (n=23), für die Wildtypiere ein Gewicht von  $29.1 \pm 0.6$  g (n=15), somit zeigte sich kein signifikanter Unterschied (p=NS) (Abb. 3).

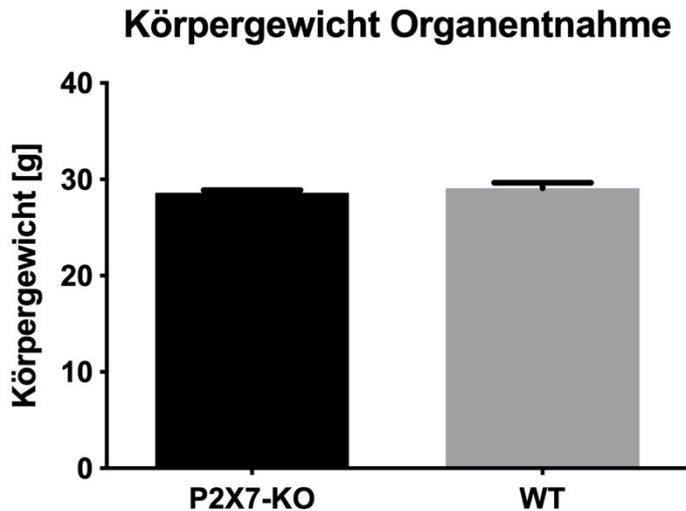


Abb. 3: Körpergewicht beider Versuchstiergruppen unmittelbar vor der Organentnahme an Versuchstag 35

#### 3.1.2 Nierengewicht zum Zeitpunkt der OP (Beginn Versuchszeitraum Tag 0)

Das Gewicht des entfernten Nierengewebes wurde intraoperativ erfasst. Hierbei betrug das Gewicht des totalen Nephrektomiepräparates der rechten Niere bei den P2X7-KO-Tieren  $0.201 \pm 0.002$  g (n=18), in der Gruppe der Wildtypiere  $0.202 \pm 0.004$  g (n=23) (p=NS) (Abb. 4).

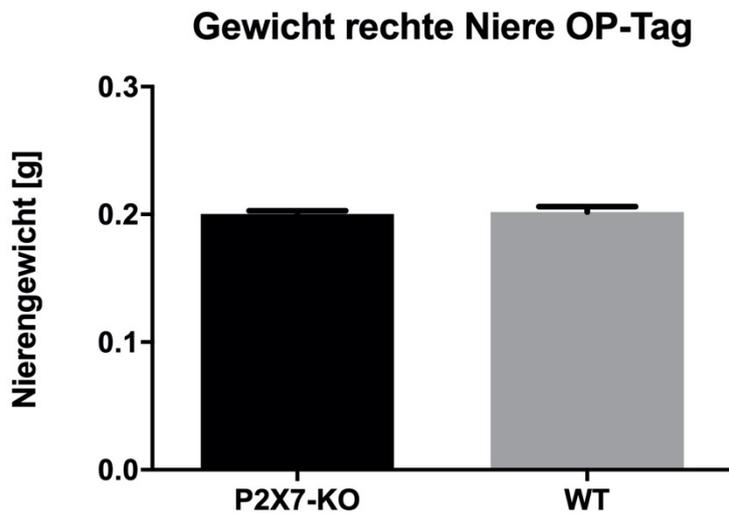


Abb. 4: Nierengewicht des totalen Nephrektomiepräparates rechtsseitig beider Versuchstiergruppen an Versuchstag 0

Das Gewicht des entfernten subtotalen Nephrektomiepräparates der linken Niere betrug für die P2X7-KO-Tiere  $0.101 \pm 0.002$  g (n=18), für die Wildtypiere  $0.095 \pm 0.003$  g (n=23) (p=NS).

### 3.1.3 Nierengewicht zum Zeitpunkt der Organentnahme (Beginn Versuchszeitraum Tag 35)

Am Tag der Organentnahme (Tag 35) wurde das Gewicht des verbliebenen Nierengewebes der linken Niere ermittelt. Das Restnierengewicht am Entnahmetag (Tag 35) wurde gewogen. Es zeigte sich, dass das Nierengewicht für die P2X7-KO-Tiere mit  $0.196 \pm 0.005$  g (n=23) im Vergleich mit dem der Wildtypiere mit  $0.226 \pm 0.009$  g (n=15) signifikant geringer war (p<0.01). An Tag 0 musste das Restnierengewicht geschätzt werden (Restniere links Tag 0 [g] = Entnommene Niere rechts – entnommenes Nierengewebe links [g]) (Abb. 5).

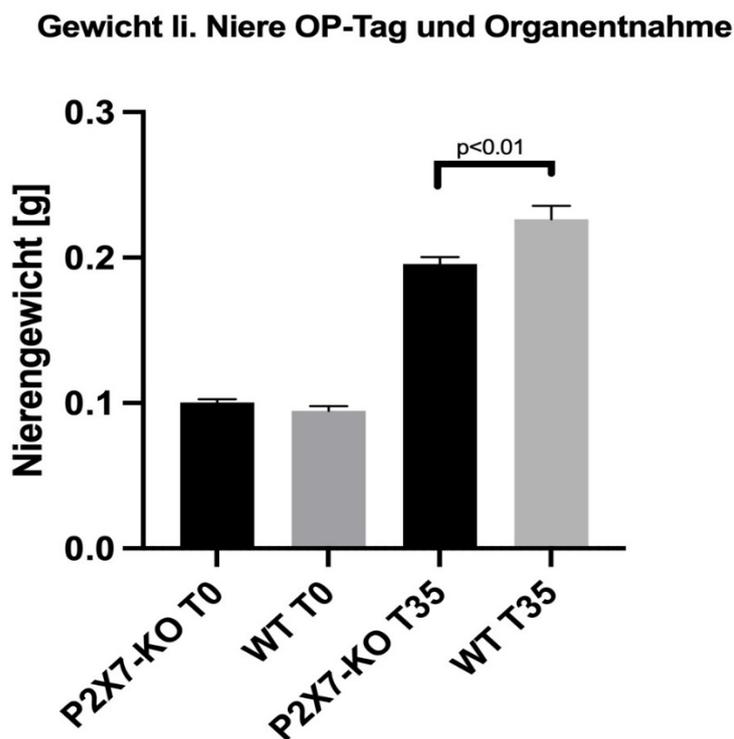


Abb. 5: Geschätztes Nierengewicht des subtotalen Nephrektomiepräparates linksseitig beider Versuchstiergruppen an Versuchstag 0 (T0) sowie des gewogenen residuellen Nierengewebes beider Versuchstiergruppen an Versuchstag 35 (T35)

### 3.1.4 Herzgewicht und Blutdruck

Am Tag der Organentnahme wurde zusätzlich das Herzgewicht bestimmt. Für die P2X7-KO-Tiere betrug das Herzgewicht  $0.1338 \pm 0.0027$  g (n=17), für die Wildtypiere  $0.1344 \pm 0.0020$  g (n=15). Es bestand kein signifikanter Unterschied (p=NS).

An Tag 32 wurden Blutdruckmessungen in beiden Versuchstiergruppen durchgeführt. Für die P2X7-KO-Tiere ergab sich ein systolischer Blutdruck von  $143.9 \pm 1.1$  mmHg (n=24), für die Wildtypiere von  $149.6 \pm 2.3$  mmHg (n=15). Es zeigten sich signifikant geringere Blutdruckwerte auf Seiten der P2X7-KO-Tiere (p<0.01) (Abb. 6).

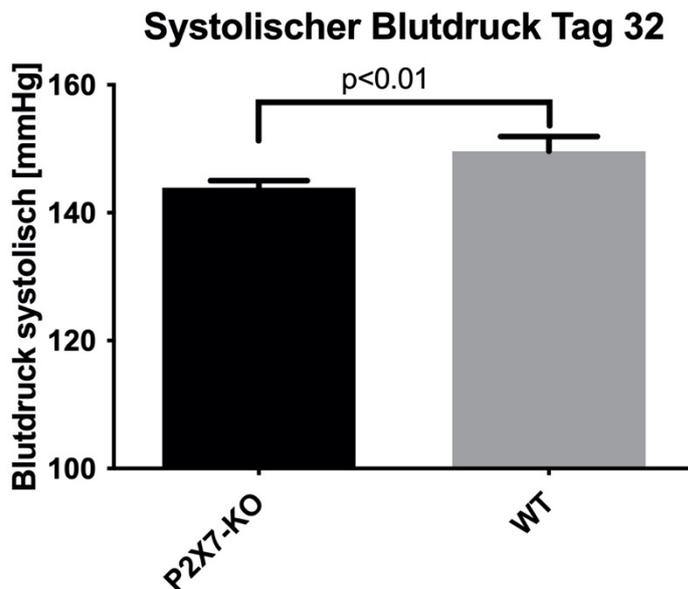


Abb. 6: Systolischer Blutdruck beider Versuchstiergruppen an Versuchstag 32

## 3.2 Urinanalysen

### 3.2.1 Harnstoff-Messungen

Die Messungen der Harnstoffkonzentrationen im Urin zur Beurteilung der renalen Konzentrationsfähigkeit wurden an den Tagen 5, 10, 20 und 35 durchgeführt. An Tag 5 zeigte sich eine signifikant höhere Harnstoffkonzentration von  $3209.0 \pm 363.7$  mg/dl (n=11) für die P2X7-KO-Tiere im Vergleich mit den Wildtypieren von  $1810.0 \pm 713.2$  mg/dl (n=9) (p<0.05). Für die Tage 10 und 20 wurden für die P2X7-KO-

Tiere Konzentrationen von  $3270.0 \pm 463.4$  (n=11) bzw.  $3181 \pm 420$  mg/dl (n=11) und für die Wildtyptiere von  $2637.0 \pm 367.7$  (n=9) bzw.  $2235.0 \pm 584.8$  mg/dl (n=9) gemessen. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (p=NS). Die an Tag 35 gemessenen Konzentrationen zeigten signifikant höhere Werte für die P2X7-KO-Tiere von  $4407.0 \pm 352.7$  mg/dl (n=23) verglichen mit  $2502.0 \pm 331.3$  mg/dl (n=15) für die Wildtyptiere (p<0.001) (Abb. 7).

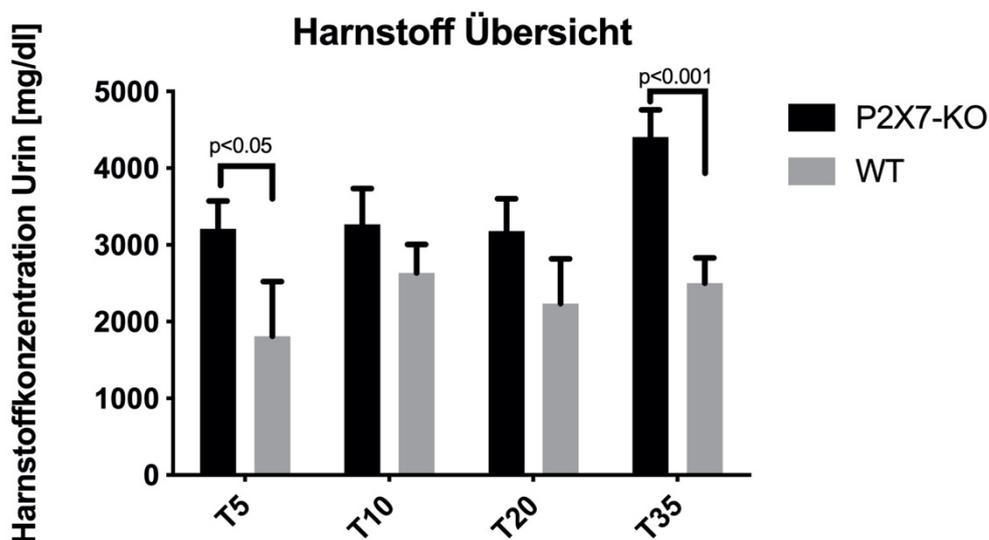


Abb. 7: Zusammenfassende Darstellung der Harnstoffkonzentrationen im Urin beider Versuchstiergruppen an den Versuchstagen 5, 10, 20 und 35

### 3.2.2 Kreatinin-Messungen

Kreatinin wurde ebenfalls zur Abschätzung der renalen Konzentrationsfähigkeit an den Tagen 5, 10, 20 und 35 im Urin gemessen. Über alle Messpunkte hinweg zeigten sich signifikant höhere Kreatinin-Konzentrationen auf Seiten der P2X7-KO-Tiere. Genauer betrachtet wurden an Tag 5 eine Konzentration von  $15.7 \pm 1.8$  mg/dl (n=11) bei den P2X7-KO-Tieren gegenüber einer Konzentration von  $8.3 \pm 3.6$  mg/dl (n=9) bei den Wildtyptieren (p<0.05), an Tag 10 von  $16.4 \pm 2.6$  mg/dl (n=11) gegenüber  $9.2 \pm 1.5$  mg/dl (n=9) (p<0.05), an Tag 20 von  $15.3 \pm 2.1$  mg/dl (n=11) gegenüber  $8.1 \pm 2.1$  mg/dl (n=9) (p<0.05) und an Tag 35 von  $18.6 \pm 2.4$  mg/dl (n=23) gegenüber  $10.2 \pm 1.2$  mg/dl (n=15) (p<0.01) gemessen (Abb. 8).

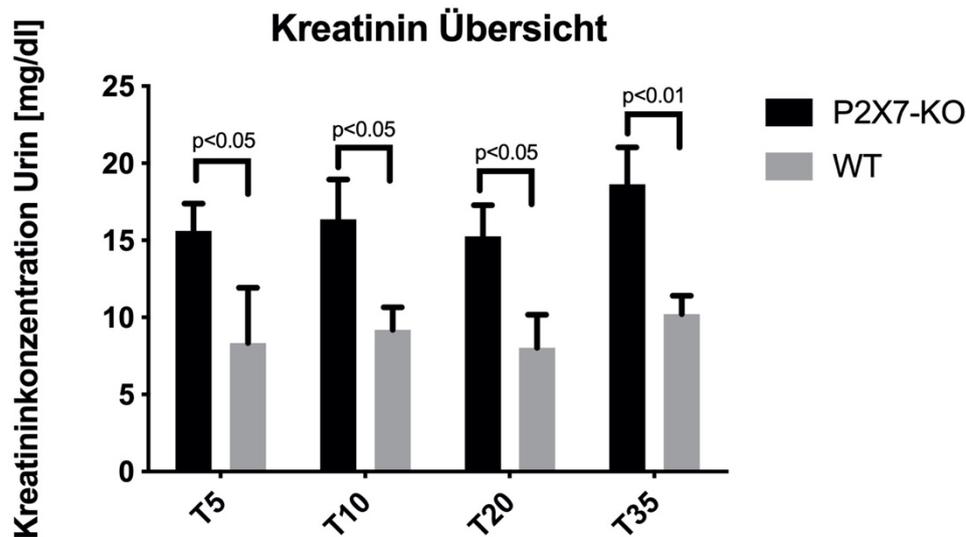


Abb. 8: Zusammenfassende Darstellung der Kreatininkonzentrationen im Urin beider Versuchstiergruppen an den Versuchstagen 5, 10, 20 und 35

### 3.2.3 Albumin-Kreatinin-Ratio

Die Albumin-Kreatinin-Ratio dient laborchemisch der Quantifizierung der Proteinurie und wurde für die Messzeitpunkte Tag 5, 10, 20 und 35 bestimmt. Für Tag 5 ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen einem Wert von  $4.3 \pm 3.7$  mg/g (n=11) für die P2X7-KO-Tiere und einem Wert von  $3.9 \pm 1.0$  mg/g (n=9) für die Wildtyp-tiere (p=NS). Für die übrigen Messpunkte ergaben sich durchweg signifikant niedrigere Albumin-Kreatinin-Ratios für die P2X7-KO-Tiere. Im Detail wurden an Tag 10 Werte von  $4.3 \pm 2.8$  mg/g (n=11) bei den P2X7-KO-Tieren gegenüber Werten von  $76.3 \pm 19.7$  mg/g (n=9) bei den Wildtyp-tieren ( $p<0.001$ ), an Tag 20 von  $6.2 \pm 4.5$  mg/g (n=11) gegenüber  $36.9 \pm 10.3$  mg/g (n=9) ( $p<0.01$ ) und an Tag 35 von  $4.9 \pm 2.1$  mg/g (n=23) gegenüber  $18.8 \pm 5.2$  mg/g (n=15) ( $p<0.01$ ) errechnet (Abb. 9).

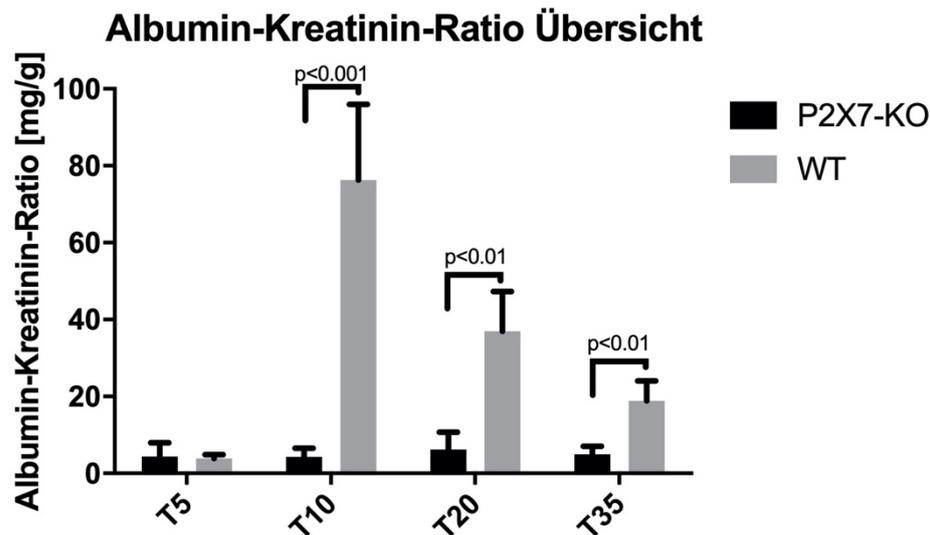


Abb. 9: Zusammenfassende Darstellung der Albumin-Kreatinin-Ratio beider Versuchstiergruppen an den Versuchstagen 5, 10, 20 und 35

### 3.3 Serumanalysen

#### 3.3.1 *Cystatin C*

Cystatin C als Marker der Nierenfunktion wurde an Tag 20 und 35 aus dem Serum bestimmt. Für Tag 20 zeigte sich eine signifikant höhere Konzentration für die P2X7-KO-Tiere von  $1058.0 \pm 42.7$  ng/ml (n=17) gegenüber einer Konzentration von  $877.3 \pm 35.6$  ng/ml (n=28) für die Wildtypiere (p<0.01). Die Konzentrationsbestimmung für Tag 35 hingegen bot keinen signifikanten Unterschied mehr (p=NS), hier ergaben sich für die P2X7-KO-Tiere Konzentrationen in Höhe von  $858.6 \pm 42.3$  ng/ml (n=24), für die Wildtypiere in Höhe von  $787.6 \pm 49.3$  ng/ml (n=23) (Abb. 10).

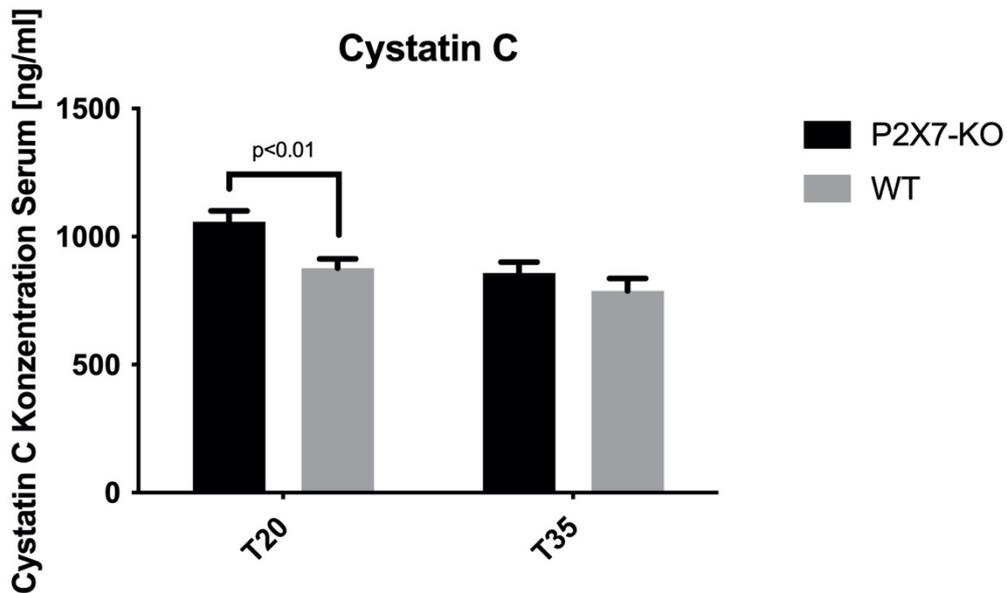


Abb. 10: Zusammenfassende Darstellung der Cystatin C Konzentrationen im Serum beider Versuchstiergruppen an den Versuchstagen 20 und 35

Zusätzlich zeigte sich innerhalb P2X7-KO-Tiere eine signifikante Reduktion der Cystatin C Konzentration ( $p < 0.001$ ) von Tag 20 ( $1058.0 \pm 42.7$  ng/ml ( $n=17$ )) auf Tag 35 ( $858.6 \pm 42.3$  ng/ml ( $n=24$ )), innerhalb der Wildtypiere ergab sich kein signifikanter Unterschied ( $877.3 \pm 35.6$  ng/ml ( $n=28$ ) vs.  $787.6 \pm 49.4$  ng/ml ( $n=23$ ),  $p=NS$ ) (Abb. 11).

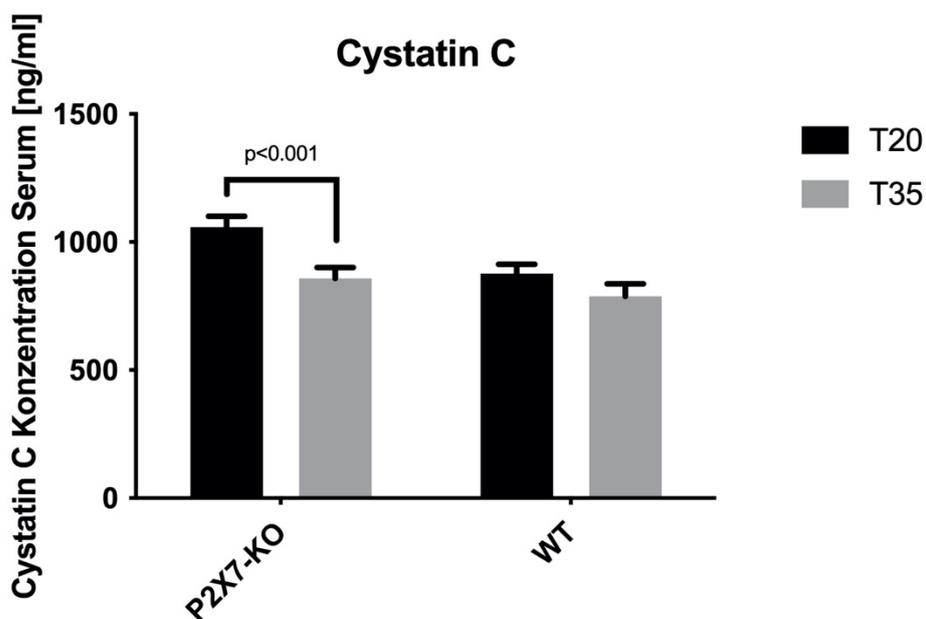


Abb. 11: Intergruppenunterschied der Cystatin C Konzentrationen im Serum beider Versuchstiergruppen im zeitlichen Verlauf von Versuchstag 20 auf 35

### 3.4 Genexpressionsanalyse

#### 3.4.1 Real-time PCR

Mittels quantitativer Real-time PCR wurde die Expression bestimmter mRNA in dem aus der Organentnahme gewonnenen Nierengewebe, sowohl der P2X7-KO-Tiere als auch der Wildtypiere analysiert.

#### 3.4.2 Fibrosemarker

Die Analyse der Fibrosemarker Collagen1, TGF $\beta$  und PAI-1 ergab die im Folgenden dargestellten Ergebnisse.

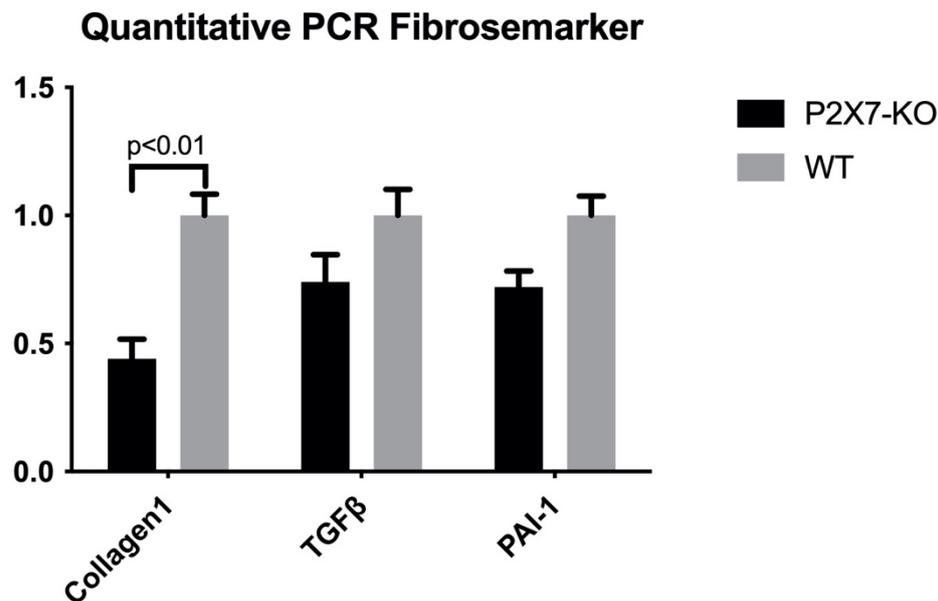


Abb. 12: Zusammenfassende Darstellung der relativen Expression via quantitativer PCR der Fibrosemarker Collagen1, TGF $\beta$  und PAI-1 aus dem asservierten Nierengewebe beider Versuchstiergruppen von Versuchstag 35; dargestellt ist die relative Expression der Marker normiert auf den Wildtyp.

Für Collagen1 zeigt sich eine signifikant geringere Expression in der Gruppe der P2X7-KO-Tiere ( $4.4 \pm 0.3 \Delta\text{CT}$ ;  $n=23$ ) verglichen mit den Wildtypieren ( $3.3 \pm 0.3 \Delta\text{CT}$ ;  $n=23$ ) ( $p < 0.01$ ). Für TGF $\beta$  (P2X7-KO  $7.2 \pm 0.2 \Delta\text{CT}$ ; Wildtyp  $6.7 \pm 0.2 \Delta\text{CT}$ ;  $n=23$ ) und PAI1 (P2X7-KO  $9.1 \pm 0.4 \Delta\text{CT}$ ; Wildtyp  $8.6 \pm 0.3 \Delta\text{CT}$ ;  $n=23$ ) ergab sich jeweils eine tendenzielle niedrigere Expression in der Gruppe der P2X7-KO-Tiere, jedoch kein signifikanter Unterschied ( $p = \text{NS}$ ) (Abb. 12).

### 3.4.3 Entzündungsmarker

Nachfolgend dargestellt sind die Ergebnisse der Analyse der Entzündungsmarker IL1 $\beta$ , MCP-1, RANTES und NF $\kappa$ B.

#### Quantitative PCR Entzündungsmarker

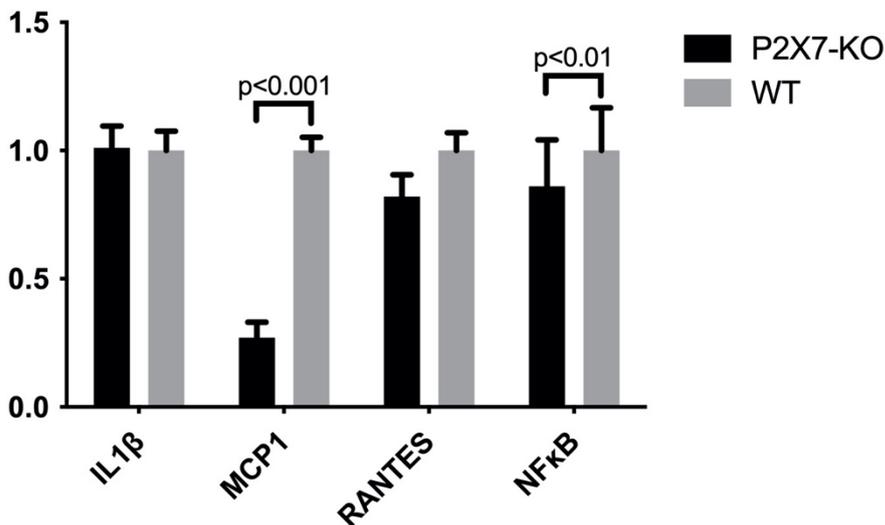


Abb. 13: Zusammenfassende Darstellung der relativen Expression via quantitativen PCR der Entzündungsmarker IL1 $\beta$ , MCP-1, RANTES und NF $\kappa$ B aus dem asservierten Nierengewebe beider Versuchstiergruppen von Versuchstag 35; dargestellt ist die relative Expression der normiert auf den Wildtyp.

Es zeigten sich signifikant geringere Expressionen für MCP-1 und NF $\kappa$ B auf Seiten der P2X7-KO-Tiere ( $10.3 \pm 0.4 \Delta\text{CT}$ ; n=23 bzw.  $11.2 \pm 0.1 \Delta\text{CT}$ ; n=23) im Vergleich mit den Wildtyptieren ( $8.4 \pm 0.4 \Delta\text{CT}$ ; n=23 bzw.  $11.0 \pm 0.1 \Delta\text{CT}$ ; n=23) ( $p < 0.001$  bzw.  $p < 0.01$ ). Für IL1 $\beta$  (P2X7-KO  $11.1 \pm 0.3 \Delta\text{CT}$ ; Wildtyp  $11.1 \pm 0.3 \Delta\text{CT}$ ; n=23) und RANTES (P2X7-KO  $8.5 \pm 0.3 \Delta\text{CT}$ ; Wildtyp  $8.2 \pm 0.3 \Delta\text{CT}$ ; n=23) ergaben sich keine signifikanten Unterschiede ( $p > 0.05$ ) (Abb. 13).

### 3.5 Proteinanalyse

#### 3.5.1 Collagen1-Blot

Für Collagen1 ergibt sich eine signifikant reduziert gemessene Menge an Collagen1 für die P2X7-KO-Tiere ( $1.0 \pm 0.2 \text{ AU}$ ; n=14) verglichen mit den Wildtyptieren ( $2.1 \pm 0.3 \text{ AU}$ ; n=14) ( $p < 0.05$ ) (Abb. 14).

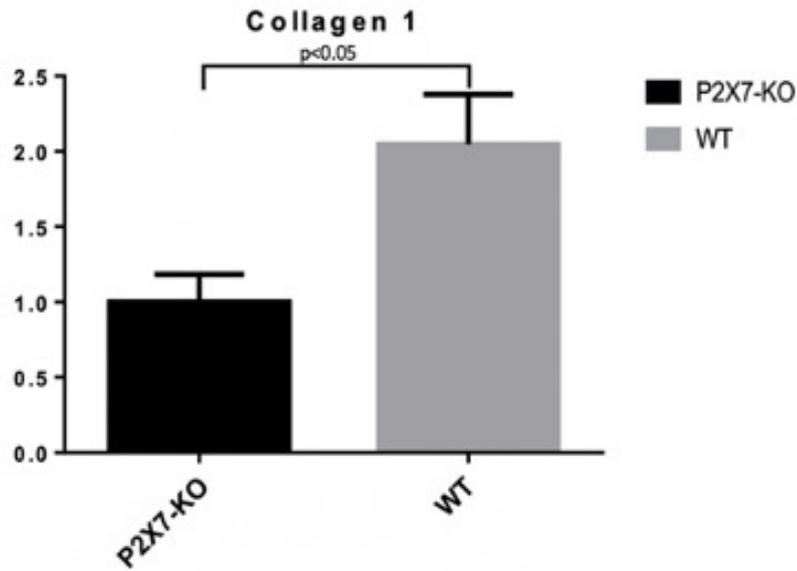


Abb. 14: Densitometrisch gemessene Proteinmenge von Collagen1 aus dem asservierten Nierengewebe beider Versuchstiergruppen von Versuchstag 35; dargestellt ist die relative Proteinmenge normiert auf die P2X7-KO-Tiere.

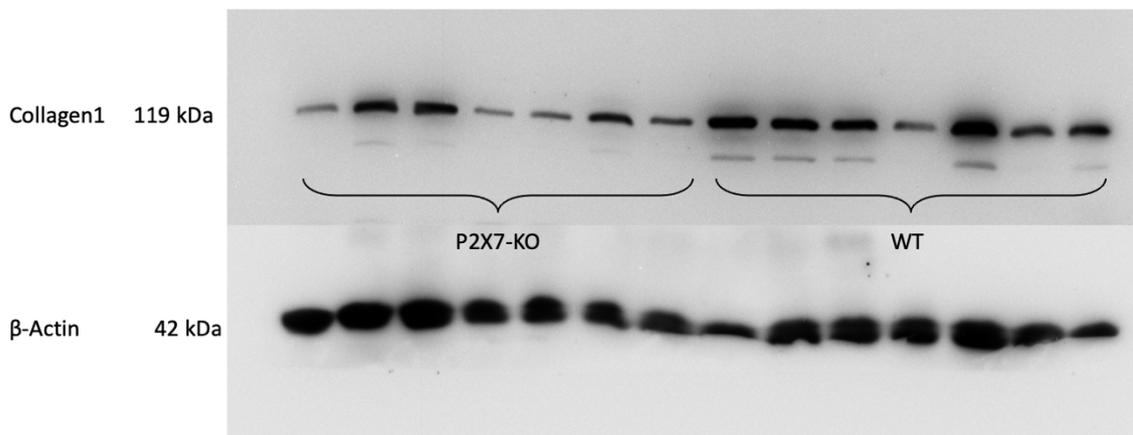


Abb. 15: Exemplarische Darstellung einer Western Blot Analyse aus asserviertem Nierengewebe unterschiedlicher P2X7-KO- und Wildtypiere zum Zeitpunkt Versuchstag 35. Der oben dargestellte Blot zeigt die Collagen1 Proteinexpression, der untere die Eiweißbeladungskontrolle mittels  $\beta$ -Actin.

### 3.6 Histologie

#### 3.6.1 PAS-Färbung

Insgesamt zeigten sich in der Auswertung signifikant weniger sklerosierte Glomeruli in den Präparaten der P2X7-KO-Tiere ( $0.035 \pm 0.015$ ;  $n=23$ ) verglichen mit denen der Wildtypiere ( $0.199 \pm 0.040$ ;  $n=16$ ) ( $p<0.001$ ) (Abb. 16).

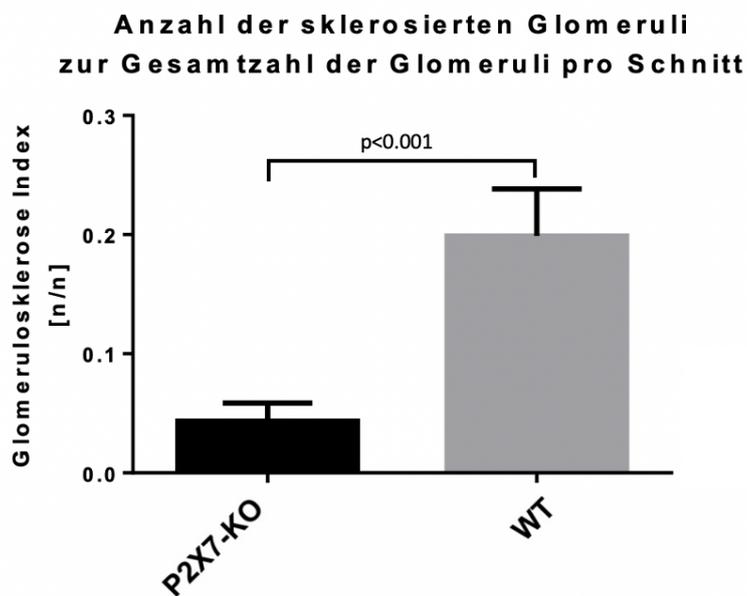


Abb. 16: Glomerulosklerose Index anhand der asservierten Nierengewebe beider Versuchstiergruppen von Versuchstag 35.

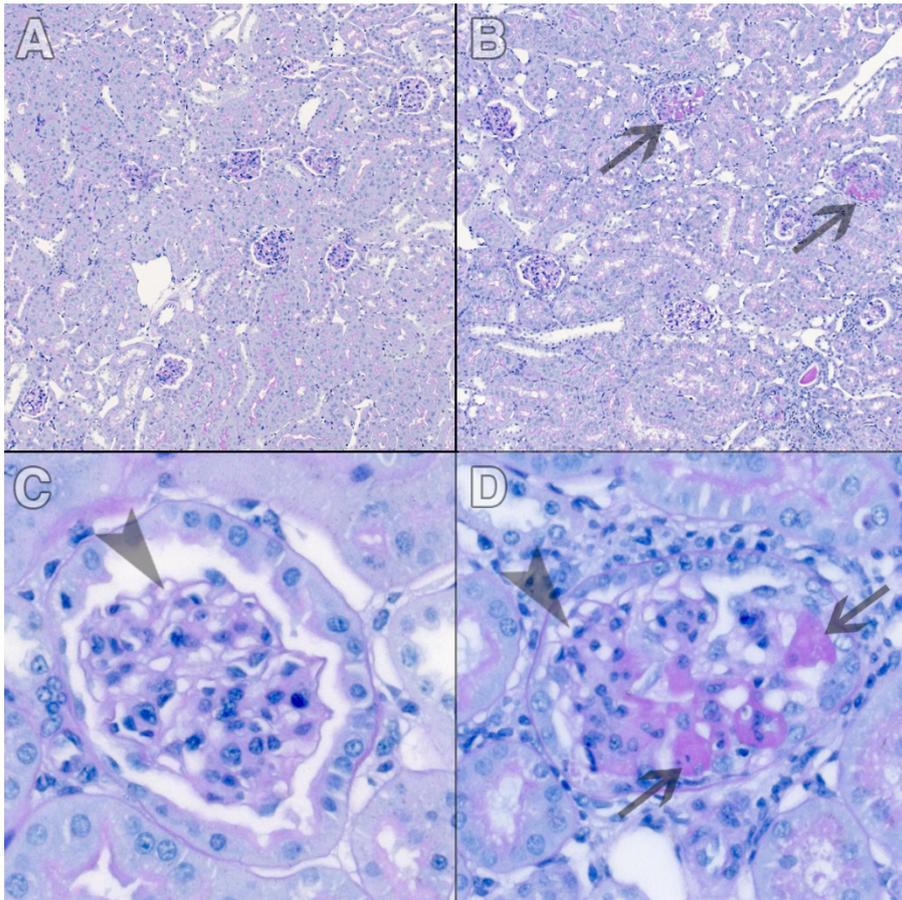


Abb. 17: PAS-Färbung von histologischen Schnitten der asservierten Nierengewebe beider Versuchstiergruppen von Versuchstag 35 (exemplarisch); A: 40-fache Vergrößerung des renalen Kortex eines Wildtypieres; B: 40-fache Vergrößerung des renalen Kortex eines P2X7-KO-Tieres, pfeilmarkierte Glomeruli; C: 400-fache Vergrößerung eines Glomerulus eines Wildtypieres, pfeilmarkiert Podozyt; D: 400-fache Vergrößerung eines Glomerulus eines P2X7-KO-Tieres, pfeilmarkiert Podozyt und sklerotisierte Basalmembran.

### 3.6.2 Masson-Trichrome-Färbung

In der Auswertung mittels 400-facher Vergrößerung konnte ein signifikant geringer Teil angefärbter Collagenfasern im Interstitium in den Präparaten der P2X7-KO-Tiere nachgewiesen werden ( $2.2 \pm 0.5 \text{ \%/HPF}$ ;  $n=21$ ) verglichen mit denen der Wildtypiere ( $3.9 \pm 0.8 \text{ \%/HPF}$ ;  $n=18$ ) ( $p < 0.05$ ) (Abb. 18).

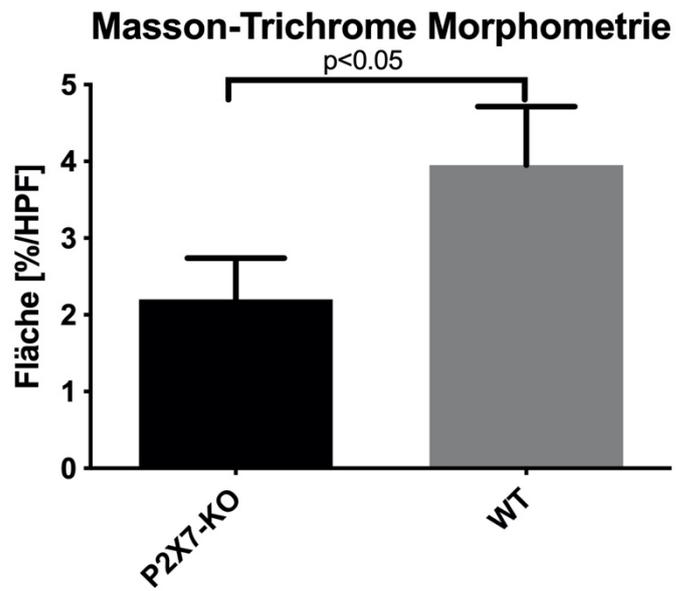


Abb. 18: Anteilig angefärbte Collagenfasern anhand der asservierten Nierengewebe beider Versuchstiergruppen von Versuchstag 35

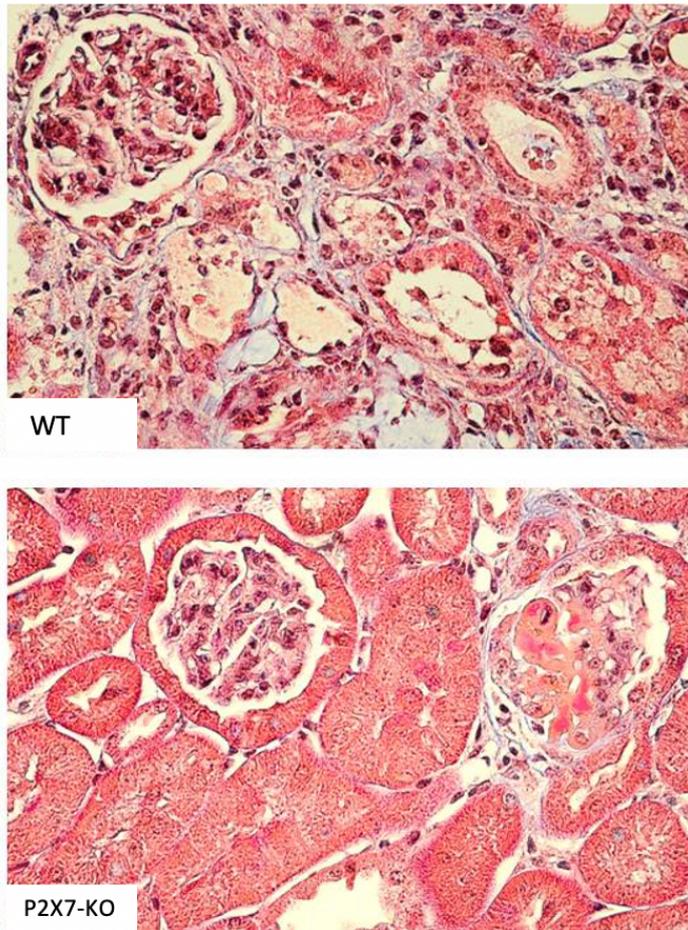


Abb. 19: Masson-Trichrome-Färbung von histologischen Schnitten der asservierten Nierengewebe beider Versuchstiergruppen von Versuchstag 35 (exemplarisch); Oben: 400-fache Vergrößerung eines Glomerulus mit angrenzendem Interstitium eines Wildtyptieres; Unten: 400-fache Vergrößerung eines Gomerulus mit angrenzendem Intertsitium eines P2X7-KO-Tieres.

## 4 Diskussion

### 4.1 Verlauf der chronischen Niereninsuffizienz am Modell der subtotalen Nephrektomie

Die subtotale (5/6) Nephrektomie ist ein Modell der chronischen Nierenschädigung. Durch chirurgische Resektion von funktionellem Nierengewebe und eine damit verbundene Reduktion der absoluten Anzahl der Glomeruli, wird eine Nierenfunktionseinschränkung hervorgerufen. Daraus resultieren unter anderem eine reduzierte Filtrationsleistung im erhaltenen Nierengewebe und eine Steigerung des systolischen Blutdruck. Diese funktionellen Veränderungen setzen unmittelbar ein, zeigen einen progredienten Verlauf, gehen mit einer verkürzten Lebenserwartung einher und sind daher vergleichbar mit denen einer chronischen Niereninsuffizienz (Sari et al., 2020; Y. Zhang & Kompa, 2014). Die hier gezeigten Daten zum postoperativen Gewicht der Restniere an Tag 35 zeigen eine Hypertrophie der Nieren in beiden Versuchstiergruppen. Das Gewicht der verbleibenden Niere an Tag 35 entsprach in etwa dem Gewicht der kontralateralen Niere an Tag 0, für die Wildtypiere wurde es überschritten. Dabei handelt es sich am ehesten um eine kompensatorische Hypertrophie des verbliebenen Nierengewebes nach 5/6 Nephrektomie. Al Banchaabouchi et al. konnten solch eine kompensatorische Hypertrophie nach Verlust von funktionellem Nierengewebe ebenso zeigen (Al Banchaabouchi, Marescau, D'Hooge, Van Marck, & De Deyn, 2001). Gemessen an diesem Parameter war der Grad der kompensatorischen Hypertrophie in der Gruppe der P2X7-KO-Tiere geringer ausgeprägt. In den vorliegenden histologischen Präparaten lässt sich dies mikroskopisch ebenfalls nachweisen. In der PAS-Färbung zeigte sich ein signifikant geringerer Grad an Glomerulosklerose, in der Masson-Trichrome-Färbung ein signifikant geringer Anteil an interstitiellen Collagen in der Gruppe der P2X7-KO-Tiere. Dies könnte indirekt bedeuten, dass die stärkere Hypertrophie in der Gruppe der Wildtypiere mit einem höheren Grad an Fibrose und Sklerose assoziiert ist und an der Nierenfunktionseinschränkung beteiligt ist. Unterstützend hierzu haben Arfian et al. gezeigt, dass es im Rahmen der subtotalen Nephrektomie zu Entwicklung einer Glomerulosklerose kommt (Arfian, Setyaningsih, Anggorowati, Romi, & Sari, 2019).

Für einen Effekt unabhängig von der Operationstechnik in beiden Versuchstiergruppen sprechen das nahezu gleiche Entnahmegewicht von

Nierengewebe an Tag 0 zusammen mit dem geringeren Nierengewicht am Explantationstag Tag 35 für die P2X7-KO-Tiere. Im Rahmen der Progredienz einer Niereninsuffizienz kommt es zu histologisch nachweisbaren Veränderungen im Nierengewebe. Die Bildung von collagenösem Ersatzgewebe ist Ausdruck einer verstärkten Fibrose, sowohl im tubulo-interstitiellen Gewebe als auch im Bereich der Glomeruli. Die hierdurch entstehende Funktionseinschränkung wird durch die weiter unten diskutierten Ergebnisse zum Grad der Proteinurie belegt. Die mittels PAS-Färbung untersuchten Glomeruli zeigten eine signifikant geringere Zahl an sklerosierten Glomeruli in der Gruppe der P2X7-KO-Tiere, was für eine besser erhaltene Entgiftungsfunktion spricht.

#### 4.2 Unterschiede in der Nierenfunktion

Für die P2X7-KO-Tiere zeigte sich über den gesamten Versuchszeitraum eine erhöhte Konzentration von Kreatinin und Harnstoff im Urin. Hierfür können unterschiedliche Mechanismen verantwortlich sein. Mit zunehmender Einschränkung der Nierenfunktion kann ein Konzentrierungsdefekt auftreten. Daher wäre dies in dem hier dargestellten Experiment ein Hinweis auf eine bessere tubulo-interstitielle Funktion im Vergleich zu den Wildtyptieren (Gentile, Natale, Lazzerini, Capecchi, & Laghi-Pasini, 2015; Szrejder, Rogacka, & Piwkowska, 2021).

Die Ergebnisse der Albumin-Kreatinin-Ratio zur Abschätzung der Albuminurie und damit der Intaktheit der glomerulären Filterbarriere weisen für die P2X7-KO-Tiere ab Tag 10 eine signifikant geringere Albuminurie auf. Da Albuminurie einen der frühesten Marker für eine Glomerulusschädigung darstellt, scheint die Funktion der Filterbarriere für die P2X7-KO-Tiere besser erhalten (Guh, 2010). Pathophysiologisch kommt es hierbei zu einer Schädigung der podozytären Schlitzmembran resultierend in einer höheren Permeabilität für Albumin. Ein erhöhter Grad an Albuminurie findet sich bei Erkrankungen wie beispielsweise der diabetischen oder hypertensiven Nephropathie, die häufige Ursachen einer chronischen Niereninsuffizienz sind. Die geringere Albumin-Kreatinin-Ratio kann daher darauf hinweisen, dass eine mögliche geringere Progredienz einer chronischen Niereninsuffizienz besteht, womit der P2X7-Rezeptor möglicherweise mit maladaptiven Umbauvorgängen an der glomerulären Filterbarriere assoziiert sein könnte (Levin, 2013a; Verhave et al., 2004).

Ein weiterer Parameter, der Auskunft über die globale Funktion der Niere gibt, ist das Serum-Cystatin C (Ferguson, Komenda, & Tangri, 2015). Cystatin C korreliert mit Nierenfunktionseinschränkungen, weil es von allen Zellen gleichmäßig sezerniert wird und vergleichsweise weniger störanfällig ist (Benoit, Ciccio, & Devarajan, 2020). In der hier vorliegenden Untersuchung zeigt Cystatin C signifikant erhöhte Serumkonzentrationen an Tag 20 für die P2X7-KO-Tiere. In der frühen Phase der Nierenschädigung kommt es aufgrund der reduzierten Zahl der Glomeruli zu einer Hyperfiltration. In der Gruppe der Wildtypiere ist dieser Effekt aufgrund eines Konzentrationsdefizites stärker ausgeprägt als in der Gruppe der P2X7-KO-Tiere. Daher ergibt sich zunächst eine verbesserte Gesamtclearance für Cystatin C für die Wildtypiere. Es wurde beschrieben, dass in Fällen von Inflamationsreaktionen der Niere, in diesem Experiment ausgelöst durch die 5/6-Nephrektomie, die Serum-Konzentration von Cystatin C nicht affiziert wird (Newman et al., 1995). Song et al. haben die Reliabilität von Cystatin C in einem Mausmodell untersucht, allerdings gibt es keine Aussage zur tatsächlichen Validität. Einschränkend sollte dazu gesagt werden, dass in dem Modell von Song et al. ausschließlich Mäuse des gleichen Genotyps untersucht wurden (S. Song et al., 2009). Im zeitlichen Verlauf sehen wurde jedoch eine signifikante Reduktion der Cystatin C Serumkonzentration von Versuchstag 20 auf 35 innerhalb der Gruppe der P2X7-KO-Tiere gesehen, während die Serumkonzentrationen innerhalb der Wildtypiere nahezu konstant blieben.

Noch während des Beobachtungszeitraumes kommt es zu einer Inflamations- und Fibrosereaktion, die in der Gruppe der P2X7-KO-Tiere geringer ausgeprägt ist. Es zeigte sich am Ende des Beobachtungszeitraums eine geringere mRNA Expression für MCP-1 und NF $\kappa$ B in der quantitativen PCR. Histologisch war eine geringergradige Glomerulosklerose mit reduzierter collagenhaltiger extrazellulärer Matrix bei P2X7 KO-Tieren zu beobachten. Diese Mechanismen könnten das Angleichen der Cystatin C Clearance im Verlauf erklären. Möglicherweise käme es zu einem wiederholt späteren Untersuchungszeitpunkt zu einer weiteren Verbesserung der Cystatin C Clearance innerhalb der Gruppe der P2X7-KO-Tiere, aufgrund einer anhaltenden geringer ausgeprägten Inflamations- und Fibrosereaktion. Analysen über 35 Tage hinausgehend liegen jedoch nicht vor.

### 4.3 Einfluss des P2X7-Rezeptors auf Inflammation

Eine chronische Inflammationsreaktion zeigt sich häufig simultan mit einer chronischen Niereninsuffizienz, die bei Patienten mit einer persistierenden Erhöhung der Serumkonzentrationen von beispielsweise IL1 $\beta$  oder dem C-reaktiven Protein einhergeht (Gupta et al., 2012; Sato, Takahashi, & Yanagita, 2020). In einer Kohortenstudie haben Amdur et al. gezeigt, dass erhöhte Plasmakonzentrationen von Fibrinogen und TNF $\alpha$  mit beschleunigtem Verlust der Nierenfunktion bei chronischer Niereninsuffizienz einhergingen (Amdur et al., 2016). Im Rahmen der Progredienz einer chronischen Niereninsuffizienz zeigt sich ein Übergang von akuter Inflammationsreaktion, die zunächst protektiv gegen Infektion und metabolische Veränderungen wirkt, hin zu einer chronischen Inflammationsreaktion, die zu einem Umbau des funktionellen Gewebes führt (Mihai et al., 2018).

Der P2X7-Rezeptor spielt eine wichtige Rolle in der Mediation der Entzündungsreaktion. Im Verteilungsmuster des Rezeptors konnte im Rahmen einer chronischen Nierenschädigung unter tierexperimentellen Bedingungen wie medikamentös-induziertem Diabetes mellitus oder durch transgen bedingte Hypertonie eine deutliche Veränderung beobachtet werden. So konnte gezeigt werden, dass es hierdurch zu einer deutlich vermehrten Expression des P2X7-Rezeptors an Mesangiumzellen, Podozyten und Endothelzellen der Niere kommt (Vonend et al., 2004). P2X7-Rezeptor-defiziente Mäuse in einem UUO Modell zeigten nach histologischer Aufarbeitung des Nierengewebes einen geringeren Grad an inflammationsassoziiierter Fibrose (Goncalves et al., 2006). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass es durch die simultane LPS- und ATP-Stimulation auf Zellebene an P2X7-Rezeptor-defizienten Granulozyten zu einer signifikant geringeren Ausschüttung von IL1 $\beta$  und einer damit einhergehenden reduzierten Inflammationsreaktion kam (Karmakar et al., 2016). Die Ergebnisse der hier durchgeführten quantitativen PCR zeigen am Ende des Beobachtungszeitraums eine signifikant geringere Expression von mRNA für MCP-1 und NF $\kappa$ B für die P2X7-KO-Tiere, aber keinen Unterschied für IL1 $\beta$  zwischen den Versuchstiergruppen. Die erniedrigte MCP-1-mRNA-Expression weist auf eine schwächer ausgeprägte Makrophagenaktivierung und -präsenz hin, da MCP-1 chemotaktisch auf Makrophagen wirkt (Eardley et al., 2006) und zu einer erhöhten Migration an den

Ort der Inflammation führen. Hierdurch kommt es sowohl zu einem erhöhten Grad an Proteinurie (Morii et al., 2003), als auch zu einer vermehrten T-Zellvermittelten Interleukinsekretion (Deshmane, Kremlev, Amini, & Sawaya, 2009). Ein selektiver Antagonismus des P2X7-Rezeptors konnte vergleichbare Effekte mit Reduktion der Proteinurie zeigen (Bautista-Pérez et al., 2020; Pereira et al., 2020).

Die reduzierte Expression des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B, dessen Synthese durch die Stimulation von Interleukin 1-Rezeptors Typ I (IL1R) vermittelt wird, unterstützt diese Annahme (Gilmore, 2006; Mitchell, Vargas, & Hoffmann, 2016). Das Chemokin RANTES zeigt zwar keinen signifikanten Unterschied, aber eine Tendenz zu einer geringeren Expression in der Gruppe der P2X7 KO-Tiere. RANTES spielt vor allem eine Rolle bei der Rekrutierung von Leukozyten zu inflammatorischen Herden (Qidwai & Khan, 2016) und unterstützt gleichfalls die These, dass eine P2X7-Rezeptordefizienz in diesem Modell protektiv gegenüber einer chronischen Entzündungsreaktion wirken kann (Umetsu et al., 2021). Der fehlende Unterschied im Falle des IL1 $\beta$  könnte durch den singulären Beobachtungszeitpunkt (Tag 35) der Untersuchung zu erklären sein. Vermutlich nimmt der Einfluss von IL1 $\beta$  zum späten Untersuchungszeitpunkt nur noch eine untergeordnete Rolle ein. Die Inflammation wird zu diesem Zeitpunkt möglicherweise bereits von anderen Faktoren aufrechterhalten.

Bei der Entwicklung und Aufrechterhaltung dieser Inflammation könnte das NLRP3 *nucleotide-binding oligomerisation domain, leucine rich repeat and pyrin domain containing* (NLRP3) Inflammasom eine wichtige Rolle spielen (Kelley, Jeltama, Duan, & He, 2019). Inflammasome sind Teil des angeborenen Immunsystems, die durch bestimmte Triggerfaktoren aktiviert werden und an der Produktion und Prozession von Interleukinen beteiligt sind. Die Zellen der angeborenen Immunabwehr detektieren über *pattern recognition receptors* (PPRs) zum einen bestimmte mikrobielle Komponenten, die *pathogen associated molecular patterns* (PAMPs) genannt werden, in diesem Fall aber noch wichtiger auch *damage associated molecular patterns* (DAMPs). Zu den DAMPs zählt beispielsweise extrazelluläres ATP, das nach größerem Zellschaden in höheren Konzentrationen auftritt. Zu den relevanten PPRs gehören extrazelluläre *Toll-like receptors* (TLRs) und intrazelluläre *nucleotide-binding domain and leucine rich repeat containing proteins* (NLRs), die aus verschiedenen Domänen bestehen (Lamkanfi & Dixit,

2014; Takeuchi & Akira, 2010). Die Signalübertragung läuft hier meist über den NF $\kappa$ B-Signalweg. Entscheidend ist, dass manche Inflammasome über ein *NLR sensor molecule* verfügen, dass zusammen mit dem NLR das *apoptosis associated speck like protein containing a CARD* (ASC) rekrutieren kann. Das ASC ist in diesem Fall relevant für den NF $\kappa$ B-Signalweg. Im Falle des NLRP3 Inflammasoms wird durch TLR Aktivierung NF $\kappa$ B-abhängig pro-IL1 $\beta$  transkribiert. Damit die aktive Form IL1 $\beta$  entstehen kann, muss das pro-Interleukin noch durch Caspase-1 gespalten werden. ASC wird benötigt um die Caspase zu aktivieren (Latz, Xiao, & Stutz, 2013). Das zweite Signal zur Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms kann stark variieren. Eine Möglichkeit der Aktivierung besteht über die Signaltransduktion via den P2X7-Rezeptor. Eine P2X7-Rezeptor-Defizienz könnte diesen Mechanismus unterbrechen, was die Effekte auf die hier dargestellten Ergebnisse erklären könnte (Ferrari et al., 2006; Karmakar et al., 2016).

#### 4.4 Einfluss von Inflammation auf chronische Niereninsuffizienz, interstitielle Fibrose und Proteinurie

Die Monozyten und Makrophagen der Niere haben alle nötigen zellulären Bestandteile zur Aktivierung und Ausprägung des NLRP3 Inflammasoms (Anders & Muruve, 2011). Abais et al. und Zhang et al. haben gezeigt, dass nierenselektives Ausschalten der ASC Sequenz Proteinurie und Glomerulosklerose in Schädigungsmodellen mit Hyperhomocysteinämie abschwächen konnte (Abais et al., 2013; C. Zhang et al., 2012). Weiterhin konnte hier gezeigt werden, dass Inflammasomaktivierung in glomerulären Endothelzellen und Podozyten möglich ist (Kim, Kim, Kim, Lee, & Moon, 2019). Weitere Ergebnisse deuten darauf hin, dass auch murine tubuläre Epithelzellen in der Lage sind durch Inflammasomaktivierung Interleukine zu sezernieren (Homsí, Janino, & de Faria, 2006; Lichtnekert et al., 2011; J. Wang et al., 2015). IL1 liegt in zwei biologisch aktiven Formen vor: IL1 $\alpha$  und IL1 $\beta$  (Chan & Schroder, 2020). Ihr gemeinsamer Effektor ist der IL1R, der auf einer Vielzahl an Zellen exprimiert wird (Boraschi, Italiani, Weil, & Martin, 2018). Durch IL1 werden weitere pro-inflammatorische wie IL6 oder TNF $\alpha$ , aber auch profibrotische Mediatoren wie TGF- $\beta$  ausgeschüttet. Als natürliche Gegenspieler dienen der Interleukin 1-Rezeptor Antagonist (IL1-RA) und der Interleukin 1 Rezeptor Typ II (IL1RII) (Gabay et al., 2010). Ein Beitrag zur Nierenschädigung durch IL1 geschieht in Form von Rekrutierung inflammatorischer Zellen. In

Mausmodellen mit ischämischem Reperfusionsschaden konnte gezeigt werden, dass durch IL1 die renale Schädigung durch vermehrtes Auftreten von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten gesteigert wurde (Furuichi et al., 2006). Suppression der Interleukinwirkung zeigte eine Verbesserung der Progredienz experimenteller Glomerulonephritis. Lan et al. konnten hier zeigen, dass durch Einsatz von IL1-Rezeptor Antagonisten ein signifikant geringerer Grad an Proteinurie und eine insgesamt besser erhaltene Nierenfunktion erreicht werden konnten (Lan et al., 1993). Bezogen auf die Rolle des P2X7-Rezeptors in der Exkretion von IL1 $\beta$ , könnte ein geringerer Einfluss von IL1 eine Rolle in dem hier dargestellten Modell spielen. Timoschanko et. al konnten zeigen, dass in einem Modell anti-GBM-induzierter Glomerulonephritis ein geringerer Grad an Makrophageninfiltration in IL1 $\beta$ -defizienten Mäusen zu erkennen war (Timoshanko, Kitching, Iwakura, Holdsworth, & Tipping, 2004). DAMPs wie ATP, Harnsäure, mitochondriale *reactive oxygen species* (ROS), aber auch Bestandteile der extrazellulären Matrix wie Hyaluronsäure oder Biglykane sind an der Aktivierung des Inflammasoms beteiligt (Anders & Schaefer, 2014). Die Ergebnisse der in diesem Modell durchgeführten PAS-Färbung zeigten einen signifikant geringeren Grad an Glomerulosklerose in der Gruppe der P2X7 KO-Tiere. In einem Rattenmodell mit Albumin-induzierter Nephropathie konnten Liu et al. zeigen, dass Albuminurie renale Inflammation durch mitochondriale ROS-abhängige Inflammasomaktivierung unterhalten könnte (Liu et al., 2014). Die in unseren Ergebnissen dargestellte Albumin-Kreatinin-Ratio zeigte ab Versuchstag 20 signifikant niedrigere Werte für die P2X7-KO-Tiere. Die höhergradige Albuminurie der Wildtypiere könnte also eine zusätzliche Verstärkung der renalen Inflammation mit sich bringen. Qian et. al konnten in einem renalen Schädigungsmodell im Tierversuch mit induziertem Reperfusionsschaden zeigen, dass durch Blockade des P2X7-Rezeptors es zu einer geringer ausgeprägten Inflammasom- und IL1 $\beta$ -vermittelten Inflammationsreaktion gekommen ist (Qian et al., 2021). Bezogen auf die Ergebnisse dieser Doktorarbeit kann die Aktivierung des Inflammasoms über den P2X7-Signalweg als möglicher Mechanismus einen Beitrag zur Progredienz der chronischen Niereninsuffizienz leisten.

Die chronische Niereninsuffizienz geht mit Fibrosierung einher, die zu einem Funktionsverlust führt. Eine besondere Schlüsselfunktion bei der Induktion von

Fibrose bei renalen Erkrankungen kommt dem TGF $\beta$  zu (Bottinger, 2007; Morikawa, Derynck, & Miyazono, 2016; W. Wang et al., 2005). Die TGF $\beta$ -Familie enthält drei Isoformen TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 und TGF $\beta$ 3, von denen TGF $\beta$ 1 die häufigste Form darstellt und im Folgenden mit dem Begriff TGF $\beta$  gemeint ist. Alle renalen Zelltypen sind in der Lage TGF $\beta$  zu produzieren (Roberts, 1998). Sezerniert wird es als inaktive Vorläuferform (latentes TGF $\beta$ ) mit einem *latency-associated peptide* (LAP) gebunden an *latent TGF $\beta$  binding proteins* (LTBPs). Durch Stimulation mit beispielsweise ROS kann es in seine aktive Form übergehen und der vor allem auto- oder parakrinen Signaltransduktion dienen. TGF $\beta$  bindet an den TGF $\beta$ -Rezeptor Typ 2 (T $\beta$ RII) wodurch die TGF $\beta$  Rezeptor Typ 1-Kinase (T $\beta$ RI) aktiviert wird. Diese phosphoryliert intrazellulär die rezeptorassoziierten SMAD-Proteine 2 und 3 (Smad2 und Smad3), die zusammen mit dem common SMAD-Protein 4 (Smad4) einen Komplex bilden. Dieser Komplex wird in den Nucleus der Zelle transloziert um die Transkription bestimmter Gene zu regulieren (Derynck & Zhang, 2003). Das SMAD-Protein 7 (Smad7) fungiert in dieser Kaskade als physiologischer Inhibitor für smad2/3 und den T $\beta$ RI im Sinne eines negativen Feedbacks, da es unter anderem durch smad3 induziert werden kann (Ebisawa et al., 2001; Hu et al., 2018; Kavsak et al., 2000).

Das Hauptcharakteristikum renaler Fibrose ist die starke Ablagerung von extrazellulärer Matrix (ECM), die im Rahmen der Progredienz chronischer Niereninsuffizienz auftritt (Eddy & Neilson, 2006; Nogueira, Pires, & Oliveira, 2017). Die hier vorliegenden histologischen Ergebnisse haben zum einen einen geringeren Grad an Glomerulosklerose, aber auch einen geringeren Anteil an collagenhaltiger extrazellulärer Matrix im Sinne einer verminderten interstitiellen Fibrose in der Gruppe der P2X7-KO-Tiere zeigen können. Die gemessenen Unterschiede im Grad der Fibrosierung konnten mittels Masson-Trichrome-Färbung reproduziert werden. Es zeigen sich morphometrisch signifikant geringere Anteile an gefärbter Matrix für die P2X7-KO-Tiere, was einen geringeren Grad an Fibrose anzeigt. Ein möglicher Mechanismus hierfür könnte eine verminderte TGF $\beta$ -abhängige Produktion von extrazellulärer Matrix sein. Für Collagen1 als wichtiger Bestandteil von extrazellulärer Matrix konnte eine signifikant geringere Expression in der Gruppe der P2X7-KO-Tiere nachgewiesen werden, für TGF $\beta$  zeigt sich eine Tendenz zu geringerer Expression für die P2X7-KO-Tiere. Die verschiedenen

biologischen Eigenschaften von TGF $\beta$  sind gut untersucht und umfassen unter anderem Zellproliferation und -differenzierung, Apoptose und Produktion von extrazellulärer Matrix (Meng, Chung, & Lan, 2013). Weitere Studien konnten zeigen, dass TGF $\beta$  substanziiell erhöhte Expression in geschädigten Nieren sowohl beim Menschen als auch Tiermodellen zeigt (Bottinger & Bitzer, 2002; Chen et al., 2018; Yamamoto et al., 1996). Murakami et al. haben beschrieben, dass eine erhöhte TGF $\beta$ -Konzentration im Urin bei Patienten mit verschiedenen Nierenerkrankungen positiv mit dem Grad der renalen Fibrose korreliert (Murakami, Takemura, Hino, & Yoshioka, 1997). Tierexperimentelle Arbeiten mit transgenen Mäusen, die hohe Konzentrationen an TGF $\beta$  in Hepatozyten produzierten, zeigten deutliche histologische Veränderung wie beispielsweise Expansion der Mesangiums, tubulointerstitielle Fibrose und tubuläre Atrophie. Weiterhin entwickelten diese Tiere konsekutiv eine Proteinurie, die zu weiterer Nierenfunktionseinschränkung führte (Kopp et al., 1996; Sanderson et al., 1995). In einem Modell der unilateralen Ureterobstruktion haben Moon et al. gezeigt, dass durch selektive Inhibition des TGF $\beta$ -Signalweges signifikant geringere fibrotische Veränderungen in Rattennieren nachzuweisen waren, aber auch eine geringere Expression von TGF $\beta$  zu detektieren war (Moon et al., 2006). Neuere Arbeiten deuten darauf hin, dass durch TGF $\beta$ -Rezeptor Typ 2 Blockade allerdings auch die anti-inflammatorische Wirkung des TGF $\beta$  beeinträchtigt wird. Durch Smad3 wird das inhibitorische Smad7 stimuliert (Budi, Duan, & Derynck, 2017). Smad7 seinerseits ist aber auch der Inhibition des NF $\kappa$ B-Signalweges, der durch IL1 $\beta$  stimuliert werden kann, beteiligt. Fällt diese Inhibition weg, kann es zu vermehrter pro-inflammatorischer Transkription kommen (Meng et al., 2012). Babelova et al. konnten zeigen, dass Biglykan-defiziente Mäusen in einem Tiermodell mit unilateraler Ureterobstruktion weniger renale Schädigung im Sinne von tubulointerstitieller Fibrose aufwiesen. Zusätzlich wurde in dieser Arbeit der Effekt von P2X7-Rezeptordefizienz mitberücksichtigt, der sich günstig auf die gemessenen IL1 $\beta$ -Konzentrationen und ebenfalls auf den Grad an Fibrose auswirkte (Babelova et al., 2009). Huang et al. haben in einem UUO-Modell mit transgenen Mäusen gezeigt, dass durch latentes TGF $\beta$  eine Hochregulierung von Smad7 erfolgt. Dadurch ergab sich eine verminderte inflammatorische, aber auch fibrotische Reaktion im Gewebe nach UUO (Huang, Chung, Wang, Lai, & Lan, 2008). In der Zusammenschau konnten in dieser Doktorarbeit gezeigt werden, dass es auf Ebene der Genexpressionsanalyse

zu einer Verminderung relevanter Fibrosemarker gekommen ist und sich durch die histologischen Untersuchungen bestätigen ließ. Insgesamt vermittelt TGF $\beta$  seine profibrotische Wirkung durch mehrere möglichen Mechanismen. Es induziert direkt die Produktion extrazellulärer Matrix, die Collagen1 und Fibronectin enthält, durch Smad3-abhängige, aber auch –unabhängige Signalwege (Samarakoon, Overstreet, Higgins, & Higgins, 2012). TGF $\beta$  inhibiert die Aktivität von sog. Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), die am Ab- und Umbau von ECM beteiligt sind und induziert gleichzeitig *tissue inhibitors of metalloproteinases* (TIMPs), als natürliche Gegenspieler der MMPs. Mittels Western Blot Analyse für Collagen1 konnte in dieser Arbeit eine ebenfalls signifikant geringere Expression an Collagen in der Gruppe der P2X7-KO-Tiere gemessen werden. Es wird diskutiert, dass TGF $\beta$  ebenfalls eine kritische Rolle im Rahmen von Zelltransdifferenzierung von Epithel, Endothel und Perizyten in Richtung Myofibroblasten spielt (Meng et al., 2013; Wu et al., 2013). Myofibroblasten selbst synthetisieren vermehrt extrazelluläre Matrixproteinen, hierin könnte ein möglicher Mechanismus begründet sein (Sun, Qu, Caruana, & Li, 2016). Auf verschiedene renale Zelltypen hat TGF $\beta$  ebenfalls eine direkte Wirkung: es kann die Proliferation von Mesangiumzellen fördern, um die Produktion von ECM zu erhöhen, oder induziert die Elimination von Podozyten und Tubulusepithel, was zu einer Progredienz der renalen Schädigung und zu einer Zunahme der renalen Fibrose führen kann (Bottinger & Bitzer, 2002; Lopez-Hernandez & Lopez-Novoa, 2012).

Der P2X7-Rezeptor spielt eine Schlüsselrolle in der Prozession von aktivem IL1 $\beta$  und kann durch para- oder autokrine Signaltransduktion zu einem Anstieg von TGF $\beta$  führen (LeRoy, Trojanowska, & Smith, 1990). In vitro Studien konnten zeigen, dass IL1 $\beta$  konzentrationsabhängig Collagenexpression stimulieren kann (Postlethwaite et al., 1988). Da IL1 $\beta$  in der Lage ist seine eigene Genexpression zu induzieren, könnte eine Aktivierung des NALP3-Inflammasoms zu einer kontinuierlichen Freisetzung von IL1 $\beta$  führen. Ein positiver Feedback-Mechanismus könnte dazu beitragen dauerhaft Expression an TGF $\beta$  zu erzeugen, die letztlich in Gewebefibrose resultiert (Artlett, 2012). Solini et al. haben in diesem Zusammenhang gezeigt, dass P2X7-Rezeptoraktivierung zu einer TGF $\beta$ -Sekretion und in Folge zur Produktion extrazellulärer Matrix aus dem Mesangium führt (Solini et al., 2005). P2X7-Rezeptor-defiziente Mäuse zeigten experimentell eine geringe

Zahl an Myofibroblasten, verminderte Collagenablagerung und generell verminderte TGF $\beta$ -Expression im renalen Intersitium (Goncalves et al., 2006). Möglicherweise können Myofibroblasten daher direkt durch P2X7-Rezeptoraktivierung stimuliert werden. Eine indirekte Stimulation könnte über IL1 $\beta$  durch Förderung von Fibroblastenproliferation und der Synthese extrazellulärer Matrix erfolgen.

Die Genexpression des Serinprotease Inhibitors *plasminogen activator inhibitor 1* (PAI-1) wird unter anderem von TGF $\beta$  induziert (Samarakoon et al., 2012). PAI-1 wird von einer Vielzahl an Zellen synthetisiert, darunter Adipozyten, Gefäßendothel, Kardiomyozyten, Makrophagen und Fibroblasten. Die aktive Form von PAI-1 wirkt als natürlicher Inhibitor der Enzyme *urokinase plasminogen activator* (uPA) und *tissue plasminogen activator* (tPA). Es verhindert die Aktivierung der Protease Plasmin, die vor allem bei der Blutgerinnung relevant ist, die Aktivierung von latentem TGF $\beta$  und die Prozession von pro-MMPs zu MMPs. Zusammengefasst verhindert es den proteolytischen Abbau von extrazellulärer Matrix (Hertig et al., 2003; Lackie, 2008) und unterstützt über diesen Weg den Grad der Fibrose (Flevaris & Vaughan, 2017). Es konnte festgestellt werden, dass die Promoterregion von PAI-1 Bindungsstellen für die SMAD-Proteine 2 und 3 enthält (Nagamine, 2008). Hier ergibt sich eine Verbindung zum TGF $\beta$ -Signalweg. Guo et al. konnten in einer Studie mit Mesangiumzellen aus Ratten zeigen, dass TGF $\beta$  auch unabhängig von Smad2/3 die Genexpression von PAI-1 induziert (Guo et al., 2005). Ein Beispiel für eine Smad-abhängige Signaltransduktion lieferten Song et al. in einer Studie in der die PAI-1 Expression in humanen Mesangiumzellen Smad-abhängig stimuliert wurde (C. Y. Song, Kim, Hong, & Lee, 2005). Zusammengefasst zeigt sich die Induktion von PAI-1 gewebe- und zellabhängig, wobei eine Verbindung zum TGF $\beta$ -Signalweg besteht. Es ist bekannt, dass veränderte, unphysiologische Expression von PAI-1 mit fibrotischen Veränderungen in der Niere assoziiert ist (Malgorzewicz, Skrzypczak-Jankun, & Jankun, 2013). Dieser Zusammenhang wurde von Oda et al. in einem Modell der UUO-Modell mit PAI-1-defizienten Mäusen aufgezeigt, die eine signifikant geringere Expression von TGF $\beta$  zeigten (Oda et al., 2001). In der hier vorliegenden Genexpressionsanalyse zu PAI-1 zeigte sich zwar kein signifikanter Unterschied, jedoch aber eine Tendenz zu geringerer PAI-1-Expression in der Gruppe der P2X7-KO-Tiere. Ma et al. haben in diesem Zusammenhang gezeigt, dass PAI-1-defiziente Mäuse in einem Modell der

5/6 Nephrektomie vor Glomerusklerose geschützt sind. Mittels PAS Färbung konnte von dieser Arbeitsgruppe signifikant weniger Glomerulosklerose und Hypertrophie beobachtet werden (Ma, Naito, Han, & Fogo, 2005). Die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten PAS Färbung zeigten einen signifikant geringeren Grad an sklerosierten Glomeruli für die P2X7-KO-Tiere verglichen mit den Wildtyp-Tieren. Dieser Effekt könnte für das Modell teilweise PAI-1 vermittelt sein, so dass P2X7-Rezeptordefizienz auch einen Einfluss auf PAI-1-vermittelte Effekte haben könnte. Unterstützt wird die Relevanz von PAI-1 im Zusammenhang mit renaler Fibrose durch die Beobachtung, dass überexprimiertes TGF $\beta$  die PAI-1 Expression und die Ablagerung von collagener Matrix in TGF $\beta$ -transgenen Mäusen stimuliert. Hier zeigte sich, dass PAI-1-Defizienz die Expansion mesangialer Matrix und eine Verdickung der Basalmembran vermindert (Krag, Danielsen, Carmeliet, Nyengaard, & Wogensen, 2005).

#### 4.5 P2X7-Rezeptor und Blutdruck

In dieser Arbeit zeigte der systolische Blutdruck signifikant geringere Werte in der Gruppe der P2X7-KO-Tiere. Exprimiert wird der P2X7-Rezeptor in renalen arteriellen Stromgebieten und in Perizyten, die die mikrovaskulären Bereiche umgeben (Kawamura et al., 2003; Lewis & Evans, 2001). Turner et al. haben immunhistochemisch gezeigt, dass es auch P2X7-Rezeptorexpression in der glatten Gefäßmuskulatur der Intermediärarterien der Niere beim Menschen gibt (Turner et al., 2007). Diese Ergebnisse konnten durch Lewis und Evans in einem Rattenmodell bestätigt werden (Lewis & Evans, 2001). Zusätzlich zeigt eine Arbeit von Menzies et al. Rezeptorexpression am Endothel prä-glomerulärer Gefäße und in den Vasa recta des Tubulussystems (Menzies et al., 2013). In letztgenannter Arbeit wurden Lewis Ratten, die vergleichsweise unempfindlich gegenüber Hypertonie induziertem vaskulärem Schaden sind, mit F334 Ratten, die eine Anfälligkeit für renale Gefäßschäden haben, verglichen. Die F334 Ratten zeigten hier eine Hochregulation des P2X7-Rezeptors. Diese Ergebnisse zeigten, dass die F334 Ratten erst bei hohen systolischen Blutdrücken in der Nierenarterie eine ausreichende Diurese aufwiesen. Durch selektiven Antagonismus des P2X7-Rezeptors verbesserte sich die gemessene Druck-Diurese-Kurve, was auf eine bessere Blutdruckhämöostase hindeutet; hierin könnte ein möglicher Mechanismus begründet sein. Ähnliche Ergebnisse erzielten Ji et al. in einem Hypertoniemodell

bei Mäusen mittels salzreicher Diät und subkutaner Implantation von Kortikosteroidpallets. Die P2X7-KO-Tiere in diesem Modell zeigten im Verlauf einen signifikant geringeren systolischen Blutdruck verglichen mit den Wildtyp-Tieren, bei besser erhaltener Kreatininclearance (Ji, Naito, Weng, et al., 2012). In einer weiteren Arbeit mit salzsensitiver Hypertonie und medikamentösem P2X7-Rezeptorantagonismus konnten die Ergebnisse zu signifikant geringerem Blutdruck reproduziert werden (Ji, Naito, Hirokawa, et al., 2012). In der Zusammenschau mit der verminderten Inflammations- und Fibrosereaktion könnte diese Tatsache die renale Schädigung in dem Tiermodell dieser Doktorarbeit weiter günstig beeinflusst haben. In einem Tiersersuch mit Angiotensin-induzierter Hypertonie konnte der selektive Antagonismus des P2X7-Rezeptors zu einer Normalisierung der Druckverhältnisse in den Vasa afferentes und efferentes des Glomerulus beitragen, was einen positiven Effekt auf die Langzeitentwicklung des Blutdruckes haben könnte (Bautista-Pérez et al., 2020).

#### 4.6 Relevanz der Untersuchung und Ausblick auf mögliche Folgearbeiten

Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch die 5/6 Nephrektomie eine renale Schädigung erzeugt wird, die mit einer erhöhten inflammatorischen und fibrotischen Reaktion einhergeht, die in der Gruppe der P2X7-KO-Tiere mit signifikant weniger pathologischen Veränderungen einhergeht. Es wurde dargestellt, dass es zu einer signifikant geringeren Expression an inflammatorischen Markern gekommen ist, die eine verminderte IL1 $\beta$ -vermittelte Entzündungsantwort durch verminderte Rekrutierung inflammatorischer Zellen nahelegen. Die daraus resultierende bessere Nierenfunktion ließ sich durch die geringere Albuminurie der P2X7-KO-Tiere erhärten. Die P2X7-KO-Tiere zeigten in den histopathologischen Untersuchungen einen geringeren Grad an interstitieller Fibrose sowie Glomerulosklerose. Zusammenfassend lassen die Ergebnisse dieser Doktorarbeit die Schlussfolgerung zu, dass eine P2X7-Rezeptordefizienz im Modell der 5/6 Nephrektomie vor der Progredienz einer chronischen Niereninsuffizienz schützen kann. Der dargestellte Mechanismus mit Disruption des P2X7-Signaltransduktionswegs stellt einen möglichen pharmakotherapeutischen Ansatzpunkt, z.B. mit dem möglichen Antagonisten Brilliantblau, dar (Pereira et al., 2020). Die weitere Differenzierung der zu Grunde liegenden Signalwege stellt dabei eine wichtige Aufgabe zukünftiger Forschung dar.

## 5 Literaturverzeichnis

- Abais, J. M., Zhang, C., Xia, M., Liu, Q., Gehr, T. W., Boini, K. M., et al. (2013). NADPH oxidase-mediated triggering of inflammasome activation in mouse podocytes and glomeruli during hyperhomocysteinemia. *Antioxid Redox Signal*, *18*(13), 1537-1548.
- Abbracchio MP, C. F., FredholmBB, Williams M (1993). Purinoceptor nomenclature: A status report. *Drug Development Research*, *28*(3), 207 - 213.
- Al Banchaabouchi, M., Marescau, B., D'Hooge, R., Van Marck, E., & De Deyn, P. P. (2001). Biochemical, histological and behavioral consequences of nephrectomy in young and aged mice. *Nephron*, *89*(1), 90-100.
- Amdur, R. L., Feldman, H. I., Gupta, J., Yang, W., Kanetsky, P., Shlipak, M., et al. (2016). Inflammation and Progression of CKD: The CRIC Study. *Clin J Am Soc Nephrol*, *11*(9), 1546-1556.
- Anders, H. J., & Muruve, D. A. (2011). The inflammasomes in kidney disease. *J Am Soc Nephrol*, *22*(6), 1007-1018.
- Anders, H. J., & Schaefer, L. (2014). Beyond tissue injury-damage-associated molecular patterns, toll-like receptors, and inflammasomes also drive regeneration and fibrosis. *J Am Soc Nephrol*, *25*(7), 1387-1400.
- Anderson, C. M., & Nedergaard, M. (2006). Emerging challenges of assigning P2X7 receptor function and immunoreactivity in neurons. *Trends Neurosci*, *29*(5), 257-262.
- Arfian, N., Setyaningsih, W. A. W., Anggorowati, N., Romi, M. M., & Sari, D. C. R. (2019). Ethanol Extract of *Centella asiatica* (Gotu Kola) Attenuates Tubular Injury Through Inhibition of Inflammatory Cytokines and Enhancement of Anti-Fibrotic Factor in Mice with 5/6 Subtotal Nephrectomy. *Malays J Med Sci*, *26*(5), 53-63.
- Artlett, C. M. (2012). The Role of the NLRP3 Inflammasome in Fibrosis. *Open Rheumatol J*, *6*, 80-86.
- Babelova, A., Moreth, K., Tsalas-Greul, W., Zeng-Brouwers, J., Eickelberg, O., Young, M. F., et al. (2009). Biglycan, a danger signal that activates the NLRP3 inflammasome via toll-like and P2X receptors. *J Biol Chem*, *284*(36), 24035-24048.
- Bautista-Pérez, R., Pérez-Méndez, O., Cano-Martínez, A., Pacheco, U., Santamaría, J., Rodríguez-Iturbe, F. R. B., et al. (2020). The Role of P2X7 Purinergic Receptors in the Renal Inflammation Associated with Angiotensin II-induced Hypertension. *Int J Mol Sci*, *21*(11).
- Benoit, S. W., Ciccia, E. A., & Devarajan, P. (2020). Cystatin C as a biomarker of chronic kidney disease: latest developments. *Expert Rev Mol Diagn*, *20*(10), 1019-1026.
- Boraschi, D., Italiani, P., Weil, S., & Martin, M. U. (2018). The family of the interleukin-1 receptors. *Immunol Rev*, *281*(1), 197-232.
- Bottinger, E. P. (2007). TGF-beta in renal injury and disease. *Semin Nephrol*, *27*(3), 309-320.
- Bottinger, E. P., & Bitzer, M. (2002). TGF-beta signaling in renal disease. *J Am Soc Nephrol*, *13*(10), 2600-2610.
- Budi, E. H., Duan, D., & Derynck, R. (2017). Transforming Growth Factor- $\beta$  Receptors and Smads: Regulatory Complexity and Functional Versatility. *Trends Cell Biol*, *27*(9), 658-672.
- Burnstock, G. (1978). A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. *Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones: A Multidisciplinary Approach*, 107 - 118
- Burnstock, G. (2012). Purinergic signalling: Its unpopular beginning, its acceptance and its exciting future. *Bioessays*, *34*(3), 218-225.
- Burnstock, G., & Knight, G. E. (2004). Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *Int Rev Cytol*, *240*, 31-304.
- Chan, A. H., & Schroder, K. (2020). Inflammasome signaling and regulation of interleukin-1 family cytokines. *J Exp Med*, *217*(1).
- Chen, L., Yang, T., Lu, D. W., Zhao, H., Feng, Y. L., Chen, H., et al. (2018). Central role of dysregulation of TGF- $\beta$ /Smad in CKD progression and potential targets of its treatment. *Biomed Pharmacother*, *101*, 670-681.

- Chessell, I. P., Hatcher, J. P., Bountra, C., Michel, A. D., Hughes, J. P., Green, P., et al. (2005). Disruption of the P2X7 purinoceptor gene abolishes chronic inflammatory and neuropathic pain. *Pain*, *114*(3), 386-396.
- Chiao, C. W., Tostes, R. C., & Webb, R. C. (2008). P2X7 receptor activation amplifies lipopolysaccharide-induced vascular hyporeactivity via interleukin-1 beta release. *J Pharmacol Exp Ther*, *326*(3), 864-870.
- Derynck, R., & Zhang, Y. E. (2003). Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature*, *425*(6958), 577-584.
- Deshmane, S. L., Kremlev, S., Amini, S., & Sawaya, B. E. (2009). Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res*, *29*(6), 313-326.
- Di Virgilio, F., Chiozzi, P., Falzoni, S., Ferrari, D., Sanz, J. M., Venketaraman, V., et al. (1998). Cytolytic P2X purinoceptors. *Cell Death Differ*, *5*(3), 191-199.
- Drury, A. N., & Szent-Gyorgyi, A. (1929). The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J Physiol*, *68*(3), 213-237.
- Eardley, K. S., Zehnder, D., Quinkler, M., Lepenies, J., Bates, R. L., Savage, C. O., et al. (2006). The relationship between albuminuria, MCP-1/CCL2, and interstitial macrophages in chronic kidney disease. *Kidney Int*, *69*(7), 1189-1197.
- Ebisawa, T., Fukuchi, M., Murakami, G., Chiba, T., Tanaka, K., Imamura, T., et al. (2001). Smurf1 interacts with transforming growth factor-beta type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation. *J Biol Chem*, *276*(16), 12477-12480.
- Eddy, A. A., & Neilson, E. G. (2006). Chronic kidney disease progression. *J Am Soc Nephrol*, *17*(11), 2964-2966.
- Ferguson, T. W., Komenda, P., & Tangri, N. (2015). Cystatin C as a biomarker for estimating glomerular filtration rate. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, *24*(3), 295-300.
- Ferrari, D., Chiozzi, P., Falzoni, S., Dal Susino, M., Melchiorri, L., Baricordi, O. R., et al. (1997). Extracellular ATP triggers IL-1 beta release by activating the purinergic P2Z receptor of human macrophages. *J Immunol*, *159*(3), 1451-1458.
- Ferrari, D., Pizzirani, C., Adinolfi, E., Lemoli, R. M., Curti, A., Idzko, M., et al. (2006). The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release. *J Immunol*, *176*(7), 3877-3883.
- Fintha, A., Sebe, A., Masszi, A., Terebessy, T., Huszar, T., Rosivall, L., et al. (2007). Angiotensin II activates plasminogen activator inhibitor-1 promoter in renal tubular epithelial cells via the AT1 receptor. *Acta Physiol Hung*, *94*(1-2), 19-30.
- Flevaris, P., & Vaughan, D. (2017). The Role of Plasminogen Activator Inhibitor Type-1 in Fibrosis. *Semin Thromb Hemost*, *43*(2), 169-177.
- Furuichi, K., Wada, T., Iwata, Y., Kokubo, S., Hara, A., Yamahana, J., et al. (2006). Interleukin-1-dependent sequential chemokine expression and inflammatory cell infiltration in ischemia-reperfusion injury. *Crit Care Med*, *34*(9), 2447-2455.
- Gabay, C., Lamacchia, C., & Palmer, G. (2010). IL-1 pathways in inflammation and human diseases. *Nat Rev Rheumatol*, *6*(4), 232-241.
- Gentile, D., Natale, M., Lazzerini, P. E., Capecchi, P. L., & Laghi-Pasini, F. (2015). The role of P2X7 receptors in tissue fibrosis: a brief review. *Purinergic Signal*, *11*(4), 435-440.
- Gilmore, T. D. (2006). Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene*, *25*(51), 6680-6684.
- Goncalves, R. G., Gabrich, L., Rosario, A., Jr., Takiya, C. M., Ferreira, M. L., Chiarini, L. B., et al. (2006). The role of purinergic P2X7 receptors in the inflammation and fibrosis of unilateral ureteral obstruction in mice. *Kidney Int*, *70*(9), 1599-1606.
- Guh, J. Y. (2010). Proteinuria versus albuminuria in chronic kidney disease. *Nephrology (Carlton)*, *15* Suppl 2, 53-56.
- Guo, B., Inoki, K., Isono, M., Mori, H., Kanasaki, K., Sugimoto, T., et al. (2005). MAPK/AP-1-dependent regulation of PAI-1 gene expression by TGF-beta in rat mesangial cells. *Kidney Int*, *68*(3), 972-984.

- Gupta, J., Mitra, N., Kanetsky, P. A., Devaney, J., Wing, M. R., Reilly, M., et al. (2012). Association between albuminuria, kidney function, and inflammatory biomarker profile in CKD in CRIC. *Clin J Am Soc Nephrol*, 7(12), 1938-1946.
- Hertig, A., Berrou, J., Allory, Y., Breton, L., Commo, F., Costa De Beauregard, M. A., et al. (2003). Type 1 plasminogen activator inhibitor deficiency aggravates the course of experimental glomerulonephritis through overactivation of transforming growth factor beta. *Faseb j*, 17(13), 1904-1906.
- Hillman, K. A., Burnstock, G., & Unwin, R. J. (2005). The P2X7 ATP receptor in the kidney: a matter of life or death? *Nephron Exp Nephrol*, 101(1), e24-30.
- Homsí, E., Janino, P., & de Faria, J. B. (2006). Role of caspases on cell death, inflammation, and cell cycle in glycerol-induced acute renal failure. *Kidney Int*, 69(8), 1385-1392.
- Hu, H. H., Chen, D. Q., Wang, Y. N., Feng, Y. L., Cao, G., Vaziri, N. D., et al. (2018). New insights into TGF- $\beta$ /Smad signaling in tissue fibrosis. *Chem Biol Interact*, 292, 76-83.
- Huang, X. R., Chung, A. C., Wang, X. J., Lai, K. N., & Lan, H. Y. (2008). Mice overexpressing latent TGF-beta1 are protected against renal fibrosis in obstructive kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol*, 295(1), F118-127.
- Ji, X., Naito, Y., Hirokawa, G., Weng, H., Hiura, Y., Takahashi, R., et al. (2012). P2X(7) receptor antagonism attenuates the hypertension and renal injury in Dahl salt-sensitive rats. *Hypertens Res*, 35(2), 173-179.
- Ji, X., Naito, Y., Weng, H., Endo, K., Ma, X., & Iwai, N. (2012). P2X7 deficiency attenuates hypertension and renal injury in deoxycorticosterone acetate-salt hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol*, 303(8), F1207-1215.
- Karmakar, M., Katsnelson, M. A., Dubyak, G. R., & Pearlman, E. (2016). Neutrophil P2X7 receptors mediate NLRP3 inflammasome-dependent IL-1beta secretion in response to ATP. *Nat Commun*, 7, 10555.
- Kavsak, P., Rasmussen, R. K., Causing, C. G., Bonni, S., Zhu, H., Thomsen, G. H., et al. (2000). Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF beta receptor for degradation. *Mol Cell*, 6(6), 1365-1375.
- Kawamura, H., Sugiyama, T., Wu, D. M., Kobayashi, M., Yamanishi, S., Katsumura, K., et al. (2003). ATP: a vasoactive signal in the pericyte-containing microvasculature of the rat retina. *J Physiol*, 551(Pt 3), 787-799.
- Kelley, N., Jeltema, D., Duan, Y., & He, Y. (2019). The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation. *Int J Mol Sci*, 20(13).
- Kim, Y. G., Kim, S. M., Kim, K. P., Lee, S. H., & Moon, J. Y. (2019). The Role of Inflammasome-Dependent and Inflammasome-Independent NLRP3 in the Kidney. *Cells*, 8(11).
- Kopp, J. B., Factor, V. M., Mozes, M., Nagy, P., Sanderson, N., Bottinger, E. P., et al. (1996). Transgenic mice with increased plasma levels of TGF-beta 1 develop progressive renal disease. *Lab Invest*, 74(6), 991-1003.
- Koushanpour, E. (2013). Renal physiology: principles, structure, and function.
- Krag, S., Danielsen, C. C., Carmeliet, P., Nyengaard, J., & Wogensens, L. (2005). Plasminogen activator inhibitor-1 gene deficiency attenuates TGF-beta1-induced kidney disease. *Kidney Int*, 68(6), 2651-2666.
- Lackie, P. M. (2008). Molecular portfolios: cells interacting with matrix in repairing airway epithelium. *Clin Exp Allergy*, 38(12), 1840-1843.
- Lamkanfi, M., & Dixit, V. M. (2014). Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell*, 157(5), 1013-1022.
- Lammas, D. A., Stober, C., Harvey, C. J., Kendrick, N., Panchalingam, S., & Kumararatne, D. S. (1997). ATP-induced killing of mycobacteria by human macrophages is mediated by purinergic P2Z(P2X7) receptors. *Immunity*, 7(3), 433-444.
- Lan, H. Y., Nikolic-Paterson, D. J., Zarama, M., Vannice, J. L., & Atkins, R. C. (1993). Suppression of experimental crescentic glomerulonephritis by the interleukin-1 receptor antagonist. *Kidney Int*, 43(2), 479-485.

- Latz, E., Xiao, T. S., & Stutz, A. (2013). Activation and regulation of the inflammasomes. *Nat Rev Immunol*, 13(6), 397-411.
- LeRoy, E. C., Trojanowska, M. I., & Smith, E. A. (1990). Cytokines and human fibrosis. *Eur Cytokine Netw*, 1(4), 215-219.
- Levin, A. (2013a). Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney International Supplements* 3(1), 1 - 150.
- Levin, A. (2013b). Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney International, Supplements* 3(1), 1 - 150.
- Lewis, C. J., & Evans, R. J. (2001). P2X receptor immunoreactivity in different arteries from the femoral, pulmonary, cerebral, coronary and renal circulations. *J Vasc Res*, 38(4), 332-340.
- Lichtnekert, J., Kulkarni, O. P., Mulay, S. R., Rupanagudi, K. V., Ryu, M., Allam, R., et al. (2011). Anti-GBM glomerulonephritis involves IL-1 but is independent of NLRP3/ASC inflammasome-mediated activation of caspase-1. *PLoS One*, 6(10), e26778.
- Liu, D., Xu, M., Ding, L. H., Lv, L. L., Liu, H., Ma, K. L., et al. (2014). Activation of the Nlrp3 inflammasome by mitochondrial reactive oxygen species: a novel mechanism of albumin-induced tubulointerstitial inflammation. *Int J Biochem Cell Biol*, 57, 7-19.
- Lopez-Hernandez, F. J., & Lopez-Novoa, J. M. (2012). Role of TGF-beta in chronic kidney disease: an integration of tubular, glomerular and vascular effects. *Cell Tissue Res*, 347(1), 141-154.
- Ma, L., Naito, T., Han, J., & Fogo, A. (2005). Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) deficiency prevents the development of glomerulosclerosis in the subtotal nephrectomy (5/6 Nx) in the mouse. *J Am Soc Nephrol*, 16, 653A.
- Malgorzewicz, S., Skrzypczak-Jankun, E., & Jankun, J. (2013). Plasminogen activator inhibitor-1 in kidney pathology (Review). *Int J Mol Med*, 31(3), 503-510.
- Meguid El Nahas, A., & Bello, A. K. (2005). Chronic kidney disease: the global challenge. *Lancet*, 365(9456), 331-340.
- Meng, X. M., Chung, A. C., & Lan, H. Y. (2013). Role of the TGF-beta/BMP-7/Smad pathways in renal diseases. *Clin Sci (Lond)*, 124(4), 243-254.
- Meng, X. M., Huang, X. R., Xiao, J., Chen, H. Y., Zhong, X., Chung, A. C., et al. (2012). Diverse roles of TGF-beta receptor II in renal fibrosis and inflammation in vivo and in vitro. *J Pathol*, 227(2), 175-188.
- Menzies, R. I., Unwin, R. J., Dash, R. K., Beard, D. A., Cowley, A. W., Jr., Carlson, B. E., et al. (2013). Effect of P2X4 and P2X7 receptor antagonism on the pressure diuresis relationship in rats. *Front Physiol*, 4, 305.
- Mihai, S., Codrici, E., Popescu, I. D., Enciu, A. M., Albulescu, L., Necula, L. G., et al. (2018). Inflammation-Related Mechanisms in Chronic Kidney Disease Prediction, Progression, and Outcome. *J Immunol Res*, 2018.
- Mitchell, S., Vargas, J., & Hoffmann, A. (2016). Signaling via the NFkB system. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 8(3), 227-241.
- Moon, J. A., Kim, H. T., Cho, I. S., Sheen, Y. Y., & Kim, D. K. (2006). IN-1130, a novel transforming growth factor-beta type I receptor kinase (ALK5) inhibitor, suppresses renal fibrosis in obstructive nephropathy. *Kidney Int*, 70(7), 1234-1243.
- Morii, T., Fujita, H., Narita, T., Shimotomai, T., Fujishima, H., Yoshioka, N., et al. (2003). Association of monocyte chemoattractant protein-1 with renal tubular damage in diabetic nephropathy. *J Diabetes Complications*, 17(1), 11-15.
- Morikawa, M., Derynck, R., & Miyazono, K. (2016). TGF-β and the TGF-β Family: Context-Dependent Roles in Cell and Tissue Physiology. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 8(5).
- Murakami, K., Takemura, T., Hino, S., & Yoshioka, K. (1997). Urinary transforming growth factor-beta in patients with glomerular diseases. *Pediatr Nephrol*, 11(3), 334-336.
- Nagamine, Y. (2008). Transcriptional regulation of the plasminogen activator inhibitor type 1--with an emphasis on negative regulation. *Thromb Haemost*, 100(6), 1007-1013.

- Newman, D. J., Thakkar, H., Edwards, R. G., Wilkie, M., White, T., Grubb, A. O., et al. (1995). Serum cystatin C measured by automated immunoassay: a more sensitive marker of changes in GFR than serum creatinine. *Kidney Int*, 47(1), 312-318.
- Nogueira, A., Pires, M. J., & Oliveira, P. A. (2017). Pathophysiological Mechanisms of Renal Fibrosis: A Review of Animal Models and Therapeutic Strategies. *In Vivo*, 31(1), 1-22.
- North, R. A. (2002). Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev*, 82(4), 1013-1067.
- Oberhauser, V., Vonend, O., & Rump, L. C. (1999). Neuropeptide Y and ATP interact to control renovascular resistance in the rat. *J Am Soc Nephrol*, 10(6), 1179-1185.
- Oda, T., Jung, Y. O., Kim, H. S., Cai, X., Lopez-Guisa, J. M., Ikeda, Y., et al. (2001). PAI-1 deficiency attenuates the fibrogenic response to ureteral obstruction. *Kidney Int*, 60(2), 587-596.
- Pelegri, P., Barroso-Gutierrez, C., & Surprenant, A. (2008). P2X7 receptor differentially couples to distinct release pathways for IL-1beta in mouse macrophage. *J Immunol*, 180(11), 7147-7157.
- Pereira, J. M. S., Barreira, A. L., Gomes, C. R., Ornellas, F. M., Ornellas, D. S., Miranda, L. C., et al. (2020). Brilliant blue G, a P2X7 receptor antagonist, attenuates early phase of renal inflammation, interstitial fibrosis and is associated with renal cell proliferation in ureteral obstruction in rats. *BMC Nephrol*, 21(1), 206.
- Pippias, M., Stel, V. S., Abad Diez, J. M., Afentakis, N., Herrero-Calvo, J. A., Arias, M., et al. (2015). Renal replacement therapy in Europe: a summary of the 2012 ERA-EDTA Registry Annual Report. *Clin Kidney J*, 8(3), 248-261.
- Pollak, M. R., Quaggin, S. E., Hoenig, M. P., & Dworkin, L. D. (2014). The glomerulus: the sphere of influence. *Clin J Am Soc Nephrol*, 9(8), 1461-1469.
- Postlethwaite, A. E., Raghow, R., Stricklin, G. P., Poppleton, H., Seyer, J. M., & Kang, A. H. (1988). Modulation of fibroblast functions by interleukin 1: increased steady-state accumulation of type I procollagen messenger RNAs and stimulation of other functions but not chemotaxis by human recombinant interleukin 1 alpha and beta. *J Cell Biol*, 106(2), 311-318.
- Qian, Y., Qian, C., Xie, K., Fan, Q., Yan, Y., Lu, R., et al. (2021). P2X7 receptor signaling promotes inflammation in renal parenchymal cells suffering from ischemia-reperfusion injury. *Cell Death Dis*, 12(1), 132.
- Qidwai, T., & Khan, M. Y. (2016). Impact of genetic variations in C-C chemokine receptors and ligands on infectious diseases. *Hum Immunol*.
- Ralevic, V., & Burnstock, G. (1998). Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev*, 50(3), 413-492.
- Ralevic, V., & Burnstock, G. (2003). Involvement of purinergic signaling in cardiovascular diseases. *Drug News Perspect*, 16(3), 133-140.
- Roberts, A. B. (1998). Molecular and cell biology of TGF-beta. *Miner Electrolyte Metab*, 24(2-3), 111-119.
- Samarakoon, R., Overstreet, J. M., Higgins, S. P., & Higgins, P. J. (2012). TGF-beta1 --> SMAD/p53/USF2 --> PAI-1 transcriptional axis in ureteral obstruction-induced renal fibrosis. *Cell Tissue Res*, 347(1), 117-128.
- Sanderson, N., Factor, V., Nagy, P., Kopp, J., Kondaiah, P., Wakefield, L., et al. (1995). Hepatic expression of mature transforming growth factor beta 1 in transgenic mice results in multiple tissue lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(7), 2572-2576.
- Sari, D. C. R., Putri, M. W., Leksono, T. P., Chairunnisa, N., Reynaldi, G. N., Simanjuntak, B. C., et al. (2020). Calcitriol Ameliorates Kidney Injury Through Reducing Podocytopeny, Tubular Injury, Inflammation and Fibrosis in 5/6 Subtotal Nephrectomy Model in Rats. *Kobe J Med Sci*, 65(5), E153-e163.
- Sato, Y., Takahashi, M., & Yanagita, M. (2020). Pathophysiology of AKI to CKD progression. *Semin Nephrol*, 40(2), 206-215.
- Schrier, R. W., & Schrier, R. (1997). Diseases of the kidney. 1 (1997).
- Seccia, T. M., Caroccia, B., & Calo, L. A. (2017). Hypertensive nephropathy. Moving from classic to emerging pathogenetic mechanisms. *J Hypertens*, 35(2), 205-212.

- Siegenthaler, W. (2006). *Klinische Pathophysiologie* : 239 Tabellen.
- Smeets, B., Kuppe, C., Sicking, E. M., Fuss, A., Jirak, P., van Kuppevelt, T. H., et al. (2011). Parietal epithelial cells participate in the formation of sclerotic lesions in focal segmental glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol*, 22(7), 1262-1274.
- Solini, A., Iacobini, C., Ricci, C., Chiozzi, P., Amadio, L., Pricci, F., et al. (2005). Purinergic modulation of mesangial extracellular matrix production: role in diabetic and other glomerular diseases. *Kidney Int*, 67(3), 875-885.
- Solle, M., Labasi, J., Perregaux, D. G., Stam, E., Petrushova, N., Koller, B. H., et al. (2001). Altered cytokine production in mice lacking P2X(7) receptors. *J Biol Chem*, 276(1), 125-132.
- Song, C. Y., Kim, B. C., Hong, H. K., & Lee, H. S. (2005). Oxidized LDL activates PAI-1 transcription through autocrine activation of TGF-beta signaling in mesangial cells. *Kidney Int*, 67(5), 1743-1752.
- Song, S., Meyer, M., Turk, T. R., Wilde, B., Feldkamp, T., Assert, R., et al. (2009). Serum cystatin C in mouse models: a reliable and precise marker for renal function and superior to serum creatinine. *Nephrol Dial Transplant*, 24(4), 1157-1161.
- Sun, Y. B., Qu, X., Caruana, G., & Li, J. (2016). The origin of renal fibroblasts/myofibroblasts and the signals that trigger fibrosis. *Differentiation*.
- Surprenant, A., Rassendren, F., Kawashima, E., North, R. A., & Buell, G. (1996). The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science*, 272(5262), 735-738.
- Szejder, M., Rogacka, D., & Piwkowska, A. (2021). Purinergic P2 receptors: Involvement and therapeutic implications in diabetes-related glomerular injury. *Arch Biochem Biophys*, 714, 109078.
- Takeuchi, O., & Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, 140(6), 805-820.
- Timoshanko, J. R., Kitching, A. R., Iwakura, Y., Holdsworth, S. R., & Tipping, P. G. (2004). Contributions of IL-1beta and IL-1alpha to crescentic glomerulonephritis in mice. *J Am Soc Nephrol*, 15(4), 910-918.
- Turin, T. C., Coresh, J., Tonelli, M., Stevens, P. E., de Jong, P. E., Farmer, C. K., et al. (2012a). One-year change in kidney function is associated with an increased mortality risk. *Am J Nephrol*, 36(1), 41-49.
- Turin, T. C., Coresh, J., Tonelli, M., Stevens, P. E., de Jong, P. E., Farmer, C. K., et al. (2012b). Short-term change in kidney function and risk of end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant*, 27(10), 3835-3843.
- Turin, T. C., Coresh, J., Tonelli, M., Stevens, P. E., de Jong, P. E., Farmer, C. K., et al. (2013). Change in the estimated glomerular filtration rate over time and risk of all-cause mortality. *Kidney Int*, 83(4), 684-691.
- Turner, C. M., Tam, F. W., Lai, P. C., Tarzi, R. M., Burnstock, G., Pusey, C. D., et al. (2007). Increased expression of the pro-apoptotic ATP-sensitive P2X7 receptor in experimental and human glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant*, 22(2), 386-395.
- Turner, C. M., Vonend, O., Chan, C., Burnstock, G., & Unwin, R. J. (2003). The pattern of distribution of selected ATP-sensitive P2 receptor subtypes in normal rat kidney: an immunohistological study. *Cells Tissues Organs*, 175(2), 105-117.
- Umetsu, H., Watanabe, S., Imaizumi, T., Aizawa, T., Tsugawa, K., Kawaguchi, S., et al. (2021). Interleukin-6 via Toll-Like Receptor 3 Signaling Attenuates the Expression of Proinflammatory Chemokines in Human Podocytes. *Kidney Blood Press Res*, 46(2), 207-218.
- Verhave, J. C., Gansevoort, R. T., Hillege, H. L., Bakker, S. J., De Zeeuw, D., & de Jong, P. E. (2004). An elevated urinary albumin excretion predicts de novo development of renal function impairment in the general population. *Kidney Int Suppl*(92), S18-21.
- Vonend, O., Oberhauser, V., von Kugelgen, I., Apel, T. W., Amann, K., Ritz, E., et al. (2002). ATP release in human kidney cortex and its mitogenic effects in visceral glomerular epithelial cells. *Kidney Int*, 61(5), 1617-1626.

- Vonend, O., Turner, C. M., Chan, C. M., Loesch, A., Dell'Anna, G. C., Srai, K. S., et al. (2004). Glomerular expression of the ATP-sensitive P2X receptor in diabetic and hypertensive rat models. *Kidney Int*, 66(1), 157-166.
- Wang, J., Wen, Y., Lv, L. L., Liu, H., Tang, R. N., Ma, K. L., et al. (2015). Involvement of endoplasmic reticulum stress in angiotensin II-induced NLRP3 inflammasome activation in human renal proximal tubular cells in vitro. *Acta Pharmacol Sin*, 36(7), 821-830.
- Wang, W., Koka, V., & Lan, H. Y. (2005). Transforming growth factor-beta and Smad signalling in kidney diseases. *Nephrology (Carlton)*, 10(1), 48-56.
- Wang, Y., Wang, Y. P., Zheng, G., Lee, V. W., Ouyang, L., Chang, D. H., et al. (2007). Ex vivo programmed macrophages ameliorate experimental chronic inflammatory renal disease. *Kidney Int*, 72(3), 290-299.
- Weiner, D. E. (2007). Causes and consequences of chronic kidney disease: implications for managed health care. *J Manag Care Pharm*, 13(3 Suppl), S1-9.
- Wu, C. F., Chiang, W. C., Lai, C. F., Chang, F. C., Chen, Y. T., Chou, Y. H., et al. (2013). Transforming growth factor beta-1 stimulates profibrotic epithelial signaling to activate pericyte-myofibroblast transition in obstructive kidney fibrosis. *Am J Pathol*, 182(1), 118-131.
- Yamamoto, T., Noble, N. A., Cohen, A. H., Nast, C. C., Hishida, A., Gold, L. I., et al. (1996). Expression of transforming growth factor-beta isoforms in human glomerular diseases. *Kidney Int*, 49(2), 461-469.
- Zhang, C., Boini, K. M., Xia, M., Abais, J. M., Li, X., Liu, Q., et al. (2012). Activation of Nod-like receptor protein 3 inflammasomes turns on podocyte injury and glomerular sclerosis in hyperhomocysteinemia. *Hypertension*, 60(1), 154-162.
- Zhang, Y., & Kompa, A. R. (2014). A practical guide to subtotal nephrectomy in the rat with subsequent methodology for assessing renal and cardiac function. *Nephrology (Carlton)*, 19(9), 552-561.