

Aus dem Zentrum für Innere Medizin der Universität zu Köln Klinik und Poliklinik für
Innere Medizin II der Universität zu Köln
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Th. Benzing

Die Rolle von ACOD1 in der Pathogenese der Glomerulonephritis

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Bastian Trinsch
aus Hann. Münden

promoviert am 05. Februar 2026

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink
1. Gutachter: Privatdozent Dr. med. S. Brähler
2. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. med. C. Pallasch

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Herr Priv.-Doz. Dr. Sebastian Brähler

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die Eingriffe an den Versuchstieren wurden durch mich unter Anleitung von Herrn Dr. med. Paul Diefenhardt durchgeführt. Metabolomische Untersuchungen aus von mir vorbereitetem Probenmaterial wurden durch Herrn Dr. Patrick Giavalisco durchgeführt. Alle weiteren Experimente wurden durch mich unter Anleitung von Herrn Dr. med. Paul Diefenhardt und Frau Vivian Ludwig durchgeführt.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 08.07.2025

Unterschrift:

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich auf meinem wissenschaftlichen Weg unterstützt und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt zunächst meinem Doktorvater und Betreuer PD Dr. Sebastian Brähler für seine richtungsweisende fachliche Expertise, seine stets motivierenden Worte und die inspirierende Begleitung auf meinem Weg in die Wissenschaft. Für die Weitergabe wertvoller methodischer und technischer Expertise danke ich herzlich Frau Vivian Ludwig. Ihre geduldige Unterstützung war unverzichtbar für die Umsetzung experimenteller Ansätze. Herrn Dr. Paul Diefenhardt möchte ich für die fruchtbare Zusammenarbeit in gemeinsamen Projekten sowie den steten wissenschaftlichen Austausch danken.

Ein Stipendium des Köln Fortune Förderprogramms ermöglichte es mir, mich vollständig auf meine Forschung zu konzentrieren. Für diese finanzielle Unterstützung und das damit verbundene Vertrauen bin ich dankbar. Der CECAD Imaging Facility, der Serviceeinheit FACS & Mikroskopie des Max-Planck-Instituts für Biologie des Alterns, sowie Herrn Dr. Patrick Giavalisco und seiner Serviceeinheit Metabolomik des Max-Planck-Instituts für Biologie des Alterns danke ich für die exzellente technische Beratung und die Bereitstellung modernster Geräte. Ohne ihre professionelle Infrastruktur wären viele Experimente nicht realisierbar gewesen. Nicht zuletzt gilt mein Dank den Tierpflegerinnen und Tierpflegern der CECAD in vivo Research Facility für ihren Einsatz und die verantwortungsvolle Betreuung der Versuchstiere.

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	7
1. ZUSAMMENFASSUNG	9
2. EINLEITUNG	11
2.1 Glomerulonephritis - Stand der Forschung	11
2.1.1. Die glomeruläre Filtrationsbarriere - Aufbau und Funktion	11
2.1.2. Glomerulonephritiden – Epidemiologie und klinische Bedeutung	12
2.1.3. Aktuelle Therapiestrategien und ihre Limitationen	13
2.1.4. Molekulare und zelluläre Pathomechanismen glomerulärer Entzündungen	14
2.1.5. Itaconat als neuer therapeutischer Ansatzpunkt	15
2.2 Fragestellungen und Ziel der Arbeit	18
3. MATERIAL UND METHODEN	21
3.1. Material	21
3.1.1. Chemikalien	21
3.1.2. Antikörper	22
3.1.3. Primer	23
3.1.4. Lösungen und Puffer	23
3.2. Methoden	25
3.2.1. Mäuse	25
3.2.2. Nephrotoxische Nephritis	26
3.2.3. Knochenmarktransfer	27
3.2.4. Maus-Genotypisierung	28
3.2.5. Kreatinin-Assay	29
3.2.6. Albumin-ELISA	30
3.2.7. Anti-Schaf-IgG-ELISA	31
3.2.8. Harnstoff-Stickstoff Messung in Plasmaproben	31
3.2.9. Histologie	32

3.2.10.	Ribonukleinsäure-Isolation aus Gewebe	32
3.2.11.	Reverse Transkription von RNA zu komplementärer DNA	33
3.2.12.	Quantitative Polymerasekettenreaktion	34
3.2.13.	Durchflusszytometrie	35
3.2.14.	Metabolomik	37
3.2.15.	Statistik	38
4.	ERGEBNISSE	39
4.1.	Quantitative PCR bestätigt eine komplette <i>Acod1</i> -Defizienz in <i>Acod1</i> ^{-/-} -Mäusen	39
4.2.	<i>Acod1</i> ^{-/-} -Mäuse zeigen keinen renalen Phänotyp unter physiologischen Bedingungen	40
4.3.	<i>Acod1</i> ^{-/-} -Mäuse zeigen eine aggravierte histologische Schädigung und reduzierte Albuminurie in der experimentellen Glomerulonephritis	45
4.4.	ACOD1 hat keinen Einfluss auf die Anzahl renaler Immunzellen während der experimentellen GN	49
4.5.	Albuminurie und renale Immunzellinfiltration bleiben in <i>Acod1</i> -Knochenmarkchimären unverändert	54
4.6.	ACOD1 beeinflusst den Glutathion- und Laktat-Stoffwechsel des Nierenkortex in der Glomerulonephritis	58
5.	DISKUSSION	63
5.1.	<i>Acod1</i> in der renalen Gewebshomöostase unter physiologischen Bedingungen	63
5.2.	Die Rolle von <i>Acod1</i> während der glomerulären Entzündungsreaktion	64
5.3.	Die gewebespezifische Wirkung von ACOD1 im Kontext der glomerulären Filtrationsbarriere	65
5.4.	Limitationen der Studie	65
5.5.	Zukunftsperspektiven und Bedeutung für die Forschung	67
5.6.	Fazit	68
6.	LITERATURVERZEICHNIS	70

7.	ANHANG	74
8.	VORABVERÖFFENTLICHUNGEN VON ERGEBNISSEN	75

Abkürzungsverzeichnis

ACK.....	<i>Ammoniumchlorid-Kalium-Lysepuffer</i>
AKR.....	<i>Albumin-Kreatinin-Ratio</i>
ANCA.....	<i>Anti-Neutrophile zytoplasmatische Antikörper</i>
BSA.....	<i>Bovine Serum Albumin</i>
BUN.....	<i>Blood Urea Nitrogen</i>
cDNA.....	<i>komplementäre DNA</i>
DI.....	<i>Dimethylitaconat</i>
DMSO.....	<i>Dimethylsulfoxid</i>
DNS.....	<i>Desoxyribonukleinsäure</i>
EDTA.....	<i>Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz-Dihydrat</i>
ELISA.....	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
FBS.....	<i>Fetal bovine serum</i>
FSGS.....	<i>Fokal-segmentale Glomerulosklerose</i>
GBM.....	<i>Glomeruläre Basalmembran</i>
GFR.....	<i>Glomeruläre Filtrationsrate</i>
GN.....	<i>Glomerulonephritis</i>
HIF1 α	<i>Hypoxie-induzierbarer Faktor 1-Alpha</i>
HRP.....	<i>Meerrettichperoxidase</i>
i.p.....	<i>intraperitoneal</i>
Irg1.....	<i>Immune-Responsive Gene 1</i>
JAK.....	<i>Januskinase</i>
KCl.....	<i>Kaliumchlorid</i>
KDIGO.....	<i>Kidney Disease: Improving Global Outcomes</i>
KG.....	<i>Körpergewicht</i>
LPS.....	<i>Lipopolysaccharid</i>
MCD.....	<i>Minimal-change disease</i>
Mtb.....	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
mTOR.....	<i>mechanistic Target of Rapamycin</i>
NF- κ B.....	<i>nuclear factor κ-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NK.....	<i>natürliche Killerzelle</i>
NTN.....	<i>Nephrotoxische Nephritis</i>
NTS.....	<i>Nephrotoxisches Serum</i>
OD.....	<i>optische Dichte</i>
PAS.....	<i>Perjodsäure-Schiff-Reaktion</i>
PBS.....	<i>Phosphatgepufferte Kochsalzlösung</i>
PCA.....	<i>Principal Component Analysis</i>

PCR	<i>Polymerase-Kettenreaktion</i>
PFA	<i>Paraformaldehyd</i>
qPCR	<i>quantitative Polymerase-Kettenreaktion</i>
RNA	<i>Ribonukleinsäure</i>
RPGN.....	<i>rasch progrediente Glomerulonephritis</i>
SDH	<i>Succinatdehydrogenase</i>
STED	<i>Stimulated Emission Depletion</i>
TAE	<i>Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Acetat-Ethylendiamintetraessigsäure</i>
TMB	<i>Tetramethylbenzidin</i>
TNF	<i>Tumornekrosefaktor</i>
Treg.....	<i>T-regulatorische Zelle</i>
UAW.....	<i>unerwünschte Arzneimittelwirkung</i>
WT	<i>Wildtyp</i>

1. Zusammenfassung

Die Regulation metabolischer Prozesse ist ein wesentlicher Bestandteil der Aktivierung von Immunzellen. Die Erforschung der Rolle des Metabolismus für die Entstehung von entzündlichen Erkrankungen erhält zunehmende Aufmerksamkeit in der Immunologie. Der Metabolit Itaconat wurde hierbei in verschiedenen Krankheitsmodellen als Schlüsselmediator identifiziert. In dieser Arbeit wurde erstmals die Rolle des Itaconat-synthetisierenden Enzyms ACOD1 in der Pathogenese der Glomerulonephritis im Mausmodell der nephrotoxischen Nephritis (NTN) untersucht. Durch den Einsatz von *Acod1*-defizienten Mäusen sowie Knochenmarkchimären konnten sowohl funktionelle als auch mechanistische Einblicke in die Bedeutung dieses Stoffwechselwegs für die renale Entzündungsreaktion gewonnen werden.

Unter physiologischen Bedingungen zeigten *Acod1*-Knockout-Mäuse keine Auffälligkeiten in der Nierenfunktion oder Histologie ebenso wenig wie Veränderungen in der Zusammensetzung renaler Immunzellpopulationen. Nach Induktion der NTN entwickelten *Acod1*-defiziente Tiere jedoch vermehrt histologische Schädigungen der Glomeruli. Die Albuminurie war hingegen signifikant reduziert. Durchflusszytometrische Analysen ergaben keine Unterschiede in der Infiltration oder Verteilung von Immunzellen, was auf einen von der Immunzellrekrutierung unabhängigen Mechanismus hindeutet.

Knochenmarktransfer-Experimente offenbarten, dass der beobachtete phänotypische Unterschied spezifisch für den Ganzkörper-Knockout war und in Chimären mit ausschließlich hämatopoetischer *Acod1*-Defizienz nicht reproduziert werden konnte. Dies legt nahe, dass nicht die Wirkung von ACOD1 in Immunzellen sondern in parenchymatösen Nierenzellen – möglicherweise Podozyten oder Tubuluszellen – für einen protektiven Effekt verantwortlich sein könnte. Metabolomische Analysen bestätigten die zentrale Rolle von ACOD1 in der mitochondrialen Stoffwechselregulation und zeigten charakteristische Verschiebungen im Succinat/Fumarat-Haushalt während der NTN.

Zusammenfassend demonstriert diese Arbeit, dass ACOD1 die glomeruläre Filtrationsbarriere bei entzündlicher Schädigung beeinflusst, während seine Rolle in der Immunzellregulation in diesem Krankheitskontext begrenzt zu sein scheint. Die Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung metabolischer Signalwege für die Integrität der Nierenfiltrationsbarriere und eröffnen neue Perspektiven für zielgerichtete Therapieansätze bei Proteinurie-assoziierten Nierenerkrankungen. Weitere Studien sollten die zellspezifischen Wirkmechanismen von Itaconat in Podozyten sowie dessen therapeutisches Potenzial näher untersuchen und den Einfluss auf die Aktivität renaler Immunzellen untersuchen.

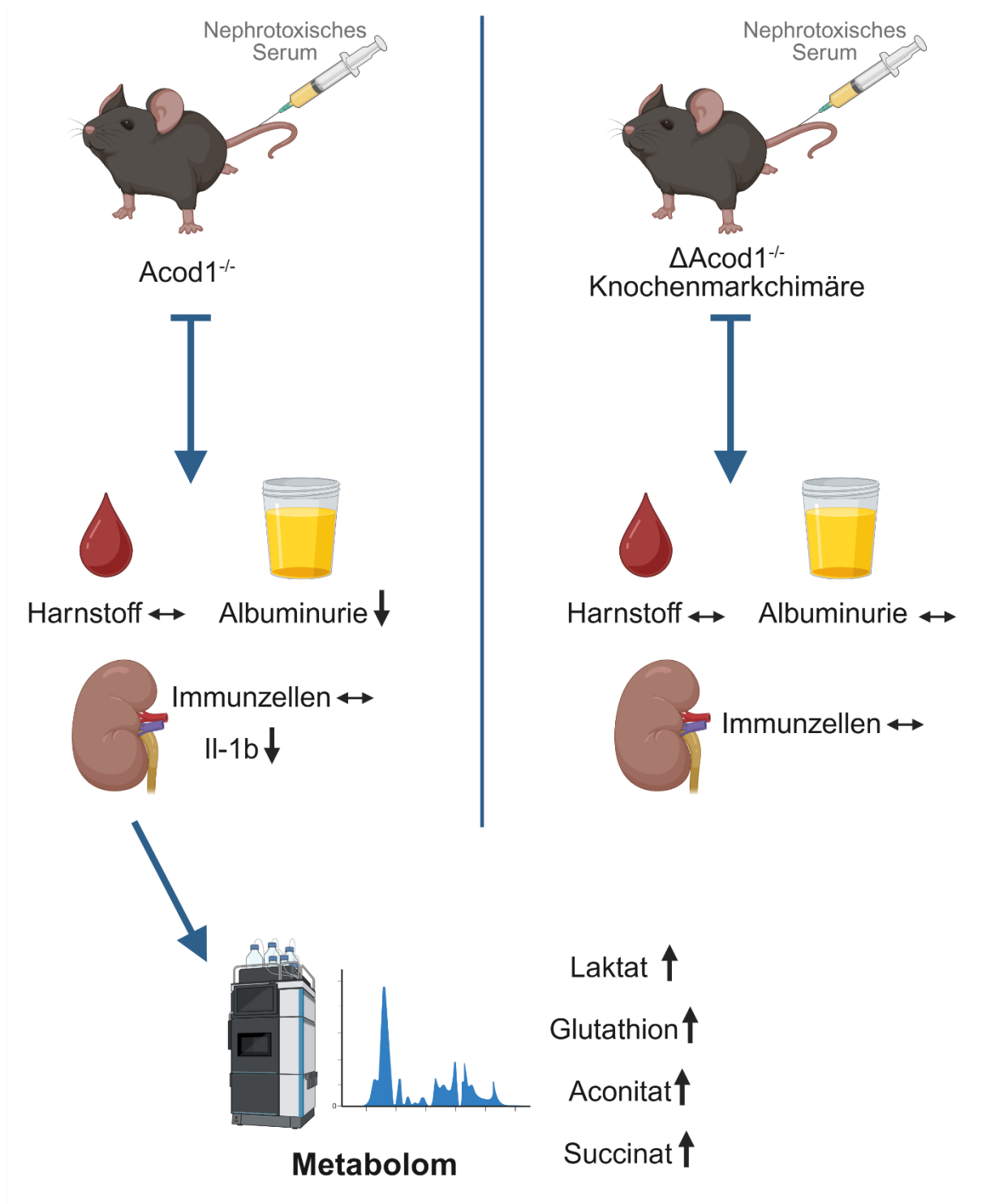


Abbildung 1: Visuelle Projektzusammenfassung

Schematische Darstellung der zentralen Befunde dieser Arbeit. Gegenüberstellung von *Acod1*-Knockout und *Acod1*-Knochenmarkchimären nach Induktion der experimentellen GN. Eine Reduktion der Albuminurie war nur im Ganzkörper-Knockout zu beobachten. Veränderungen im Metabolom aus Nierenkortex von *Acod1*^{-/-}-Tieren mit experimenteller GN. *Abbildung erstellt in <https://BioRender.com>.*

2. Einleitung

2.1 Glomerulonephritis - Stand der Forschung

2.1.1. Die glomeruläre Filtrationsbarriere - Aufbau und Funktion

Die Nieren übernehmen zentrale Aufgaben in der Homöostase des menschlichen Körpers. Zu ihren Hauptfunktionen zählen die Ausscheidung harnpflichtiger Substanzen, die Regulation des Wasser- und Elektrolythaushalts sowie die Kontrolle des Säure-Basen-Gleichgewichts. Darüber hinaus sind sie an der Blutdruckregulation und Erythropoese beteiligt¹. Anatomisch bestehen die Nieren aus etwa einer Million funktioneller Untereinheiten, den Nephronen, die jeweils aus einem Glomerulus und einem Tubulussystem bestehen.

Der Glomerulus bildet zusammen mit der Bowman-Kapsel die Filtrationseinheit der Niere. Die glomeruläre Filtrationsbarriere stellt dabei eine hochspezialisierte Struktur dar, die den Primärharn aus dem Blutplasma generiert, während größere Plasmaproteine und Blutzellen zurückgehalten werden. Sie ist essenziell für die selektive Ultrafiltration und damit für die Aufrechterhaltung der inneren Milieubedingungen. Die glomeruläre Filtrationsbarriere besteht aus drei funktionell und morphologisch klar differenzierbaren Schichten: dem fenestrierten Endothel der glomerulären Kapillaren, der glomerulären Basalmembran (GBM) und den Podozyten mit ihren Schlitzmembranen².

Das kapilläre Endothel ist fenestriert und weist Poren mit einem Durchmesser von etwa 70 bis 100 nm auf. Diese Poren ermöglichen den Durchtritt von Wasser und kleinen Molekülen, wirken jedoch als erste Barriere für größere Partikel wie zelluläre Bestandteile oder Makromoleküle³. Die darunterliegende glomeruläre Basalmembran stellt die zentrale strukturelle und funktionelle Barriere der Filtrationsstruktur dar. Sie ist etwa 300 bis 350 nm dick und setzt sich überwiegend aus Typ-IV-Kollagen, Laminin, Nidogen und Heparansulfat-Proteoglykanen zusammen. Ihre negativ geladene Matrix spielt eine entscheidende Rolle in der elektrostatischen Abstoßung negativ geladener Plasmaproteine wie Albumin⁴. Mutationen oder Schädigungen an Komponenten der GBM können zu Proteinurie und glomerulären Erkrankungen wie dem Alport-Syndrom führen⁵.

Die äußerste Schicht der Filtrationsbarriere wird durch Podozyten gebildet, die viszerale Schicht der Bowman-Kapsel. Diese hochdifferenzierten Epithelzellen verfügen über verzweigte Fortsätze, die sich interdigitierend um die Kapillaren legen und sogenannte Filtrationsschlitze (Schlitzmembranen) zwischen den sekundären Fußfortsätzen bilden. Die Schlitzmembran enthält essenzielle Proteine wie Nephrin und Podocin, welche die

mechanische Stabilität und Filtrationsselektivität sichern⁶. Störungen in der Expression oder Funktion dieser Proteine führen häufig zu einer gestörten Filtrationsleistung und sind mit nephrotischen Syndromen assoziiert⁷.

Zusammengefasst ermöglicht die glomeruläre Filtrationsbarriere eine präzise Selektion der filtrierten Substanzen anhand von Größe, Form und elektrischer Ladung. Die Integrität aller drei Schichten ist für die Aufrechterhaltung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) sowie der Filtrationsselektivität unerlässlich. Eine Dysfunktion einzelner Komponenten kann zu Proteinurie, eingeschränkter Nierenfunktion und langfristig zur Entwicklung chronischer Nierenerkrankungen führen⁸.

2.1.2. Glomerulonephritiden – Epidemiologie und klinische Bedeutung

Entzündliche Prozesse sind fundamentale Reaktionen des Immunsystems auf schädigende Reize wie Infektionen, toxische Substanzen oder autoimmunologische Auslöser. Dabei kommt es zur Aktivierung verschiedener Immunzelltypen, zur Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und zur Rekrutierung von Entzündungszellen in das betroffene Gewebe. Ziel ist eigentlich die Wiederherstellung der Gewebshomöostase und die Reparatur von Schäden, allerdings können überschießende oder chronische Entzündungen auch Gewebeschäden verursachen und chronische Erkrankungen auslösen⁹.

Im Kontext der Niere gehören Glomerulonephritiden (GN) zu den bedeutendsten entzündlichen Erkrankungen. Sie umfassen eine heterogene Gruppe immunvermittelter Entzündungen im Bereich der glomerulären Filtrationsbarriere. In Deutschland sind GN für etwa 20–25 % der Fälle terminaler Niereninsuffizienz verantwortlich. Klassifiziert werden GN in primär renale und sekundäre Formen. Primäre GN treten isoliert in der Niere auf, während sekundäre GN im Rahmen systemischer Autoimmunerkrankungen oder Infektionen entstehen. Zu den häufigsten primären GN zählen IgA-Nephropathie, Membranöse GN, Minimal-change disease (MCD) und die primäre Fokal-segmentale Glomerulosklerose (FSGS). Sekundäre GN können u.a. im Rahmen des Systemischen Lupus Erythematoses, von ANCA-assoziierte Vaskulitiden und der Anti-GBM-Erkrankung (Goodpasture-Syndrom) vorkommen. Auch die sekundäre Form der FSGS kann durch Systemerkrankungen wie Virushepatitiden oder Diabetes Mellitus auftreten¹⁰.

Die Inzidenzen variieren zwischen unterschiedlichen Entitäten erheblich: IgA-Nephropathie tritt mit etwa 2,5 /100.000 Einwohner und Jahr in Europa am häufigsten auf¹¹, membranöse GN bei etwa 2-17 /Millionen Einwohner und Jahr¹², ANCA-assoziierte Vaskulitiden bei rund

13-20 /Millionen Einwohner und Jahr¹³. Die Prognose hängt ebenfalls stark von der GN-Entität ab: Bei der FSGS entwickeln je nach Subtyp bis zu 40-60 % der Patienten innerhalb von zehn Jahren eine terminale Niereninsuffizienz¹⁴, während ein solcher Progress in MCD-Fällen selten ist¹⁵.

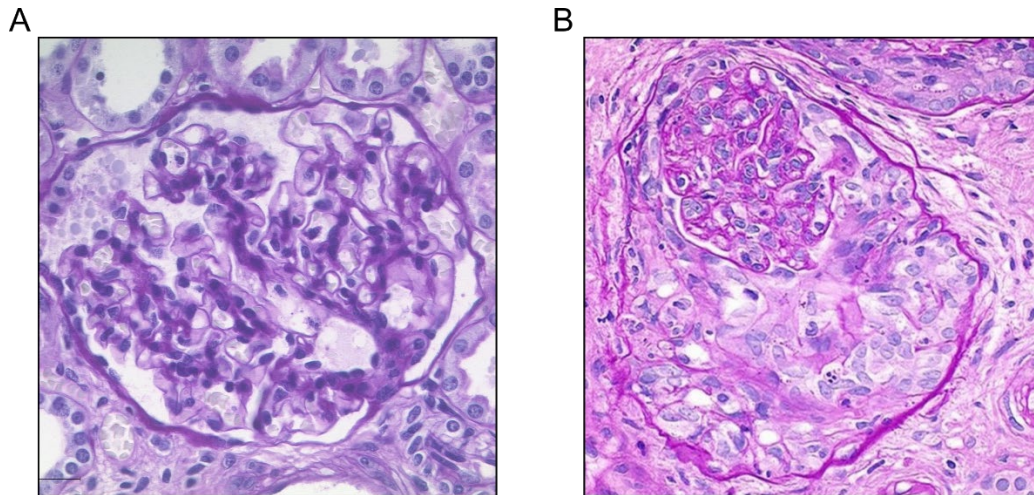


Abbildung 2: Histologische Aspekte der Glomerulonephritis

PAS-Färbungen (40x) humaner Nierenbiopsie-Präparate mit repräsentativen Darstellungen von Glomeruli im gesunden Zustand (A) und mit halbmondförmigem Zellproliferat bei RPGN (B). In A typisches Bild eines regelrecht aufgebauten Nierenkörperchens mit zarter glomerulärer Basalmembran, normozellulärem Mesangium, offenen Kapillarlichtungen und ohne Auffälligkeiten im Bereich der Bowman-Kapsel. In B eingefallene glomeruläre Struktur umgeben von halbmondförmigem zellulär-bindegewebigem Proliferat innerhalb der Bowman-Kapsel.

Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Frau Dr. Heike Göbel (Institut für Allgemeine Pathologie der Uniklinik Köln).

2.1.3. Aktuelle Therapiestrategien und ihre Limitationen

Die Behandlung entzündlicher Erkrankungen basiert traditionell auf der Unterdrückung des Immunsystems mittels breiter Immunsuppression mit entsprechenden unerwünschten Arzneimittelwirkungen (UAW) und begrenzter Effektivität. Neuere Therapiestrategien zielen jedoch zunehmend auf spezifische Signalwege und zelluläre Mechanismen ab. Dazu zählen Biologika wie TNF- oder IL-6-Inhibitoren, Small Molecules mit Wirkung auf Januskinasen (JAK) oder mTOR sowie Ansätze der Zelltherapie und Immunmodulation. Diese Entwicklungen eröffnen insbesondere bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis oder Morbus Crohn neue Perspektiven^{16,17}.

Im Gegensatz dazu sind die Therapieoptionen bei GN bislang limitiert. Die Behandlung von GN basiert auf der histologischen Entität, dem klinischen Erscheinungsbild und dem Schweregrad der Erkrankung. Laut Leitlinie der Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO), an der sich die Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie orientiert, stellen Glukokortikoide in hoher Dosierung (z. B. 1 mg/kg KG Prednisolonäquivalent) die Initialtherapie bei vielen primären GN dar¹⁸. Je nach Subtyp erfolgt eine Kombination mit weiteren Immunsuppressiva. Neben dem Zytostatikum Cyclophosphamid etablierten sich in den vergangenen Jahren mehrere zielgerichtete Therapien. Beispielsweise wird der B-Zell-depletierende anti-CD20-Antikörper Rituximab eingesetzt, um die Bildung von Autoantikörpern zu reduzieren. Im Falle der ANCA-assoziierten GN wird die Induktionstherapie um Cyclophosphamid oder Rituximab erweitert, wobei sich zwischen beiden Alternativen kein ausgeprägter Unterschied hinsichtlich Remissions- und Nebenwirkungsraten zeigen ließ¹⁹. Zur spezifischen Hemmung des Komplementsystems konnten sich auch in der Nephrologie neue Medikamente etablieren. So wird der C5a-Rezeptor-Inhibitor Avacopan nach den Ergebnissen der ADCOVATE-Studie bereits ab dem Zeitpunkt der Induktion als Alternative zu Prednisolon eingesetzt²⁰. Der anti-BAFF-Antikörper Belimumab zur Hemmung der B-Zell-Aktivität konnte in einer klinischen Studie zu Patienten mit Lupus-Nephritis eine Verbesserung des renalen Outcomes erzielen, allerdings zeigt sich an diesem Beispiel, dass die Effektivität der Behandlung trotz verbesserter Therapie-Regimes weiterhin begrenzt ist²¹.

Trotz intensiver therapeutischer Maßnahmen zeigen Patienten mit rasch progredientem GN-Verlauf renale 5-Jahres-Überlebensraten zwischen ca. 17-70 %²². Hinzu kommen erhebliche unerwünschte Wirkungen der Therapie: unter hochdosierter und prolongierter Glukokortikoidtherapie entwickelt eine Vielzahl von Patienten relevante UAW, darunter Hyperglykämie, Steroid-induzierter Diabetes mellitus, Osteoporose, Katarakte oder Infektanfälligkeit²³. Diese nicht-spezifische Immunsuppression geht häufig mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität einher. Es besteht daher ein hoher Bedarf an innovativen, zielgerichteten Therapien, die spezifische Pathomechanismen der GN adressieren.

2.1.4. Molekulare und zelluläre Pathomechanismen glomerulärer Entzündungen

Die Pathogenese glomerulärer Entzündungen ist durch komplexe Wechselwirkungen zwischen Immunzellen, Zytokinen und glomerulären Strukturzellen gekennzeichnet. Zentrale Elemente sind eine gestörte Immuntoleranz sowie die Aktivierung sowohl des angeborenen als auch des adaptiven Immunsystems²⁴. Der Beginn glomerulärer Entzündungen ist durch unterschiedliche pathophysiologische Mechanismen geprägt. Bei der membranösen GN sind Autoantikörper gegen podozytäre Antigene ursächlich. Bei der seltenen und aggressiven Anti-

GBM-Nephritis richten sich Autoantikörper gegen die glomeruläre Basalmembran. In der IgA-Nephropathie spielen aberrant glykosylierte IgA1-Moleküle und deren Immunkomplexe eine zentrale Rolle. Lupusnephritis und postinfektiöse GN zeichnen sich durch extrakapilläre Immunkomplexablagerungen aus, die über Fc-Rezeptoren und das Komplementsystem Entzündungsreaktionen vermitteln. Bei ANCA-assoziierten Vaskulitiden kommt es zur Autoantikörper-induzierten Aktivierung neutrophiler Granulozyten, die kapilläre Endothelien zerstören. Trotz dieser Unterschiede zeigen viele GN-Formen gemeinsame Merkmale: Komplementaktivierung (klassischer oder alternativer Weg), Zytokinfreisetzung und Zellinfiltration²⁵⁻²⁷.

Ein gemeinsames pathohistologisches Endstadium vieler GN-Formen ist die extrakapilläre Proliferation mit Halbmondbildung (*crescents*), wie sie bei der rasch progredienten Glomerulonephritis (RPGN) beobachtet wird. Hierbei kommt es zu einer raschen Zerstörung der glomerulären Struktur mit Einschluss von Fibrin, Makrophagen und proliferierenden parietalen Epithelzellen im Bowman-Raum. RPGN ist klinisch durch ein akutes nephritisches Syndrom mit Nierenfunktionsverschlechterung gekennzeichnet²⁸.

Ein etabliertes Tiermodell zur Untersuchung dieser Pathomechanismen ist die NTN. Das Modell wird durch die Injektion anti-glomerulärer Antikörper induziert, welche aus dem Serum eines Schafes stammen, das zuvor mit isolierten Glomeruli immunisiert wurde. Hierdurch wird bei den Versuchstieren eine Immunkomplex-vermittelte GN ausgelöst, welche über die Bindung der Antikörper an die GBM zu einem akut entzündlichen Schaden führt²⁹. Die NTN hat sich als zentrales experimentelles System zur Erforschung immunkomplexvermittelter GN etabliert. Seine wissenschaftliche Grundlage geht auf die bahnbrechenden Arbeiten der 1960er Jahre zurück, die erstmals die Induktion glomerulärer Schäden durch heterologe Antikörper gegen die GBM beschrieben³⁰. In den folgenden Jahrzehnten wurde das Modell systematisch weiterentwickelt und standardisiert, wobei insbesondere die Charakterisierung der immunologischen Abläufe an Wichtigkeit gewann. So konnte gezeigt werden, dass nach einer heterologen Immunantwort als Reaktion auf einen direkten Zellschaden eine autologe Phase der Immunantwort folgt, die durch eine Reaktion des adaptiven Immunsystems auf Fremdartigene gekennzeichnet ist³¹.

2.1.5. Itaconat als neuer therapeutischer Ansatzpunkt

Der Immunmetabolismus beschreibt die gezielte Reprogrammierung zellulärer Stoffwechselwege in Immunzellen, die für deren Aktivierung, Differenzierung und Funktion entscheidend ist³². Beispiele für therapeutisch relevante Zielstrukturen sind mTOR (in T-

Zellen), HIF1 α (in inflammatorischen Makrophagen), sowie Glykolyse-assoziierte Enzyme (z. B. Hexokinase). In Tiermodellen zu viralen Infektionen³³, Autoimmun-Kolitis³⁴, Sepsis³⁵ oder chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen³⁶ konnte durch Manipulation von metabolischen Signalwegen eine Modulation der Immunantwort mit therapeutischem Erfolg erzielt werden.

Ein Metabolit, der in den vergangenen Jahren vermehrte Aufmerksamkeit für seine immunmodulatorische Funktion erhalten hat, ist Itaconat. Das Gen *Acod1*, auch bekannt als Immune-Responsive Gene 1 (*Irg1*), kodiert für das mitochondriale Enzym Aconitat-Decarboxylase 1 (ACOD1), das erstmals in den 1990er Jahren als hochreguliertes Gen in Makrophagen unter entzündlichen Bedingungen identifiziert wurde³⁷. ACOD1 katalysiert die Umwandlung von cis-Aconitat, einem intermediären Metaboliten des Tricarbonsäurezyklus, zu Itaconat - ein Prozess, der als immunmetabolischer Schalter fungiert³⁸.

Die Nomenklatur des Gens hat sich im Laufe der Zeit gewandelt: Während die Bezeichnung *Irg1* seine Induktion durch immunologische Stimuli betont, reflektiert der systematische Name *Acod1* seine biochemische Funktion als Decarboxylase. Strukturell gehört das kodierte Enzym zur Familie der Fe(II)-abhängigen Decarboxylasen und weist eine charakteristische dreidomänige Architektur auf, die für die Bindung des Eisen-Cofaktors und des Substrats essenziell ist³⁹.

Die Entdeckung von Itaconat als immunregulatorischer Metabolit markierte einen Paradigmenwechsel im Verständnis der Verbindung zwischen Stoffwechsel und Immunantwort⁴⁰. Neben seiner bekannten Funktion als antimikrobieller Faktor durch Hemmung der bakteriellen Isocitratlyase⁴¹ wirkt Itaconat als endogener Immunmodulator³⁸. Von Itaconat selbst konnte gezeigt werden, dass es hemmenden Einfluss auf eine Mehrzahl von pro-inflammatorisch wirksamen Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B hat. Über die Hemmung der Succinatdehydrogenase inhibiert es zudem dessen pro-inflammatorische Wirkung über den Transkriptionsfaktor HIF-1 α ^{42,43}.

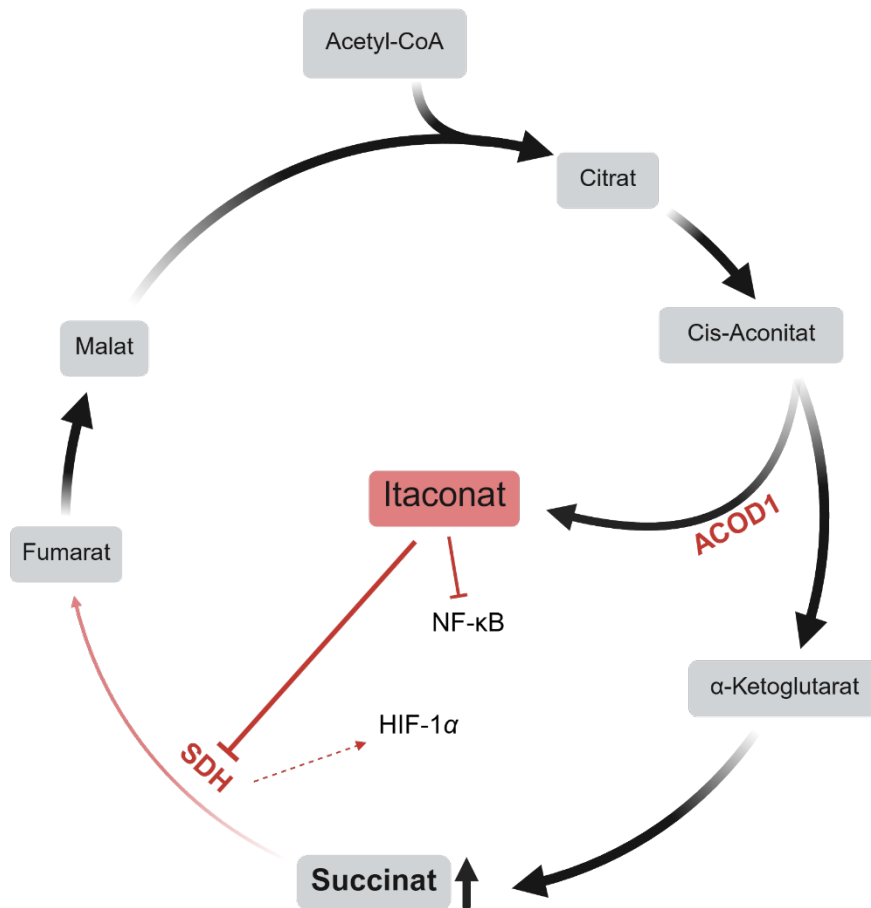


Abbildung 3: Itaconat als immunregulatorischer Metabolit.

Schematische Darstellung des Citratzyklus und der regulatorischen Einflüsse durch ACOD1/Itaconat, angepasst nach Lampropoulou 2016 und Pålsson-McDermott 2025. Im Falle einer Aktivierung von ACOD1 kommt es zur Umwandlung von cis-Aconitat in Itaconat, welches neben Hemmung von NF-κB und anderer Transkriptionsfaktoren inhibierend auf die Succinatdehydrogenase (SDH) wirkt. Dies führt neben Akkumulation von Succinat auch zur Abschwächung der pro-inflammatorischen Wirkung über HIF-1α.

Abbildung erstellt in <https://BioRender.com>.

Es ist bereits bekannt, dass eine Behandlung mit Dimethylitaconat (DI), eine membrangängige Form von Itaconat, in einem Ischämie-Reperusionsmodell an *Acod1*-Knockout Mäusen die Infarktgröße im Myokard verkleinern kann⁴². Auch in in vivo Experimenten zur Infektion von Mäusen mit *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) konnte gezeigt werden, dass *Acod1* neben dem bakteriostatischen Effekt von Itaconat auf Mtb⁴⁴ auch protektiven Einfluss auf den Krankheitsverlauf via Regulierung der Neutrophilenrekrutierung nimmt⁴⁵. In in vivo Modellen zu Sepsis zeigte sich Itaconat als ein zentraler Metabolit zur Limitierung von Entzündungen und Modulator des Interferon-Signalings. Zudem wurde gezeigt, dass Typ I Interferone die Expression von *Acod1* steigern. Über einen negativen Rückkopplungsmechanismus limitiert

Itaconat wiederum die Typ I Interferonantwort. 4-octyl Itaconat - ein neues zellpermeables Derivat von Itaconat - stellte sich in diesem Zuge im Mausmodell als protektiv gegen LPS-induzierte Sterblichkeit heraus⁴⁶.

2.2 Fragestellungen und Ziel der Arbeit

Die Behandlung von Glomerulonephritiden stellt die Medizin vor eine Reihe von Herausforderungen. Das Ziel der Therapie ist der Erhalt der Nierenfunktion unter Vermeidung von Nebenwirkungen. Etablierte Therapien setzen bislang auf eine breite Immunsuppression unter Inkaufnahme teils schwerwiegender Nebenwirkungen und zeigen dabei eine begrenzte Effektivität. Hieraus resultiert ein Bedarf an Therapieansätzen, die gezielt zugrundeliegende pathophysiologische Mechanismen der glomerulären Entzündung im Sinne einer Präzisionstherapie modulieren. Itaconat hat sich in den vergangenen Jahren bei verschiedenen entzündlichen Tiermodellen als immunmetabolischer Regulator etabliert. Die zentrale Hypothese dieser Arbeit ist, dass Itaconat auch in der experimentellen Glomerulonephritis eine Stellgröße der immunologischen Aktivität darstellt und sich damit als Ziel für neue therapeutische Ansätze herausstellen kann. Folgende Fragen sollen bei der Prüfung dieser Hypothese beantwortet werden:

1. Lässt sich die komplette *Acod1*-Defizienz in der *Acod1*^{-/-}-Mauslinie bestätigen?

Um in den nachfolgenden Experimenten den Einfluss von *Acod1* zu untersuchen, werden Tiere einer *Acod1*-defizienten Mauslinie verwendet. Der Nachweis des Ganzkörper-Knockouts soll mittels transkriptioneller Untersuchung erfolgen. Die Quantifizierung von *Acod1*-RNA in Gewebe von Wildtyp- und *Acod1*^{-/-}-Tieren soll Aufschluss über die Validität der verwendeten Mauslinie geben. Nach Genotypisierung der Tiere mittels PCR erfolgt die Isolierung von RNA aus Lebergewebe von beiden Versuchsgruppen. Mittels qPCR wird im Anschluss die relative Expression von *Acod1* quantifiziert.

2. Hat ACOD1 unter physiologischen Bedingungen eine Bedeutung für die Homöostase der Niere?

Vor der Durchführung von NTN-Experimenten muss grundlegend geklärt werden, ob *Acod1*^{-/-}-Mäuse bereits unter physiologischen Bedingungen, also ohne Induktion einer Nierenerkrankung, einen veränderten renalen Phänotyp aufweisen. Diese Fragestellung ergibt sich aus mehreren Überlegungen: Einerseits ist bekannt, dass die Niere unter Basalbedingungen ein komplexes Immunzellnetzwerk beherbergt, das zur Gewebshomöostase beiträgt⁴⁷. Da Itaconat als immunmodulatorischer Metabolit beschrieben wurde, kann vermutet werden, dass dessen Fehlen zu diskreten Veränderungen in der

Zusammensetzung oder Funktion dieser residenten Immunzellpopulationen führen könnte. Andererseits muss ausgeschlossen werden, dass *Acod1*^{-/-}-Mäuse bereits basale strukturelle oder funktionelle Nierenveränderungen aufweisen, die die Interpretation späterer Experimente im Krankheitsmodell verfälschen könnten. Zu diesem Zweck werden beide Versuchsgruppen unter basalen Bedingungen umfassend charakterisiert, wobei besonderes Augenmerk auf die Proteinurie als sensitivsten Marker glomerulärer Schädigung, die Serumharnstoffkonzentration als Maß der Nierenfunktion sowie die histologische Integrität des Nierengewebes gelegt wird. Parallel erfolgt eine detaillierte Analyse der renalen Immunzellpopulationen.

3. Beeinflusst ACOD1 die Krankheitsschwere im Mausmodell der RPGN?

Basierend auf den bekannten immunmodulatorischen Eigenschaften von Itaconat in anderen Entzündungsmodellen wird die Hypothese aufgestellt, dass der Verlust von *Acod1* auch den Verlauf der experimentellen GN signifikant beeinflusst. Konkret vermuten wir, dass die bekannte entzündungslimitierende Wirkung von Itaconat zu einem schwereren Krankheitsverlauf in *Acod1*^{-/-}-Mäusen führt. Diese Hypothese soll durch eine Kombination funktioneller Parameter wie Proteinurie und Serumharnstoff sowie durch die Quantifizierung der histologischen Schädigung nach Induktion der NTN überprüft werden.

4. Welchen Effekt hat eine ACOD1-Defizienz auf die Aktivierung von Immunzellen?

Besonderes Interesse gilt bei der Charakterisierung des Krankheitsverlaufs den Veränderungen renaler Immunzellpopulationen. Vorangegangene Studien in anderen Organen zeigen, dass Itaconat insbesondere die Rekrutierung und Aktivierung von myeloischen Zellen beeinflusst. Die detaillierte Analyse der quantitativen Immunzellzusammensetzung während der experimentellen GN soll Aufschluss darüber geben, ob bestimmte Zellpopulationen besonders sensitiv auf den Verlust von ACOD1 reagieren. Die Quantifizierung ausgewählter Zytokine auf transkriptioneller Ebene sowie die Untersuchung der adaptiven Immunreaktion im Sinne einer Antikörper-vermittelten Antwort sollen die Charakterisierung des immunologischen Milieus der Niere vertiefen.

5. Hat ACOD1 Effekte außerhalb des Immunsystems?

Die vorangegangenen Experimente verwenden einen Ganzkörper-Knockout von *Acod1*. Das Ziel in diesem Teil der Arbeit ist die Klärung der Frage, ob die zuvor beobachteten Effekte primär auf hämatopoetische Zellen (Immunzellen) oder auf nicht-hämatopoetische Körperzellen (z.B. Podozyten, tubuläre Epithelzellen) zurückzuführen sind. Der Transfer von *Acod1*^{-/-}-Knochenmark in knochenmarkdepletierte Wildtyp-Empfängertiere soll diese Differenzierung ermöglichen. Nach Knochenmarkrekonstitution werden auch diese Tiere der

NTN ausgesetzt und hinsichtlich ihrer Nierenfunktion und der immunologischen Zusammensetzung der Niere charakterisiert.

6. Wie ändert sich der renale Metabolismus während der GN und wie wirkt sich ACOD1 auf diese Veränderungen aus?

Itaconat erlangte Bekanntheit über die Funktion als Enzym des Citratzyklus und daraus folgende immunologische Auswirkungen in verschiedenen Organen und Zelltypen. Bislang ist nicht untersucht, welchen metabolischen Einfluss *Acod1* auf renales Gewebe hat. Um ein Verständnis für diese Einflüsse zu bekommen, soll ein Metabolom des Nierenkortex untersucht werden. Die Einflüsse der NTN und der Einfluss einer *Acod1*-Defizienz sollen das Verständnis für die metabolischen Veränderungen während renaler Inflammation erweitern und die Funktion von *Acod1* in diesem Kontext aufklären.

Durch die Beantwortung dieser Forschungsfragen wollen wir die Funktion von ACOD1 in der Gewebshomöostase und bei entzündlichen Nierenerkrankungen entschlüsseln, um so den Grundstein für eine metabolische Therapie autoinflammatorischer Nierenerkrankungen zu legen.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Chemikalien

Chemikalie	Hersteller/Vertrieb	Katalognummer
2-Propanol (Isopropanol)	CARL ROTH	6752.4
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) Tabletten	Merck	T5525
Agarose	Merck	A9539
Albumin aus Mausserum	Merck	A3139
Albumin aus Rinderserum	Merck	A7030
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Merck	213330
CountBright™ Absolute Counting Beads	Thermo Fisher Scientific	C36950
Creatinine (urinary) Colorimetric Assay Kit	Cayman Chemical	500701
Disruption Beads for Tissue, 1.0mm	Research Products International	50-212-144
DNAse I	Roche	10104159001
Ethanol 99,8 % vergällt	AppliChem	1471941214
Ethidiumbromid Lsg 1 %	CARL ROTH	2218.2
Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz-Dihydrat (EDTA)	Thermo Fisher Scientific	33312.36
Fetal bovine serum (FBS)	PAN Biotech	P30-2102
Heparin 500 I.U. Amp. 5ml	Burg Pharma GmbH	114598
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Thermo Fisher Scientific	4374967
Histomount Mounting Solution	Thermo Fisher Scientific	8030
Kaliumbicarbonat KHCO ₃	Merck	237205
Kaliumchlorid (KCl)	CARL ROTH	6781.1
Ketamin 100 mg/2 mL	Panpharma GmbH	113554
KH ₂ PO ₄ (Kaliumdihydrogenat)	CARL ROTH	3904.2
Kollagenase B	Roche	11088807001
Mayer's Hämatoxylin-Lösung	AppliChem	254766
Natriumazetat	CARL ROTH	X891.1
Natriumcarbonat Decahydrat (Na ₂ CO ₃ 10x H ₂ O)	Merck	71360
Natriumchlorid (NaCl)	Merck	S5886
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	CARL ROTH	8551.1
Natriumphosphat Heptahydrat (Na ₂ HPO ₄ 7xH ₂ O)	Merck	S9390
Nephrotoxisches Serum (NTS)	ProbeTex	PTX-001
Paraformaldehyd	Thermo Fisher Scientific	J19943.K2
Perjodsäure	CARL ROTH	3257,1

Phenol/Guanidin-Thiocyanat (TRI Reagent™)	Thermo Fisher Scientific	AM9738
Qubit™ RNA HS Assay Kit	Thermo Fisher Scientific	Q32852
REDTaq® ReadyMix™ PCR-Reaktionsmischung	Merck	R2523
RPMI 1640 Medium	Thermo Fisher Scientific	11875093
Salzsäure (HCl) 37 %ig	CARL ROTH	9787.1
Schiffs-Reagenz	Merck	109033
Sulfuric acid 99.999% H ₂ SO ₄	Merck	339741
TaqMan Genexpressions- Assay Mm00434228_m1 (Il1b)	Thermo Fisher Scientific	4453320
TaqMan Genexpressions- Assay Mm00439618_m1 (Il17a)	Thermo Fisher Scientific	4453320
TaqMan Genexpressions- Assay Mm00441242_m1 (Ccl2)	Thermo Fisher Scientific	4453320
TaqMan Genexpressions- Assay Mm01224532_m1 (<i>Acod1</i>)	Thermo Fisher Scientific	4331182
TaqMan Genexpressions- Assay Mm02619580_g1 (<i>Actb</i>)	Thermo Fisher Scientific	4453320
TaqMan™ Schneller Advanced Master-Mix	Thermo Fisher Scientific	4444556
TRIS ultapure	Life Technologies GmbH	15504020
TRIZMA Base	Merck	T1503
Trizma® Hydrochlorid	Merck	857645
True-Nuclear™ Transcription Factor Buffer Set	BioLegend	442401
Tween/Polysorbat 20 (Tween20)	Caesar&Lorentz	3472
UltraPure™, DNase/RNase- freies destilliertes Wasser	Thermo Fisher Scientific	10977035
Urea Nitrogen (BUN) Colorimetric Detection Kit	Thermo Fisher Scientific	EIABUN
Wasserstoffperoxid 30 % ROTIPURAN®	CARL ROTH	8070.2
Xylazinhydrochlorid (Rompun) 2%	Serumwerk Bernburg AG	116565
Xylol >98 %	Th. Geyer	11646713

3.1.2. Antikörper

Antigen	Konjugation	Hersteller	Katalognummer	Chargen-Nr.	Klon
CD45	FITC	BioLegend	103108	B228450	30-F11

F4/80	PE	BioLegend	123109	B281020	BM8
CD11b	PerCP/Cy5.5	BioLegend	101227	B223926	M1/70
Ly-6C	APC	BioLegend	128015	B293691	HK1.4
Ly-6G	BV510	BioLegend	127633	B307304	1A8
CD19	PerCP/Cy5.5	BD	561113	9128523	1D3
CD4	APC/Fire 750	BioLegend	100567	B293092	RM4-5
CD8a	PE/Cy7	BioLegend	100721	B282417	53-6.7
TCR β	BV421	BioLegend	109230	B227293	H57-597
TCR γ/δ	APC	BioLegend	118115	B265970	GL3
NK 1.1	PE	BioLegend	108707	B296415	PK136
CD25	APC	BD	561048	8247612	PC61
FOXP3	FITC	Invitrogen	11-5773-82	2007700	FJK-16s
ROR γ t	PE	BD	562607	7201863	Q31-378
CD45.1	APC	BioLegend	110713	B294034	A20
CD16/CD32	-	BD	553142	9060742	2.4G2
Mouse Albumin	HRP	Bethyl	A90-134P	39	Polyklonal

3.1.3. Primer

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	Konzentration
Acod1_COM_FWD	GTGGGGAGGGGAAGTATGAG	100 pmol/ μ l
Acod1_MUT_REV	CAGCCTCTAAGCCAGACAGC	100 pmol/ μ l
Acod1_WT_REV	ATTTGGAGGAACCCCATGAC	100 pmol/ μ l

3.1.4. Lösungen und Puffer

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) (20 x)

- 841,6 g NaCl
- 21,2 g KCl
- 120,8 g Na₂HPO₄ 7xH₂O
- 21,2 g KH₂PO₄
- → ad 5 L ddH₂O

FACS-Puffer

- 2,5 g BSA
- 372 mg EDTA
- 500 mL 1 x PBS

Ammoniumchlorid-Kalium-Lysepuffer (ACK) (10 x)

- 43 g NH₄Cl

- 5 g KHCO_3
- 0,186 g EDTA
- ad 500 mL ddH₂O

Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Acetat-Ethylendiamintetraessigsäure (TAE) Puffer

- 10 mL 1 M Tris-HCl pH8
 - 121 g TRIS + 46 mL HCl 37 %ig ad 1000 mL H₂O
- 2 mL 0,5 M EDTA
 - 93 g EDTA ad 500 mL H₂O
- ad 1000 mL H₂O

ELISA-Stopp-Lösung

- 8,82 g H₂SO₄
- ad 500 mL H₂O

3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) Lösung

- 1 Tbl. TMB in 220 µL DMSO
- 10,8 mL H₂O
- 180 µL 3 M Natriumazetat
- 5 µL H₂O₂ 30 %ig

ELISA-Beschichtungs-Puffer pH 9,6

- 16 mL Lösung A (0,2 M Na₂CO₃)
 - 28,61 g Na₂CO₃ 10x H₂O ad 500 mL H₂O
- 34 mL Lösung B (0,2 M NaHCO₃)
 - 8,4 g NaHCO₃ ad 500 mL H₂O
- ad 500 mL H₂O

10 X ELISA Stammlösung pH 8

- 44,4 g Trizma HCl
- 26,5 g Trizma Base
- 81,8 g NaCl
- ad 1000 ml H₂O

ELISA-Waschlösung

- 100 mL 10 X ELISA Stammlösung

- 500 µl Tween20
- ad 1000 ml H₂O

ELISA-Blockierungs-Lösung

- 20 mL 10 X ELISA Stammlösung
- 0,2 g BSA
- ad 200 ml H₂O

ELISA-Verdünnungslösung

- 20 mL 10 X ELISA Stammlösung
- 0,2 g BSA
- 100 µL Tween20
- ad 200 ml H₂O

3.2. Methoden

3.2.1. Mäuse

In allen Experimenten wurden männliche Mäuse im Alter zwischen acht und 16 Wochen verwendet. Alle Mauslinien wurden auf dem Hintergrund des C57BL/6N Stammes gezüchtet. Die Unterbringung und Zucht aller experimenteller Tiere erfolgte in den Barrieren der Tierhaltung des CECAD Forschungsgebäudes Köln. Die Haltung erfolgte in einzelbelüfteten Käfigsystemen innerhalb von geschlossenen spezifisch pathogenfreien Barrieren, so dass eine Infektion mit opportunistischen Pathogenen auszuschließen war. Alle hier durchgeführten Tierexperimente wurden durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen genehmigt und durch geschultes Personal durchgeführt.

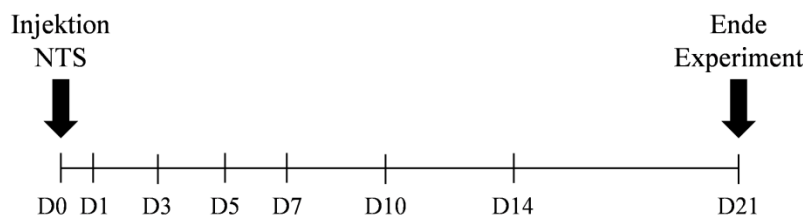
Zur Untersuchung der ACOD1-Defizienz wurden Mäuse der Linie C57BL/6NJ-Acod1em1(IMPC)/J/J verwendet⁴⁸. Diese Linie wurde im Rahmen des Knockout Mouse Phenotyping Program entwickelt. Mittels CRISPR-Technologie konnte eine Deletion von 360 Basenpaaren, welche Exon 4 des *Acod1*-Gens überspannt, erzielt werden. Die Zucht experimenteller Tiere für dieses Projekt erfolgte mittels Verpaarung zweier für die Deletion heterozygoter Elterntiere. Dies resultierte in homozygoter Deletion des *Acod1*-Gens (*Acod1*^{-/-}; 25 %), homozygot wildtypischen (WT; 25%) oder für die Deletion heterozygoten (*Acod1*^{het}; 50 %) Geschwistertieren. Für die Experimente wurden Geschwistertiere mit den Genotypen *Acod1*^{-/-} und WT verwendet.

Als Empfängertiere in Knochenmarktransfer-Experimenten wurden Mäuse der Linie B6.SJL-Ptprca Pepcb/BoyJ verwendet. Diese Linie exprimiert im Gegensatz zu Wildtyp-C57BL/6N Mäusen einen anderen Pan-Leukozytenmarker. Exprimiert wird in diesen Tieren *Ptprc^a* (*CD45.1*) anstelle des ansonsten üblichen *Ptprc^b* (*CD45.2*). Die Herstellung erfolgte 1985 durch die Systematische Rückkreuzung von SJL/J-Mäusen, welche *CD45.1* exprimieren, in den Hintergrund der C57BL/6N Tiere⁴⁹.

Die Tötung zu wissenschaftlichen Zwecken erfolgte in der Regel durch zervikale Dislokation. Falls eine Verwendung von Nieren zur histologischen oder durchflusszytometrischen Aufarbeitung vorgesehen war, erfolgte eine kardiale Perfusion. Hierzu erfolgte eine Narkoseeinleitung mit Ketamin/Xylazin (intraperitoneal (i.p.), gewichtsadaptiert: Ketamin 100 mg/kg KG, Xylazin 20 mg/kg KG; Injektionsvolumen i.p. maximal 0,1 mL/10 g Maus). Es folgte die Eröffnung des Thorax und Kanülierung des rechten Ventrikels zur Entnahme von Blut in eine heparinbenetzte Spritze. Anschließend wurde nach Eröffnung des rechten Ventrikels insgesamt 5 mL 0,9 %ige Natriumchloridlösung linkskardial infundiert, um eine Perfusion des gesamten Körpers zu sichern. Nach der Perfusion folgte die Entnahme der Milz gefolgt von Präparation und Entnahme sowie Entkapseln beider Nieren. Sämtliche Tierversuche erfolgten nach Genehmigung durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen unter dem Aktenzeichen 2017.A244.

3.2.2. Nephrotoxische Nephritis

Das „passive nephrotoxic nephritis model“ (NTN) wird als Modell RPGN mit Halbmondbildung angesehen³⁰. Hierbei erfolgte die i.v.-Injektion eines heterologen Serums (NTS), welches aus Schafen gewonnen wurde, die gegen Ratten-Glomeruli immunisiert wurden. Verwendet wurde das Serum der Firma Probetex (Katalognummer: PTX-001, San Antonio, Texas USA). An Tag -1 und 0 des NTN-Experimentes erfolgte jeweils die Injektion von 10 Mikrolitern NTS pro Gramm Körpergewicht in die Schwanzvene der experimentellen Tiere. Während des anschließenden Beobachtungszeitraums von bis zu 21 Tagen erfolgten regelmäßige Entnahmen von Spontanurin. Das Versuchsende erfolgte durch oben beschriebene Tötung zu wissenschaftlichen Zwecken.



An bezeichneten Tagen Gewinnung von Spontanurin zur Bestimmung der Albumin/ Kreatinin-Ratio zum Monitoring der Proteinurie

3.2.3. Knochenmarktransfer

Zur Generierung von Knochenmarkchimären wurden männliche B6.SJL-Ptprca Pepcb/BoyJ Mäuse im Alter von 6-8 Wochen eingesetzt. Diese Mäuse wurden in einer Biobeam Gammastrahlenquelle (von Gamma-Service Medical GmbH) mit einer Dosis von 11 Gy bestrahlt, um einen myeloablativen Effekt zu erreichen. Die Mäuse befanden sich dabei in für diesen Zweck speziell hergestellten Käfigen (z.B. BB500 oder BB500-01, Gamma-Service Medical GmbH), welche Tiere bei Bestrahlung vor Erblindung schützen.

Die *Acod1*^{-/-}-Spendertiere wurden durch zervikale Dislokation getötet. Anschließend wurden Femur und Tibia entfernt und das Knochenmark mit einer sterilen Spritze und Kanüle ausgespült. Die Knochenmarkzellen wurden in PBS aufgenommen, über einen 40 µm Zellfilter gegeben und in einer Neubauer improved Zählkammer gezählt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 400 x g für 5 min und die Resuspension in sterilem PBS in einer Konzentration von 1×10^7 /mL. 6-8 Stunden nach Bestrahlung der Empfängertiere erhielten diese eine Injektion von 100 µL der oben beschriebenen Zellsuspension.

Zur Kontrolle des Knochenmarkchimärismus erfolgte eine durchflusszytometrische Analyse von Blutzellen zwei bis vier Wochen nach Knochenmarktransfer. Hierzu erfolgte die Punktion der V. temporalis superficialis mit einer Lanzette. Ein Blutstropfen von etwa 20 µL wurde dabei aufgefangen und im Anschluss untersucht. Nach Hinzugabe von 1 mL ACK Lysepuffer und Inkubation für drei Minuten zur Lyse von Erythrozyten folgte das Stoppen der Lyse mittels 3 mL eiskaltem PBS. Es folgte eine Färbung zur durchflusszytometrischen Analyse wie im Methodenteil über Durchflusszytometrie beschrieben. Verwendet wurden Antikörper gegen CD45.1 und CD45.2 auf verschiedenen Kanälen, um die Zusammensetzung der Immunzellen zu untersuchen.

3.2.4. Maus-Genotypisierung

Zur Genotypisierung der gezüchteten Mäuse erfolgte zunächst die Gewinnung genomischer Desoxyribonukleinsäure (DNS) aus Gewebe. Nach Absetzen vom Muttertier erfolgte eine individuelle Markierung jedes Tieres durch Stanzen von Löchern und Kerben in die Ohren der Jungtiere nach fortlaufendem Nummerierungssystem. Dabei gewonnene Ohrbiopsien konnten zur DNS-Gewinnung verwendet werden. Das Gewebe wurde zunächst bei 95 °C für 30 Minuten in 75 µL basischer DNS-Extraktions-Arbeitslösung inkubiert. Nach dem Abkühlen auf 8 °C erfolgte Neutralisation mit 75 µL Neutralisierungs-Arbeitslösung. Die gewonnene DNS-Lösung wurde bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

Zur Genotypisierung der *Acod1*^{-/-}-Linie erfolgte die Amplifikation der DNS im Abschnitt um Exon 4 mittels Polymerasekettenreaktion (PCR). Zur Verwendung kamen hierbei ein gemeinsamer Primer vor der oben beschriebenen Deletion, ein reverser Primer innerhalb der beschriebenen Deletion, dessen Bindung in WT-Tieren eine Amplifikation zur Folge hatte, sowie ein reverser Primer, dessen Bindung im Bereich nach Exon 4 nur nach stattgehabter Deletion in *Acod1*^{-/-}-Tieren zur Amplifikation führen konnte. Eine Deletion von Exon 4 in *Acod1*^{-/-}-Tieren führte zu einem Amplifikationsprodukt, welches 152 Basenpaare größer war.

Zusammensetzung des Reaktionsgemisches:

- 6,25 µL ddH₂O
- 12,5 µL REDTaq® ReadyMix™
- 1,25 µL *Acod1*_COM_FWD Primer im Verhältnis 1:10 mit ddH₂O vorverdünnt
- 1,25 µL *Acod1*_MUT_REV Primer im Verhältnis 1:10 mit ddH₂O vorverdünnt
- 1,25 µL *Acod1*_WT_REV Primer im Verhältnis 1:10 mit ddH₂O vorverdünnt
- 2,5 µL DNS-Lösung

Reaktionsbedingungen:

1. 94 °C 5 min
2. 94 °C 30 s
3. 63 °C 45 s → 0,5 °C Reduktion pro Zyklus
4. 72 °C 90 s
5. 10 Zyklen Schritte 2 – 4
6. 94 °C 30 s
7. 58 °C 45 s
8. 72 °C 90 s
9. 28 Zyklen Schritte 6 – 8
10. 72 °C 3 min

11.8 °C ∞

Die Visualisierung der Reaktionsprodukte erfolgte mittels Gelelektrophorese. Verwendet wurden Gele aus TAE-Puffer mit 2 % Agarose und 0,1 µg/mL. 10 µL des PCR-Produktes wurden neben einem Längenstandard in Taschen des Gels gegeben und eine Elektrophorese wurde in TAE-Puffer mit 120 Volt Spannung durchgeführt, bis eine ausreichende horizontale Auftrennung des Längenstandards erkennbar war. Die entstandenen Banden wurden unter Belichtung mit ultraviolettem Licht in einer Dunkelkammer visualisiert und dokumentiert.

3.2.5. Kreatinin-Assay

Die Bestimmung des Kreatiningehaltes in Urinproben erfolgte mittels kommerziell erhältlichem kolorimetrischem Assay nach Herstellerangaben (Creatinine (urinary) Colorimetric Assay Kit, Cayman Chemical). Der beiliegende Kreatinin-Standard wurde mit Wasser auf die Konzentrationen 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 und 15 mg Kreatinin/dl verdünnt. Urinproben wurden 1:15 mit Wasser verdünnt. Jeweils 15 µL der Standard-Verdünnungen und Urinproben wurden in Duplikaten auf 96-Well Mikropipettierplatten mit flachem Boden pipettiert. Nach Hinzugabe von 150 µL Alkaline Picrate Lösung erfolgte eine 10-minütige Inkubation. Nachfolgend wurde Adsorption im Bereich von 490 nm Licht-Wellenlänge gemessen bevor 5 µL der beiliegenden Säurelösung zu jedem Reaktions-Well gegeben wurde. Nach 20 Minuten Inkubationszeit erfolgte eine zweite Messung der Adsorption im Bereich von 490 nm Licht-Wellenlänge.

Das zugrundeliegende Prinzip beim beschriebenen Assay ist die Reaktion von Kreatinin mit Alkaline Picrate, bei der die Lösung mit zunehmendem Kreatiningehalt eine ausgeprägtere gelb-orange Farbe entwickelt. Die Farbtintensität wird in der ersten Adsorptionsmessung gemessen, bevor die entstandene Farbe durch Ansäuern der Lösung zerstört wird⁵⁰. Die zweite Messung wird im Sinne einer Leer-Messung von den Messwerten des ersten Durchgangs abgezogen, sodass errechnete Werte den Kreatiningehalt der Probe widerspiegeln. Die Messung der Standardproben ermöglicht die lineare Regression des Verhältnisses von Adsorption zu Kreatininkonzentration. Hiermit konnten Kreatininkonzentrationen der gewonnen Urinproben errechnet werden.

3.2.6. Albumin-ELISA

Der Gehalt von Albumin in Urinproben wurde mittels Sandwich-ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) bestimmt. Eine 96-Well Mikropipettierplatte mit flachem Boden wurde mit einem anti-Maus-Albumin Antikörper beschichtet. Dieser wurde 1:5000 in ELISA-Beschichtungs-Puffer verdünnt und bei Raumtemperatur für eine Stunde in der 96-Well Platte inkubiert. Danach erfolgte fünfmaliges Waschen der Platte durch Hinzugabe von 200 µL ELISA-Waschlösung. Über Nacht bei 4 °C erfolgte die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen durch Hinzugabe von 200 µL ELISA-Blockierungs-Lösung. Zur Herstellung der Standardlösungen wurde eine Maus-Albumin-Lösung zunächst mit ELISA-Verdünnungslösung auf eine Konzentration von 625 ng Albumin/mL verdünnt. Es folgten sieben weitere Verdünnungsschritte, bei der die vorherige Verdünnung jeweils mit der gleichen Menge ELISA-Verdünnungslösung (1:2 Verdünnung) versetzt wurde. Für die achte Standardlösung der Reihe ergibt sich demnach eine Konzentration von 4,875 ng Albumin/mL. Urinproben wurden je nach erwarteter Größenordnung der Albuminurie mit einem Verdünnungsfaktor zwischen 500 und 1.000.000 in ELISA-Verdünnungslösung verdünnt. 100 µL der Standardlösungen und Urinproben wurden auf die beschichtete und geblockte Platte in Duplikaten aufgetragen und bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert. Maus-Albumin bindet in dieser Zeit an den anti-Maus-Albumin Antikörper auf der 96-Well Platte. Nach fünfmaligem Waschen erfolgte Hinzugabe eines weiteren anti-Maus-Albumin-Antikörpers in der Verdünnung von 1:10.000, welcher an Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt ist. An den Primärantikörper gebundenes Albumin sorgt je nach Albumin-Konzentration der Probe für unterschiedliche Mengen des Detektionsantikörpers und somit zu unterschiedlichem Vorliegen von HRP in den Reaktions-Wellen. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte fünfmaliges Waschen wie oben beschrieben. Anschließend wurde durch Hinzugabe von 100 µL TMB-Lösung eine Farbreaktion begonnen, bei der TMB-Substrat oxidiert wird und eine blaue Farbe entsteht. Höherer Gehalt an HRP durch höhere Albuminkonzentration beschleunigt diese Reaktion. Durch Ansäuern der Lösung mit 100 µL ELISA-Stopp-Lösung nach 20 Minuten Reaktionszeit wird die Farbreaktion gestoppt und das blaue Reaktionsprodukt wechselt zu einer gelben Farbe. Die Menge an Reaktionsprodukt wird anschließend durch eine Adsorptionsmessung bei 450 nm Licht-Wellenlänge quantifiziert. Die Verwendung von Standardlösungen in bekannter Konzentration erlaubt das in-Beziehung-setzen von Albumin-Konzentration zu Adsorptionsmesswerten. Eine sigmoidale Regression erlaubt anschließend die Berechnung von Albuminkonzentrationen in den gemessenen Urinproben.

3.2.7. Anti-Schaf-IgG-ELISA

Zur Untersuchung von Anti-Schaf-IgG-Antikörpern in Maus-Plasma wurde ein Sandwich-ELISA entworfen, bei dem plattengebundenes Schaf-IgG die im Mausplasma enthaltenen Antikörper bindet und eine Quantifizierung mittels Sekundärantikörper und Farbreaktion erlaubt. Zur Beschichtung einer 96-Well Mikropipettierplatte erfolgte eine Inkubation von Schaf-IgG in einer Konzentration von 100 µg/mL in ELISA-Beschichtungspuffer. Nach Waschen und Blockieren analog zum Albumin-ELISA wurden Plasmaproben aufgetragen. Die Proben wurden 1:25, 1:50, 1:100 und 1:200 in ELISA-Verdünnungslösung verdünnt und in technischen Duplikaten analysiert. Nach einem weiteren Waschschriff erfolgte die Inkubation mit einem HRP-gekoppelten anti-Maus-IgG-Antikörper in der Verdünnung von 1:5.000. Die anschließenden Schritte zur Farbreaktion erfolgten analog zum Albumin-ELISA. Eine Quantifizierung erfolgte durch Adsorptionsmessungen bei 450 nm Licht-Wellenlänge. Analysiert wurde die Adsorption der Proben in Differenz zu einer Kontrolle, welche Wasser anstelle von Plasma enthielt.

3.2.8. Harnstoff-Stickstoff Messung in Plasmaproben

Zur Gewinnung von Heparinplasma erfolgte zunächst die Blutentnahme an Versuchstieren wie oben beschrieben in heparinbenetzte Spritzen. Nach Überführung in Probengefäße erfolgte eine zehnmünütige Zentrifugation bei 3000 x g unter Raumtemperatur zur Abtrennung der zellulären Blutbestandteile an den Boden des Reaktionsgefäßes. Anschließend konnte das Blutplasma bei -80 °C gelagert werden. Die Bestimmung des Harnstoff-Stickstoff-Gehaltes in Heparinplasma erfolgte mittels kommerziell erhältlichem kolorimetrischem Assay (Urea Nitrogen (BUN) Colorimetric Detection Kit, Thermo Fisher Scientific). Zunächst wurde die mitgelieferte Harnstoff-Standard-Lösung mit doppelt destilliertem Wasser in sieben aufsteigenden Konzentrationen zwischen 0,156 und 10 mg/dL verdünnt. Plasmaproben wurden nach dem Auftauen im Verhältnis 1:15 mit doppelt destilliertem Wasser verdünnt. In eine 96-Well Platte wurden pro Well jeweils 50 µL der Proben, Standard-Verdünnungen und einer Negativkontrolle (doppelt destilliertes Wasser) in Duplikaten aufgetragen. Es folgte die Hinzugabe von jeweils 75 µL der beiden mitgelieferten Farbreagenzien. Nach 30-minütiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur folgte eine Adsorptionsmessung bei 450 nm Licht-Wellenlänge. Nach Subtraktion der Adsorption der Negativkontrolle von allen anderen Messwerten erfolgte eine lineare Regression der Adsorptions-Konzentration-Beziehung anhand der Standardlösungen. Aus der Adsorption wurden anhand der Regression die Harnstoff-Stickstoff-Konzentrationen in den Proben errechnet.

3.2.9. Histologie

Alle in dieser Arbeit beschriebenen histologischen Untersuchungen erfolgten an Paraformaldehyd (PFA)-fixiertem Nierengewebe. Entnommene Nieren wurden hierzu dekapsuliert, längs halbiert und für 24 h bei 4 °C in 4 %iger PFA-Lösung inkubiert. Hiernach wurde das Gewebe mit PBS gespült und anschließend einer aufsteigenden Alkoholreihe zugeführt. Das Gewebe wurde bei Raumtemperatur jeweils einmal 1 h in 70 %, 85 %, 95 % Ethanol und dreimal 1 h in 100 % Ethanol sowie dreimal 30 min in 100 % Xylol inkubiert. Anschließend folgte dreimalig eine einstündige Inkubation in 58 °C warmem Paraffin und danach Einbettung in einen Paraffinblock durch Erkalten-lassen.

Nach Einbettung folgte Schneiden der Gewebelöcke an einem Mikrotom (Leica RM2235) mit einer Schnittdicke von 2 µm und Aufbringen der Schnitte auf einen Glas-Objektträger. Nach Trocknen der Schnitte bei 60 °C für eine Stunde folgte vor allen histologischen Färbungen eine Hydrierung des Gewebes mittels absteigender Alkoholreihe. Objektträger wurden hierbei nacheinander drei Mal 5 Minuten in 100 % Xylol und anschließend jeweils drei Minuten in 100 %, 96 % und 70 % Ethanol sowie Wasser getaucht.

Zur Perjodsäure-Schiff-Reaktion (kurz PAS aus dem Englischen *periodic acid–Schiff reaction*) folgte nach absteigender Alkoholreihe die zehnminütige Inkubation in 0,9 %iger Perjodsäure. Nach einminütigem Waschen in Wasser folgte die Inkubation in Schiffschem Reagenz für zehn Minuten. Nach erneutem Waschen und 30-sekündiger Inkubation in Hämalaun nach Mayer folgte die Wässerung unter fließendem Wasser für 5 min vor einer aufsteigenden Ethanolreihe (analog zur absteigenden Reihe in umgekehrter Reihenfolge).

Die Schnitte wurden im Anschluss an die Färbungen mit Histomount Eindeckmedium versehen und mit einem Deckgläschen eingedeckt. Zur Digitalisierung der Schnitte wurden Aufnahmen bei 40-facher Vergrößerung im Slidescanner der CECAD Imaging Facility (Hamamatsu S360) angefertigt.

3.2.10. Ribonukleinsäure-Isolation aus Gewebe

Für die Ribonukleinsäure (RNA)-Isolation wurde ein 1x1x1 mm großes Stück Gewebe zusammen mit Zirconia/Silica-Perlen und 1 mL Phenol/Guanidin-Thiocyanat in ein Schraubdeckelröhrchen überführt.

Zur Homogenisierung des Gewebes erfolgte die Verarbeitung in einem Precellys-Homogenisator (2 x 20 Sekunden, 4000 U/min). Anschließend wurde die flüssige Phase von den Zirconia/Silica-Perlen getrennt, zur Phasentrennung mit 200 µL Chloroform versetzt und für etwa 15 Sekunden gemischt. Nach einer Inkubation von 2–3 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Probe 15 Minuten bei 10.000 × g und 4 °C zentrifugiert.

Die klare Überphase (RNA-Phase) wurde anschließend getrennt. Danach wurde die Probe zur RNA-Fällung in einem 1:1 Verhältnis mit Isopropanol versetzt und für 15 Sekunden gemischt. Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Probe 15 Minuten bei 10.000 × g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, und das Pellet mit 500 µL 70 % Ethanol gewaschen und für 5 Minuten bei 10.000 × g und 4 °C zentrifugiert. Der Waschschrift mit Ethanol wurde einmal wiederholt und der gesamte Überstand wurde anschließend vorsichtig entfernt. Das RNA-Pellet wurde in 50 µL RNase freiem Wasser resuspendiert und direkt weiterverarbeitet.

Die RNA-Konzentration wurde mit dem Qubit® 4 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific) unter Verwendung des Qubit™ RNA HS Assay Kits gemessen. Hierfür wurden zunächst die Arbeitslösungen gemäß Herstellerprotokoll vorbereitet. Dazu wurde der Qubit™ RNA HS Reagent im Verhältnis 1:200 mit dem Qubit™ RNA HS Buffer verdünnt. Anschließend wurden 190 µL dieser Arbeitslösung mit 1 µL der RNA-Probe und 9 µL RNase freiem Wasser in einem Qubit™ Assay Tube gemischt. Als Kontrolle wurden beiliegende Standardlösungen analog vorbereitet.

Die Proben wurden für 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um eine gleichmäßige Bindung des Fluoreszenzfarbstoffs an die RNA zu gewährleisten. Nach der Inkubation wurde die Fluoreszenzintensität der Proben mit dem Qubit® 4 Fluorometer gemessen. Die RNA-Konzentration wurde automatisch unter Verwendung der integrierten Software des Geräts basierend auf den Standardwerten berechnet. Jede Probe wurde in Doppelbestimmung gemessen, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sicherzustellen.

3.2.11. Reverse Transkription von RNA zu komplementärer DNA

Für die Synthese von komplementärer DNA (cDNA) aus isolierter RNA wurde das High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) verwendet. Die Reaktion wurde gemäß dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Hierfür wurden pro Probe 1 µg RNA mit 10× RT Buffer, 25× dNTP-Mix (100 mM), 10× RT Random Primer und MultiScribe™ Reverse Transcriptase versetzt und mit RNase-freiem Wasser auf ein

Gesamtvolumen von 20 µL gebracht. Das Volumen der eingesetzten RNA richtete sich nach den Konzentrations-Messungen, welche oben beschrieben wurden.

Die Reaktionsmischung wurde kurz zentrifugiert und zur reversen Transkription in einen Thermocycler mit folgenden Bedingungen überführt:

- 25 °C für 10 Minuten (Primer-Annealing),
- 37 °C für 120 Minuten (Reverse Transkription),
- 85 °C für 5 Minuten (Inaktivierung der Reversen Transkriptase).

Anschließend wurden die cDNA-Proben bei -20 °C gelagert.

3.2.12. Quantitative Polymerasekettenreaktion

Die quantitative PCR (qPCR) wurde unter Verwendung von TaqMan Genexpressions-Assays (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) und dem QuantStudio 5 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Die Reaktionen wurden in 384-Well-Platten in einem Gesamtvolumen von 10 µL pro Ansatz durchgeführt. Die Zusammensetzung der qPCR-Mischung pro Well war wie folgt:

- 5 µL TaqMan Fast Advanced Master Mix (2×)
- 0,5 µL TaqMan Genexpressions-Assay (20×)
- 1 µL cDNA (entsprechend 10–50 ng RNA-Äquivalent)
- 3,5 µL RNase-freies Wasser

Die qPCR wurde unter den folgenden Reaktionsbedingungen durchgeführt:

- 50 °C für 2 Minuten
- 95 °C für 20 Sekunden (Initiale Denaturierung)
- 40 Zyklen:
 - 95 °C für 1 Sekunde (Denaturierung)
 - 60 °C für 20 Sekunden (Annealing und Extension)

Die Fluoreszenzsignale wurden während der Annealing/Extension-Phase jedes Zyklus aufgezeichnet. Die Datenauswertung erfolgte mit der QuantStudio Design & Analysis Software (Thermo Fisher Scientific). Die relative Genexpression wurde unter Verwendung der $\Delta\Delta C_t$ -Methode berechnet, wobei ein Referenzgen als interne Referenz zur Normalisierung der

Zielgenexpression diene. Jede Probe wurde in technischen Dreifachbestimmungen analysiert, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sicherzustellen.

3.2.13. Durchflusszytometrie

Probenvorbereitung:

Zur durchflusszytometrischen Analyse renaler Immunzellen erfolgte zunächst die Herstellung einer Einzelzellsuspension aus Nierengewebe. Entnommene Mausnieren wurden manuell dekapsuliert und in etwa 1 mm große Stücke zerschnitten. Die kurzfristige Lagerung erfolgte bei 4 °C in 5 mL Zellkulturmedium (RPMI 1640 + 10 % FBS). Die enzymatische Verdauung mittels DNase I (Endkonzentration 30 U/mL) und Kollagenase B (Endkonzentration 250 µg/mL) erfolgte durch Inkubation der Gewebeproben mit Rührfischen für 30 Minuten in einem 37 °C warmem Wasserbad auf einem Magnetrührer. Dabei sorgte der Magnetrührer für eine konstante, schonende Bewegung der Probe, während der Rührfisch größere Gewebestücke mechanisch zerkleinerte. Nach Abschluss der enzymatischen Verdauung wurde die entstandene Zellsuspension durch einen 100 µm Zellfilter filtriert. Verbliebene größere Gewebestücke wurden vorsichtig mit dem Kolben einer Spritze durch das Sieb gedrückt.

Zur Herstellung einer Einzelzellsuspension aus Milzen wurden die entnommenen Organe mit dem Kolben einer 5 mL Spritze durch ein 100 µm Zellsieb gedrückt. Das Zellsieb wurde zuvor mit PBS benetzt und anschließend zwei Mal mit je 3 mL gekühltem PBS gespült.

Anschließend wurden die Zellen aus Milz und Niere durch Zentrifugation bei 300 × g für 5 Minuten pelletiert und der Überstand entfernt. Zur Entfernung verbliebener Erythrozyten wurde das Zellpellet in 1 mL ACK-Lysespuffer resuspendiert und für 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lyse wurde durch Zugabe von 5 mL gekühltem FACS-Puffer gestoppt, gefolgt von einer Filtration durch einen 70 µm Zellfilter und erneuter Zentrifugation unter gleichen Bedingungen.

Den Abschluss der Probenvorbereitung bildete die Fc-Rezeptor-Blockierung zur Vermeidung unspezifischer Antikörperbindungen. Hierzu wurde das Zellpellet in 200 µL FC Block-Lösung (1:100 in FACS-Puffer verdünnt) resuspendiert und für 15 Minuten bei 4 °C inkubiert.

Oberflächenfärbung:

Nach der Fc-Rezeptor-Blockierung wurden die Zellen einmal mit FACS-Puffer gewaschen (300 × g, 5 min) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 250 µL FACS-Puffer resuspendiert. Zur absoluten Zellzahlbestimmung wurden 10 µL FlowCount Beads

(CountBright Beads, 1000 Beads/ μ L) zu jeder Einzelzellsuspension gegeben, entsprechend 10.000 Beads pro Probe. Die Proben wurden in drei Proben für die unten genannten Antikörper-Kombinationen aufgeteilt.

Nach erneuter Zentrifugation ($300 \times g$, 5 min) wurden die Zellen in 50 μ L Antikörperverdünnung resuspendiert und für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Anschließend erfolgten zwei Waschschrte mit FACS-Puffer ($300 \times g$, 5 min). Die gefärbten Zellen wurden schließlich in 500 μ L FACS-Puffer resuspendiert.

Intrazelluläre Färbung:

Für die intrazelluläre Färbung wurde das BioLegend True Nuclear™ Kit verwendet. Die Färbung begann mit Resuspension der Zellen in 1 mL Fixierlösung, gefolgt von 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln. Dann wurden 2 mL Permeabilisierungspuffer zugegeben und die Proben bei $300\text{--}400 \times g$ für 5 Minuten zentrifugiert. Der Waschschrte wurde einmal wiederholt. Die Antikörper gegen intrazelluläre Antigene wurden 1:200 in 100 μ L Permeabilisierungspuffer verdünnt, und das Pellet in dieser Lösung resuspendiert. Nach 30-minütiger Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur wurden die Zellen zweimal mit Permeabilisierungspuffer (2 mL) und einmal mit FACS-Puffer (2 mL) gewaschen (jeweils $300\text{--}400 \times g$, 5 min). Abschließend wurden die Zellen in 0,5 mL FACS-Puffer resuspendiert und für die Durchflusszytometrie vorbereitet. Alle Inkubationsschritte nach Zugabe der ersten fluoreszierenden Antikörper wurden stets unter Lichtausschluss durchgeführt, um eine mögliche Fluoreszenzbleichung zu verhindern.

Durchflusszytometrische Messung:

Für die detaillierte Charakterisierung der Zellpopulationen wurden die gefärbten Proben mit einem LSR Fortessa Durchflusszytometer (BD Biosciences) analysiert. Als Grundlage für die notwendige Farbkompensation erstellten wir Kompensationskontrollen aus Milzzellen. Dafür wurden Teile der Milzzellsuspensionen jeweils mit einzelnen Fluorochrom-konjugierten Antikörpern gefärbt, wodurch wir für jeden verwendeten Farbstoff eine saubere Referenzmessung erhalten konnten. Die eigentliche Durchflusszytometrie begann mit einer Feinjustierung der Photomultiplier-Röhren (PMTs), bei der die Verstärkung der einzelnen Kanäle so eingestellt wurde, dass sich negative und positive Zellpopulationen klar voneinander abgrenzen ließen und keine übermäßige Überlappung der Fluoreszenzsignale verschiedener Kanäle vorlag. Für die Probenmessung selbst wählten wir eine moderate Flussrate von etwa 10.000 Messsignale pro Sekunde, um einerseits eine hohe Durchsatzrate zu erreichen und andererseits eine ausreichende Messgenauigkeit beizubehalten. Die zuvor zugesetzten FlowCount Beads dienten dabei als interne Standardreferenz für die absolute

Zellzahlbestimmung. Für jede Probe erfassten wir etwa 1.000.000 Zellereignisse, um statistisch relevante Aussagen treffen zu können. Die Datenauswertung erfolgte unter Zuhilfenahme der Software FlowJo v10.0. Die von den Milzzellen abgeleitete Kompensationsmatrix wurde automatisch auf alle Messdaten angewandt, um spektrale Überlappungen zwischen den verschiedenen Fluoreszenzkanälen zu korrigieren.

Standardmäßig wurden Nieren- und Milzzellen unter Verwendung folgender Antikörper-Kombinationen gefärbt:

Myeloische Zellen		T- und B-Zellen		T _{reg} / Th ₁₇	
Antigen	Fluorochrom	Antigen	Fluorochrom	Antigen	Fluorochrom
CD45.2	FITC	CD45.2	FITC	CD45.2	FITC
F4/80	PE	CD19	PerCP/Cy5.5	CD4	APC/Fire
CD11b	PerCP/Cy5.5	CD4	APC/Fire	CD25	APC
Ly6C	APC	CD8a	PE/Cy7	FoxP3 (intrazellulär)	BV421
Ly6G	BV510	TCR γδ	APC	RORγ (intrazellulär)	PE
		TCR β	BV421		
		NK11	PE		

3.2.14. Metabolomik

Die metabolomische Untersuchung von Nierengewebe erfolgte durch Herrn Dr. Patrick Giavalisco in der Serviceeinheit Metabolomik des Max-Planck-Instituts für Biologie des Alterns in Köln. Es erfolgte die Analyse von frisch gefrorenem Nierengewebe aus 16 Wochen alten Mäusen mit und ohne Induktion von NTN. Die Metaboliten wurden in einer Extraktionslösung (50 % LC-MS-geeignetes Methanol, 30 % LC-MS-geeignetes Acetonitril, 20 % hochreines Wasser, Valin-d8 mit einer Endkonzentration von 5 µM) extrahiert, und das Gewebe wurde in einem Homogenisator lysiert. Die Gewebeextrakte wurden durch Zentrifugation isoliert und gleiche Mengen jeder Probe wurden für die weitere Analyse verwendet. Die Metaboliten wurden auf einer Millipore SeQuant ZIC-pHILIC-Säule getrennt. Die Proben wurden in

randomisierter Reihenfolge injiziert, wobei Qualitätskontrollproben regelmäßig analysiert wurden. Die Daten wurden mit einem Vanquish Horizon UHPLC-System, gekoppelt an ein Thermo Fisher Orbitrap Exploris 240 Massenspektrometer mit HESI-Quelle, erfasst. Die Metabolitenidentifikation erfolgte mit Compound Discoverer. Die Peakflächenintegration und Chromatogrammauswertung wurde mit TraceFinder durchgeführt.

3.2.15. Statistik

Falls nicht anders gekennzeichnet vergleichen statistische Berechnungen zwei unabhängige Stichproben unter Annahme gleicher Varianz. Zur Berechnung der angegebenen Signifikanzniveaus kam daher ein Zweistichproben-t-Test zum Einsatz. Als Signifikanzniveau wurde 0,05 festgelegt. In Darstellungen wurden p-Werte $\geq 0,05$ durch ns, $< 0,05$ durch „*“ abgekürzt und Werte $< 0,01$ durch „**“ gekennzeichnet. Im Falle der Metabolomikdaten erfolgte ein Vergleich von drei unabhängigen Gruppen und Testung multipler Variablen. Angewandt wurde ein einfaktorieller ANOVA-Test zur Berechnung der p-Werte. Die Korrektur auf False Discovery Rate (FDR) bei multiplen Tests erfolgte mittels Benjamini-Hochberg-Prozedur.

4. Ergebnisse

4.1. Quantitative PCR bestätigt eine komplette *Acod1*-Defizienz in *Acod1*^{-/-}-Mäusen

Nach Verpaarung zweier für das *Acod1*-Allel heterozygoter Elterntiere erfolgte eine Genotypisierung mittels PCR. Nach Gewinnung genomischer DNA aus Ohrstanzen erfolgte die Amplifikation eines Exon 4 umspannenden Bereichs des *Acod1*-Genes. Bei Deletion von Exon 4 in *Acod1*^{-/-}-Mäusen ergibt sich ein größeres PCR-Produkt. Die Visualisierung erfolgte mittels Gelelektrophorese wie in Abbildung 4.

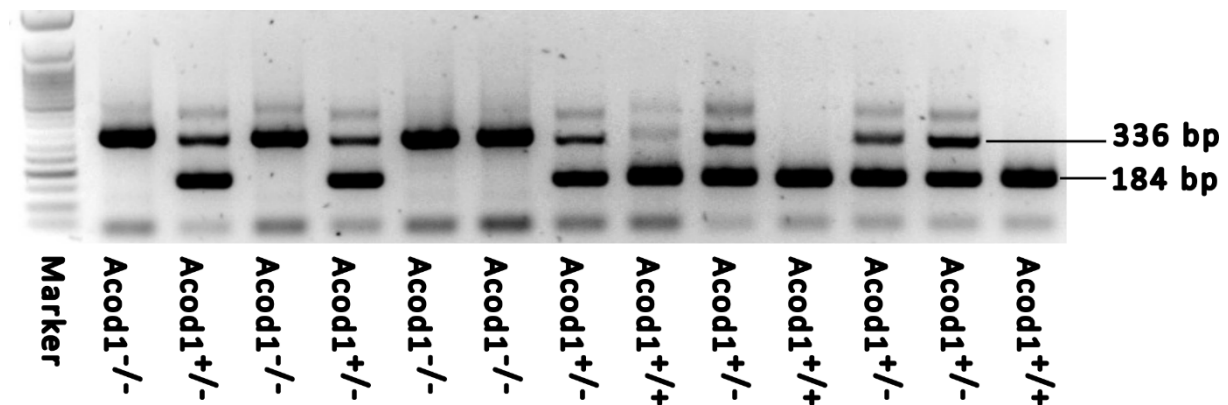


Abbildung 4: Genotypisierung

Repräsentatives Bild einer Gelelektrophorese nach *Acod1*-PCR. Links die Banden einer 50 bp DNA-Leiter. Daneben Visualisierung von 13 PCR-Produkten mit Banden bei 184 (*Acod1*⁺) und/oder 336 (*Acod1*⁻) Basenpaaren und entsprechenden Beschriftungen des Genotyps.

Zum Nachweis der Defizienz von *Acod1* in entsprechend genotypisierten Tieren erfolgte eine Untersuchung auf transkriptioneller Ebene. Es konnte gezeigt werden, dass in Lebergewebe unter physiologischen Bedingungen eine relevante Expression des *Acod1*-Genes vorherrscht⁵¹. Um den beschriebenen Nachweis zu führen, wurden insgesamt 2 *Acod1*^{-/-}- und 2 WT-Mäusen nach der Opferung Lebergewebe entnommen, welches direkt nach Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurde, um Degradierung von RNA zu vermeiden. Nach Aufreinigung der RNA wie im Methodenteil beschrieben konnte eine qPCR durchgeführt werden. Als Ziel-RNA wurde hierfür *Acod1* verwendet. Zur Normalisierung der Ergebnisse wurde jede Probe zudem auf die Expression von *Actb* als typischerweise nicht reguliertes Referenzgen untersucht. Es zeigte sich, dass in keinem der Gewebestücke aus *Acod1*^{-/-}-Mäusen *Acod1*-RNA nachweisen ließ (Abbildung 5). Im Vergleich hierzu zeigten WT-Mäuse

eine regelrechte Expression des Zielgens, sodass sich zusammenfassend eine *Acod1*-Defizienz im verwendeten Tiermodell auf transkriptioneller Ebene nachweisen ließ.

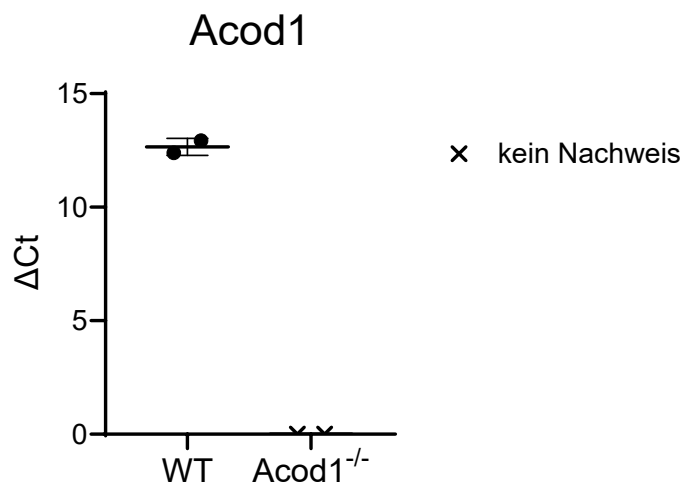


Abbildung 5: Nachweis der *Acod1*-Defizienz in Lebergewebe

Ergebnisse einer qPCR-Untersuchung auf *Acod1*-RNA aus Lebergewebe von WT- und *Acod1*^{-/-}-Mäusen. Dargestellt sind ΔC_t -Werte nach Verrechnung mit dem Referenzgen *Actb*. Während in WT-Tieren *Acod1*-RNA nachweisbar war, konnte in *Acod1*^{-/-}-Tieren keine Amplifikation der RNA stattfinden.

4.2. *Acod1*^{-/-}-Mäuse zeigen keinen renalen Phänotyp unter physiologischen Bedingungen

Bislang blieb die Rolle von ACOD1 für die renale Physiologie unerforscht. Erstmals wurde hier der Stellenwert des Stoffwechselmodulators für die Gewebshomöostase der Niere untersucht. Da es sich bei ACOD1 um einen zentralen Modulator des Metabolismus handelt, war nicht klar, ob es eine Relevanz beim Erhalt der grundlegenden Nierenfunktionen hat. Wir legten besonderes Augenmerk auf die Integrität der glomerulären Filtrationsbarriere, die Filtrationsleistung und die immunologische Zusammensetzung der Niere.

Um zu untersuchen, ob die *Acod1*-defizienten Mäuse ohne Behandlung mit NTS einen spontanen renalen Phänotyp aufweisen, wurden insgesamt 5 männliche *Acod1*^{-/-} - und 5 männliche WT-Mäuse im Alter von 8-12 Wochen ohne vorige Behandlung mit NTS untersucht. Mit dem gewonnenen Urin wurde die Albumin-Kreatinin-Ratio (AKR) bestimmt. Im Falle einer Beeinträchtigung der Filtrationsbarriere käme es wie in menschlichen Erkrankungen zur Ausscheidung von großen Proteinen wie Albumin über den Urin der Mäuse. Je nach Flüssigkeitszufuhr wird mehr oder weniger Wasser über den Harn ausgeschieden, weswegen der Verdünnungszustand des Urins dynamisch ist. Um hierfür zu korrigieren, wird eine Proteinurie auf die Kreatininkonzentration normalisiert, welche zusammen mit der

Harnkonzentrierung steigt. Beide Versuchsgruppen wiesen keine Albuminurie auf. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen *Acod1*^{-/-}-Tieren und der Kontrollgruppe festgestellt werden (Abbildung 6A). Auch bei der Untersuchung der Harnstoff-Stickstoff-Konzentration (BUN aus dem Englischen Blood Urea Nitrogen) im Mausserum unterschieden sich die beiden Gruppen nicht signifikant (Abbildung 6B). Im Falle einer Nierenfunktionseinschränkung kommt es zur Anhäufung harnpflichtiger Substanzen im Blut. Harnstoff wird klassischerweise als Surrogatparameter für das Vorliegen solcher Substanzen verwendet und im Plasma bestimmt. Hier werden demnach typische laborchemische Parameter aus der Humanmedizin auf Versuchstiere übertragen, um etwaige Veränderungen der Nierenphysiologie zu erkennen. Das Nierengewebe wurde mittels PAS-Färbung histologisch beurteilt. In beiden Gruppen sind in der Übersicht der Schnitte keine histologischen Auffälligkeiten zu erkennen (Abbildung 7). Hierbei lag das primäre Augenmerk auf einer regelrechten Architektur der Glomeruli. Es zeigten sich ubiquitär offene Kapillarschlingen und zarte Basalmembranen. Eine Hyperzellularität konnte weder glomerulär noch tubulointerstitiell beobachtet werden.

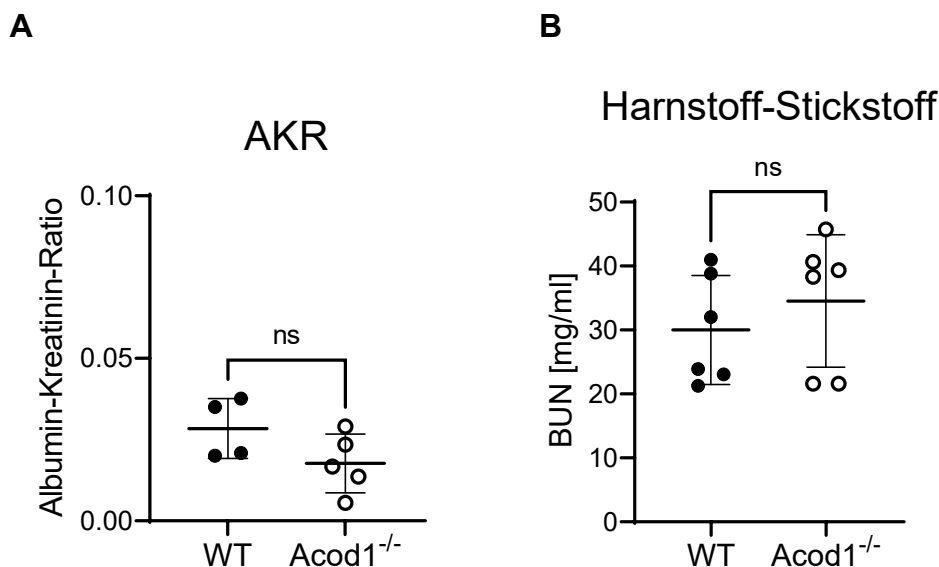


Abbildung 6: ACOD1 bewirkt unter basalen Bedingungen keine Veränderung der Nierenfunktion

Albumin-Kreatinin-Ratio im Urin (A) und Plasma-Harnstoff-Stickstoff-Gehalt (B) von WT- und *Acod1*^{-/-}-Mäusen unter physiologischen Bedingungen ohne NTN-Induktion. Beide Parameter wiesen übliche Werte für gesunde Mäuse des genetischen Hintergrunds auf. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen.

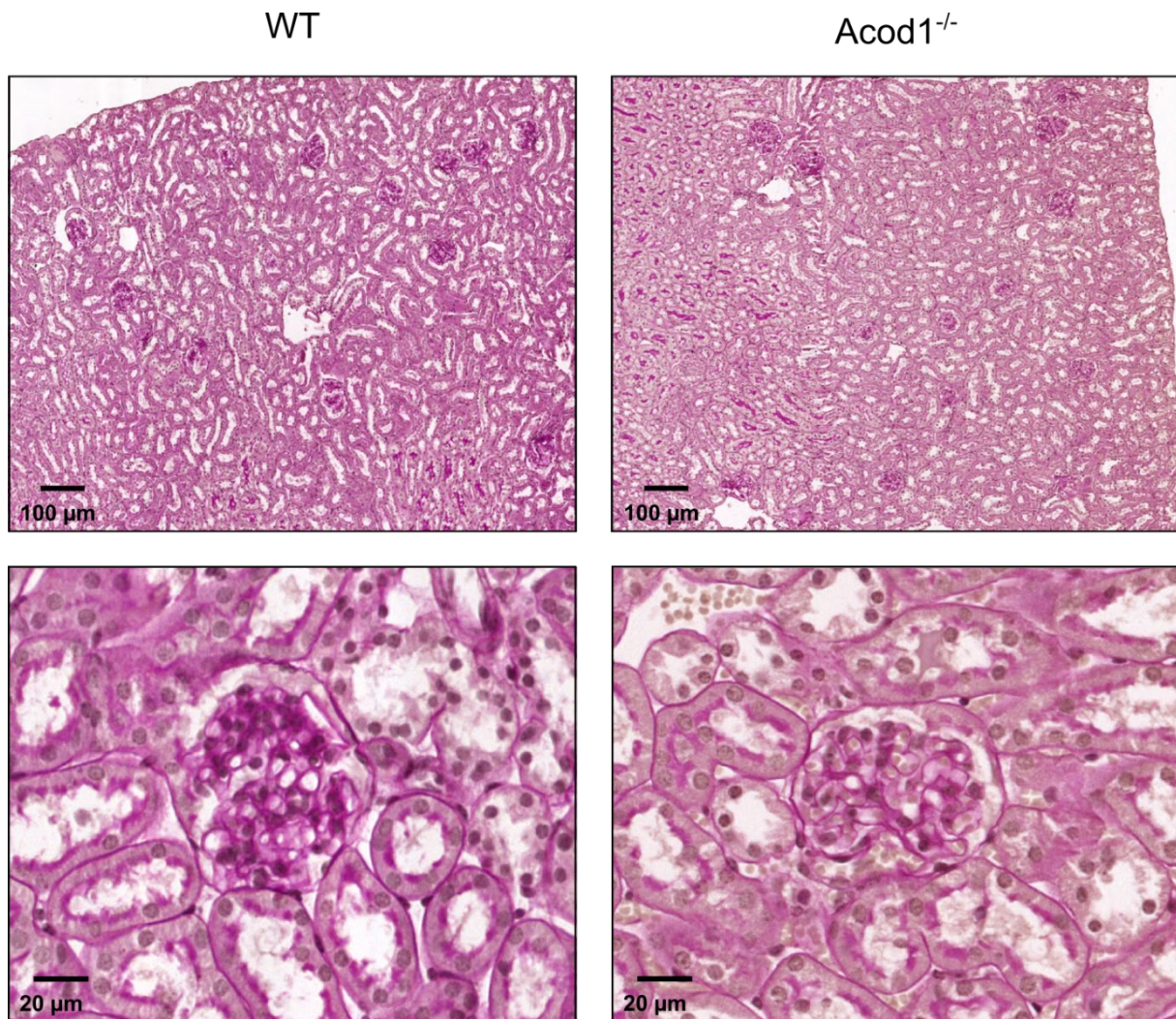


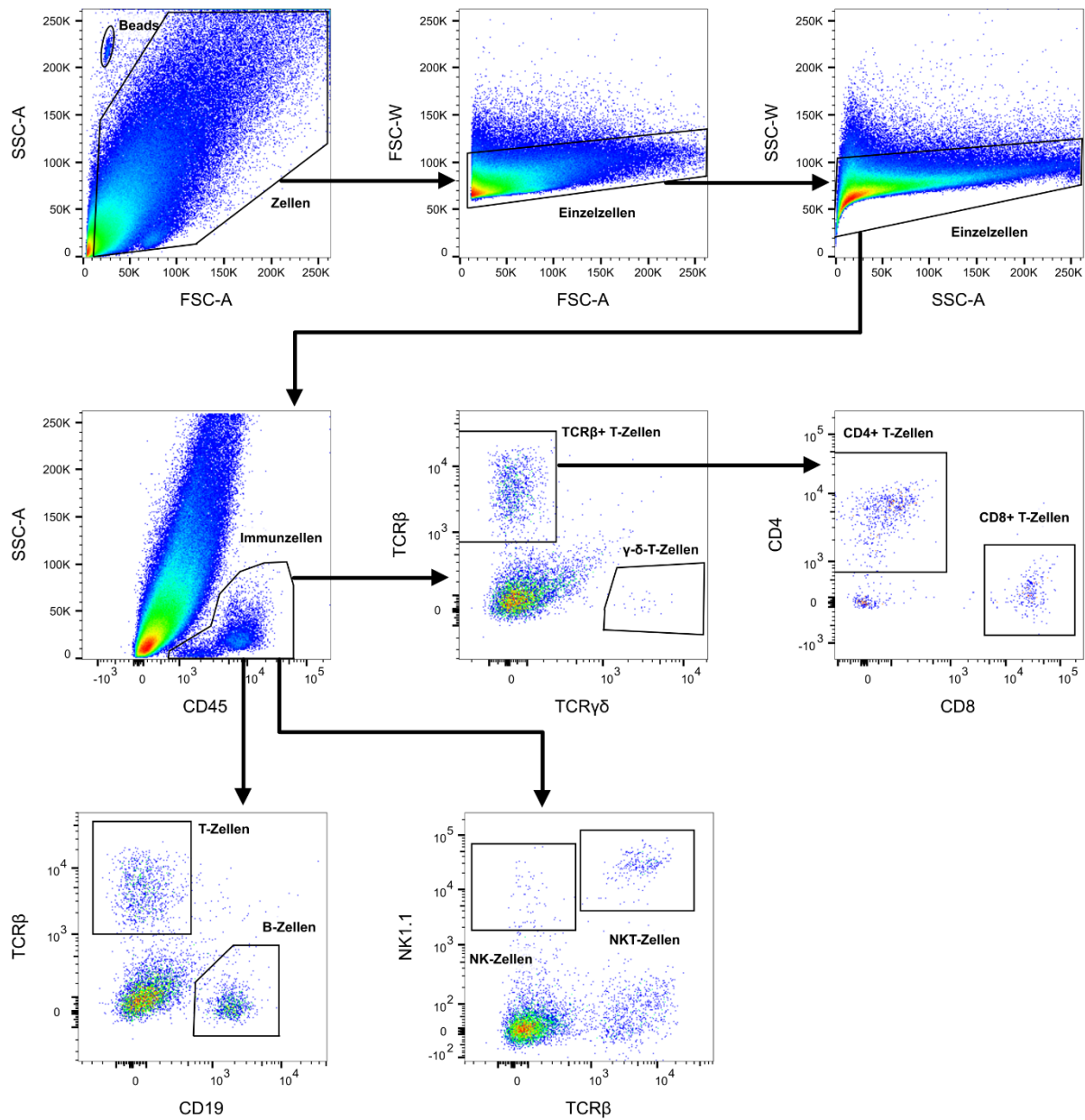
Abbildung 7: Basale Phänotypisierung – keine histologischen Veränderungen der Niere

Repräsentative Ausschnitte aus PAS-gefärbten Schnitten formalinfixierter Nierenpräparate von WT-Tieren (links) und *Acod1*^{-/-}-Mäusen (rechts). Übersichtsaufnahmen (oben) zeigen in beiden Gruppen eine regelrechte Architektur der Niere ohne Anzeichen für Entzündungen, Proteinurie oder fibrotische Veränderungen. Glomeruli (unten) zeigten sich in beiden Gruppen ohne pathologische Veränderungen mit zarter GBM, normozellulärem Mesangium, offenen Kapillarlichtungen und ohne Auffälligkeiten im Bereich der Bowman-Kapsel.

Im Nierengewebe befinden sich auch ohne akute Inflammation Immunzellen, welche im basalen Zustand zur Gewebshomöostase beitragen. Eine durchflusszytometrische Untersuchung der renalen Immunzellen ergab ohne Krankheitsinduktion keinen signifikanten Unterschied in der Anzahl der Gesamt-Leukozyten zwischen *Acod1*^{-/-} - und WT-Tieren. Eine Analyse der Lymphozytenzahlen sowie eine Untersuchung der T-Zell-Subpopulationen ergab keine signifikanten Änderungen in *Acod1*^{-/-}-Tieren. Neben CD19⁺ B-Zellen wurden hierbei zytotoxische CD8⁺ T-Zellen, CD4⁺ T-Helferzellen samt FoxP3⁺ T-regulatorischer Zellen (Treg) und RORC⁺ Th17 Zellen sowie NK1.1⁺ natürliche Killerzellen (NK) in die Auswertung einbezogen. Innerhalb der myeloischen Zellreihe erfolgte eine Auswertung der F4/80⁺

Makrophagen und der Ly-6C⁺ Monozyten. Keine der Zellpopulationen wies zwischen den Kontrollgruppen signifikante quantitative Unterschiede auf.

A



B

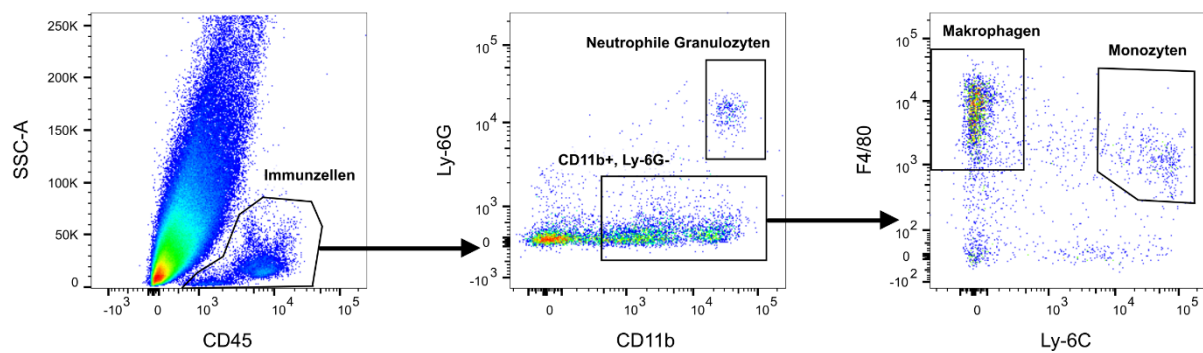


Abbildung 8: Immunphänotypisierung - Gating Strategie

Repräsentative Auswertung von durchflusszytometrischen Untersuchungen renaler Zellen. Pfeile entsprechen der Verwendung einer Ausgangspopulation am Anfang des Pfeiles für die nachfolgende Auswertung am Pfeilende. Nach der Exklusion der Normalisierungs-Beads anhand ihrer charakteristischen Größe und Dubletten anhand ihrer Breite wurden zunächst CD45⁺ Immunzellen für alle weitere Analysen identifiziert. Hieraus konnte die Identifikation von CD19⁺ B-Zellen, NK1.1⁺; TCR β - NK-Zellen, NK1.1⁺; TCR β ⁺ NKT-Zellen, TCR $\gamma\delta$ ⁺; TCR β - γ - δ -T-Zellen (**A**) und CD11b⁺; Ly-6G⁺ Neutrophilen Granulozyten erfolgen (**B**). TCR β ⁺ T-Zellen wurden in CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen unterteilt. Aus CD11b⁺/int.; Ly-6G⁻ Zellen erfolgte die Differenzierung F4/80^{hi}; Ly-6C⁻ Makrophagen und Ly-6C^{hi}; F4/80^{int.} Monozyten.

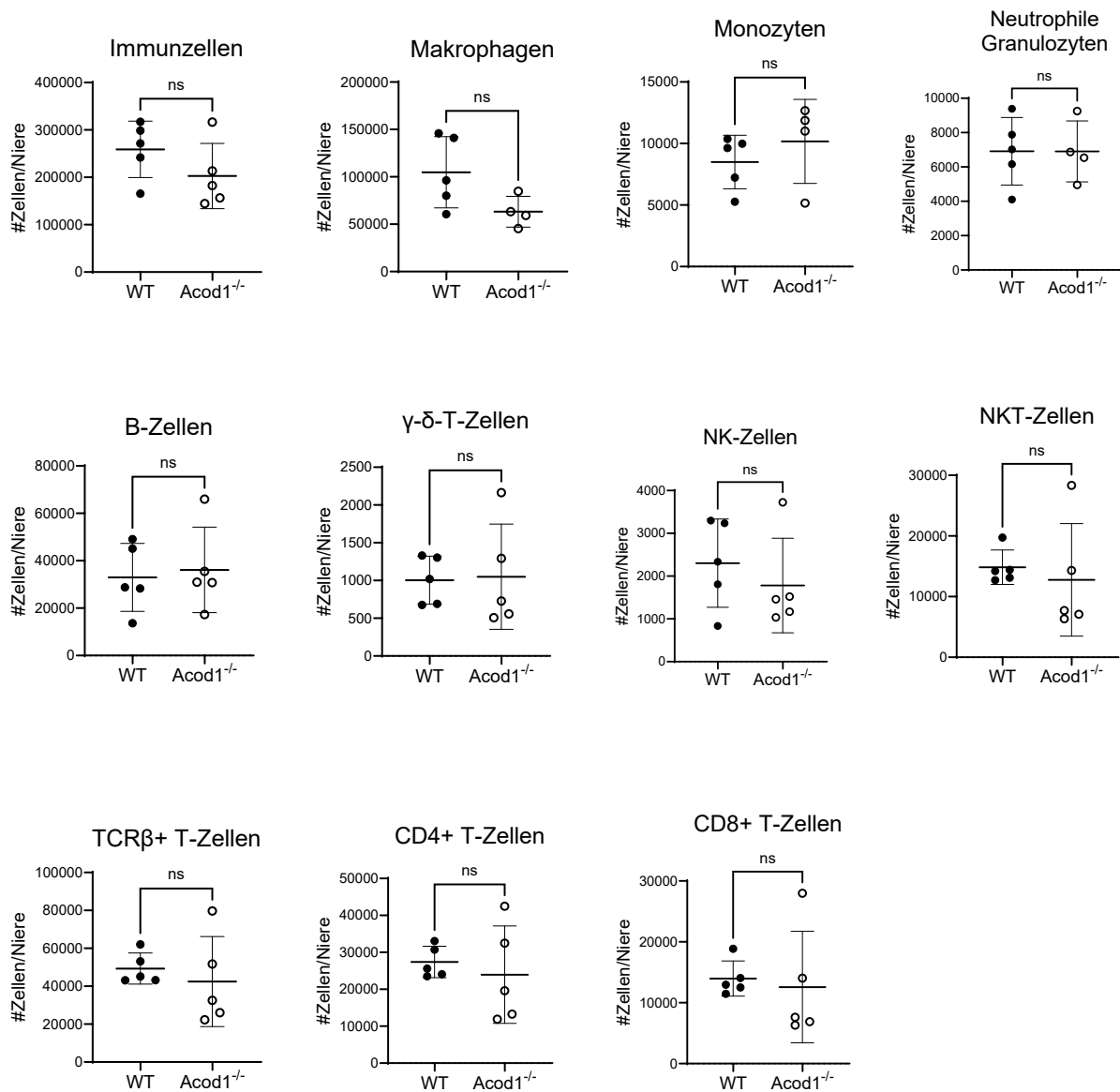


Abbildung 9: ACOD1 bewirkt unter basalen Bedingungen keine Veränderung der renalen Immunzellpopulationen

Quantitative Untersuchung der in Abbildung 8 beschriebenen Immunzellpopulationen in Nieren von WT- und *Acod1*^{-/-}-Mäusen. Zellzahlen wurden über Normalisierungs-Beads auf die Anzahl von Zellen pro Niere normalisiert und verglichen. Im Vergleich zu wildtypischen Tieren zeigte sich in keiner untersuchten Population ein signifikanter Unterschied durch *Acod1*-Defizienz.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass keine der gängigen Untersuchungen zur Beurteilung der Nierenfunktion einen Unterschied zwischen *Acod1*^{-/-} - und WT-Tieren erbrachte. Auch Veränderungen des immunologischen Milieus innerhalb des Nierengewebes konnte anhand quantitativer Untersuchungen der Immunzellzusammensetzung im physiologischen Zustand nicht beobachtet werden.

4.3. *Acod1*^{-/-}-Mäuse zeigen eine aggravierte histologische Schädigung und reduzierte Albuminurie in der experimentellen Glomerulonephritis

Aufgrund der zeitlich dynamischen Entwicklung der NTN erfolgte zunächst die Gewinnung von Urin in regelmäßigen Abständen nach Krankheitsinduktion. Eine Gewinnung konnte nicht-invasiv erfolgen und hatte somit keine Beendigung des laufenden Versuchs zur Folge. Insgesamt konnten Urinproben an vier Zeitpunkten von 9 WT- und 10 *Acod1*^{-/-} -Tieren gewonnen werden und in die Analyse einfließen. Die AKR diente hierbei als klinischer Endpunkt zur Einschätzung der Krankheitsaktivität. Zunächst war zu beobachten, dass alle Tiere nach NTN-Induktion eine Albuminurie weit über dem basalen Bereich entwickelten. Diese war zeitlich progredient und erreichte etwa an Tag 5 nach Krankheitsbeginn ihr Maximum. An den Tagen 5 und 10 nach Krankheitsbeginn war zwischen den experimentellen Gruppen signifikante Unterschiede zu beobachten. An beiden Tagen war eine Reduktion der Albuminurie in der Gruppe der *Acod1*^{-/-}-Tiere im Vergleich zu den WT-Tieren ersichtlich (Abbildung 10).

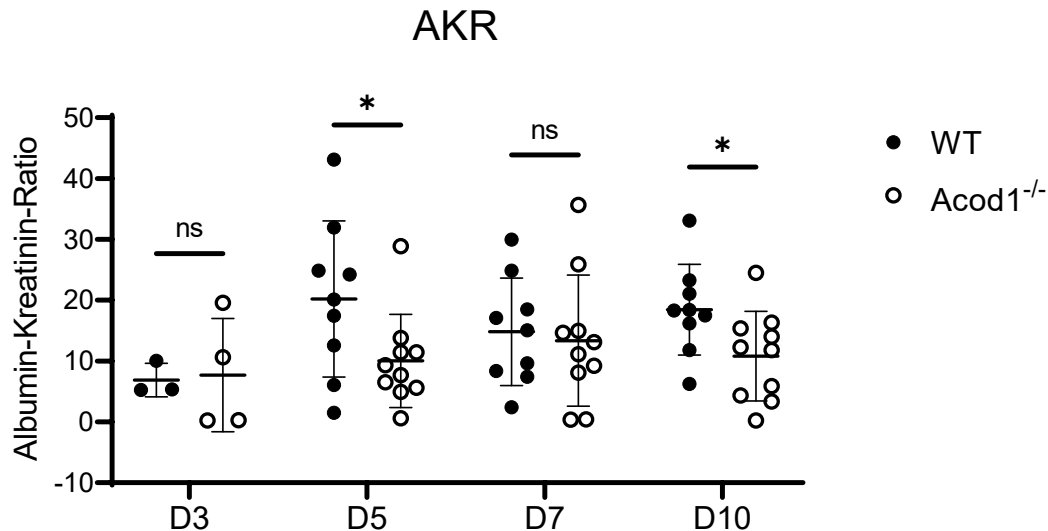


Abbildung 10: *Acod1*-Knockout führt zur Reduktion der Albuminurie in der experimentellen GN
 Albumin-Kreatinin-Ratio im Urin von WT- und *Acod1*^{-/-}-Mäusen an den Tagen drei, fünf, sieben und zehn nach Induktion von NTN. Es zeigte sich in beiden Versuchsgruppen eine deutliche Albuminurie, die sich ab Tag fünf auf ähnlichen Niveaus bis zum Versuchsende hielt. An den Tagen fünf und zehn zeigten *Acod1*^{-/-}-Tiere signifikant reduzierte Albuminurie-Werte.

Nach dem Opfern der Tiere an Tag 10 nach Krankheitsinduktion erfolgte eine terminale Blutentnahme. Aus gewonnenem Heparinplasma wurden von insgesamt 7 WT- und 7 *Acod1*^{-/-}-Tieren BUN-Werte bestimmt. Hier konnten im Vergleich zur basalen Untersuchung leicht erhöhte Werte als Zeichen einer Nierenfunktionseinschränkung beobachtet werden. Zum Zeitpunkt der Probenentnahme konnte allerdings kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen gezeigt werden (Abbildung 11).

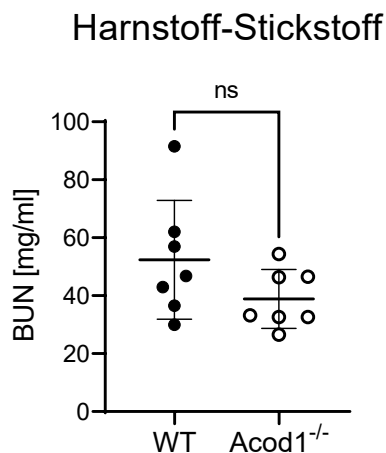


Abbildung 11: Keine Veränderung der Harnstoff-Werte in der NTN durch *Acod1*-Defizienz

Plasma-Harnstoff-Stickstoff-Gehalt von WT- und *Acod1*^{-/-}-Mäusen an Tag zehn nach Induktion von NTN. Im Vergleich zu gesunden Tieren zeigten sich an Tag 10 der NTN nur leicht erhöhte Werte. Ein Vergleich der Versuchsgruppen ergab keinen signifikanten Unterschied.

Ebenfalls an Tag 10 nach Krankheitsinduktion erfolgte die Entnahme von Nieren zur histologischen Aufarbeitung mittels PAS-Färbung. Abbildung 12 zeigt exemplarische Ausschnitte aus beiden Versuchsgruppen. Insgesamt zeigten sich deutliche Veränderungen im Vergleich zur basalen Untersuchung. Beide Gruppen zeigten Proteinzylinder im Tubulussystem als Folge der ausgeprägten Proteinurie. Zudem waren vermehrt teilsklerosierte Glomeruli zu beobachten. Halbmondförmige Zellproliferate, welche im menschlichen Krankheitsbild der RPGN bzw. halbmondförmigen GN zu finden sind, ließen sich in dem hier verwendeten Krankheitsmodell selten beobachten. Passend zum entzündlichen Krankheitsmodell wurden vermehrt hyperzelluläre Areale beobachtet, die auf eine Immunzellinfiltration hindeuten.

Um die histologischen Befunde zwischen den Versuchsgruppen vergleichen zu können, ist eine Quantifizierung der glomerulären Schädigung notwendig. Hierzu wurden einzelne Glomeruli in Viertel unterteilt, von denen jedes auf histologische Auffälligkeiten hin begutachtet wurde. Lagen in einem Viertel Vernarbungen, kollabierte Kapillarschlingen oder pathologische Zellproliferate vor, so wurde dies als positiv gewertet. Für jedes Glomerulum ergibt sich nach dieser Vorgehensweise ein Schadens-Wert zwischen 0 und 4. In die Auswertung flossen Transversalschnitte von insgesamt 16 Nieren ein. Nach Verblindung erfolgte die Durchsicht von mindestens 60 Glomeruli pro histologischem Präparat. Aus der Summe aller Schadenswerte geteilt durch die Anzahl der bewerteten Glomeruli ergibt sich für jedes Präparat ein Schadensindex. Nach Entblindung und Zuordnung zu den Versuchsgruppen wurde ersichtlich, dass *Acod1*^{-/-}-Tiere signifikant höhere Schadensindizes aufwiesen (Abbildung 12).

Zusammenfassend ließ sich zeigen, dass ACOD1 signifikante Einflüsse auf die Veränderung der Nierenhomöostase während der experimentellen GN hat. Einerseits war eine Reduktion der Albuminurie in *Acod1*^{-/-}-Mäusen im mittelfristigen Verlauf der NTN zu beobachten. Dies deutet darauf hin, dass ACOD1 am Erhalt der Integrität der glomerulären Filtrationsbarriere beteiligt sein könnte. Andererseits zeigte die histologische Beurteilung der Glomeruli eine stärkere Schädigung bei ACOD1-Defizienz. Dies könnte einerseits auf eine reduzierte Toleranz der glomerulären Zellpopulationen gegenüber äußerlichen Stressoren hindeuten, andererseits könnte dieser Befund auf eine aggravierte intra- oder periglomeruläre Inflammation hinweisen. Die nachfolgende Charakterisierung des renalen immunologischen Milieus sollte klären, ob sich der histologische Befund tatsächlich durch eine Veränderung der inflammatorischen Einflüsse auf glomeruläre Strukturen erklären lassen könnte.

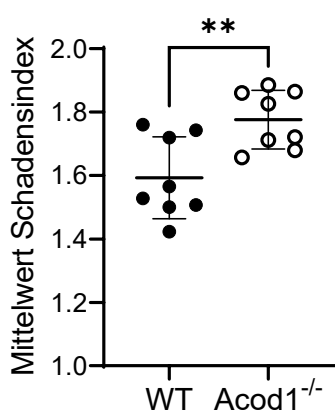
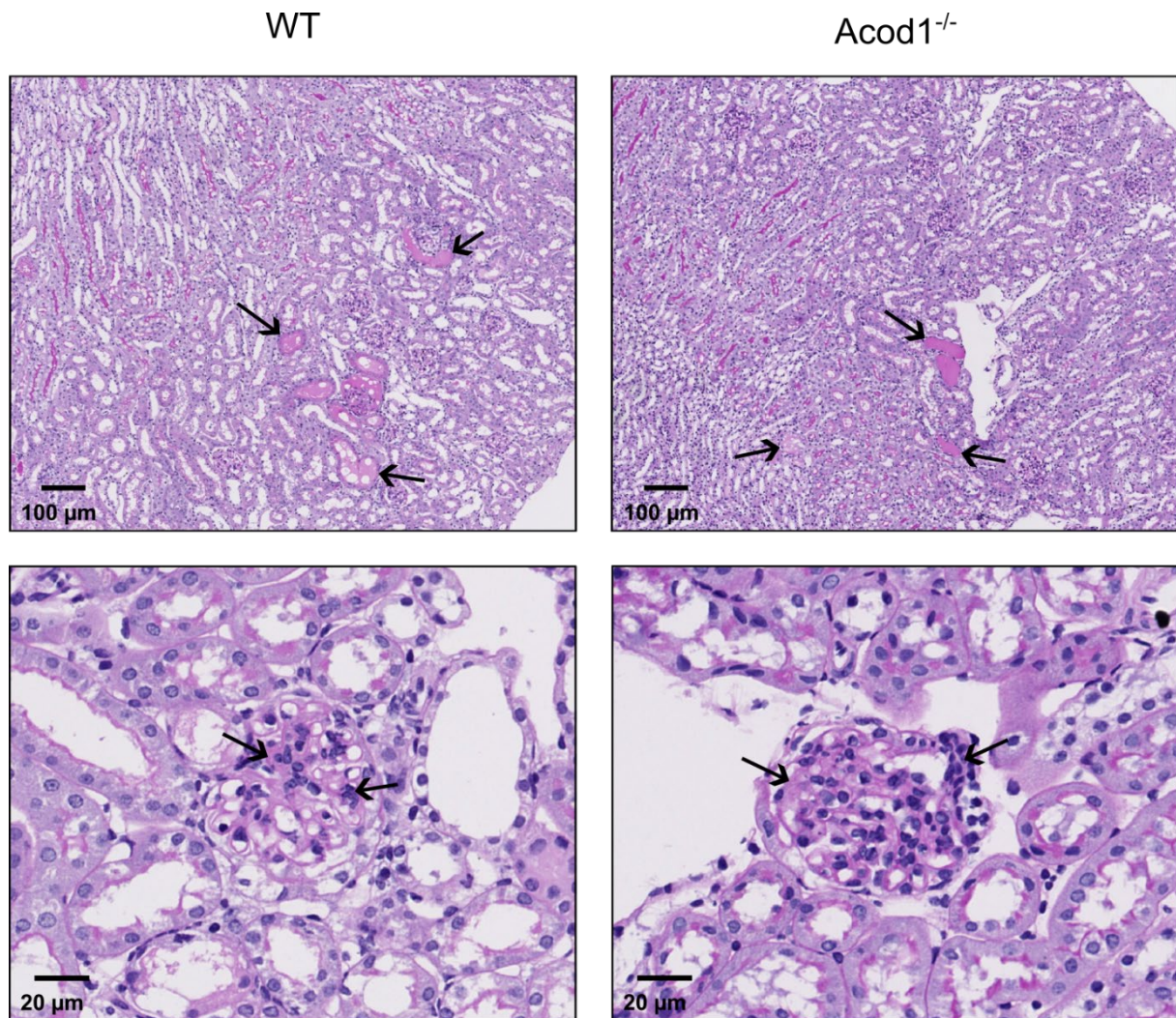


Abbildung 12: Aggravierte Schädigung in der NTN durch *Acod1*-Defizienz

Repräsentative Ausschnitte aus PAS-gefärbten Schnitten formalinfixierter Nierenpräparate von WT-Tieren (links) und *Acod1*^{-/-}-Mäusen (rechts). Übersichtsaufnahmen (oben) zeigen Folgeerscheinungen der proteinurischen Erkrankung im Sinne von proteingefüllten Tubuluslumina (Protein-Ausgüsse bzw. Protein-Casts) (Pfeilspitzen). Die genauere Betrachtung von Glomeruli (mittlere Reihe) offenbarte hyperzelluläre Anteile sowie sklerotische Veränderungen (Pfeilspitzen) in beiden Versuchsgruppen. Die Individuums-bezogenen Mittelwerte der glomerulären Schadensindizes (unten) zeigten signifikant aggravierte Schäden in *Acod1*^{-/-}-Mäusen.

4.4. ACOD1 hat keinen Einfluss auf die Anzahl renaler Immunzellen während der experimentellen GN

Zur Untersuchung der immunologischen Veränderungen nach Induktion einer renalen Entzündung erfolgte die Analyse des Nierengewebes mittels Durchflusszytometrie. Es wurden insgesamt 11 WT- und 12 *Acod1*^{-/-}-Tiere auf diese Weise zehn Tage nach Induktion der NTN untersucht. Die Einteilung der Immunzellsubgruppen erfolgte wie im Abschnitt zur basalen Phänotypisierung anhand der Anfärbung verschiedener Oberflächenmarker. Aufgrund der erhöhten Anzahl von Lymphozyten im entzündeten Nierengewebe war zudem eine bessere Charakterisierung der T-Helferzellen mittels Anfärbung intrazellulärer Transkriptionsfaktoren möglich. Analysiert wurden anti-inflammatorisch wirkende regulatorische T-Zellen anhand des Oberflächenmarkers CD25 in Kombination mit dem für diesen Zelltyp charakteristische Expression des Transkriptionsfaktors FOXP3. Zudem konnte die Anzahl von Th17-Zellen anhand des Transkriptionsfaktors ROR γ bestimmt werden. Diese Zellen spielen in der Pathogenese der experimentellen Glomerulonephritis eine zentrale pro-inflammatorische Rolle²⁹.

Im Vergleich zur basalen Phänotypisierung konnte ein Anstieg der Gesamtzahl von renalen Immunzellen als Zeichen für das lokale entzündliche Geschehen gezeigt werden. Insbesondere die Infiltration von Monozyten, Makrophagen, NK-Zellen und T-Effektorzellen wird augenscheinlich. Im Vergleich der beiden experimentellen Gruppen lässt sich anhand von absoluten Zahlen infiltrierender Immunzellen kein signifikanter Unterschied feststellen.

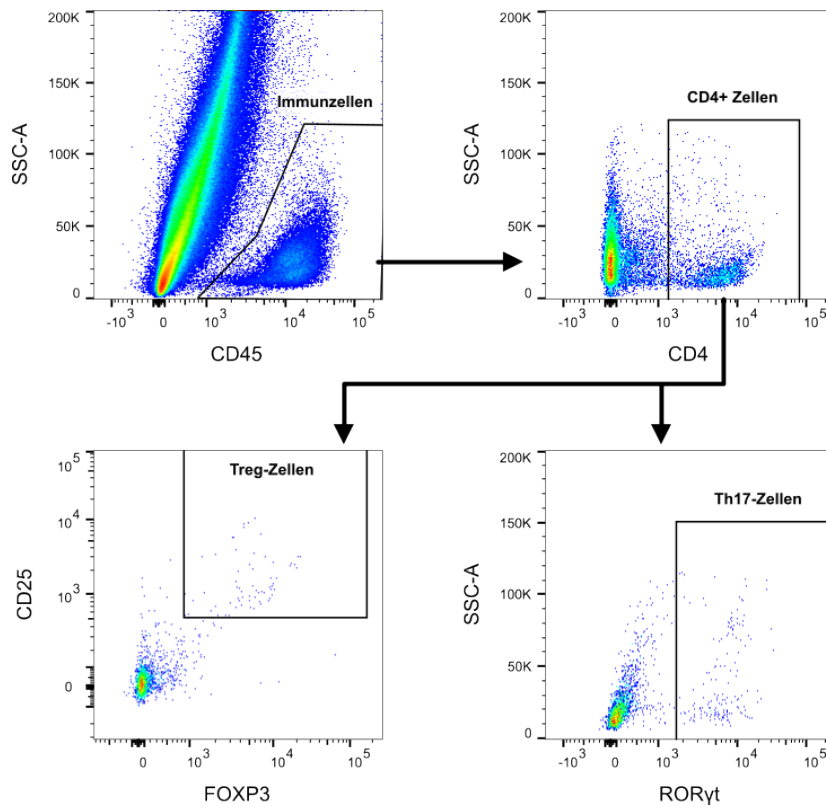


Abbildung 13: Immunphänotypisierung – ergänzende Gating Strategie

Repräsentative Auswertung von durchflusszytometrischen Untersuchungen renaler Zellen. Pfeile entsprechen der Verwendung einer Ausgangspopulation am Anfang des Pfeiles für die nachfolgende Auswertung am Pfeilende. Nach Inklusion aller CD45+ Immunzellen wie in Abbildung 8 erfolgte innerhalb der Population CD4+ Zellen die Identifikation CD25+; FOXP3+ regulatorischer T-Zellen (Treg) und RORyt+ Th17-Zellen.

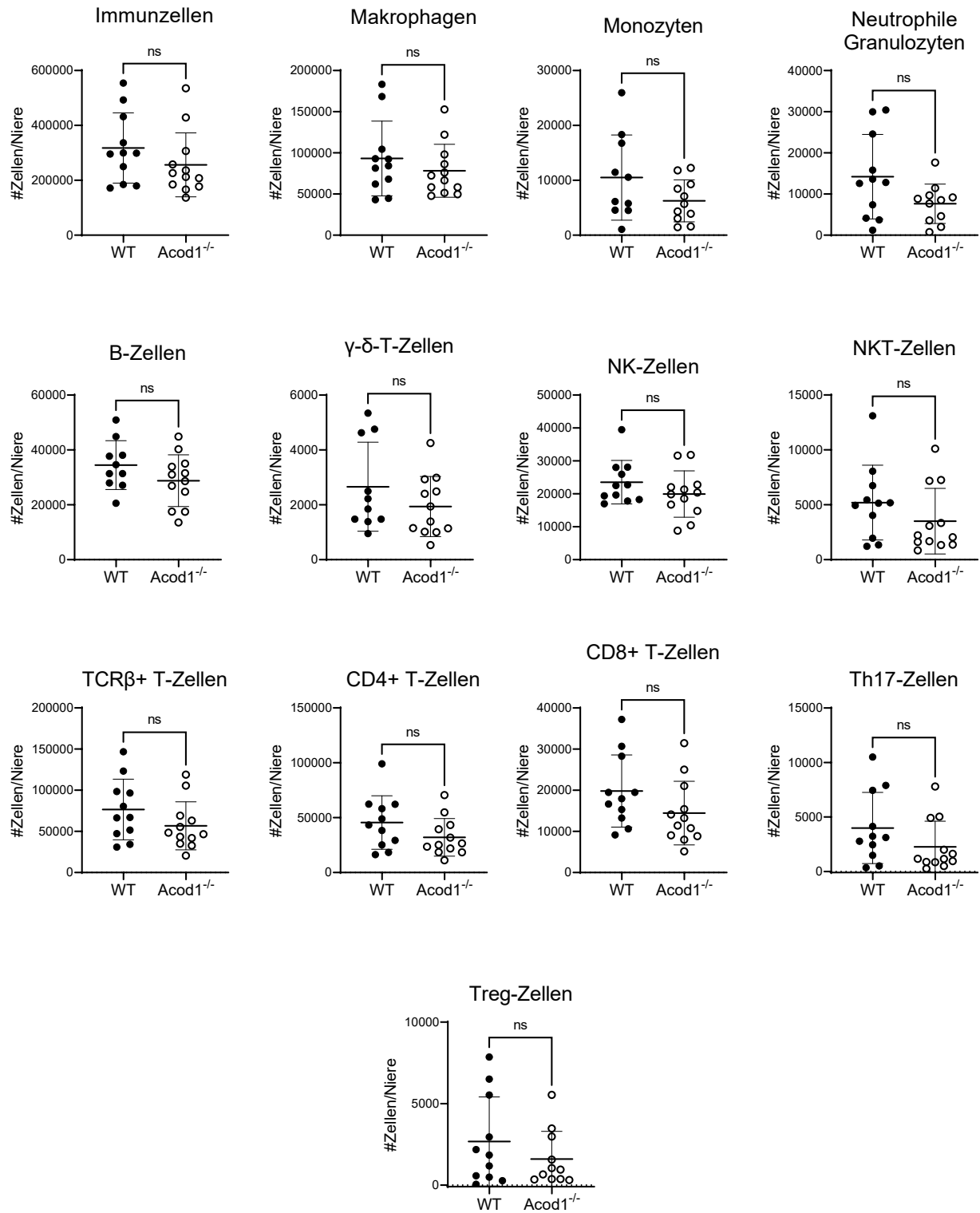


Abbildung 14: Quantifizierung renaler Immunzellpopulationen in der NTN

Quantitative Untersuchung der in Abbildung 8 und 13 beschriebenen Immunzellpopulationen in Nieren von WT- und *Acod1*^{-/-}-Mäusen zehn Tage nach NTN-Induktion. Zellzahlen wurden über Normalisierungs-Beads auf die Anzahl von Zellen pro Niere normalisiert und verglichen. Im Vergleich zu wildtypischen Tieren zeigte sich in keiner untersuchten Population ein signifikanter Unterschied durch *Acod1*-Defizienz.

Neben der quantitativen Untersuchung der renalen Immunzellinfiltration wurde das inflammatorische Milieu der Nieren nach NTN-Induktion auf transkriptioneller Ebene untersucht. Von Behandlungen mit Itaconat und dessen Derivaten konnte gezeigt werden, dass es die Sekretion von CCL2 und Interleukin-1 β hemmen und so inflammatorische Prozesse dämpfen kann^{52,53}. Wir vermuteten in unserem Modell daher durch den kompletten Wegfall von Itaconat eine Veränderung in der Produktion der beiden Zytokine und untersuchten dies mittels RNA-Quantifizierung im Nierenkortex nach NTN-Induktion. Interessanterweise reduzierte die Abwesenheit von Itaconat die Expression von Il-1b signifikant, was für eine verminderte Aktivierung myeloischer Zellen spricht⁵⁴. Auch bei Ccl2 ergab sich eine Tendenz zu einer reduzierten Expression (Abbildung 15). Diese Beobachtung widerspricht Erkenntnissen aus Therapiestudien und könnte einen Erklärungsansatz für die fehlende Veränderung der renalen Immunzellinfiltration geben. Womöglich spiegelt sich die Komplexität der Itaconat-Wirkung im Kontext der renalen Entzündung, welche schon in Abschnitt 4.3 apparent wurde, auch bei der Betrachtung des immunologischen Milieus wider.

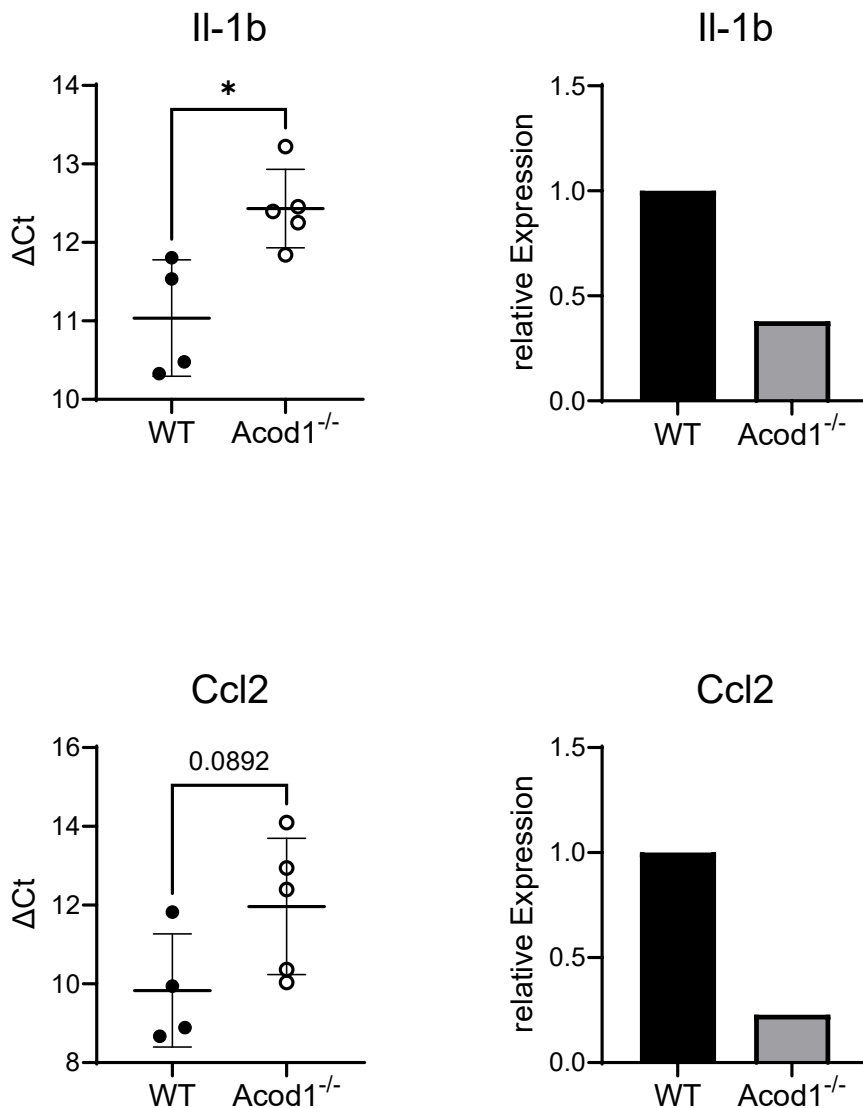


Abbildung 15: Reduktion von Zytokin-Expression im Nierenkortex durch *Acod1*-Defizienz

Ergebnisse einer qPCR-Untersuchung auf *Il1-b*- (oben) und *Ccl2*-RNA (unten) aus Nierenkortex von WT- und *Acod1*^{-/-}-Mäusen zehn Tage nach NTN-Induktion. Dargestellt sind ΔC_t -Werte nach Verrechnung mit dem Referenz-Gen *Actb* (links) und die relative Expression der beiden Gene im Vergleich zum Wildtyp berechnet nach $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode (rechts). Es zeigt sich eine signifikante Reduktion der *Il1-b*-Expression sowie eine Tendenz zu reduzierter *Ccl2*-RNA-Menge.

Zur Vertiefung der immunologischen Charakterisierung ergänzten wir eine Untersuchung der adaptiven Immunantwort. Im Verlauf der NTN kommt es zur Bildung von Antikörpern gegen das NTS im Sinne eines Fremdartigens²⁹. Es konnte ein ELISA etabliert werden, welcher die Mengen von Maus-IgG-Antikörpern spezifisch gegen Schaf-IgG im Plasma der Versuchstiere vergleichbar macht. Im Vergleich der beiden Versuchsgruppen zeigte sich zwar eine Tendenz

zu einer verstärkten IgG-Bildung in *Acod1*^{-/-}-Mäusen, jedoch war dieser Effekt durch große interindividuelle Unterschiede nicht signifikant, sodass keine eindeutigen Rückschlüsse über den Einfluss auf die adaptive Immunantwort gemacht werden konnten.

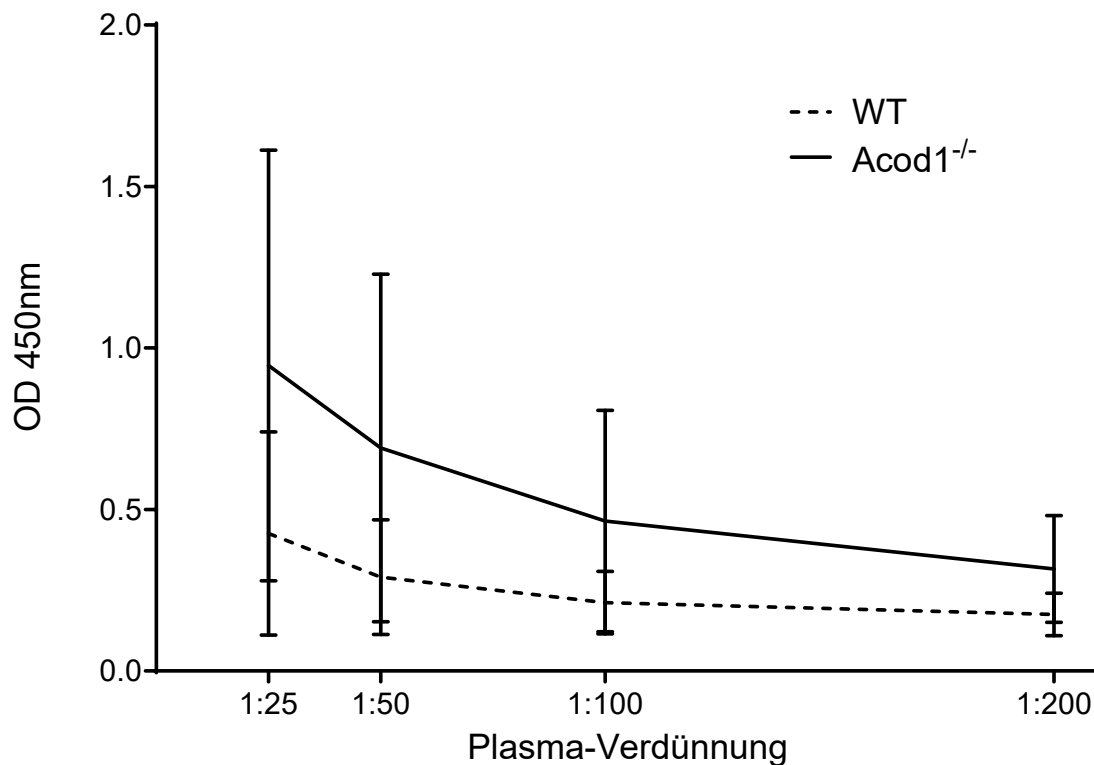


Abbildung 16: Charakterisierung der adaptiven Immunantwort mittels Anti-Schaf-IgG-ELISA
 Anti-Schaf-IgG-ELISA aus Plasma von WT- und *Acod1*^{-/-}-Mäusen zehn Tage nach NTN-Induktion. Gezeigt werden Mittelwerte und Standardabweichungen der optischen Dichte (OD) nach Farbreaktion als Parameter für die vorliegende Antikörpermenge in verschiedenen Plasma-Verdünnungen. Erkennbar werden große interindividuelle Unterschiede mit einer nicht signifikanten Tendenz zu gesteigerten Anti-Schaf-IgG-Mengen in *Acod1*^{-/-}-Mäusen.

4.5. Albuminurie und renale Immunzellinfiltration bleiben in *Acod1*-Knochenmarkchimären unverändert

In den bisher gezeigten Experimenten wurde der Einfluss eines Ganzkörper-Knockouts von *Acod1* mittels *Acod1*^{-/-}-Maus untersucht. Um eine Differenzierung zwischen Funktionen von ACOD1 in Immunzellen und anderen Körperzellen vornehmen zu können, wurde ein Versuchsaufbau zum Knochenmarktransfer zwischen verschiedenen transgenen Mauslinien etabliert. Resultierende Tiere waren Chimäre mit wildtypischen Körperzellen und transferiertem Knochenmark aus *Acod1*^{-/-}- oder WT-Mäusen.

Als Empfänger wurden CD45.1-Mäuse verwendet. Diese tragen im Vergleich zu den anderen experimentellen Tieren (CD45.2) eine andere Isoform des CD45 Oberflächenmarkers. Hierdurch war innerhalb der CD45 exprimierenden Zellen eine Differenzierung zwischen Empfänger-eigenen und mittels Knochenmarktransfer übertragenen Zellen möglich. Nach Bestrahlung von insgesamt 16 Empfänger-Mäusen erfolgte der Transfer von Knochenmark, welches entweder aus WT- oder *Acod1*^{-/-}-Mäusen gewonnen wurde. Nach sechs Wochen zur Regeneration von Immunzellen aus transferiertem Knochenmark erfolgte eine Blutentnahme zur Chimärismus-Kontrolle. Hier konnte in allen Tieren, die für weitere Experimente genutzt wurden, ein Chimärismus von über 95 % der CD45+ Zellen bestätigt werden (repräsentative Auswertung in Abbildung 17), sodass hier von einem erfolgreichen Knochenmarktransfer ohne relevante Residuen gesprochen werden kann.

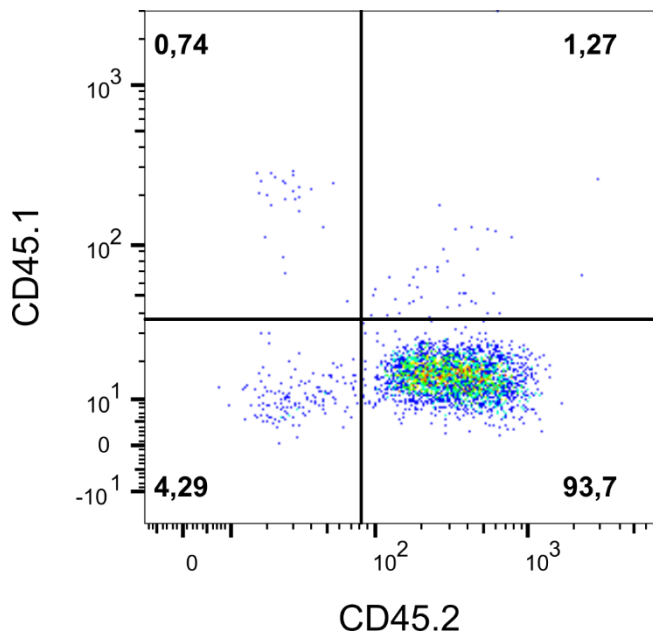


Abbildung 17: Chimärismus-Kontrolle nach Knochenmark-Rekonstitution

Repräsentative FACS-Analyse von Blut-Leukozyten aus einem CD45.1-Empfängertier, welches nach Knochenmarkablation mit Knochenmarkzellen aus einem CD45.2-Spendertier rekonstituiert wurde, sechs Wochen nach Knochenmarktransfer. Nach vorab-Gating auf Einzelzellen mit Leukozyten-typischer Größe erfolgte die Darstellung nach CD45.1- und CD45.2-Positivität. Annotiert sind prozentuale Anteile an der Gesamtpopulation. Mit 93,7 % CD45.2+ gegenüber 0,74 % CD45.1+ ergibt sich in diesem Beispiel eine Chimärismusquote von $93,7/(0,74+93,7)=99,22\%$.

Im Anschluss an den erfolgreichen Knochenmarktransfer erfolgte eine NTN-Induktion in insgesamt 7 WT in CD45.1 Chimären (Δ WT) und 9 *Acod1*^{-/-} in CD45.1 Chimären (Δ *Acod1*^{-/-}). Analog zum vorherigen Versuchsteil erfolgte die regelmäßige Entnahme von Urinproben zur

Bestimmung der AKR. Hierbei zeigte sich zu keinem Zeitpunkt des Krankheitsverlaufs ein Unterschied zwischen den experimentellen Gruppen (Abbildung 18).

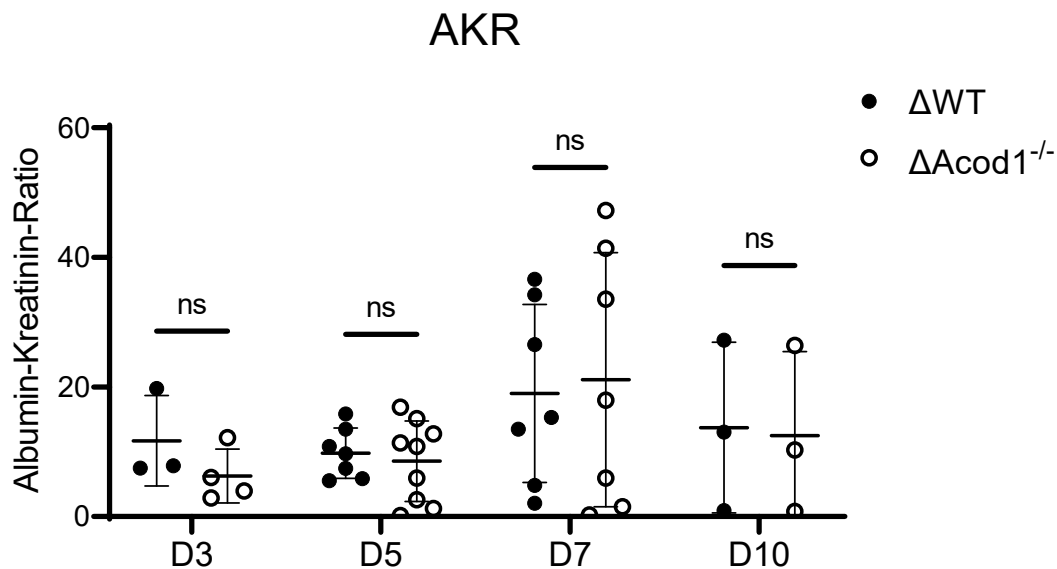


Abbildung 18: *Acod1*-Knochenmarkchimärismus beeinflusst nicht die Albuminurie in der NTN. Albumin-Kreatinin-Ratio im Urin von Δ WT- und Δ Acod1^{-/-}-Mäusen an den Tagen drei, fünf, sieben und zehn nach Induktion von NTN. Es zeigte sich in beiden Versuchsgruppen eine deutliche Albuminurie, die an Tag fünf die maximale Ausprägung erreicht. Es zeigt sich an keinem der untersuchten Tage ein signifikanter Unterschied der Albuminurie. An Tag zehn gelang es bei sechs Tieren nicht, eine ausreichende Menge Urin für die Analysen zu gewinnen.

Zur genaueren Charakterisierung des inflammatorischen Geschehens erfolgte auch in diesem Versuchsteil die durchflusszytometrische Quantifizierung der zuvor genannten Immunzellpopulationen. Es zeigte sich im Vergleich zu den Tieren, welche keinem Knochenmarktransfer unterzogen wurden, ähnliche Werte in der Anzahl der Gesamt-Immunzellen. Beim Vergleich zwischen Δ WT- und Δ Acod1^{-/-} konnte weder in Bezug auf absolute Immunzellpopulationen noch in der prozentualen Verteilung der Immunzellsubtypen signifikante Unterschiede nachgewiesen werden.

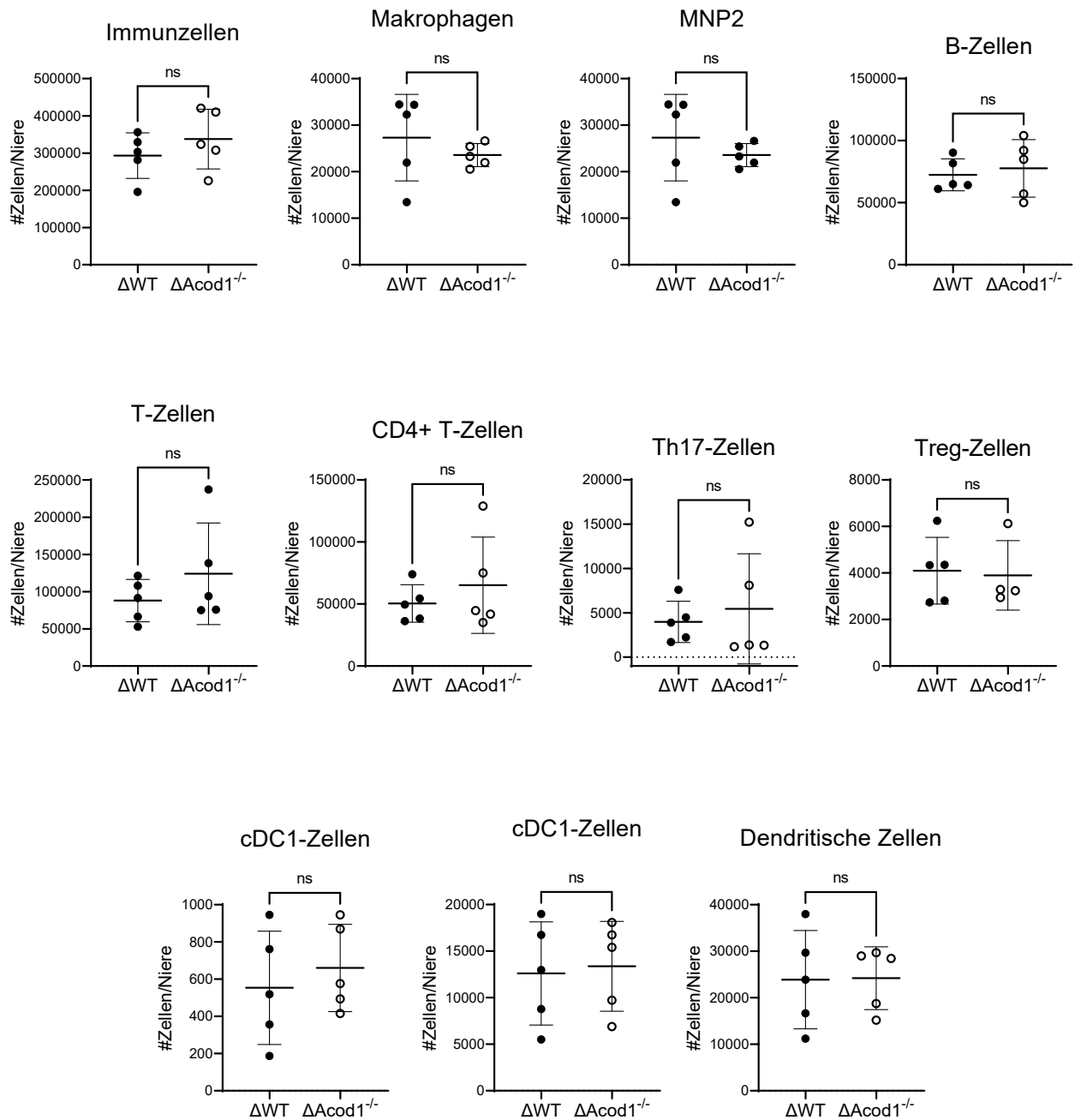


Abbildung 19: *Acod1*-Knochenmarkchimärismus beeinflusst nicht die renale Immunzellinfiltration in der NTN

Quantitative Untersuchung der in Abbildung 8 und 13 beschriebenen Immunzellpopulationen in Nieren von Δ WT- und Δ Acod1^{-/-}-Mäusen zehn Tage nach NTN-Induktion. Zellzahlen wurden über Normalisierungs-Beads auf die Anzahl von Zellen pro Niere normalisiert und verglichen. Im Vergleich zu wildtypisch rekonstituierten Tieren zeigte sich in keiner untersuchten Population ein signifikanter Unterschied durch *Acod1*-Defizienz.

Zusammenfassend ließ sich in diesem Versuchsteil zeigen, dass auch durch den Transfer *Acod1*-defizienter hämatopoetischer Stammzellen keine Veränderung der renalen Immunzellinfiltration zu induzieren war. Dies unterstützte unsere bisherigen Ergebnisse, dass ein Verlust von ACOD1 weder unter physiologischen Bedingungen noch im Mausmodell der Glomerulonephritis einen signifikanten Effekt auf renale Immunzellen zu haben scheint. Dies zeigt auch die Tatsache, dass in den Parametern zur Nierenfunktion im Gegensatz zum Ganzkörperknockout, keine Unterschiede zwischen den experimentellen Gruppen nachweisen ließen. Dies unterstreicht die Vermutung, dass der Itaconat-Stoffwechsel primär einen relevanten Einfluss auf die Integrität von glomerulären oder tubulären Zellstrukturen in den Nieren haben könnte.

4.6. ACOD1 beeinflusst den Glutathion- und Laktat-Stoffwechsel des Nierenkortex in der Glomerulonephritis

Zur Aufrechterhaltung ihrer physiologischen Funktion sind Nierenzellen auf einen beachtlichen mitochondrialen Energieumsatz angewiesen⁵⁵. Dies trifft insbesondere auf die proximalen Tubuluszellen zu, die zahlreiche energieintensive Transportprozesse aufrechterhalten müssen. Im Gegensatz dazu sind Podozyten, die wesentliche Komponente des Nierenfilters, eher von anaerober Glykolyse abhängig, wie kürzliche Untersuchungen nahelegen⁵⁶.

In den vergangenen Jahren konnte in einer Vielzahl wissenschaftlicher Arbeiten zudem gezeigt werden, dass auch Immunzellen in besonderer Weise funktionell abhängig von einer raschen Anpassung des Metabolismus sind⁵⁷. Ein inflammatorisches Milieu, wie es in dem Modell der experimentellen GN im Nierengewebe induziert wird, sollte weitreichende Veränderungen auf den Metabolismus von Immunzellen aber auch sekundär auf Zellen des Nierengewebes haben.

Um die Frage zu adressieren, wie ACOD1 die Regulation des Metabolismus in der Erkrankung beeinflusst, analysierten wir das Metabolom des Nierencortex von WT- und *Acod1*^{-/-}-Mäusen an Tag sieben nach NTN-Induktion im Vergleich zu gesundem, wildtypischen Nierenkortex. Die Analyse von vier bzw. drei Tieren pro Kondition ergab weitreichende Unterschiede während der Inflammation. Visualisiert wird dies durch eine Hauptkomponentenanalyse (Principal Component Analysis; PCA) (Abbildung 20), welche die Vielzahl der gemessenen Metabolite in zwei Variablen (Hauptkomponenten PC1 und PC2) zusammenfasst und somit zweidimensional darstellbar macht. Ersichtlich wird hierbei, dass Individuen einer experimentellen Gruppe in beiden Hauptkomponenten wenig variabel sind und in der

zweidimensionalen Darstellung nah zusammen liegen („clustern“), was für eine signifikante Beeinflussung des Metaboloms durch die experimentellen Konditionen spricht. Zwischen beiden experimentellen Gruppen sind allerdings in beiden Hauptkomponenten deutliche Unterschiede abzusehen, was in diesem Ansatz bedeutet, dass sowohl die Induktion der Gewebsinflammation, als auch die ACOD1-Defizienz ausgeprägte metabolische Unterschiede bewirken. Augenscheinlich wird, dass die Inflammation durch NTN beide genetischen Gruppen entlang von PC1 zu verschieben scheint. Der Unterschied zwischen WT- und *Acod1*^{-/-}-Mäusen wird vor allem in PC2 deutlich.

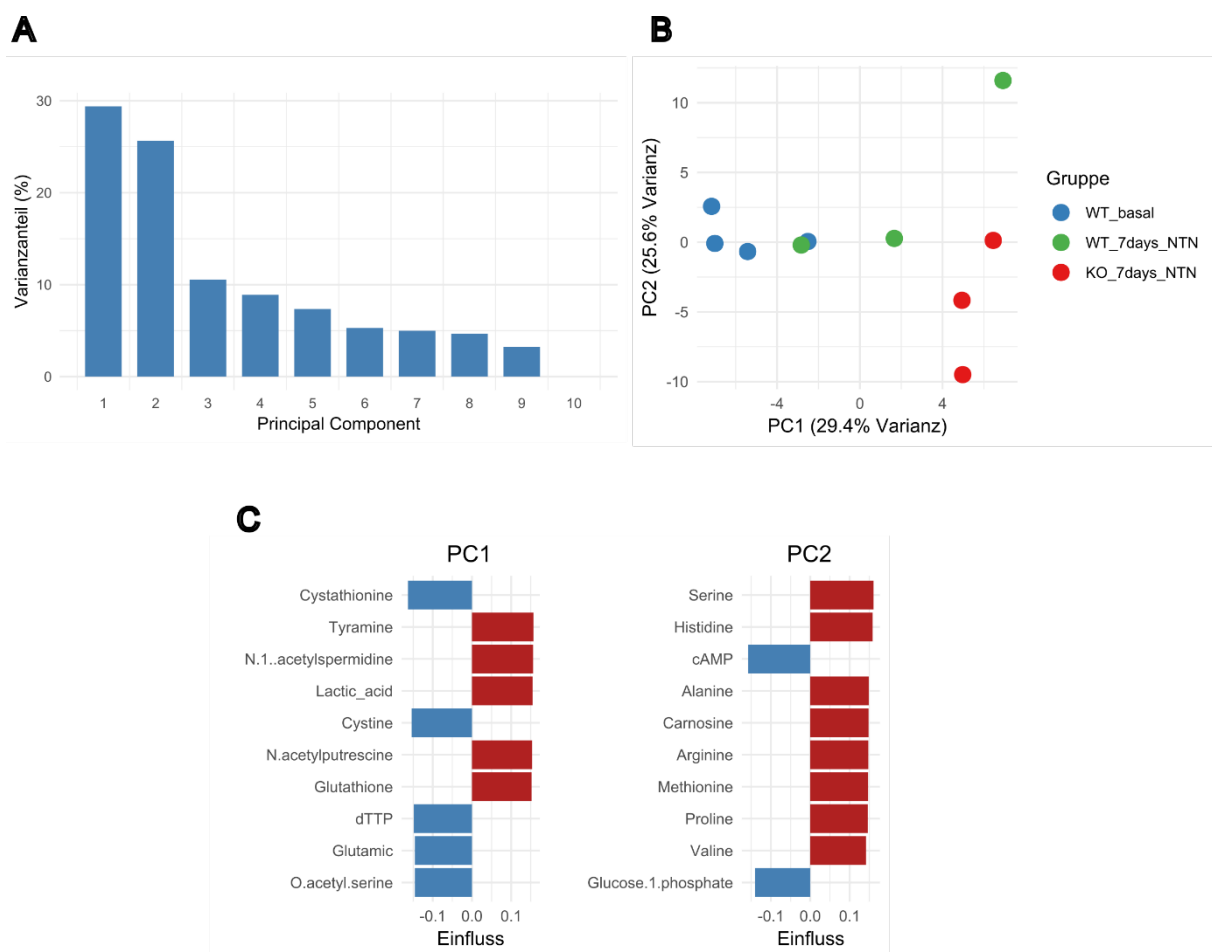


Abbildung 20: Distinkte Effekte von NTN und *Acod1*-Defizienz in renalem Metabolom

Hauptkomponentenanalyse der 108 quantifizierten Metabolite aus Nierencortex von gesunden WT-Tieren (WT_basal), WT-Tieren während der NTN (WT_7days_NTN) und *Acod1*^{-/-}-Tieren während der NTN (KO_7days_NTN). Nach Analyse mittels Singulärwertzerlegung (prcomp-Befehl im R Stats-Paket Version 3.6.2) zeigte sich der mit Abstand größte Varianzanteil in den Hauptkomponenten PC1 und PC2 (**A**). In **B** Darstellung der PCA-Analyse als Streudiagramm in PC1 und PC2. Es zeigt sich eine Gruppierung der Individuen nach experimentellen Gruppen. Zudem scheinen NTN-Effekte vornehmliche Regulationen in Richtung PC1 und ACOD1-

Effekte am ehesten in Richtung PC2 hervorzurufen. In **C** Darstellung der zehn Top-Loadings (diejenigen Variablen, die am stärksten zu einer Hauptkomponente beitragen) von PC1 und PC2.

Nachdem die PCA-Auswertung die Validität der metabolomischen Daten bestätigte, erfolgte die Auswertung auf Ebene einzelner Metabolite. Um statistisch signifikant regulierte Metabolite zu finden, wurden die Daten zunächst gefiltert. Abbildung 21 zeigt Metabolite, die anhand von einem FDR-korrigierten p-Wert $<0,05$ im einfaktoriellen ANOVA-Test in mindestens einer der experimentellen Gruppen signifikant verändert waren. Insgesamt fiel auf, dass die Dysregulation in *Acod1*^{-/-}-Tieren im Vergleich zu gesunden WT-Tieren stets stärker war als bei erkrankten WT-Tieren. In vielen Fällen war bereits durch die NTN ein signifikanter Unterschied zu erkennen, der sich in der *Acod1*^{-/-}-Gruppe weiter intensivierte. So konnte beispielsweise eine Laktat-Erhöhung als charakteristisches Zeichen der renalen Inflammation festgestellt werden, die sich in der *Acod1*-Defizienz noch weiter verstärkt zeigte. Ein ähnliches Muster war bei der Erhöhung von 5-Aminoimidazol-4-carboxamid-1-beta-D-ribofuranosyl-5'-monophosphat (AICAR), Glutathion und N1-Acetylspermidin sowie bei der Erniedrigung von Cystathionin, Cystin, Glutamat, Taurin und 5-Oxoprolin zu erkennen. Die Veränderung des Glutathion-Stoffwechsels hin zur Akkumulation größerer Mengen Glutathion kann im Sinne von verstärktem oxidativem Stress gewertet werden. Dies spricht dafür, dass Itaconat auch im Kontext der renalen Inflammation protektiv gegen oxidativen Stress wirkt und so Entzündungsreaktionen dämpfen könnte.

Neben den genannten Effekten gab es Veränderungen, die allein für die Gruppe der *Acod1*^{-/-}-Tiere charakteristisch waren und nicht durch NTN allein hervorgerufen wurden. So fällt auf, dass es einen relevanten Anstieg von Aconitat und Citrat gab, was einen metabolischen Rückstau bei fehlender Verstoffwechslung von Aconitat zu Itaconat widerspiegelt. Von Itaconat ist ein hemmender Effekt auf die Succinat-Dehydrogenase bekannt. Bei fehlender Hemmung wäre eine verstärkte Verstoffwechslung von Succinat zu Fumarat zu vermuten. Entgegengesetzt hierzu stellten wir im Kontext des entzündeten Nierencortex einen Anstieg von Succinat bei *Acod1*-Defizienz fest. Womöglich ist dies im Rahmen des beschriebenen Anfalls von Aconitat zu erklären, welches in Abwesenheit von ACOD1 über α -Ketoglutarat zu Succinat verstoffwechselt werden kann.

Signifikant regulierte Metaboliten

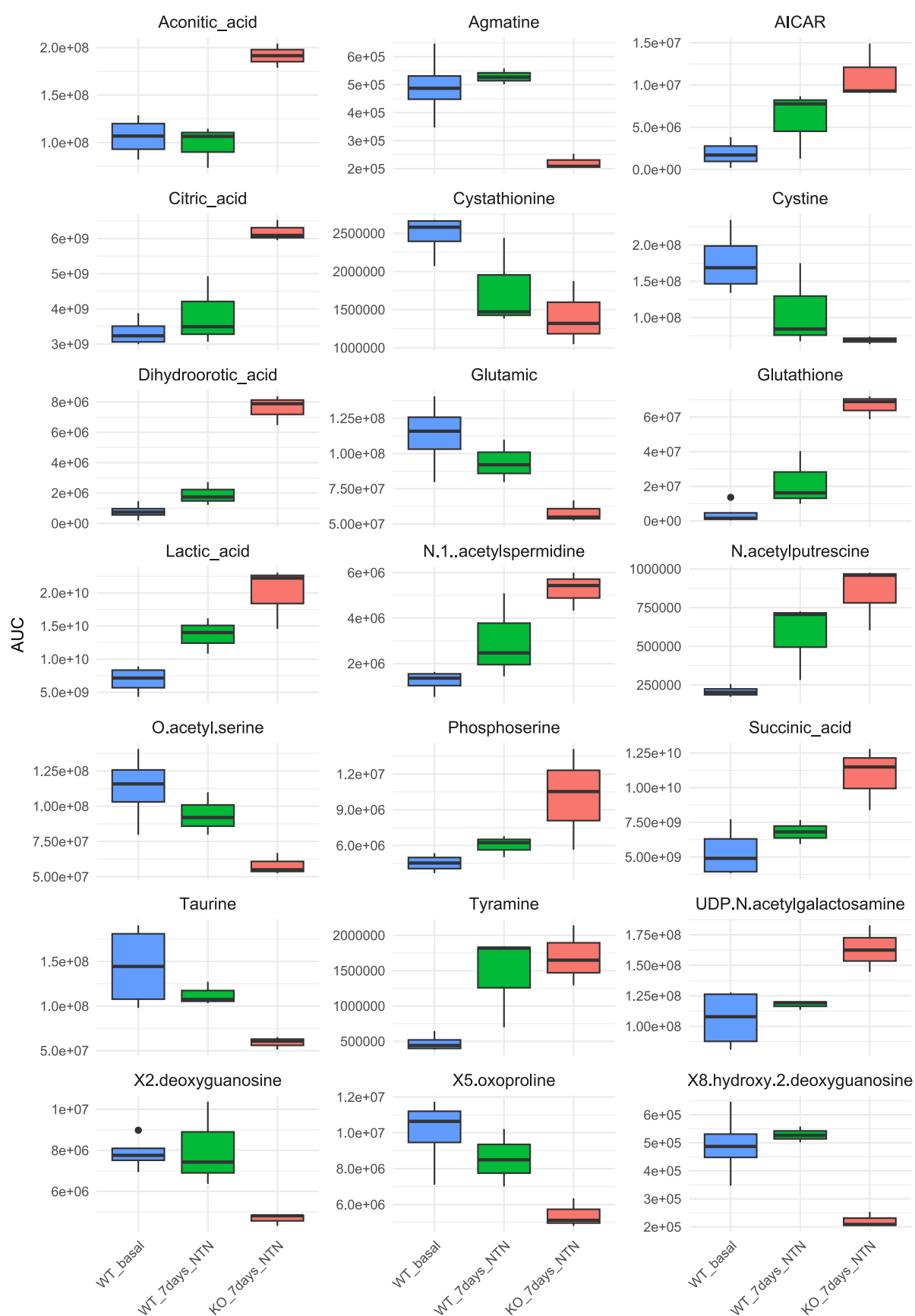


Abbildung 21: Signifikante metabolische Dysregulationen durch NTN und *Acod1*-Defizienz

Kastendiagramme der normalisierten AUC von analysierten Metaboliten aus Nierencortex von gesunden WT-Tieren (WT_basal), WT-Tieren während der NTN (WT_7days_NTN) und *Acod1*^{-/-}-Tieren während der NTN (KO_7days_NTN) gefiltert nach signifikanter Regulation in mindestens einer Versuchsgruppe (einfaktorieller ANOVA, FDR-korrigierter p-Wert <0,05).

Zusammenfassend gelang durch die metabolomische Untersuchung des Nierencortex eine Charakterisierung der metabolischen Veränderungen während der NTN auf Ebene des Gesamtgewebes. Es zeigten sich Veränderungen des Glutathion-Stoffwechsels, die durch die Abwesenheit von *Acod1* zusätzlich verstärkt wurden und aggravierten oxidativen Stress widerspiegeln könnten. Im Bereich des Citratzyklus zeigte sich ein nachvollziehbarer Rückstau zu Citrat sowie eine unerwartete Erhöhung der Succinat-Mengen.

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle des Immunmetaboliten Itaconat und seines synthetisierenden Enzyms ACOD1 in der Pathogenese der Glomerulonephritis unter Verwendung eines *Acod1*-Knockouts untersucht. Erstmals konnte so der Einfluss des metabolischen Signalmoleküls auf die Gewebshomöostase der Niere analysiert werden. Unsere Untersuchungen im Mausmodell der nephrotoxischen Nephritis (NTN) haben gezeigt, dass ACOD1 einen negativen Einfluss auf die Integrität der glomerulären Filtrationsbarriere hat. Die immunologische Phänotypisierung ergab in diesem Krankheitskontext keinen wesentlichen Einfluss von ACOD1 auf renale Immunzellen. Die histologische Beurteilung zeigt einen eher protektiven Effekt von *Acod1* auf die glomeruläre Struktur.

5.1. *Acod1* in der renalen Gewebshomöostase unter physiologischen Bedingungen

Unter Basalbedingungen zeigten *Acod1*^{-/-}-Mäuse weder Veränderungen der glomerulären Filtration noch der renalen Immunzellkomposition. Dies zeigt, dass Itaconat in der gesunden Niere nicht essenziell für den Erhalt der grundlegenden Funktionen ist. Aus physiologischer Sicht erfüllen die Nierenfiltration und -rückresorption anspruchsvolle metabolische Aufgaben, die von zahlreichen Metaboliten in einem komplexen Zusammenspiel verschiedener Zelltypen abhängen. Unsere Daten lassen vermuten, dass ACOD1 für die physiologischen metabolischen Vorgänge der Niere verzichtbar ist.

Dies ist insbesondere bemerkenswert, da das Nierenparenchym auch unter physiologischen Bedingungen von einem Netzwerk residenter Immunzellen, vorwiegend bestehend aus Makrophagen und Dendritischen Zellen, durchzogen wird. Dieses Netzwerk liegt im Bereich der intertubulären Kapillaren, d.h. auf der abluminalen Seite der Tubuli und periglomerulär um die Bowman-Kapsel und trägt zur Immunüberwachung, Abwehr gegen Krankheitserreger und Gewebsregeneration bei⁴⁷. Mögliche Funktionen sind die Überwachung des Proteintransports in das Niereninterstitium und die Einleitung einer Immunantwort, falls immunogene Proteine wie Immunkomplexe erkannt werden⁵⁸. Obwohl Itaconat besonders für Makrophagen wichtige regulatorische Funktionen zugeschrieben werden, scheinen residente Nieren-Makrophagen im ruhenden Funktionszustand unabhängig von *Acod1* zu agieren.

5.2. Die Rolle von *Acod1* während der glomerulären Entzündungsreaktion

Im Vergleich zum physiologischen Zustand ändern Nierenzellen, residente Immunzellen und infiltrierende Immunzellen im Falle einer Inflammation vermutlich transkriptionelle und metabolische Muster. Nachdem wir nachweisen konnten, dass ACOD1 für die Aufrechterhaltung der physiologischen Nierenfunktion verzichtbar ist, untersuchten wir den *Acod1*-Knockout in der experimentellen GN. Obwohl Itaconat in Entzündungsmodellen anderer Organe überwiegend anti-inflammatorische Eigenschaften hat, zeigte unser NTN-Modell eine weniger entscheidende Wirkung auf renale Immunzellen:

Acod1^{-/-}-Mäuse zeigten in der semiquantitativen Auswertung nach histologischer Aufarbeitung in der NTN einen schwereren strukturellen Schaden im Bereich der Glomeruli. Zu vermuten wäre, dass ACOD1 auch in diesem Entzündungsmodell eine anti-inflammatorische Wirkung ausübt, die sich protektiv auf glomeruläre Strukturen auswirkt. Quantitative Untersuchungen von funktionellen Parametern wie AKR und BUN spiegelten die Ergebnisse aus der Histologie allerdings nicht wider. Hier ließ sich sogar ein robuster protektiver Effekt des Knockouts auf die glomeruläre Filtrationsbarriere an mehreren Zeitpunkten nachweisen. Auch die umfassende Charakterisierung des immunologischen Milieus konnte den vermuteten Effekt auf die strukturelle Schädigung nicht stützen. Erwartete quantitative Unterschiede in Immunzellpopulationen blieben aus. Insbesondere war zahlenmäßig kein Unterschied in der Anzahl von Makrophagen zu erkennen. Die Untersuchung von pro-inflammatorischen Zytokinen auf transkriptioneller Ebene zeigte entgegen unserer Erwartung reduzierte Expressionen in der *Acod1*-Defizienz. Insbesondere die verminderte Transkription von Il-1b in *Acod1*^{-/-}-Tieren spricht für eine reduzierte inflammatorische Aktivität von Zellen der myeloischen Reihe⁵⁴. Weder ein funktionelles noch ein immunologisches Korrelat zu den aggravierten histologischen Schädigungen konnte also ausgemacht werden. Es ist zu vermuten, dass das Netzwerk renaler Makrophagen und dendritischer Zellen gewebsspezifische Unterschiede in der Abhängigkeit von Itaconat aufweist und im Gegensatz zu residenten Zellen anderer Organe wenig Regulation durch diese metabolische Achse erfährt. Die ausbleibenden immunologischen Unterschiede in *Acod1*^{-/-}-Knochenmarkchimären unterstützten diese These zusätzlich.

5.3. Die gewebespezifische Wirkung von ACOD1 im Kontext der glomerulären Filtrationsbarriere

Die Untersuchung während der NTN in Zusammenschau mit den Experimenten unter Verwendung von Knochenmarkchimären haben gezeigt, dass ACOD1 neben immunologischen Prozessen auch parenchymale Zellen, insbesondere Podozyten oder Tubuluszellen, in Stresssituationen zu beeinflussen scheint. Der protektive Effekt des *Acod1*-Knockouts auf die Proteinurie ließ eine Immunzell-unabhängige Funktion von ACOD1 vermuten, was mit der unbeeinflussten Proteinurie in Knochenmarkchimär-Experimenten bestätigt werden konnte. Unsere Experimente haben gezeigt, dass sich die Abwesenheit von Itaconat protektiv auf die Integrität der glomerulären Filtrationsbarriere auswirkt und weiterhin, dass dieser Effekt unabhängig von ACOD1 in infiltrierenden Immunzellen ist. Diese Erkenntnis erweitert das Verständnis der regulatorischen Prozesse in Zellen, die maßgeblich für die Aufrechterhaltung dieser Barriere verantwortlich sind. Es ist zu vermuten, dass Podozyten, deren Strukturveränderung in Stresssituationen zu Albuminurie führt, empfindlich auf metabolische Veränderungen durch Itaconat reagieren.

Die durchgeführten metabolischen Analysen lieferten wichtige Einblicke in die Veränderungen des renalen Stoffwechsels während der experimentellen GN. Es fanden sich Anzeichen für oxidativen Stress in Verbindung mit einem Anstieg der Laktat-Konzentrationen. Diese Entzündungseffekte zeigten sich in *Acod1*^{-/-}-Tieren noch ausgeprägter. Es ist zu folgern, dass Itaconat dämpfend auf metabolische Dysregulationen in der Entzündungsreaktion wirkt. In unserem Modell der akuten Nephritis konnten wir zeigen, dass sich die dämpfende metabolische Wirkung von ACOD1 allerdings nicht in funktionellen Parametern widerspiegelt.

Neben den genannten Dysregulationen zeigte die *Acod1*-Defizienz einige charakteristische Effekte auf Metabolite des Citratzyklus. Ein vermehrter Anfall von Aconitat, Citrat und Succinat erweitern das Verständnis der nierenspezifischen Rolle von Itaconat.

5.4. Limitationen der Studie

Trotz eindeutiger Effekte im murinen NTN-Modell muss dessen Übertragbarkeit auf menschliche Pathologien stets kritisch hinterfragt werden. Trotz seiner weiten Verbreitung in der nephrologischen Forschung weist das NTN-Modell einige Limitationen auf, die bei der Interpretation der hier erzielten Forschungsergebnisse berücksichtigt werden müssen. So präsentieren Mäuse in der NTN recht homogen und akut verlaufende Glomerulonephritiden, wohingegen humane Krankheitsbilder interindividuell unterschiedliche Präsentationen von

subakut-chronischen bis rasch progredienten Verläufen aufweisen⁵⁹. Bezüglich immunologischer Mechanismen ist zu beachten, dass bei der NTN ein exogenes Antigen verabreicht wird, um eine Autoimmunität zu imitieren, wohingegen humane Krankheitsbilder primär auf autoreaktiven Lymphozyten basieren⁶⁰. Erkenntnisse aus dem Tiermodell bedürfen vor der Implikation in der Humanmedizin also grundsätzlich einer Validierung im Kontext der menschlichen Erkrankung.

Die verwendeten Tiermodelle zur Untersuchung der nierenspezifischen ACOD1-Funktion weisen zudem selbst Limitationen auf. Verwendet wurde ein Ganzkörper-Knockout. Dies machte eine Differenzierung der Effekte auf verschiedene Zelltypen schwierig. So kann eine podozytenspezifische Wirkung zwar vermutet werden, ist allerdings in dem Kontext zu sehen, dass alle umgebenden Zellen ebenfalls von einer *Acod1*-Defizienz betroffen waren. Zur Untersuchung immunzellspezifischer Funktionen fanden wir mit knochenmarkchimären Tieren eine Annäherung. Zu betonen ist hierbei allerdings, dass die Bestrahlung und Knochenmarkrekonstitution unabhängig von verwendeten Genotypen den NTN-Verlauf verändern könnten. So ist schwer zu beurteilen, ob das transplantierte Immunsystem in einem ähnlichen Maße auf Fremddantigene in der NTN reagieren kann oder ob immunologische Effekte in Gänze verändert ablaufen. Zum anderen beziehen sich die Chimärismus-Experimente auf die Gesamtheit immunologischer Zellen. Es lässt sich demnach nur schwer eine Aussage über dezidierte Effekte auf Immunzellpopulationen geben, die in ihrer Funktion in der GN bekanntermaßen zellspezifische Rollen übernehmen.

Unsere Metabolom-Analysen lieferten Einblicke in die Veränderung von Stoffwechselprozessen während der NTN. Die metabolische Programmierung von Immunzellen hat sich über die vergangenen Jahre als äußerst komplex herausgestellt. So konnten neben Unterschieden zwischen Immunzellpopulationen vermehrt gewebs- und krankheitsspezifische Mechanismen identifiziert und therapeutisch nutzbar gemacht werden⁶¹. Die Ergebnisse unserer Studie beruhten währenddessen auf Gesamtkortex-Proben, wodurch zelltypspezifische Stoffwechselveränderungen maskiert werden könnten. Die Niere ist architektonisch komplex und besteht aus Zelltypen mit ausgeprägten funktionellen Unterschieden. So betrifft das verwendete Krankheitsmodell vor allem glomeruläre Zellen und Leukozyten. Die überwiegende Anzahl von Zellen des Nierenkortex wird allerdings von metabolisch hoch-aktiven Tubulus-Epithelzellen ausgemacht. Diese Zellen sind vermutlich für den Großteil der analysierten Metabolite verantwortlich und verwischen so mutmaßlich krankheitsspezifische Effekte. Die zellspezifische Analyse metabolischer und transkriptioneller Effekte wäre eine wichtige Perspektive. Im Folgenden werde ich auf mögliche Implikationen zellspezifischer Untersuchungen für zukünftige Forschungsprojekte eingehen.

5.5. Zukunftsperspektiven und Bedeutung für die Forschung

Die Ergebnisse eröffnen mehrere vielversprechende Forschungsrichtungen für zukünftige Studien. Zunächst ergeben sich Forschungsfragen für das hier verwendete Modell. Von Interesse wäre die genauere Untersuchung der glomerulären Filtrationsbarriere unter NTN-Einfluss. Hierzu könnte ein hochauflösendes Mikroskopieverfahren unter Verwendung der STED-Technologie (Stimulated Emission Depletion) zur Visualisierung der Schlitzmembran-Integrität genutzt werden. Durch den Einsatz dieser Methode konnten wir in anderen Projekten bereits subtile Unterschiede der Schlitzmembran-Schädigung im NTN-Modell visualisieren und quantifizieren⁶². Dieses Verfahren zeigt sich hoch-sensitiv für podozytäre Schädigungen und könnte aufschlussreiche Ergebnisse zu den vermuteten Podozyten-spezifischen Itaconat-Wirkungen liefern. Denkbar wäre zudem eine Visualisierung der Filtrationsbarriere mittels Elektronenmikroskopie. In diesem Rahmen wäre begleitend hierzu die histologische Aufarbeitung der knochenmarkchimären Versuchstiere wünschenswert. Dies würde uns in der Vermutung bestärken, dass Itaconat nierenspezifische Wirkungen hat.

Die Entwicklung zellspezifischer *Acod1*-Knockouts in Podozyten mithilfe des Cre-lox-Systems würde es ermöglichen, die zellautonomen Wirkungen von Itaconat detailliert aufzuklären und so potenzielle therapeutische Zielstrukturen zu identifizieren. In-vitro-Modelle mit primären Podozyten könnten als Brückentechnologie erste Hinweise auf die zellspezifische Rolle von *Acod1* in Podozyten geben.

Auch um die Wirkung von Itaconat auf einzelne Immunzellpopulationen zu untersuchen, wären zellspezifische Knockouts über Cre-lox-Systeme ein vielversprechender Ansatz. So konnte für die NTN die Wichtigkeit von T-Zell-Aktivierung gezeigt werden. Ein T-Zell-spezifischer *Acod1* Knockout beispielsweise in Form einer *Acod1* flox/CD4 Cre Maus könnte das regulatorische Potential von Itaconat auf die T-Zell-Aktivität prüfen.

Pharmakologische Itaconat-Derivate, darunter Dimethylitaconat, konnten in anderen Krankheitsmodellen bereits Erfolge durch die Modulierung von Immunsignalwegen feiern. Unsere Studie weist allerdings auf eine ambivalente Rolle von Itaconat in der renalen Entzündung hin. Sollte sich bestätigen, dass eine *Acod1*-Defizienz protektive Einflüsse auf Podozyten haben sollte, wäre eine systemische Applikation von Itaconat-Derivaten bei glomerulären Entzündungen kritisch zu sehen. Denkbar wären Applikationswege mit zielgerichteter Freisetzung von Itaconat-Derivaten zu Immunzellen. Auch Experimente mit prä-Konditionierungen von Immunzellen durch Itaconat ex-vivo wären denkbar.

Unsere Ergebnisse weisen auf charakteristische transkriptionelle und metabolische Veränderungen des Nierengewebes durch Itaconat hin. Um diese Erkenntnisse therapeutisch nutzbar zu machen, wäre es von hohem Interesse zu erfahren, welche Zelltypen empfindlich auf die Regulation durch Itaconat reagieren. Durch die Integration von Metabolom, Transkriptom und Proteom auf Einzelzell-Ebene könnten kompensatorische Signalwege und adaptive Regulationsmechanismen identifiziert werden, was insbesondere für translational ausgerichtete Studien von großer Bedeutung ist. Ein Immunzell-Transkriptom auf Einzelzell-Ebene während der NTN lieferte uns schon in anderen Projekten wegweisende Mechanismen⁶³ und wäre auch vor dem Hintergrund der ACOD1-Defizienz von hohem Interesse. Entsprechende Untersuchungen glomerulärer Zellen im Kontext von *Acod1*-Defizienzen oder Itaconat-Applikationen könnten wegweisende Erkenntnisse für die vermutete zellspezifische Itaconat-Wirkung liefern.

Moderne Technologien wie Einzelzell-RNA-Sequenzierung in Kombination mit Metabolom-Untersuchungen machen es möglich, zellspezifische metabolische Programmierungen im Gewebekontext zu untersuchen. Kürzlich konnten so zell- und gewebespezifische Besonderheiten in den metabolischen Bedürfnissen von alveolären Makrophagen aufgezeigt werden⁶⁴. Zur metabolischen Charakterisierung einzelner Zellen konnte in den vergangenen Jahren die Methode SCENITH (Single Cell ENergetic metabolism by profilIng Translation inHibition) etabliert werden⁶⁵. Die Untersuchung von *Acod1*^{-/-}-Tieren in der NTN mit dieser Methode könnte Erkenntnisse über die metabolische Umprogrammierung durch Itaconat in verschiedenen Immunzellpopulationen liefern.

Schließlich würde der Vergleich verschiedener GN-Modelle, etwa chronischer T-Zell-dominanter versus akuter Immunkomplex-induzierter Formen, die Kontextabhängigkeit der Itaconat-Wirkung aufzeigen und die Grundlage für präzisionsmedizinische Ansätze in der Behandlung von Glomerulopathien schaffen. Denkbar wäre beispielsweise die Untersuchung von *Acod1*^{-/-}-Tieren in einem induzierbaren Lupus-Modell durch Imiquimod-Applikation über mehrere Wochen.

5.6. Fazit

Zusammenfassend zeigt diese Studie, dass ACOD1 im Kontext der renalen Inflammation eine gewebspezifische Rolle einnimmt. Es zeigt einen negativen Einfluss auf die glomeruläre Filtrationsbarriere bei entzündlicher Schädigung, während seine Rolle in der Immunzellregulation im Modell der experimentellen Glomerulonephritis begrenzt zu sein

scheint. Die gewonnenen Daten zum renalen Metabolismus betonen die Rolle von Laktat- und Glutathion-Stoffwechsel für die entzündlichen Prozesse innerhalb der Niere. Der dämpfende Einfluss von ACOD1 auf die metabolischen Veränderungen während der Inflammation unterstreicht seine Rolle als immunologisch-metabolischer Schalter.

Unsere Ergebnisse heben die Bedeutung metabolischer Signalwege in entzündlichen Nierenschädigungen hervor und eröffnen somit Perspektiven für neue Forschungsansätze. Wir konnten aufzeigen, dass weitere Studien zur zellspezifischen Wirkung von ACOD1 im Krankheitskontext wichtige mechanistische Einblicke für die Entwicklung neuer Therapieansätze bringen könnten. Die besondere Herausforderung hierbei besteht meines Erachtens darin, die gezeigten grundlegenden Erkenntnisse aus dem Mausmodell auf den humanen Krankheitskontext zu übertragen. Neue Technologien wie Single-Cell-RNA-Sequenzierung und SCENITH liefern die Möglichkeit, metabolische Mechanismen der Glomerulonephritis im Patienten zu entziffern, um die Translation tierexperimenteller Daten für die Anwendung am Menschen zu stützen.

6. Literaturverzeichnis

- 1 Seldin and Giebisch's The Kidney. 2007 <https://shop.elsevier.com/books/seldin-and-giebischs-the-kidney/alpern/978-0-12-088488-9> (accessed July 1, 2025).
- 2 Pavenstädt H, Kriz W, Kretzler M. Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev* 2003; **83**: 253–307.
- 3 Seldin and Giebisch's The Kidney. 2007 <https://shop.elsevier.com/books/seldin-and-giebischs-the-kidney/alpern/978-0-12-088488-9> (accessed July 1, 2025).
- 4 Haraldsson B, Nyström J, Deen WM. Properties of the glomerular barrier and mechanisms of proteinuria. *Physiol Rev* 2008; **88**: 451–87.
- 5 Torra R, Lipska-Zietkiewicz B, Acke F, *et al.* Diagnosis, management and treatment of the Alport syndrome – 2024 guideline on behalf of ERKNet, ERA and ESPN. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2025; **40**: 1091–106.
- 6 Schwarz K, Simons M, Reiser J, *et al.* Podocin, a raft-associated component of the glomerular slit diaphragm, interacts with CD2AP and nephrin. *J Clin Invest* 2001; **108**: 1621–9.
- 7 Shih NY, Li J, Karpitskii V, *et al.* Congenital nephrotic syndrome in mice lacking CD2-associated protein. *Science* 1999; **286**: 312–5.
- 8 Tryggvason K, Wartiovaara J. How Does the Kidney Filter Plasma? *Physiology* 2005; **20**: 96–101.
- 9 Medzhitov R. The spectrum of inflammatory responses. *Science* 2021; **374**: 1070–5.
- 10 Couser WG. Glomerulonephritis. *Lancet* 1999; **353**: 1509–15.
- 11 Willey CJ, Coppo R, Schaefer F, Mizerska-Wasiak M, Mathur M, Schultz MJ. The incidence and prevalence of IgA nephropathy in Europe. *Nephrol Dial Transplant* 2023; **38**: 2340–9.
- 12 Ronco P, Beck L, Debiec H, *et al.* Membranous nephropathy. *Nat Rev Dis Primers* 2021; **7**: 69.
- 13 Watts RA, Mahr A, Mohammad AJ, Gatenby P, Basu N, Flores-Suárez LF. Classification, epidemiology and clinical subgrouping of antineutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated vasculitis. *Nephrol Dial Transplant* 2015; **30 Suppl 1**: i14–22.
- 14 Shoji J, Mii A, Terasaki M, Shimizu A. Update on Recurrent Focal Segmental Glomerulosclerosis in Kidney Transplantation. *Nephron* 2020; **144 Suppl 1**: 65–70.
- 15 Waldman M, Crew RJ, Valeri A, *et al.* Adult minimal-change disease: clinical characteristics, treatment, and outcomes. *Clin J Am Soc Nephrol* 2007; **2**: 445–53.
- 16 Abbasi M, Mousavi MJ, Jamalzehi S, *et al.* Strategies toward rheumatoid arthritis therapy; the old and the new. *J Cell Physiol* 2019; **234**: 10018–31.
- 17 Baker KF, Isaacs JD. Novel therapies for immune-mediated inflammatory diseases: What can we learn from their use in rheumatoid arthritis, spondyloarthritis, systemic lupus erythematosus, psoriasis, Crohn's disease and ulcerative colitis? *Ann Rheum Dis* 2018; **77**: 175–87.

- 18 Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Glomerular Diseases Work Group. KDIGO 2021 Clinical Practice Guideline for the Management of Glomerular Diseases. *Kidney Int* 2021; **100**: S1–276.
- 19 Jones RB, Tervaert JWC, Hauser T, *et al.* Rituximab versus cyclophosphamide in ANCA-associated renal vasculitis. *N Engl J Med* 2010; **363**: 211–20.
- 20 Jayne DRW, Merkel PA, Schall TJ, Bekker P, ADVOCATE Study Group. Avacopan for the Treatment of ANCA-Associated Vasculitis. *N Engl J Med* 2021; **384**: 599–609.
- 21 Furie R, Rovin BH, Houssiau F, *et al.* Two-Year, Randomized, Controlled Trial of Belimumab in Lupus Nephritis. *N Engl J Med* 2020; **383**: 1117–28.
- 22 Chen S, Tang Z, Xiang H, *et al.* Etiology and Outcome of Crescentic Glomerulonephritis From a Single Center in China: A 10-Year Review. *Am J Kidney Dis* 2016; **67**: 376–83.
- 23 Hendra H, Salama AD. Steroids as treatment for glomerulonephritis: time for a rethink. *Nephrol Dial Transplant* 2022; **37**: 1212–7.
- 24 Issa W, Njeim R, Carrazco A, Burke GW, Mitrofanova A. Role of the Innate Immune Response in Glomerular Disease Pathogenesis: Focus on Podocytes. *Cells* 2024; **13**: 1157.
- 25 Kronbichler A, Bajema I, Geetha D, Säemann M. Novel aspects in the pathophysiology and diagnosis of glomerular diseases. *Ann Rheum Dis* 2023; **82**: 585–93.
- 26 Dong Z, Dai H, Liu W, *et al.* Exploring the Differences in Molecular Mechanisms and Key Biomarkers Between Membranous Nephropathy and Lupus Nephritis Using Integrated Bioinformatics Analysis. *Front Genet* 2021; **12**: 770902.
- 27 Strizzi CT, Ambrogio M, Zanoni F, *et al.* Epitope Spreading in Immune-Mediated Glomerulonephritis: The Expanding Target. *Int J Mol Sci* 2024; **25**: 11096.
- 28 Mohamed ON, Ibrahim SA, Saleh RK, *et al.* Clinicopathological characteristics and predictors of outcome of rapidly progressive glomerulonephritis: a retrospective study. *BMC Nephrol* 2024; **25**: 103.
- 29 Hoppe JM, Vielhauer V. Induction and analysis of nephrotoxic serum nephritis in mice. *Methods Mol Biol* 2014; **1169**: 159–74.
- 30 Dixon FJ, Feldman JD, Vazquez JJ. Experimental glomerulonephritis. The pathogenesis of a laboratory model resembling the spectrum of human glomerulonephritis. *J Exp Med* 1961; **113**: 899–920.
- 31 Sheerin NS, Springall T, Carroll MC, Hartley B, Sacks SH. Protection against anti-glomerular basement membrane (GBM)-mediated nephritis in C3- and C4-deficient mice. *Clin Exp Immunol* 1997; **110**: 403–9.
- 32 Kang S, Kumanogoh A. The spectrum of macrophage activation by immunometabolism. *Int Immunol* 2020; **32**: 467–73.
- 33 Jiang H, Shi H, Sun M, *et al.* PFKFB3-Driven Macrophage Glycolytic Metabolism Is a Crucial Component of Innate Antiviral Defense. *J Immunol* 2016; **197**: 2880–90.
- 34 Zeng H, Yang K, Cloer C, Neale G, Vogel P, Chi H. mTORC1 couples immune signals and metabolic programming to establish T(reg)-cell function. *Nature* 2013; **499**: 485–90.

- 35 Mills EL, Kelly B, Logan A, *et al.* Succinate Dehydrogenase Supports Metabolic Repurposing of Mitochondria to Drive Inflammatory Macrophages. *Cell* 2016; **167**: 457-470.e13.
- 36 Gonzalez-Acera M, Patankar JV, Erkert L, *et al.* Integrated multimodel analysis of intestinal inflammation exposes key molecular features of preclinical and clinical IBD. *Gut* 2025; : gutjnl-2024-333729.
- 37 Lee CG, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, O'Brien WE. Cloning and analysis of gene regulation of a novel LPS-inducible cDNA. *Immunogenetics* 1995; **41**: 263–70.
- 38 McGettrick AF, Bourner LA, Dorsey FC, O'Neill L a. J. Metabolic Messengers: itaconate. *Nat Metab* 2024; **6**: 1661–7.
- 39 Chun HL, Lee SY, Kim K-H, Lee CS, Oh T-J, Park HH. The crystal structure of mouse IRG1 suggests that cis-aconitate decarboxylase has an open and closed conformation. *PLoS One* 2020; **15**: e0242383.
- 40 O'Neill LAJ, Artyomov MN. Itaconate: the poster child of metabolic reprogramming in macrophage function. *Nat Rev Immunol* 2019; **19**: 273–81.
- 41 Naujoks J, Tabeling C, Dill BD, *et al.* IFNs Modify the Proteome of Legionella-Containing Vacuoles and Restrict Infection Via IRG1-Derived Itaconic Acid. *PLoS Pathog* 2016; **12**: e1005408.
- 42 Lampropoulou V, Sergushichev A, Bambouskova M, *et al.* Itaconate Links Inhibition of Succinate Dehydrogenase with Macrophage Metabolic Remodeling and Regulation of Inflammation. *Cell Metab* 2016; **24**: 158–66.
- 43 Pålsson-McDermott EM, O'Neill LAJ. Gang of 3: How the Krebs cycle-linked metabolites itaconate, succinate, and fumarate regulate macrophages and inflammation. *Cell Metab* 2025; **37**: 1049–59.
- 44 Michelucci A, Cordes T, Ghelfi J, *et al.* Immune-responsive gene 1 protein links metabolism to immunity by catalyzing itaconic acid production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; **110**: 7820–5.
- 45 Nair S, Huynh JP, Lampropoulou V, *et al.* Irg1 expression in myeloid cells prevents immunopathology during M. tuberculosis infection. *J Exp Med* 2018; **215**: 1035–45.
- 46 Mills EL, Ryan DG, Prag HA, *et al.* Itaconate is an anti-inflammatory metabolite that activates Nrf2 via alkylation of KEAP1. *Nature* 2018; **556**: 113–7.
- 47 Rogers NM, Ferenbach DA, Isenberg JS, Thomson AW, Hughes J. Dendritic cells and macrophages in the kidney: a spectrum of good and evil. *Nat Rev Nephrol* 2014; **10**: 625–43.
- 48 Price JV, Russo D, Ji DX, *et al.* IRG1 and Inducible Nitric Oxide Synthase Act Redundantly with Other Interferon-Gamma-Induced Factors To Restrict Intracellular Replication of Legionella pneumophila. *mBio* 2019; **10**: e02629-19.
- 49 Shen FW, Saga Y, Litman G, *et al.* Cloning of Ly-5 cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; **82**: 7360–3.
- 50 Slot C. Plasma creatinine determination. A new and specific Jaffe reaction method. *Scand J Clin Lab Invest* 1965; **17**: 381–7.

- 51 Yue F, Cheng Y, Breschi A, *et al.* A comparative encyclopedia of DNA elements in the mouse genome. *Nature* 2014; **515**: 355–64.
- 52 Sohail A, Iqbal AA, Sahini N, *et al.* Itaconate and derivatives reduce interferon responses and inflammation in influenza A virus infection. *PLoS Pathog* 2022; **18**: e1010219.
- 53 DiBattista JA, Mehdi AZ, Sandor T. Steroid C-20 oxidoreductase activity of duck intestinal mucosa: the interrelations of the enzymatic activity with steroid binding. *Gen Comp Endocrinol* 1989; **74**: 136–47.
- 54 Xu L. The Role of Myeloid Cells in Acute Kidney Injury and Kidney Repair. *Kidney360* 2021; **2**: 1852–64.
- 55 Bhargava P, Schnellmann RG. Mitochondrial energetics in the kidney. *Nat Rev Nephrol* 2017; **13**: 629–46.
- 56 Brinkkoetter PT, Bork T, Salou S, *et al.* Anaerobic Glycolysis Maintains the Glomerular Filtration Barrier Independent of Mitochondrial Metabolism and Dynamics. *Cell Rep* 2019; **27**: 1551-1566.e5.
- 57 O'Neill LAJ, Kishton RJ, Rathmell J. A guide to immunometabolism for immunologists. *Nat Rev Immunol* 2016; **16**: 553–65.
- 58 Stamatiades EG, Tremblay M-E, Bohm M, *et al.* Immune Monitoring of Trans-endothelial Transport by Kidney-Resident Macrophages. *Cell* 2016; **166**: 991–1003.
- 59 Muhammad S. Nephrotoxic nephritis and glomerulonephritis: animal model versus human disease. *Br J Biomed Sci* 2014; **71**: 168–71.
- 60 Foster MH. Optimizing the translational value of animal models of glomerulonephritis: insights from recent murine prototypes. *Am J Physiol Renal Physiol* 2016; **311**: F487-495.
- 61 Hu T, Liu C-H, Lei M, *et al.* Metabolic regulation of the immune system in health and diseases: mechanisms and interventions. *Sig Transduct Target Ther* 2024; **9**: 268.
- 62 Schömig T, Diefenhardt P, Plagmann I, *et al.* The podocytes' inflammatory responses in experimental GN are independent of canonical MYD88-dependent toll-like receptor signaling. *Sci Rep* 2024; **14**: 2292.
- 63 Diefenhardt P, Braumann M, Schömig T, *et al.* Stimulation of Immune Checkpoint Molecule B and T-Lymphocyte Attenuator Alleviates Experimental Crescentic Glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 2023; **34**: 1366–80.
- 64 Wculek SK, Heras-Murillo I, Mastrangelo A, *et al.* Oxidative phosphorylation selectively orchestrates tissue macrophage homeostasis. *Immunity* 2023; **56**: 516-530.e9.
- 65 Argüello RJ, Combes AJ, Char R, *et al.* SCENITH: A Flow Cytometry-Based Method to Functionally Profile Energy Metabolism with Single-Cell Resolution. *Cell Metab* 2020; **32**: 1063-1075.e7.

7. Anhang

7.1. Abbildungsverzeichnis

<u>Abbildung</u>	<u>Seite</u>
1: Visuelle Projektzusammenfassung	10
2: Histologische Aspekte der Glomerulonephritis	13
3: Itaconat als immunregulatorischer Metabolit	17
4: Genotypisierung	39
5: Nachweis der Acod1-Defizienz in Lebergewebe	40
6: ACOD1 bewirkt unter basalen Bedingungen keine Veränderung der Nierenfunktion	41
7: Basale Phänotypisierung – keine histologischen Veränderungen der Niere	42
8: Immunphänotypisierung - Gating Strategie	43
9: ACOD1 bewirkt unter basalen Bedingungen keine Veränderung der renalen Immunzellpopulationen	44
10: Acod1-Knockout führt zur Reduktion der Albuminurie in der experimentellen GN	46
11: Keine Veränderung der Harnstoff-Werte in der NTN durch Acod1-Defizienz	46
12: Aggravierte Schädigung in der NTN durch Acod1-Defizienz	48
13: Immunphänotypisierung – ergänzende Gating Strategie	50
14: Quantifizierung renaler Immunzellpopulationen in der NTN	51
15: Reduktion von Zytokin-Expression im Nierenkortex durch Acod1-Defizienz	53
16: Charakterisierung der adaptiven Immunantwort mittels Anti-Schaf-IgG-ELISA	54
17: Chimärismus-Kontrolle nach Knochenmark-Rekonstitution	55
18: Acod1-Knochenmarkchimärismus beeinflusst nicht die Albuminurie in der NTN	56
19: Acod1-Knochenmarkchimärismus beeinflusst nicht die renale Immunzellinfiltration in der NTN	57
20: Distinkte Effekte von NTN und Acod1-Defizienz in renalem Metabolom	59
21: Signifikante metabolische Dysregulationen durch NTN und Acod1-Defizienz	61

7.2. Tabellenverzeichnis

<u>Tabelle</u>	<u>Seite</u>
1: Chemikalien	21
2: Antikörper	22
3: Primer	23
4: Antikörper-Kombinationen	37

8. Vorabveröffentlichungen von Ergebnissen

Keine Ergebnisse aus dieser Arbeit wurden vorab veröffentlicht. Folgende Arbeiten mit eigener Beteiligung wurden im Rahmen dieser Arbeit referenziert:

Schömig T, Diefenhardt P, Plagmann I, et al. The podocytes' inflammatory responses in experimental GN are independent of canonical MYD88-dependent toll-like receptor signaling. *Sci Rep* 2024; 14: 2292.

Diefenhardt P, Braumann M, Schömig T, et al. Stimulation of Immune Checkpoint Molecule B and T-Lymphocyte Attenuator Alleviates Experimental Crescentic Glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 2023; 34: 1366–80.