

Aus der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik  
der Universitätsmedizin der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

Expression und protektive Funktion des Zinkfingerproteins A20  
in der Nierentransplantation

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der  
Humanmedizin  
der Universitätsmedizin  
der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Victor Sabo  
aus Stuttgart

Mainz, 2025

Es gilt das Urheberrecht.

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. med. Ulrich Förstermann

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion: 04. September 2025

In liebevoller Erinnerung an meine Großeltern

„Bilde dein Wissen, denn was du im Geiste trägst, kann dir niemand rauben!“

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>VII</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>IX</b>
<b>1 Einleitung und Ziel der Dissertation .....</b>	<b>1</b>
<b>2 Theoretische Grundlagen .....</b>	<b>3</b>
2.1 Das Zinkfingerprotein A20.....	3
2.1.1 Historische Einordnung .....	4
2.1.2 Struktur und Expression des Zinkfingerproteins A20 .....	4
2.1.3 Die Rolle von A20 im NF- $\kappa$ B-Signalweg.....	5
2.1.4 Der klassische Signalweg .....	6
2.1.5 Weitere relevante Signalwege .....	8
2.1.6 Ablauf der Apoptose und Nekroptose .....	10
2.1.7 Die pathophysiologische Rolle von A20 .....	11
2.1.8 Zusammenhang zwischen B- und T-Lymphozyten und dem Zinkfingerprotein A20 .....	12
2.1.8.1 Die B-Lymphozyten .....	12
2.1.8.2 Die T-Lymphozyten.....	13
2.2 Die Nierentransplantation und die Abstoßungsreaktion .....	15
2.2.1 Prophylaktische Immunsuppression .....	17
2.2.2 Die Transplantatabstoßung.....	18
2.2.3 Die Rolle der Makrophagen bei autoimmunen Prozessen und der Nierenabstoßung.....	20
2.2.4 Systemischer Lupus erythematoses und Lupusnephritis.....	22
<b>3 Material und Methoden .....</b>	<b>23</b>
3.1 Material .....	23
3.2 Methoden .....	24
3.2.1 Studienaufbau.....	24
3.2.2 Das Patientenkollektiv.....	25

3.2.3	Die Mäuse.....	25
3.2.4	Zellisolation.....	26
3.2.4.1	Isolation humaner periphere Blutleukozyten aus EDTA-Blut .....	26
3.2.4.2	Isolation humaner Tubulusepithelzellen.....	26
3.2.4.3	Isolation humaner Makrophagen .....	27
3.2.4.4	Isolation muriner Tubulusepithelzellen.....	27
3.2.4.5	Isolation muriner Makrophagen .....	28
3.2.5	In-vitro Versuche.....	28
3.2.5.1	Kultivierung und Stimulation von Tubulusepithelzellen .....	28
3.2.5.2	Kultivierung und Stimulation von Makrophagen.....	29
3.2.6	Proteinbiochemie .....	29
3.2.6.1	Immunhistochemie aus Biopsieschnitten .....	29
3.2.6.2	Durchflusszytometrische Analysen .....	30
3.2.6.3	Western Blot .....	32
3.2.7	Nukleinsäurenbiochemie.....	33
3.2.7.1	RNA- Isolation und qPCR aus FFPE-fixiertem Gewebe .....	33
3.2.7.2	RNA- Isolation und qPCR aus Zelllysaten .....	35
3.3	Statistische Auswertung.....	36
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>36</b>
4.1	Die Rolle des Zinkfingerproteins A20 nach Nierentransplantationen .....	36
4.1.1.1	Das Patientenkollektiv .....	36
4.1.1.2	A20- Expression in Nierenbopsien bei akuter Nierenschädigung .	39
4.2	A20-mRNA Expression bei akuter Nierenschädigung und bei der Transplantatabstoßung.....	42
4.3	Durchflusszytometrische Untersuchungen aus Patientenblut .....	44
4.4	Expressionanalyse von A20 in der Lupus Nephritis (In-vitro).....	50
4.4.1	A20- RNA Induktion in humanen Tubulusepithelzellen .....	51
4.4.2	A20- Protein Induktion in humanen Tubulusepithelzellen .....	52

4.4.3	A20- RNA Induktion in humanen Makrophagen.....	53
4.4.4	A20- RNA Induktion in murinen Tubulusepithelzellen .....	55
4.4.5	A20- RNA Induktion in murinen Makrophagen.....	56
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>57</b>
5.1	These.....	57
5.1.1	Die Rolle von A20 im Rahmen der Nierentransplantatabstoßungsreaktion.....	57
5.1.2	Die A20- Expression der Lupus Nephritis .....	61
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>64</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>66</b>
	<b>Anhang.....</b>	<b>IV</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>XIII</b>
	<b>Tabellarischer Lebenslauf .....</b>	<b>XIV</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ABIN	<i>A20-bindender Inhibitor des NF-<math>\kappa</math>B-Aktivierung</i>
ABMR	<i>Antibody-Mediated Rejection</i>
ANK	<i>Ankyrin-Repeat-Domäne</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
ctrl	<i>Kontrolle</i>
CYLD	<i>Cylindromatose</i>
DBD	<i>DNA- bindende Domäne</i>
DD	<i>Death Domäne</i>
PBS	<i>Dublecco's Phosphate Buffere Saline</i>
DTT	<i>Dithiothreitol</i>
EDTA	<i>Ethylendiamintetraacetat</i>
GAPDH	<i>Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase</i>
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
IKK	<i>I<math>\kappa</math>B-Kinase-Komplex</i>
IL-1	<i>Interleukin 1</i>
ITCH	<i>Itchy E3 Ubiquitin Proteinligase</i>
I $\kappa$ B	<i>Inhibitor von NF-<math>\kappa</math>B</i>
KMZ	<i>Knochenmarkszellen</i>
LPS	<i>Lipopolysaccharid</i>
LZ	<i>Leuzinzipper</i>
MAPK	<i>Mitogen-aktivierte-Protein-Serin-Threonin-Kinase</i>
MYD88	<i>Myeloische Differenzierungsprimärantwort 88</i>
NEMO	<i>NF<math>\kappa</math>B-essentieller Modulator</i>
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear Factor of Kappa-ligth-chain-enhacer of Activated B Cells</i>
NIK	<i>NF-<math>\kappa</math>B-induzierbare Kinase</i>
NLS	<i>Nukleäre Lokalisations-Sequenz</i>
OTU	<i>Ovarialtumor Domäne</i>
PBL	<i>Periphere Blutleukozyten</i>
PBL	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>
PFA	<i>Paraformaldehyd</i>
Rel	<i>Reticuloendotheliosis Virus-Protein</i>
RHD	<i>Rel-Homologie-Domäne</i>
RIP1	<i>Rezeptorinteragierendem Protein 1</i>
RNF11	<i>Ring Finger Protein 11</i>
ROS	<i>Reaktive Sauerstoffspezies</i>
TAD	<i>Transaktivierungsdomäne</i>

TCMR.....	<i>T-Cell-Mediated-Rejection</i>
TCR.....	<i>T-Zell-Rezeptor</i>
TLR.....	<i>Toll-like-Rezeptor</i>
TNFAIP3.....	<i>Tumornekrosefaktor Alpha induced Protein 3</i>
TNFa .....	<i>Tumornekrosefaktor-alpha</i>
TRADD .....	<i>TNF-Associated-Receptor-Death-Domain</i>
TRAF2 .....	<i>TNF-Rezeptor-Associated-Factor-2</i>
uTEZ.....	<i>Tubulusepithelzellen des Urogenitaltraktes</i>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Beispielhafte Übersichtsaufnahmen eines immunhistochemischen A20-Nachweis einer Biopsie bei akutem Nierenversagen. ....	39
Abbildung 2: Erhöhte Anzahl A20-positiver Zellen in Nierenbiospien bei akutem Nierenversagen. ....	42
Abbildung 3: Verstärkte A20-Expression bei akutem Nierenversagen und einer Transplantatabstoßung. ....	43
Abbildung 4: Konstante Zahl von TH1 Zellen und Tregs vor und nach Nierentransplantation. ....	45
Abbildung 5: Konstante Zahl von A20+ T-Zellen (CD3+) vor und nach Nierentransplantation. ....	46
Abbildung 6: Konstante Zahl von A20+ TH-Zellen (CD4+) vor und nach Nierentransplantation. ....	47
Abbildung 7: Konstante Zahl von A20+ Monozyten/Makrophagen (CD11b+) vor und nach Nierentransplantation. ....	48
Abbildung 8: Konstante Zahl von A20+ B-Zellen (CD19+) vor und nach Nierentransplantation. ....	49
Abbildung 9: A20-Expression in humanen TEZ nach Stimulation mit TNFa sowie LPS/IFNy. ....	51
Abbildung 10: Verstärkte A20-Proteinexpression in TEZ nach Stimulation mit TNFa. ....	52
Abbildung 11: Induktion der A20-Expression in humanen Makrophagen mittels LPS+IFNy unabhängig von hypoxischen Bedingungen. ....	53
Abbildung 12: Vergleichbare A20-Expression in humanen Makrophagen (SLE) im Vergleich zu gesunder Kontrolle. ....	54
Abbildung 13: Vergleichbare Expression von A20 in renalen TEZ aus Lupus und Kontrollmäusen nach Stimulation. ....	55
Abbildung 14: Tendenziell verstärkte Expression von A20 in primären Makrophagen aus Lupus im Vergleich zu Makrophagen aus Kontrollmäusen nach Stimulation. ....	56

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Durchflusszytometrische Antikörpermixe mit entsprechender Verdünnung .....	32
Tabelle 2: Diagnose der untersuchten Patientenproben .....	37
Tabelle 3: Medikamentöse Initialtherapie pro Patient .....	38
Tabelle 4: Medikamentöse Therapie zur Aufrechterhaltung der Immunsuppression pro Patient .....	38
Tabelle 5: Immunhistochemische Auswertung der ersten Biopsien, Zeitpunkt „A“ ....	40
Tabelle 6: Immunhistochemische Auswertung der zweiten Biopsien, Zeitpunkt „B“ ..	40
Tabelle 7: Immunhistochemische Auswertung der dritten Biopsien, Zeitpunkt „C“ ...	40
Tabelle 8: Immunhistochemische Auswertung der vierten Biopsien, Zeitpunkt „D“ ...	41

# 1 Einleitung und Ziel der Dissertation

In Deutschland leiden nach aktueller Datenlage ca. 100.000 Menschen an einer dialysepflichtigen Nierenkrankheit (1) deren Ursachen von der arteriellen Hypertonie bis hin zur diabetischen Nephropathie sowie autoimmunen Erkrankungen, wie dem systemischen Lupus erythematodes (SLE), bis hin zu hereditären Nierenfehlbildungen reichen. Aufgrund des Fortschritts in der modernen Transplantationsmedizin hat sich die Transplantation heute als Mittel der Wahl bei terminalen Organerkrankungen etabliert. Somit steht den Betroffenen mit der Nierentransplantation eine erfolgsversprechende und technisch ausgereifte Therapiemethode zur Verfügung (2). Während die Überlebensraten stetig wachsen, stellt jedoch die chronische Transplantatdysfunktion weiterhin eine der primären Ursachen von Langzeitschäden und Organverlusten dar.

Neben der Transplantation mit dem Fokus auf dem Erhalt des Nierentransplantats ist ein vorgeschaltetes Ziel der Erhalt der Nierenfunktion. Um diesen Aspekt ebenfalls zu berücksichtigen wird in vorliegender Arbeit ein besonderes Augenmerk auf den SLE und die damit einhergehende Lupus-Nephritis als eine häufige Ursache für Nierenkomplikationen gelegt (3). Forschungsbemühungen konzentrieren sich darauf, die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen zu analysieren, um potenzielle therapeutische Ansätze zu entwickeln, um die Nierenfunktion zu erhalten oder alternativ die Transplantationsprognose von Nierenpatienten mit Lupus-Nephritis zu verbessern.

Die Ursache chronischer Abstoßungsreaktionen entspringt einer multifaktoriellen Genese. Es zeigte sich, dass der Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) als proinflammatorischer Faktor und proapoptotisches Zytokin hierbei eine wesentliche Rolle spielen (4). Vor allem ist das Zinkfingerprotein A20, auch als TNF $\alpha$ -induzierendes Protein 3 (TNFAIP3) bekannt, als wesentlicher Faktor zu nennen (5). Das Zinkfingerprotein A20 entspricht einem bedeutenden Regulator des Immunsystems und spielt eine entscheidende Rolle bei der Verminderung der TNF $\alpha$ -vermittelten Apoptose, sowie bei Entzündungsreaktionen, und zwar durch Hemmung der TNF $\alpha$ -, Interleukin-1- und Toll-like-Rezeptor-4-vermittelten Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B. Es wurde nachgewiesen, dass A20 sowohl im Gewebe als auch in Lymphozyten an der Pathogenese entzündlicher und autoimmuner Erkrankungen beteiligt ist (4). Weiter ist bekannt, dass A20 bei diversen

Autoimmunerkrankungen, zum Beispiel der rheumatoiden Arthritis, dem Morbus Crohn, der Psoriasis oder dem SLE, eine signifikante Rolle spielt (6). Dabei reguliert A20 die Signalwege, die zur Aktivierung der Entzündungsreaktion führen, und interagiert mit verschiedenen Proteinen, um die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B, sowie anderer proinflammatorischer Signalwege zu hemmen (7). So kommt es bei einer gestörten A20-Funktion zu einer übermäßigen Aktivierung des NF- $\kappa$ B- und weiterer proinflammatorischer Signalwege, was wiederum zu vermehrten Entzündungsreaktionen führt und in verschiedenen Autoimmunerkrankungen resultieren kann (8). Eine gestörte A20-Funktion kann durch unterschiedliche Faktoren verursacht werden, beispielsweise Genmutationen und epigenetische Veränderungen (8). Auch vermögen oxidativer Stress oder eine gestörte Protein-Homöostase zu Störungen der A20-Funktionen zu führen, ebenso wie bestimmte Infektionen, beispielsweise durch Viren oder Bakterien (9). Vorhergehende Untersuchungen zeigten eine vermehrte Expression von A20 in CD4+, CD11b+, CD19+ und CD14+ Zellen nach Nierentransplantationen (10). Zudem wiesen Patienten mit T-Zell-vermittelter Abstoßung im weiteren Verlauf dieser Analysen eine höhere A20-Expression in peripheren Blutleukozyten auf, als solche ohne Abstoßungsreaktion (10). Hierzu passend zeigten Transplantate bei Vorliegen einer T-Zell-vermittelten Abstoßung eine stärkere A20-Expression infiltrierender Lymphozyten (10).

Nach dem aktuellen Stand der Forschung spielt das Zinkfingerprotein A20 potenziell eine Rolle bei Alloimmunprozessen in Verbindung mit einer Nierentransplantation. Welche Rolle jedoch das Zinkfingerprotein A20 für den Ischämie- bzw. Reperfusionsschaden eines Nierentransplantats bzw. die Transplantatschädigung nach Nierentransplantation durch Abstoßungsreaktionen im klinischen Bereich spielt, ist bisher unklar.

In der vorliegenden Arbeit wurden daher die nachfolgenden Forschungsaspekte beleuchtet.

Zunächst wurden die vermuteten protektiven Effekte von A20 in Bezug auf Nierentransplantationen und autoimmunbedingte Entzündungsprozesse untersucht. Darüber hinaus wurde untersucht, inwiefern sich die A20-Expression nach Stimulation zwischen immunkompetenten, sowie -inkompetenten Patienten und Mäusen mit systemischem Lupus unterscheidet.

Hierbei wurden konkret die Expression von A20 unter verschiedenen pathophysiologischen Bedingungen analysiert, um neue Erkenntnisse über seine

Bedeutung in der Transplantationsmedizin und bei systemischen Entzündungen zu gewinnen.

Um die erste Fragestellung zu bearbeiten, wurde der Fokus der Versuche zunächst auf die Rolle von A20 nach Nierentransplantationen gelegt. Hierzu wurden Biopsien von Transplantatpatienten zu unterschiedlichen Zeitpunkten mithilfe von Immunhistochemie und qPCR analysiert, um die A20-Expression in verschiedenen Zelltypen zu bestimmen. Zusätzlich fand eine Untersuchung von A20-positiven Zellen im Patientenblut von Nierentransplantatempfängern statt, wobei durchflusszytometrische Analysen verwendet wurden, um spezifische Immunzellpopulationen wie T- oder B-Zellen und Makrophagen zu charakterisieren.

Zur Beantwortung der zweiten Fragestellung wurde *in vitro* die Expression von A20 in renalen Tubulusepithelzellen und Makrophagen analysiert.

Neben dem Vergleich primärer Zellen aus gesunden Probanden und SLE-Patienten wurden Zellen aus MRL-*Fas*<sup>pr</sup>-Mäusen verwendet. Zellen aus C57BL/6J-Mäusen wurden zum Vergleich genutzt.

## 2 Theoretische Grundlagen

### 2.1 Das Zinkfingerprotein A20

Das Zinkfingerprotein A20, im Jahr 1990 erstmalig von der Arbeitsgruppe um Vishva Dixit beschrieben (11), ist als zytoplasmatisches Protein an inflammatorischen, autoimmunen und neoplastischen Prozessen beteiligt (12). Als bifunktionelles Ubiquitin-editierendes Protein beeinflusst A20 durch inhibitorische Funktionen die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), indem es die entsprechenden voranstehenden, entzündungsfördernden Signalwege unterbricht (6). Dabei ist NF- $\kappa$ B für die Entstehung inflammatorischer und autoimmuner Prozesse verantwortlich und erfüllt somit eine zentrale Funktion im angeborenen, sowie im erworbenen Immunsystem. Unter anderem werden hierbei die NF- $\kappa$ B-aktivierenden Signalwege für die Tumornekrosefaktoren  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) und Interleukin 1 (IL-1) moduliert (13). Weitere Funktionen des NF- $\kappa$ B-Signalweges umfassen unter anderem die Induktion der

Proliferation verschiedener Zelltypen, die Angiogenese, die Modulation anti-apoptotischer Funktionen und die Induktion proinflammatorischer Gene (14).

### **2.1.1 Historische Einordnung**

Im Jahre 1990 entdeckten Dixit et al. bei einem Experiment zur Untersuchung der Entstehung von Entzündungsprozessen in humanen Nabelvenenendothelzellen das Zinkfingerprotein A20. Es wurden die Endothelzellen mit hochpotenten proinflammatorischen Zytokinen, genauer TNF, IL-1 und Lipopolysacchariden (LPS), stimuliert, wobei drei bis dahin unbekannte Genprodukte quantitativ nachgewiesen werden konnten. Die Expression eines dieser Genprodukte stieg besonders nach der Exposition mit TNF $\alpha$  frühzeitig an, weshalb das Zinkfingerprotein A20 ebenfalls TNF-Induced Protein 3 (TNFAIP3) genannt wird (11).

### **2.1.2 Struktur und Expression des Zinkfingerproteins A20**

Das aus 13 Exons mit 790 Aminosäuren bestehende A20-Protein liegt auf Chromosom 6 am Genlocus q23.3 (15), wobei das A20-Gen als inflammatorisches Early-Response-Gen fungiert und somit in der frühen Phase von Entzündungsprozessen aktiv ist. Nachfolgend wird die molekulare Struktur des Zinkfingerproteins A20 kurz beschrieben.

Am N-Terminus befindet sich die Ovarialtumor-(OTU)-Domäne, die die Funktion einer spezifischen Lysin-K63-Deubiquitinase besitzt (16). Mithilfe dieser Domäne kann das RIP1-Protein an seinem Lysin K63 deubiquitiniert und damit inaktiviert werden; somit kann A20 Ubiquitin-Polymere entfernen (17). Der C-Terminus besteht dagegen aus sieben Zinkfingerstrukturen, die die Lysin-K48-Polyubiquitierung ermöglichen (15), wobei die E3-Ubiquitinligase in der Zinkfingerdomäne 4 eine wesentliche Rolle spielt. Durch die, auf die Aminosäure Lysin übertragenen, Polyubiquitinketten wird das RIP1-Protein für den Abbau durch das 26S-Proteasom markiert (18), wodurch A20 mithilfe dieser Ubiquitin-modifizierenden dualen Funktion die Funktion und den Abbau entsprechender Zielproteine steuern kann. Die Ubiquitinierung entspricht also einem posttranslationalen Regulationsmechanismus, über den durch Anhaftung von

Ubiquitinmonomeren bzw. -polymeren die Funktion, der Aufbau oder der Abbau von Proteinen gesteuert wird.

Des Weiteren findet die Expression des Zinkfingerproteins A20 in jeder Körperzelle auf einem niedrigen Niveau statt. Durch körpereigene Botenstoffe, zum Beispiel TNF $\alpha$  oder IL-1, sowie durch bakterielle Bestandteile wie LPS, und Viren, etwa das Epstein-Barr-Virus, kann die Expression hochreguliert werden (12). Vor allem in Zellen des Immunsystems wird A20 konstitutiv exprimiert und bei Stimulation induziert. Hierbei sind besonders Zellen der lymphatischen Organe, wie der Milz und des Thymus, aber auch B- und T-Lymphozyten zu nennen (19). Die Aktivierung der T-Zellen führt im Folgenden allerdings zu einer Abnahme der A20-Expression. Grund hierfür ist die Rekrutierung von A20 in den CARMA1-Bcl10-MALT1-Komplex, der den T-Zell-Rezeptor mit dem klassischen NF- $\kappa$ B-Signalweg verbindet. Darin wird das Protein A20 abgebaut und die Expression zusätzlich über eine Promotormethylierung inhibiert (20).

### **2.1.3 Die Rolle von A20 im NF- $\kappa$ B-Signalweg**

Im Rahmen der Immunantwort, der Zellproliferation und der Apoptose spielt der NF- $\kappa$ B-Signalweg eine fundamentale Rolle, wobei zwischen dem klassischen und dem alternativen Signalweg unterschieden wird (14). Bei NF- $\kappa$ B handelt es sich zudem um eine primäre Rapid-acting-Transkriptionsfaktorfamilie, die sich wiederum aus Homo- und Heterodimeren der Reticuloendotheliosis-Virus-Protein(Rel)-Proteinfamilie zusammensetzt (21). Mit ihrer Aktivität in allen Zellen haben diese die Fähigkeit, eine Vielzahl von Genen zu regulieren. Die NF- $\kappa$ B-Komplexe bestehen aus untergeordneten Proteineinheiten, die an einer Domäne von 300 Aminosäuren angehängt sind. Derzeit sind fünf Untereinheiten bekannt (14), wobei jeweils die Rel-Homologie-Domäne (RHD), die DNA-bindende Domäne und eine Dimerisierungsdomäne charakteristisch sind. An Letzterer verändert sich durch unterschiedliche Dimerbildungen die jeweilige Spezifität von NF- $\kappa$ B für die jeweiligen Aktivator- und Promotorsequenzen, wobei sie durch Phosphorylierung die eigene Transkriptionsfaktoraktivität regulieren und dadurch die Expression der Zielgene modulieren kann. Auch enthält die RHD die nukleäre Lokalisationssequenz (NLS), die ein Durchdringen der Zellkernmembran ermöglicht. Die Proteine p105/p50, auch als NF- $\kappa$ B1 bekannt, und p100/p52, auch unter der Bezeichnung NF- $\kappa$ B2 laufend,

enthalten eine für sie typische glycinreiche Region (GRR). Sie gehören aufgrund ihrer Ankyrin-Repeat-Domäne (ANK) ebenfalls zur I $\kappa$ B-Proteinfamilie und haben zudem eine inhibitorische Wirkung auf NF- $\kappa$ B. An der GRR werden die Proproteine p105 und p100 durch Proteasomen ATP-, sowie magnesiumabhängig gespalten und so unter Verlust der Transaktivierungsdomäne in die aktiven Proteine p50 und p52 überführt (21). Ebenso besitzen diese Proteine an ihrem C-Terminus eine Death-Domäne (DD), während RelA, auch p65, analog zu RelB und c-Rel, am C-Terminus ebenfalls eine Transaktivierungsdomäne aufweist, wobei RelB zusätzlich einen Leuzinzipper am N-Terminus besitzt (13, 22).

Durch Komplexbildung mit Inhibitoren von NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B) werden die Dimere in unstimulierten Zellen inhibiert. Bei Stimulation werden die Komplexbindungsdomänen durch Phosphorylierung mittels des I $\kappa$ B-Kinase-Komplexes (IKK) deaktiviert und im Anschluss daran die I $\kappa$ B-Moleküle durch Polyubiquitinierung an Lysin 48 in Proteasomen abgebaut, womit die Freisetzung des NF- $\kappa$ B-Komplexes ubiquitinabhängig erfolgt. Der IKK seinerseits besteht aus zwei Kinaseuntereinheiten (IKK1 und IKK2), sowie dem NF- $\kappa$ B-essenziellen Modulator (NEMO) (21, 23). Bekannte NF- $\kappa$ B-Induktoren umfassen reaktive Sauerstoffspezies (ROS), TNF $\alpha$ , IL-1, bakterielle LPS und Endothelin-1 (24). Ferner wirken, je nach Signalweg und Rezeptor, verschiedene intrazelluläre, membranständige Proteine an der Signaltransduktion mit.

### 2.1.4 Der klassische Signalweg

Am Anfang des klassischen Signalweges stehen inflammatorische Zytokine wie TNF $\alpha$  und IL-1 oder PAMPs wie LPS. Auch kann er durch Wachstumsfaktoren und den Cluster of Differentiation (CD) 40 stimuliert werden (13). Diese binden an Rezeptoren der IL-1- oder der TNF-Rezeptorfamilie oder an Toll-like-Rezeptoren (14).

Durch die Aktivierung eines membranständigen Rezeptors der TNF-Rezeptorfamilie kommt es über die Bindung des Adapterproteins TRADD (TNF-associated receptor death domain) an den zytoplasmatischen Teil des TNF-Rezeptors zur Bindung von TRAF2 (TNF-receptor-associated Factor 2) und zur Aktivierung spezifischer Kinasen (21). Dazu gehören die NIK (NF- $\kappa$ B-induzierbare Kinase) und die Mitogen-aktivierte Protein-Serin-Threonin-Kinase (MAPK), wobei die NIK die IKK aktiviert, die wiederum I $\kappa$ B phosphoryliert und polyubiquitiniert. Im Weiteren wird I $\kappa$ B durch das 26S-

Proteasom abgebaut, und die nun aktiven sowie freien NF- $\kappa$ B-Dimere können mithilfe der NLS in die Zellkernmembran translozieren und sich dort an die spezifischen Promotorsequenzen binden (21). Das Zinkfingerprotein A20 verbindet sich ebenfalls mit TRAF2, wobei seine Expression, im Sinne eines negativen Feedbackmechanismus, durch die NF- $\kappa$ B-Aktivierung stimuliert werden kann. Dadurch hemmt A20 die TRAF2-induzierte Aktivierung von NIK und damit weiterführend die Aktivierung von NF- $\kappa$ B (18).

Ferner erfolgt die für die Regulation von NF- $\kappa$ B erforderliche Ubiquitinierung bedeutender Signalmoleküle durch drei Enzyme (E1–E3), wobei E1 als ubiquitinaktivierendes Enzym bezeichnet wird, E2 das Ubiquitin-konjugierende Enzym darstellt und E3 die Funktion einer Ubiquitin-Ligase erfüllt (7). Im NF- $\kappa$ B-Komplex existieren zudem potenziell ubiquitinierungsfähige Lysinreste (K6, K11, K27, K29, K33, K48 und K63), wobei K48 und K63 im Rahmen der Einführung des NF- $\kappa$ B-Signalweges bereits erwähnt wurden. Mit seiner E3-Ligase-Domäne kann A20 über die DUB-Aktivität K63 deubiquitinieren und über die OTU-Domäne K48 polyubiquitinieren. Die K63-Polyubiquitinkette ist für die Zellsignalisierung von Bedeutung, während die K48-Polyubiquitinkette den proteosomalen Abbau katalysiert. Bei der zuvor beschriebenen Interaktion von A20 mit dem TNF-Rezeptor entfernt A20 die Polyubiquitinkette von K63 des rezeptorinteragierenden Proteins 1 (RIP1), wodurch es zur Destabilisierung des Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptoren (TNFR)-Komplexes und gleichzeitig zur Blockade nachgeschalteter Signalmoleküle kommt (25). Zusätzlich wird das RIP1 durch eine Polyubiquitinierung an K48 proteosomal abgebaut.

Um diese Modifikationen durchführen zu können, bildet das Zinkfingerprotein A20 einen Komplex mit TAX1BP1, wobei es sich um ein stabilisierendes Adapterprotein handelt, das die Bindung an K63 ermöglicht. Zusätzlich sind der ABIN (A20-bindender Inhibitor der NF- $\kappa$ B-Aktivierung), das E3-Ubiquitin-Ligase-Ringfinger-Protein 11 (RNF11) und die Itchy-E3-Ubiquitin-Protein-Ligase (ITCH) am Komplex beteiligt (26, 27). Der Komplex aus A20, TAX1BP1, ABIN, RNF11 und ITCH kann nun die NF- $\kappa$ B-Kaskade inhibieren.

Die Transkriptionsaktivität von NF- $\kappa$ B muss streng reguliert werden, um eine Schädigung des Wirts durch eine anhaltende Aktivierung im Kontext einer Immunantwort zu verhindern. Im Rahmen dieser Regulation existieren mehrere Rückkopplungsschleifen, unter anderem durch das Zinkfingerprotein A20, die die

Homöostase aufrechterhalten. Bei Tierversuchen mit A20-Knock-out-Mäusen, zeigten sich systemische Entzündungsreaktionen und eine verkürzte Lebenserwartung (28).

### 2.1.5 Weitere relevante Signalwege

Ein weiterer relevanter Signalweg, der durch A20 beeinflusst wird, ist die IL-1-/TLR-Kaskade. Durch die Stimulation des IL-1-Rezeptors durch IL-1 oder des TLR durch LPS binden sich die myeloische Differenzierungsprimärantwort 88 (MyD88) und in diesem Fall TRAF6 an den intrazellulären Rezeptoranteil. Mithilfe der E2-Ligase Ubc13/H5 kann sich die Polyubiquitinierung von K63 und nachfolgend die Aktivierung der NF- $\kappa$ B-Kaskade ereignen. Nach erfolgter Induktion bildet A20 einen bekannten Komplex mit TAX1BP1, wonach am TRAF6-Rezeptoranteil die Polyubiquitinketten an K63 durch den TAX1BP1-A20-Komplex abgespalten werden, was den weiterführenden Ablauf des Signalweges inhibiert (6). Zusätzlich wird durch A20 das E2-Enzym polyubiquitiniert und im Anschluss daran proteasomal abgebaut (7).

Weitere Signalwege, auf die A20 direkten Einfluss hat, sind der NOD-1/2-, der TCR-, der RIG1- und der IL-17-Signalweg. Alle diese Kaskaden münden in einer NF- $\kappa$ B-Aktivierung und einer darauffolgend vermehrten Transkription sowie Induktion verschiedener Gene, inklusive des A20.

Zusätzlich kann das A20-Protein durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus in allen Signalwegen nach Induktion ebenso durch IKK phosphoryliert werden und somit den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B verstärkt hemmen (29). Nachfolgend werden weitere assoziierte Signalwege kurz beleuchtet.

Die Rezeptoren der Nukleotid-bindenden Oligomerisierungsdomän-Familie (NOD) stellen intrazelluläre Sensoren zur Erkennung pathogen-assoziiertes molekularer Muster (PAMPs) nach Phagozytose dar. Bei Aktivierung der NOD1/2-Rezeptoren wird RIP2 zum Rezeptor rekrutiert, woraufhin es durch cIAP1/2 mit K63-verknüpften Polyubiquitinketten versehen wird, was zur anschließenden Aktivierung von NF- $\kappa$ B und zum Ablauf der zuvor, im klassischen Signalweg beschriebenen, Kaskade führt. Hierbei wirkt A20 der NF- $\kappa$ B-Aktivierung entgegen, indem es die K63-verknüpften Polyubiquitinketten von RIP2 entfernt und dadurch die Aktivierung terminiert (23).

Bei der Stimulation des TCR durch Antigen- und Co-stimulation werden die Proteinkinase C und der CARMA1/Bcl10/Mucosa-assoziierte, lymphoide Gewebe-Lymphom-Translokationsprotein(MALT)1(CBM)-Komplex rekrutiert sowie aktiviert. Darauf schließt sich die mit MALT1-K63 verknüpfte Polyubiquitination durch TRAF6 an, was wiederum die Aktivierung des IKK-Komplexes und die darauffolgende NF- $\kappa$ B-Signalgebung bewirkt. Hierbei spielt A20 eine signifikante Rolle, indem es die K63-verknüpften Polyubiquitinketten von MALT1 entfernt und dadurch die NF- $\kappa$ B-Aktivierung hemmt. Damit moduliert A20 den TCR-Signalweg in T-Zellen und wirkt als Feedback-Inhibitor, um die T-Zell-Aktivierung und -Proliferation zu kontrollieren. Die Regulierung der Stärke sowie der Dauer der IKK/NF- $\kappa$ B-Antwort bei TCR/CD28-Co-stimulation durch A20 wird durch die Entfernung von K63-verknüpften Ubiquitinketten von MALT1 katalysiert. Durch das Entfallen dieser Ketten verhindert A20 letztlich eine anhaltende Interaktion zwischen ubiquitiniertem MALT1 sowie dem IKK-Komplex und dient somit als negativer Regulator der induzierbaren IKK-Aktivität (30).

Des Weiteren erfüllt A20 eine zentrale Funktion bei der Regulierung der Apoptose, denn es kann den programmierten Zelltod sowohl positiv als auch negativ beeinflussen, abhängig von den Signalen und den Bedingungen in der Zelle. Es ist bekannt, dass A20 in einigen Fällen den programmierten Zelltod unterdrücken kann, während es ihn in anderen Situationen fördert. Jedoch ist der genaue Regulierungsmechanismus der Apoptose durch A20 noch nicht vollständig geklärt; es existieren lediglich Hypothesen und Studien, die darauf hindeuten, dass A20 auf verschiedene Weise in den Prozess der Apoptose eingreifen kann (31). Die Fähigkeit des A20, die Apoptose zu beeinflussen, kann zur Regulation des Aktivitätszustandes von NF- $\kappa$ B führen. Eine Aktivierung des Signalweges vermag die Expression antiapoptotischer Gene zu fördern und die Zelle vor dem Zelltod zu schützen, wohingegen eine Hemmung zu einer erhöhten Apoptose führen kann (32). Eine weitere Möglichkeit, wie A20 die Apoptose beeinflusst, zeigt sich durch seine Interaktion mit anderen Proteinen im Apoptose-Signalweg; beispielsweise kann A20 mit dem Protein RIPK1 interagieren, das als bedeutender Regulator der Apoptose dient. Dadurch ist A20 in der Lage, die Aktivität von RIPK1 zu hemmen und somit die Apoptose zu regulieren. Schließlich steuert A20 auch die Aktivität anderer Enzyme, die an der Apoptose beteiligt sind; zum Beispiel kann es die Aktivität von Caspase-8 hemmen, eines bedeutenden Enzyms, das den apoptotischen Signalweg aktiviert.

### 2.1.6 Ablauf der Apoptose und Nekroptose

Im Folgenden wird der genaue Ablauf der Apoptose und Nekroptose geschildert. Durch die Bindung des TNF an den TNF-Rezeptor 1 wird der Komplex I induziert, wobei der E3-Ligase-Zellinhibitor des Apoptoseproteins 1/2 und der lineare Ubiquitin-Kettenbaukomplex nach ihrer Aktivierung die K63- und M1-Polyubiquitinierung verschiedener Signalkomponenten fördern. A20 sichert das Überleben der Zellen, indem es den durch Cylindromatose (CYLD) vermittelten Abbau M1-verknüpfter Ubiquitinketten in Komplex I verhindert. In Abwesenheit von A20 ist CYLD jedoch in der Lage, die M1-Ketten zu hydrolysieren, was die Bildung des Komplexes II fördert, die Caspase-8 aktiviert und schließlich zur Apoptose führt.

Die Aktivierung des TNF-verwandten Apoptose-induzierenden Liganden (TRAIL)-Rezeptors führt zum Aufbau des todesinduzierenden Signalkomplexes (DISC). An dieser Stelle hemmt A20 die Aktivierung, indem es die Caspase-8 deubiquitiniert und darüber hinaus die Rezeptor-interagierende Kinase 1 (RIPK1) ubiquitiniert, um ihre Rekrutierung in die DISC zu erleichtern und die Caspase-8-Aktivierung zu unterdrücken. Dadurch werden RIPK3 und das gemischte Kinasedomänen-ähnliche Protein (MLKL) zum Komplex II rekrutiert, um das Nekrosom zu bilden. An dieser Stelle wird die Zelle durch Membranporen getötet und gefahrenassoziierte molekulare Muster (DAMPs) freigesetzt. Dagegen schränkt A20 die Nekroptose-Induktion ein, indem es RIPK3 deubiquitiniert, um das Nekrosom zu destabilisieren (31).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass das Zinkfingerprotein A20 eine signifikante Rolle bei der Regulation des NF- $\kappa$ B- und anderer Signalwege spielt. Es kontrolliert die Entzündungsreaktion und die Immunität, indem es direkt an Signalkomplexe von NF- $\kappa$ B bindet und dadurch dessen Aktivierung hemmt. Auch kann A20 über negative Rückkopplungsschleifen beendet werden und somit die Aktivierung von NF- $\kappa$ B nach einer Entzündungsreaktion stören. Diese Funktion wiederum trägt dazu bei, den immunreagiblen Gewebsschaden im Anschluss an eine Infektion zu beenden (7, 33). Demgegenüber führen Fehlfunktionen von A20 potenziell zu überschießender Aktivierung von NF- $\kappa$ B und somit zu chronischen Entzündungen sowie verschiedenen Erkrankungen (7, 34).

### 2.1.7 Die pathophysiologische Rolle von A20

Durch die ubiquitäre Expression von A20 können Mutationen oder Verluste im A20-Gen zu einer Dysfunktion des Proteins führen. Dadurch kann es zur unkontrollierten oder überschießenden Aktivierung von NF- $\kappa$ B kommen, was dann wiederum potenziell chronische Entzündungsreaktionen sowie verschiedene Krankheiten hervorruft (35). Mehrere Erkrankungen aus dem Spektrum des autoimmunen oder malignen Formenkreises sind mit einer fehlerhaften Funktion der A20-modulierten Kaskade assoziiert. Es wurde festgestellt, dass eine A20-Haploinsuffizienz eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese des A20-Funktionsverlustes spielt (36). Hierbei handelt es sich um eine heterozygote TNFAIP3-Mutation, die zu einem funktionellen Verlust des A20-Proteins führt. Diese Mutation verursacht eine reduzierte Expression des A20-Proteins, was wiederum zu einer gestörten Kontrolle des NF- $\kappa$ B-Signalwegs und zu chronischen Entzündungsreaktionen führt.

Bei autoimmunen Erkrankungen ruft eine unkontrollierte Aktivierung von NF- $\kappa$ B verstärkte autoinflammatorische Prozesse hervor. Es wurde gezeigt, dass A20 bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis, der ankylosierenden Arthritis, dem SLE, der systemischen Sklerose und dem Sjögren-Syndrom eine bedeutende Rolle spielt (37). Ebenso wird A20 ein Effekt bei der Pathogenese des Morbus Behçet zugeschrieben, einer systemischen, autoimmunen Vaskulitis des rheumatischen Formenkreises (38). Eine A20-Dysfunktion ist des Weiteren bei pulmonalen Erkrankungen relevant, zum Beispiel der zystischen Fibrose (39). Auch besteht eine Verbindung zwischen einer A20-Defizienz und chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED), indem eine unzureichende Expression von A20 zu CED, wie dem Morbus Crohn und Colitis ulcerosa, führen kann (8).

Eine gestörte Regulation von NF- $\kappa$ B durch A20 ist ebenfalls an der Onkogenese beteiligt. Studien wiesen nach, dass A20 das Tumorwachstum hemmen kann, und dass A20-Defekte wiederum bei verschiedenen Krebsarten wie Lymphomen, Melanomen und gastrointestinalen Tumoren häufig vorkommen (40, 41). Auch kann eine gestörte Kontrolle des NF- $\kappa$ B-Signalweges durch A20 zu einer erhöhten Anfälligkeit für Infektionen und zu einer Immuninkompetenz führen (42).

Insgesamt spielt A20 also eine zentrale Rolle bei der Aufrechterhaltung der Homöostase des Immunsystems und seiner Entzündungsreaktionen. Eine gestörte

Funktion von A20 kann somit in verschiedenen Pathologien resultieren, die mit Entzündungen und unkontrolliertem Zellwachstum verbunden sind.

### **2.1.8 Zusammenhang zwischen B- und T-Lymphozyten und dem Zinkfingerprotein A20**

#### **2.1.8.1 Die B-Lymphozyten**

Die B-Lymphozyten beschreiben eine Unterart von Leukozyten, die wiederum Teil des adaptiven Immunsystems sind, und spielen eine bedeutende Rolle bei der Abwehr von Infektionen sowie der Bildung von Antikörpern zur Immunantwort. Auch sind B-Lymphozyten an der Bildung des Gedächtnisses des Immunsystems beteiligt, wodurch dieses in der Lage ist, schnell auf eine erneute Exposition gegenüber einem bekannten Erreger zu reagieren. Naive B-Zellen haben noch keine Antigene erkannt und sind bereit, auf eine Infektion oder Impfung zu reagieren. Plasmazellen, auch reife B-Effektorzellen, können eine große Menge an Antikörpern produzieren und geben diese in den Blutkreislauf ab, wonach die Antikörper Bakterien, Viren oder andere schädliche Substanzen erkennen und neutralisieren können. B-Gedächtniszellen bleiben im Körper und können schnell reagieren, wenn ein bekanntes Antigen erneut auftritt, weshalb sie für die langfristige Immunität gegen Krankheiten von Bedeutung sind. Regulatorische B-Zellen spielen eine zentrale Rolle bei der Regulierung der Immunantwort, indem sie entzündungshemmende Moleküle produzieren und die Aktivierung von T-Zellen hemmen, wobei Antigen-präsentierende B-Zellen Antigene auf ihrer Oberfläche darbieten und so die Aktivierung von T-Zellen fördern können. Sie sind für die Koordination der Immunantwort relevant (43).

Das Zinkfingerprotein A20 dient als Feedback-Inhibitor von Signalwegen, die von bestimmten Zellrezeptoren aktiviert werden, zum Beispiel den TNFR. In B-Lymphozyten kann A20 die Aktivierung von NF- $\kappa$ B hemmen, indem es die Signalwege von B-Zell-Rezeptoren und TLRs moduliert (44). Studien belegen, dass eine A20-Defizienz in B-Lymphozyten mit einer erhöhten Aktivierung von NF- $\kappa$ B und einer zunehmenden Sensibilität für CD40- sowie B-Zell-Rezeptor-Liganden und damit einer gesteigerten Entzündungsreaktion verbunden ist (45). Das Zinkfingerprotein scheint an der Regulierung der intrazellulären Homöostase beteiligt zu sein und führt durch

die Defizienz zu einer Immuninkompetenz oder zu autoinflammatorischen Prozessen (46). Daneben wurde nachgewiesen, dass eine Überexpression von A20 in B-Lymphozyten zu einer reduzierten Entzündungsreaktion und einer Unterdrückung von Autoimmunerkrankungen führen kann (27).

### 2.1.8.2 Die T-Lymphozyten

T-Lymphozyten beschreiben ebenfalls eine Unterart der Leukozyten, die im Knochenmark gebildet wird und im Thymus ausreift. Dort entwickeln sie Rezeptoren, die es ihnen ermöglichen, spezifische Antigene zu erkennen und die Membranzusammensetzung der verschiedenen Körperzellen zu überwachen (43). Es existieren mehrere Arten von T-Lymphozyten, darunter CD4+- und CD8+-T-Zellen. Erstere sind auch als Helfer-T-Zellen bekannt und unterstützen die Koordination der Immunantwort, indem sie andere Zellen des Immunsystems stimulieren, zum Beispiel die B-Lymphozyten, die Antikörper produzieren, oder die Makrophagen, die Fremdkörper phagozytieren. Des Weiteren sezernieren die Zellen des Immunsystems verschiedene Zytokine. Durch IL-12 und Interferon- $\gamma$  findet die Differenzierung zur Th1-Zelle statt, während IL-4 und IL-6 eine Differenzierung zur Th2-Zelle bedingen. Daneben werden CD8+-T-Zellen auch als zytotoxische T-Zellen bezeichnet und können in infizierten Zellen über die Fas- bzw. FasL-Signalwege die Apoptose auslösen (43).

Die Aktivierung von T-Lymphozyten erfolgt durch das Erkennen spezifischer Antigene, die von Antigen-präsentierenden Zellen, beispielsweise dendritischen Zellen, bereitgestellt werden. Nach der Aktivierung teilen sich die T-Zellen und differenzieren sich zu effektorischen Zellen, die eine spezifische Immunantwort durchführen, oder zu Gedächtniszellen, die eine schnellere und stärkere Immunantwort auf eine spätere Exposition gegenüber demselben Antigen ermöglichen (44).

Störungen der T-Lymphozyten-Funktion resultieren häufig in einer erhöhten Anfälligkeit für Infektionen oder Autoimmunerkrankungen, wobei CD4+-T-Helferzellen die Immunantwort koordinieren, indem sie Antigene auf den antigenpräsentierenden Zellen erkennen und über Zytokinausschüttungen andere Zellen des Immunsystems aktivieren. Angeregte Th1-Lymphozyten fördern über die Ausschüttung von Interferon- $\gamma$ , IL-2 und TNFa die Aktivierung und Differenzierung von Makrophagen,

wohingegen Th2-Lymphozyten über Zytokine und zellständige Moleküle mit B-Lymphozyten interagieren und damit wiederum deren Antikörperproduktion fördern. Dieser essenzielle Schritt für die humorale Abwehr erfolgt durch ein typisches Zytokinmuster. Th17-Lymphozyten sind nach dem von ihnen produzierten IL-17 benannt und spielen eine zentrale Rolle bei der Aktivierung neutrophiler Granulozyten, was sie mit Autoimmunerkrankungen und chronischen Entzündungen in Verbindung bringt. Dabei bewirkt IL-17 eine Ausschüttung von CSF sowie IL-6 und dadurch eine Migration neutrophiler Granulozyten sowie die verstärkte Expression inflammatorischer Proteine. Ferner können Th17-Zellen über eine Feedbackhemmung Th1-Lymphozyten unterdrücken, wodurch es zur Persistenz von Erregern oder Chronifizierung von Entzündungsprozessen kommen kann. Unter anderem wird die rheumatoide Arthritis mit Th17-Lymphozyten und diesem Mechanismus in Verbindung gebracht (44).

Eine weitere Art der T-Zellen, die CD8<sup>+</sup>-Zellen, ist in der Lage, infizierte Zellen oder Tumorzellen zu erkennen und abzutöten. Über ihren T-Zell-Rezeptor erfolgt die Erkennung infizierter Zellen über Antigene, die auf dem MHC-I-Rezeptor präsentiert werden. Durch proteasomalen Abbau werden Proteinreste an der Oberfläche jeder körpereigenen, kernhaltigen Zelle über den MHC-1-Rezeptor exprimiert, wobei gesunde Zellen eine variable Mischung aus körpereigenen Proteinbestandteilen präsentieren, während infizierte Zellen körperfremde Bestandteile darbieten. Nach Erkennung dieser körperfremden Antigene und anschließender Bindung aktiviert die CD8<sup>+</sup>-Zelle, auch zytotoxische T-Zelle genannt, in der infizierten Zelle die Apoptose. Außerdem schüttet die aktivierte zytotoxische T-Zelle Perforine und Granzyme aus, die die infizierte Zelle ebenfalls abtöten können (44).

T-Gedächtniszellen bleiben nach einer Immunantwort im Körper und können schnell reagieren, wenn ein bekanntes Antigen erneut auftritt, weshalb sie für die langfristige Immunität gegen Krankheiten von Bedeutung sind. Die natürlichen Killer-T-Zellen besitzen sowohl Eigenschaften von T-Zellen als auch von natürlichen Killerzellen. Sie weisen keinen antigenspezifischen Rezeptor auf, können aber dennoch MHC-I-Antigen-Komplexe erkennen. Auf ihrer Oberfläche exprimieren sie CD56 und CD57, wodurch sie schnell auf bestimmte Antigene reagieren können und sowohl infizierte Zellen als auch Krebszellen zu erkennen und abzutöten vermögen. Außerdem wird ihnen eine Kontrollfunktion im Falle von Autoimmunerkrankungen zugesprochen (43).  $\gamma\delta$ -Antigenrezeptor-positive T-Lymphozyten besitzen spezifische T-Zell-Rezeptoren

und sind in der Lage, auf nichtpeptidische Antigene zu reagieren. Sie spielen eine zentrale Rolle bei der Immunantwort auf Bakterien, Pilze und andere Mikroorganismen (44).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass jeder Typ von T-Lymphozyten spezifische Funktionen in der Immunantwort erfüllt, die auf die Erkennung und Abwehr bestimmter Pathogene oder Tumorzellen abzielen.

Der Mechanismus, wodurch A20 die Funktion von T-Lymphozyten reguliert, ist komplex und beinhaltet somit mehrere, in den vorhergehenden Kapiteln schon erklärte, Signalwege. Eine zentrale Rolle spielt dabei der NF- $\kappa$ B-Signalweg, der eine Schlüsselfunktion bei der Entzündungsreaktion und der Immunantwort übernimmt. Wenn T-Lymphozyten aktiviert werden, können Rezeptoren, beispielsweise der TCR- oder der CD28-Rezeptor, auf der Zelloberfläche Signalwege aktivieren, die ihrerseits wiederum zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B führen. Daraufhin kann NF- $\kappa$ B durch die Kernporen in den Zellkern eindringen und die Expression von Entzündungsmediatoren sowie anderen Genen steigern (47).

Das Zinkfingerprotein A20 ist, wie in Kapitel 2.1.3 bereits angesprochen, in der Lage, die Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch verschiedene Mechanismen zu hemmen: Einerseits kann es sich direkt an den NF- $\kappa$ B-Signalweg binden und den Abbau von NF- $\kappa$ B fördern, andererseits vermag A20 andere Signalmoleküle zu modulieren, die an der NF- $\kappa$ B-Aktivierung beteiligt sind, zum Beispiel TRAF6 oder IKK $\beta$  (48). Zusätzlich wird die Aktivierung anderer Signalwege in den T-Lymphozyten durch A20 gehemmt, etwa der MAPK- oder der PI3K/Akt-Signalweg, die ebenfalls an der Immunantwort beteiligt sind und durch die Hemmung von A20 beeinflusst werden können (49). Zusammengefasst trägt A20 also dazu bei, die T-Zell-Aktivierung sowie die Immunantwort zu regulieren, indem es mehrere Signalwege moduliert und so die Entzündungsreaktion kontrolliert.

## 2.2 Die Nierentransplantation und die Abstoßungsreaktion

Eine Nierentransplantation gilt heute als die optimale Therapieoption bei der Behandlung dialysepflichtiger Niereninsuffizienz. Bei der Operation wird eine Niere von einem Spender auf einen Empfänger transplantiert, der an einer Nierenerkrankung

leidet und eine Nierenfunktionsstörung aufweist. Die Transplantation einer Niere kann die Lebensqualität des Empfängers erheblich steigern und seine Überlebenschancen erhöhen (2).

Vor der Transplantation muss eine geeignete Spender-Nieren-Kombination vorliegen, die zu einer erfolgreichen Transplantation führt, wobei sie auf der Grundlage von Faktoren wie Gewebe- und Blutgruppenverträglichkeit und anderen klinischen Kriterien ausgewählt wird.

Die Spender-Empfänger-Kompatibilität, auch als Gewebeverträglichkeit oder Histokompatibilität bezeichnet, ist von entscheidender Bedeutung bei Organtransplantationen (50). Sie bezieht sich auf die Übereinstimmung von Gewebemerkmale zwischen dem Spenderorgan und dem Empfänger, um Abstoßungsreaktionen zu minimieren. Ein zentrales Element dabei stellt das AB0-Blutgruppensystem dar (51). AB0-Blutgruppen bestehen aus den Blutgruppen A, B, AB und 0, die durch spezifische Antigene auf den roten Blutkörperchen definiert sind. Bei der Organtransplantation ist es maßgeblich, dass Spender und Empfänger zumindest in Bezug auf die AB0-Blutgruppe kompatibel sind; eine Inkompatibilität kann zu einer lebensbedrohlichen Immunreaktion führen, weil das Immunsystem des Empfängers das fremde Organ als feindliches Gewebe erkennt und anschließend bekämpft (43).

Für die Spender-Empfänger-Kompatibilität spielt die Human-Leukocyte-Antigen (HLA)-Kompatibilität die entscheidende Rolle. Das HLA beschreibt ein in der Zellmembran verankertes Glykoprotein, das in zwei Klassen unterteilt wird: I und II. Klasse I, auch MHC-I genannt, ist auf allen kernhaltigen Zellen vorhanden, während HLA-Klasse II, ebenfalls als MHC-II bekannt, auf Immunzellen exprimiert wird. Bei sechs identischen HLA-Typen besteht das optimale Langzeittransplantatüberleben; mit abnehmender Übereinstimmung steigt die Gefahr des Transplantatversagens (52); (53).

Die Transplantation selbst findet meist statt, indem die Niere des Spenders chirurgisch entnommen und dann beim Empfänger eingesetzt wird, wonach die neue Niere an die Blut- und Harnwege des Empfängers angeschlossen wird; in der Regel nimmt der Empfängerkörper die Funktion der transplantierten Niere unmittelbar auf. Danach muss der Empfänger regelmäßig Medikamente einnehmen, um die Abstoßungsreaktion zu unterdrücken und die Funktionsfähigkeit der transplantierten

Niere zu erhalten. Die postoperative Betreuung des Empfängers ist essenziell, um Komplikationen wie Infektionen, Abstoßungsreaktionen oder Nierenversagen zu vermeiden. Ferner muss der Empfänger regelmäßige medizinische Untersuchungen und Bluttests vornehmen lassen, um sicherzustellen, dass die transplantierte Niere ordnungsgemäß funktioniert (54).

### 2.2.1 Immunsuppression

Das Ziel der Immunsuppression besteht darin, das Immunsystem zu unterdrücken oder so zu modulieren, dass eine Abstoßungsreaktion verhindert und die Funktion des transplantierten Organs erhalten wird. Insgesamt stellt die Nierentransplantation die wirksamste Behandlungsoption für Patienten mit einem Nierenversagen dar, die eine deutlich höhere Lebensqualität und Überlebenschancen gegenüber einer Dialysetherapie bietet. Allerdings können Abstoßungsreaktionen und andere Komplikationen auftreten, die eine sorgfältige postoperative Betreuung und Überwachung erfordern (55).

Die Behandlung einer Abstoßungsreaktion besteht in der Regel aus der Verabreichung von Medikamenten, die das Immunsystem unterdrücken, um die Immunreaktion gegen die transplantierte Niere zu reduzieren. Eine akute Abstoßungsreaktion kann meist erfolgreich behandelt werden, wenn sie rechtzeitig erkannt und angemessen angegangen wird. Eine chronische Abstoßungsreaktion ist schwieriger zu behandeln und kann letztendlich zum Verlust der transplantierten Niere führen (56).

Als erste bedeutende Säule zur Vermeidung einer Transplantatabstoßung sind Immunsuppressiva zu nennen, die das Immunsystem unterdrücken, um eine Abstoßungsreaktion zu verhindern. Dazu gehören beispielsweise Ciclosporin A, Tacrolimus, Sirolimus, Azathioprin und Mycophenolatmofetil. Jedes dieser Medikamente greift an unterschiedlichen Stellen in der Kaskade der Aktivierung von Immunzellen ein. Weiterhin sind Kortikosteroide von Bedeutung. Diese Medikamente besitzen entzündungshemmende sowie immununterdrückende Eigenschaften und werden in Kombination mit Immunsuppressiva verwendet, um die Abstoßungsreaktion zu kontrollieren. Dazu gehört hier Methylprednisolon genannt, als einer der hauptsächlichen Vertreter. Zusätzlich können monoklonale Antikörper spezifische Zellen des Immunsystems erkennen und binden, um ihre Aktivierung zu hemmen,

wobei beispielsweise Antikörper gegen CD3, CD25 und IL-2-Rezeptoren zu nennen sind (57). Additiv finden antivirale und antibakterielle Medikamente Einsatz, um Infektionen zu verhindern oder zu behandeln, die während oder nach der Transplantation auftreten können. Die Infektionsprophylaxe inkludiert unter anderem das Schützen vor dem Cytomegalievirus sowie der Infektion mit dem Schlauchpilz *Pneumocystis jirovecii*, worüber hinaus ein ausreichender Impfschutz vor Transplantation obligat ist (58).

Die lebenslange Immunsuppression besteht meist aus einer dreifachen Kombination: einem Calcineurin-Inhibitor, beispielsweise Tacrolimus oder Cyclosporin A, Mycophenolatmofetil als Guanosinsynthese-Hemmer (Inosinmonophosphatdehydrogenase-Inhibitor) sowie Basiliximab, einem monoklonalen Interleukin-2-Rezeptor-Antikörper oder Serin- bzw. Threoninkinase-Inhibitoren. Ebenso möglich sind mTOR-Inhibitoren wie Everolimus oder Sirolimus und zusätzlich ein Kortikosteroid wie zum Beispiel Methylprednisolon (57).

Allerdings kann eine langfristige Immunsuppression zu anderen Problemen führen, zum Beispiel zu erhöhtem Risiko von Infektionen oder Tumoren. Daher wird weiterhin nach Therapieansätzen gesucht, um die Abstoßungsreaktion zu reduzieren, ohne dass eine langfristige Immunsuppression erforderlich ist. Einen vielversprechenden Ansatz bietet die Verwendung zielgerichteter Therapien, die spezifische Zellen oder Signalwege im Immunsystem hemmen, um die Abstoßungsreaktion zu reduzieren, ohne das Immunsystem insgesamt zu unterdrücken.

### **2.2.2 Die Transplantatabstoßung**

Eine Transplantatabstoßung tritt auf, wenn das Immunsystem des Empfängers die transplantierte Niere als fremd erkennt und eine Immunreaktion auslöst, um die Niere abzustößen. Es handelt sich dabei um eine ernste Komplikation nach einer Nierentransplantation, die unbehandelt zum Verlust der transplantierten Niere führt. Das Transplantatversagen kann in eine akute und eine chronische Dysfunktion unterteilt werden: Eine akute Dysfunktion bzw. eine verspätete Transplantatfunktionsaufnahme tritt in der Regel innerhalb der ersten Wochen nach der Transplantation auf und wird durch eine plötzliche Erhöhung des Kreatininspiegels, einhergehend mit einer Abnahme der glomerulären Filtrationsrate, im Blut des

Empfängers und durch andere Symptome wie Fieber, Schmerzen sowie Schwellungen angezeigt. Meist ist das akute Transplantatversagen die Folge einer Entzündung oder eines Ischämieschadens durch eine zu lange andauernde kalte Ischämiezeit oder eine postoperative vaskuläre Ischämie (59). Ein chronisches Transplantatversagen tritt über Monate oder Jahre auf und kann durch eine allmähliche Verschlechterung der Nierenfunktion, Bluthochdruck und Anzeichen einer Proteinurie gekennzeichnet sein (58) (56). Ursächlich für das chronische Transplantatversagen sind exazerbierte Vorerkrankungen des Empfängers, Infektionen, Calcineurininhibitor-Toxizität oder eine nephrotoxische Wirkung von Immunsuppressiva und vor allem eine akute oder chronische Abstoßungsreaktion (60).

Um das Risiko einer Abstoßungsreaktion zu reduzieren, werden vor der Transplantation sorgfältige Tests durchgeführt, um die beste Spender-Empfänger-Nieren-Kombination auszuwählen.

Die Transplantatabstoßung entspricht einem komplexen pathophysiologischen Prozess, der als Grundvoraussetzung eine Ausbildung von Alloantigenen und dadurch eine Aktivierung sowie Expansion immunreaktiver T-Zellen hat. Der Prozess umfasst mehrere Schritte, die in der Folge zu einer akuten Dysfunktion und Rejektion des Transplantats führen können. Daher werden zur diagnostischen Sicherung neben klinischen und laborchemischen Untersuchungen auch histopathologische Analysen nach der Nierenbiopsie angewendet (61).

Zunächst erkennt das Immunsystem des Empfängers das transplantierte Gewebe durch Antigenpräsentation als fremd und löst eine Immunreaktion aus, wobei bei dieser Alloreaktivität die HLA des Donors eine entscheidende Rolle spielen. Die Aktivierung von T-Zellen erfolgt also durch Interaktion mit Antigen-präsentierenden Zellen (APC), die die T-Zellen aktivieren, die daraufhin die Immunantwort gegen das transplantierte Organ starten (43).

Die zwei Arten von T-Lymphozyten, CD4+- und CD8+-T-Zellen, erkennen das Antigen und werden aktiviert. Ebenso sind Interferon- $\gamma$ -aktivierte Makrophagen maßgeblich an der Immunantwort beteiligt. Indem CD4+-T-Zellen andere Zellen des Immunsystems aktivieren, koordinieren sie die Immunantwort. Währenddessen binden CD8+-T-Zellen direkt an die das Antigen präsentierenden Zellen und lösen darin den programmierten Zelltod aus. Gleichzeitig vermehren sich die aktivierten T-Lymphozyten zusätzlich und wandern ins transplantierte Gewebe ein (43). Daraufhin lösen die T-Lymphozyten und

andere Zellen des Immunsystems eine Entzündungsreaktion im transplantierten Gewebe aus, die zu einer Schädigung des Gewebes führt und schließlich potenziell in einer Funktionsstörung oder im Verlust des Transplantats resultiert. In einigen Fällen kann zusätzlich eine Antikörperproduktion gegen das transplantierte Gewebe auftreten, wobei sich die Antikörper an das Gewebe binden und das Komplementsystem aktivieren, was wiederum eine Entzündungsreaktion und eine Schädigung des Gewebes zur Folge hat (43).

### **2.2.3 Die Rolle der Makrophagen bei autoimmunen Prozessen und der Nierenabstoßung**

Makrophagen sind Immunzellen, die je nach der Art ihrer Aktivierung und Differenzierung verschiedene Funktionen erfüllen (44) und von zentraler Bedeutung für die Immunantwort sowie Entzündungsreaktion nach der Transplantation sind. Es werden M1- von M2-Makrophagen unterschieden.

Bei M1- und M2-Makrophagen handelt es sich um verschiedene Differenzierungszustände von Makrophagen, die jeweils unterschiedliche Funktionen und Eigenschaften besitzen. Diese Unterscheidung basiert auf der Erkenntnis, dass Makrophagen eine hohe Plastizität aufweisen und ihre Funktionen und Eigenschaften verändern können (44). M1-Makrophagen werden auch als klassisch aktivierte Makrophagen bezeichnet; aktiviert werden sie in Reaktion auf proinflammatorische Signale, wie in den erfolgten Versuchen geschehen, mit LPS und Interferon  $\gamma$ . Dabei zeichnen sich M1-Makrophagen durch eine verstärkte Produktion entzündungsfördernder Zytokine und reaktiver Sauerstoffspezies aus und spielen eine zentrale Rolle bei der Bekämpfung von Mikroorganismen, der Initiierung von Entzündungsreaktionen und der Unterstützung der adaptiven Immunantwort (44). M2-Makrophagen werden als alternativ aktiviert bezeichnet und durch IL-4 stimuliert, wobei sie eine reduzierte Entzündungsreaktion, jedoch eine erhöhte Fähigkeit zur Gewebeheilung und zum -umbau sowie zur Immunregulation aufweisen (44). Die Unterschiede zwischen M1- und M2-Makrophagen sind nicht absolut, sondern repräsentieren Extreme eines Kontinuums von Aktivierungszuständen. Des Weiteren können Makrophagen in der Realität verschiedene Mischformen von M1- und M2-

Eigenschaften aufweisen, abhängig von den spezifischen Umweltbedingungen und Signalen, denen sie ausgesetzt sind (44).

M1-Makrophagen sind proentzündlich und produzieren Zytokine wie TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  oder IL-6, die die Immunantwort verstärken und Pathogene oder Tumorzellen eliminieren. Gleichzeitig induzieren die Zytokine eine TH1-Immunantwort (62). Dagegen gelten M2-Makrophagen als antientzündlich und produzieren Zytokine wie IL-10, TGF- $\beta$  oder IL-4, die ihrerseits die Immunantwort regulieren, sowie die Wundheilung oder Geweberegeneration fördern. Im Vergleich zu M1-Makrophagen begünstigen sie eine TH2-Immunantwort (62). Die Differenzierung von M1-Makrophagen wird durch Zytokine wie IFN $\gamma$  gemeinsam mit LPS, M-CSF und TNF $\alpha$  gefördert, während die Differenzierung von M2-Makrophagen durch Zytokine wie IL-4, IL-10, IL-13 und TGF- $\beta$  unterstützt wird (63). Über den sogenannten klassischen Weg erfolgt die Aktivierung von M1-Makrophagen, während M2-Makrophagen über den alternativen Weg aktiviert werden (63).

Bei Autoimmunerkrankungen ist das Gleichgewicht zwischen M1- und M2-Makrophagen gestört, was zu einer chronischen Entzündung und Gewebeschädigung führt (64). Beispielsweise sind bei Lupus, rheumatoider Arthritis und Psoriasis die M1-Makrophagen erhöht, während bei Multipler Sklerose und Myasthenia gravis die M2-Makrophagen zunehmen (64). Bei der Nierentransplantation stellt die Immunantwort auf das transplantierte Organ einen entscheidenden Faktor für die Überlebensrate des Transplantats dar, womit ein Ungleichgewicht zwischen M1- und M2-Makrophagen hier ebenfalls zur dysregulierten Immunantwort und letztlich zur Nierentransplantatabstoßung führen kann. Hierbei sind dann die proinflammatorischen M1-Makrophagen führend (65-67).

Gemäß Untersuchungen der Rolle der A20-Expression bei der Differenzierung von Makrophagen und der Entwicklung von M1- oder M2-Makrophagen kann eine reduzierte A20-Expression zu einer erhöhten Entzündung und einer gesteigerten Immunantwort führen, was potenziell in einer Verstärkung des Lupus-Syndroms und der Nierentransplantatabstoßung resultiert (68). In Makrophagen wird A20 induziert, wenn sie mit verschiedenen Stimuli wie Bakterien oder Zytokinen konfrontiert werden (69); (70); (71). Ebenfalls kann A20 die Produktion proentzündlicher Zytokine wie TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  oder IL-6 in Makrophagen unterdrücken und so die Entzündungsreaktion modulieren (72); darüber hinaus kann es die Expression antientzündlicher

Zytokine wie IL-10 und TGF- $\beta$  in Makrophagen fördern, sowie damit die Gewebereparatur unterstützen (71).

Bei Nierentransplantationen spielen Makrophagen also eine bedeutende Rolle in Hinblick auf die Abstoßung des Transplantats, indem sie proentzündliche Mediatoren freisetzen und Antigen-präsentierende Zellen rekrutieren (73, 74). Obwohl die Rolle von A20 bei Nierentransplantationen noch nicht vollständig geklärt ist, wird vermutet, dass es die Abstoßungsreaktion durch die Hemmung des NF- $\kappa$ B-Signalwegs und die Modulation der Makrophagenpolarisation beeinflusst (71, 73, 75). Die Modulation der M1/M2-Polarisation von Makrophagen bietet somit einen möglichen therapeutischen Ansatz zur Immunmodulation (64).

Ebenfalls könnte die Modulation der A20-Expression ein potenzielles therapeutisches Ziel darstellen, um die Entzündungsreaktionen und die Autoimmunität bei Lupus-Patienten sowie bei der Nierentransplantatabstoßung zu regulieren. Die Fragestellungen zur Rolle von A20 und der Makrophagen bei Autoimmunerkrankungen sowie der Nierentransplantatabstoßung sind jedoch noch nicht vollständig beantwortet und weitere Untersuchungen sind erforderlich, um die Zusammenhänge zu verstehen sowie neue therapeutische Ansätze zu entwickeln.

### **2.2.4 Systemischer Lupus erythematoses und Lupusnephritis**

Systemischer Lupus beschreibt eine Autoimmunerkrankung, bei der das Immunsystem die eigenen Zellen und Organe angreift, wobei die Symptome von Erythemen, Arthralgie, Müdigkeit sowie Fieber bis hin zur akuten Nierenschädigung reichen (58). Im Rahmen der renalen Beteiligung entsteht eine sogenannte Lupus-Nephritis, wobei sich Immunkomplexe ablagern, die aus Nukleinsäuren und Proteinen bestehen. Dabei handelt es sich um Autoantikörper, die sich in den Nieren ablagern und dann das Nierengewebe schädigen (76). Das nephritische Syndrom mit Mikrohämaturie, Ödembildung und arterieller Hypertonie markiert den Beginn einer renalen Insuffizienz im Rahmen einer Lupus-Nephritis (58).

Die Behandlung von Nierenversagen bei Lupus hängt vom Schweregrad der Erkrankung ab und kann von medikamentöser Immunmodulation sowie Immunsuppression über Dialyse bis zur Notwendigkeit einer Nierentransplantation reichen (58). Dabei zielt die Behandlung darauf ab, die Entzündung zu reduzieren, die

Nierenfunktion zu erhalten oder zu verbessern und das Komplikationsrisiko zu senken (3, 77).

Die Expression von A20 ist in den peripheren Blutzellen von Lupus-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen signifikant vermindert, was wiederum auf eine gestörte NF- $\kappa$ B-Aktivierung hinweist (68). Dies kann dazu beitragen, dass das Immunsystem des Körpers aus dem Gleichgewicht gerät und daraufhin eine überschießende Immunantwort abläuft. Dies löst dann wiederum eine Autoimmunreaktion aus. Die Verminderung der A20-Expression ist mit der Schwere von Lupus und insbesondere mit Lupus-Nephritis assoziiert (78).

Heterozygote Verlustfunktionsmutationen im TNFAIP3-Gen verursachen eine Haploinsuffizienz von A20 (HA20), die dann zu einer erhöhten Anfälligkeit für Autoimmunerkrankungen wie Lupus führt (79) (80). Des Weiteren zeigen HA20-Patienten einen variablen klinischen Phänotyp, der von Hautausschlägen, Gelenkschmerzen, Fieber, Lymphadenopathie, Hepatosplenomegalie und Zytopenie bis hin zu Nierenversagen reichen kann (80). Die Behandlung von HA20-Patienten basiert somit auf der Unterdrückung oder Modulation des Immunsystems mit verschiedenen Medikamenten wie Steroiden, Methotrexat, Rituximab oder Abatacept (80). Aufgrund dieser Zusammenhänge wird die Expression von A20 zusätzlich im SLE-Mausmodell untersucht. In der Wissenschaft werden MRL-*Fas<sup>lpr</sup>*-Mäuse als SLE-Mausmodell herangezogen, da sie ähnliche Symptome sowie eine ähnliche Pathophysiologie wie SLE-Patienten besitzen.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

Die verwendeten Materialien werden im Einzelnen im Anhang aufgeführt.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Studienaufbau

Alle in dieser Arbeit verwendeten Proben von Patienten entstammen folgendem Ethikantrag: 2019-14659\_1, wobei sämtliche Patienten der Verwendung schriftlich zustimmten.

Die Nierenbiopsien ausgewählter Patienten erfolgten zu unterschiedlichen Zeitpunkten, entsprechend der klinischen Indikation zur Nierenbiopsie. Die immunhistochemisch zu färbenden Paraffinschnitte der Nierenbiopsie (bereitgestellt durch die Nephropathologie Erlangen) wurden deparaffiniert, immunhistochemisch gefärbt und lichtmikroskopisch analysiert. Darüber hinaus fand für jede Biopsie eine qPCR-Analyse der A20-Expression statt. Das Kollektiv der Biopsieproben umfasst Proben zu verschiedenen Zeitpunkten. Der Zeitpunkt A beschreibt eine Biopsie während eines akuten Nierenversagens, der Zeitpunkt B ist der Zeitpunkt der Nullbiopsie, zum Zeitpunkt C wird die Funktion des Transplantats überprüft und es finden sich entweder Zeichen einer Abstoßungsreaktion (C1) oder nicht (C2). Zum Zeitpunkt D findet bei histologischen und klinischen Zeichen einer Abstoßungsreaktion eine Steroidstoßtherapie statt. Zeitpunkt E beschreibt ein Follow-up nach einem Jahr.

Im Folgenden werden die erwähnten Verfahren detailliert beschrieben.

Die mit EDTA versetzten Vollblutproben wurden ebenfalls zum Zeitpunkt B, also vor Transplantation, dem Zeitpunkt C (C1 und C2), sowie nach einem Jahr (Zeitpunkt E) nach der Nierentransplantation gewonnen, woraufhin die Verarbeitung der Probe und die Isolierung der humanen peripheren Blutleukozyten (PBL) am Tag der Gewinnung stattfand. Nach der Isolation und anschließenden Kryokonservierung erfolgten Stimulation, Antikörperfärbung und FACS-Analyse zu einem späteren Zeitpunkt. Im Folgenden wird jeder der genannten Schritte beschrieben.

Die Analyse der A20-Expression aus den peripheren Blutleukozyten wurde nach Isolation aus EDTA-Blut mittels FACS-Analyse und in den Nierenbiopsien mittels Immunhistochemie und qPCR durchgeführt.

Zudem erfolgte parallel hierzu die Erfassung klinischer Daten der Patienten (Nierenfunktion, Entzündungsparameter, Immunsuppression etc.) und der entsprechenden Spenderdaten.

### **3.2.2 Das Patientenkollektiv**

Im Rahmen der immunhistochemischen Untersuchungen wurden Paraffinschnitte von Gewebeproben von insgesamt 18 Patienten angefertigt und anschließend mit spezifischen Antikörpern gegen A20 markiert. Zusätzlich wurden 17 Paraffinschnitte von Nierenbiopsien nach der Transplantation untersucht, um die A20-Expression mittels qPCR zu analysieren.

Für die Durchflusszytometrie und die FACS wurden Proben von 14 Patienten herangezogen, die zwischen 2019 und 2020 an der Universitätsmedizin Mainz nierentransplantiert worden waren. Unter den vielfältigen Auslösern für das Nierenversagen in diesem Patientenkollektiv wurden strukturelle, diabetes- und hypertonieassoziierte Ursachen sowie autoimmunvermittelte Nephropathien identifiziert. Im Labor wurden dafür Proben zu drei verschiedenen Zeitpunkten innerhalb eines Jahres nach der Transplantation untersucht.

Aufgrund der limitierten Fallzahl erfolgte die statistische Auswertung deskriptiv.

Im Kapitel 4.1 werden die charakteristischen Merkmale der verschiedenen Patientenkollektive zusammengefasst.

### **3.2.3 Die Mäuse**

Die genutzten Mäuse wurden in den Räumen des Translational Animal Research Center (TARC) der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz entsprechend dem deutschem Tierschutzgesetz gehalten. Verwendet wurden folgende Stämme: C57BL/6J für die nativen Mäuse und MRL-*Fas*<sup>pr</sup>-Mäuse als Lupus-Modell (Genehmigungsnummer G17-1-074).

### **3.2.4 Zellisolation**

#### **3.2.4.1 Isolation humaner periphere Blutleukozyten (PBL) aus EDTA-Blut**

EDTA-Vollblut (2–3 Röhrchen) wurde 1:1 mit PBS verdünnt, homogenisiert und vorsichtig auf Histopaque (0,77-faches Volumen) in 50-ml-Falcons aufgeschichtet (Gesamtvolumen  $\leq$  45 ml). Nach Dichtegradientenzentrifugation (2500 rpm, 20 min, RT, ohne Bremse) wurden die PBL aus der Interphase entnommen und mit PBS auf 50 ml aufgefüllt und gewaschen (1500 rpm, 5 min, Acc. / Dec.: 9).

Zur Erythrozytenlyse wurden die Zellen mit 5 ml ACK-Lysepuffer resuspendiert, 5 min inkubiert und anschließend mit PBS auf 50 ml aufgefüllt. Nach erneuter Zentrifugation (1500 rpm, 5 min) wurde dieser Schritt einmal wiederholt.

Das abschließende Zellpellet wurde in 2 ml Einfriermedium (70 % RPMI, 20 % FCS, 10 % DMSO) resuspendiert und aliquotiert (1 ml pro Kryoröhrchen). Die Kryokonservierung erfolgte kontrolliert in einer Isopropanolgefrierhilfe bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . So konservierte PBL können über Jahre stabil gelagert werden.

#### **3.2.4.2 Isolation humaner Tubulusepithelzellen**

Urinproben (400–800 ml) von katheterisierten Patienten wurden in sterile Zwei-Liter-Behälter gesammelt. Die Zellisolierung erfolgte unter sterilen Bedingungen. Nach Zentrifugation bei 400 g für 10 min bei Raumtemperatur wurde der Überstand bis auf 1–2 ml entfernt und ggf. weiterer Urin auf das verbleibende Pellet gegeben. Alle Zellpellets eines Patienten wurden in einem Falcon gesammelt. Bei Makrohämaturie erfolgte eine 5-minütige Inkubation mit ACK-Lysepuffer, gefolgt von Waschschritten mit PBS. Anschließend wurden die Zellen bei  $200 \times g$  für 10 min zentrifugiert und in 1–6 ml K1-Medium resuspendiert. Das K1-Medium bestand aus DMEM/HAM's F12 (1:1), 10 % FCS und 1 % HEPES (1 M), einem Hormonmix (siehe Anhang) und hEGF (10  $\mu\text{g/ml}$ ). Die Suspension wurde in einem Well einer 6-Well-Platte kultiviert (37  $^{\circ}\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$ ).

Medium wurde nach 24, 48 und 72 h ergänzt; ab Tag 4 täglich; später erfolgte der Wechsel alle zwei Tage. Kulturen wurden verworfen, wenn mikrobielle Kontamination

auftrat (bis zu 40 % der Fälle). Nach Erreichen von ~80 % Konfluenz erfolgte die Passage mit Trypsin. Die Zellen wurden zentrifugiert (200 × g, 5 min), in frischem K1-Medium resuspendiert und erneut ausplattiert.

### **3.2.4.3 Isolation humaner Makrophagen**

Das Vollblut (4 × 7,5 ml EDTA-Röhrchen) wurde 1:1 mit PBS + 1 mM EDTA verdünnt, auf Histopaque 1077 (0,77-faches Volumen) aufgeschichtet und 20 min bei 2500 rpm ohne Bremse zentrifugiert. Das Plasma wurde separiert, 30 min bei 56 °C hitzeinaktiviert, erneut zentrifugiert (1500 rpm, 5 min) und bis zur Verwendung bei RT gelagert. PBLs aus dem Buffy-Coat wurden mit Waschpuffer gewaschen (4×), anschließend mit 5 ml ACK-Lyse behandelt (5 min), erneut gewaschen (3×) und in PBS resuspendiert.

Nach Zählung wurden  $2 \times 10^7$  PBLs pro Well in 6-Well-Platten in RPMI mit 1,5 % autologem Plasma (plus Pen/Strep 50 mg/ml und Glutamin) ausplattiert. Die Isolation der Blut-Monozyten mittels Adhärenzisolierung erfolgte durch zweistündige Inkubation (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>), gefolgt von mehreren PBS-Waschschritten zur Entfernung nicht-adhärenter Zellen. Adhärenente Monozyten wurden anschließend mit DMEM GlutaMAX + 10 ng/ml M-CSF kultiviert. An Tag 2 und 4 erfolgte ein Medienwechsel. Am sechsten Tag wurden die differenzierten Makrophagen geerntet und für nachfolgende Stimulationsversuche weiterverwendet.

### **3.2.4.4 Isolation muriner Tubulusepithelzellen**

Tubulusepithelzellen wurden aus den Nieren von Mäusen mittels kombinierter mechanischer und enzymatischer Dissoziation isoliert. Nach Entnahme wurden die Nieren unter sterilen Bedingungen von der Kapsel befreit, in kaltem PBS gewaschen und mechanisch in kleine Fragmente zerkleinert. Anschließend erfolgte eine enzymatische Verdauung in PBS mit 1–2 mg/ml Kollagenase Typ IV und 20–50 µg/ml DNase I, für 30–45 Minuten bei 37 °C und unter sanftem Schütteln. Während der Inkubation wurde die Suspension regelmäßig pipettiert, um die Dissoziation zu unterstützen. Der Verdauungsvorgang wurde durch Zugabe von eiskaltem RPMI-

Medium mit 10 % FBS gestoppt. Die Zelllösung wurde anschließend durch ein 70 µm-Zellsieb filtriert, bei 300 g für 5 Minuten zentrifugiert und das Zellpellet in Kulturmedium resuspendiert. Optional erfolgte eine weitere Anreicherung tubulärer Zellen durch Filtration oder Dichtegradientenzentrifugation. Alle Schritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

### **3.2.4.5 Isolation muriner Makrophagen**

Murine Zellen des Knochenmarks sind wie beschrieben isoliert (81) und für die spätere Nutzung in Einfriermedium (90% FCS 10 % DMSO) bei -80°C gelagert worden.

Eingefrorene murine Knochenmarkszellen wurden durch langsames Auftauen in 20 % FCS-haltigem K1-Medium (18 ml K1-Medium + 2 ml FCS pro ml Zellsuspension, 37 °C) reaktiviert. Nach Zentrifugation (1500 rpm, 5 min) wurden die Zellen in frischem Medium resuspendiert, in beschichtete 10-cm-Petrischalen überführt und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Zur Differenzierung in Makrophagen wurde das Medium mit 5 ng/ml M-CSF supplementiert. Ein Mediumwechsel erfolgte an Tag 2 und 3. Die ausdifferenzierten Makrophagen wurden an Tag 6 anschließend zur Analyse der A20-Expression mittels qPCR stimuliert.

### **3.2.5 In-vitro Versuche**

#### **3.2.5.1 Kultivierung und Stimulation von Tubulusepithelzellen**

Humane oder murine TEZ wurden in K1-Medium kultiviert; bei 80 – 90-prozentiger Konfluenz wurden sie geerntet, um sie in einem Stimulationsversuch einzusetzen.

Hierzu wurden die TEZ optisch auf Konfluenz überprüft. Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen mit 3 ml PBS gewaschen und mit 3 ml Trypsin/EDTA (1×) für 5 min bei 37 °C inkubiert. Bei ausreichender Ablösung (≥ 50 % der Zellen) wurden 6 ml PBS zugegeben, die Zellen abgespült und in 50-ml-Falcons mit vorgelegtem 10 % FCS in RPMI aufgenommen. Nicht vollständig gelöste Zellen wurden mit einem Cellscrapper abgelöst. Die Zellsuspension wurde bei 1500 rpm für 5 min bei RT zentrifugiert, anschließend in frischem Medium resuspendiert und gezählt.

Für die Stimulation wurden die Zellen mit 500 µl Stimulationsmedium pro Well behandelt und 4 h bzw. 24 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Stimulationsbedingungen umfassten LPS + IFN $\gamma$  (100 ng/ml + 10 ng/ml) oder TNFa (25 ng/ml). Für Hypoxie-Experimente wurden Zellkulturplatten 30 min in einer Stickstoff-gespülten Hypoxiekammer inkubiert, anschließend für 48 h im Brutschrank kultiviert. Leere Wells wurden mit PBS gefüllt, um Verdunstung zu verhindern. Nach Inkubation wurden die Zellen für die RNA-Isolation verwendet.

### **3.2.5.2 Kultivierung und Stimulation von Makrophagen**

Makrophagen wurden nach 6-tägiger Differenzierung unter Zusatz von M-CSF und nach optischer Vitalitätsprüfung mittels PBS/EDTA (7 °C, 15 min) sowie mechanischer Ablösung mit einem Zellschaber geerntet, zentrifugiert und in frischem Medium resuspendiert. Anschließend wurden 1 ml Zellsuspension pro Well in 12-Well-Platten ausgesät und über Nacht inkubiert.

Am Folgetag wurden die Zellen erneut mikroskopisch überprüft und mit 500 µl Stimulationsmedium (LPS + IFN $\gamma$  100 ng/ml + 10 ng/ml; IL-4 25 ng/ml) oder Kontrollmedium pro Well für 24 h bei 37 °C inkubiert. Die Stimulation wurde durch Absaugen des Mediums beendet, und die Zellen wurden zur RNA-Isolation verwendet.

Unter Stimulation mit LPS und Interferon  $\gamma$  bilden sich M1-Makrophagen und unter Stimulation mit IL-4 M2-Makrophagen (62).

### **3.2.6 Proteinbiochemie**

#### **3.2.6.1 Immunhistochemie auf Biopsieschnitten**

Es wurden Nierenbiopsieschnitte immunhistochemisch angefärbt, um die lokale Expression von A20 zu analysieren. Die Immunhistochemie umfasst mehrere Schritte, die Fixierung der Gewebeprobe, die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen, die Inkubation mit einem spezifischen Antikörper sowie die Detektion des gebundenen Antikörpers mittels geeigneter Färbemethoden (82).

Paraffinierte Gewebeschnitte wurden 2 h bei 56 °C inkubiert, anschließend durch dreimalige 10-minütige Xylol-Inkubation sowie eine absteigende Alkoholreihe (100 %, 95 %, 70 % Ethanol, je 10 min) paraffiniert. Die Antigenretrieval erfolgte für 60 min bei 95 °C in 0,01 M Citratpuffer (pH 6,0), gefolgt von einer 30-minütigen Abkühlung auf RT. Die Schnitte wurden 5 min in PBS + 0,1 % BSA gewaschen und die endogene Peroxidase durch Methanol + 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> blockiert. Anschließend erfolgte ein 30-minütiges Blocken.

Es folgte eine Avidin-/Biotin-Blockierung (je 20 min, 1:2 mit Waschpuffer verdünnt) und ein weiteres Blocken mit 5 % normalem Rabbit-Serum in 10 % BSA/PBS. Die Primärantikörper (anti-human A20, 1:50 in 0,1 % BSA/PBS) wurden über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach PBS-Waschung wurde ein Biotin-markierter Sekundärantikörper (Rabbit-anti-Goat, 1:200 in PBS) für 1 h bei RT aufgetragen, gefolgt von einer Inkubation mit ABC-Komplex (Avidin-Biotin-Komplex, 10 µl A + 10 µl B in 1 ml PBS) für 1 h, bei RT.

Die Detektion erfolgte mittels 3,3'-Diaminobenzidin (2 Tropfen DAB-Konzentrat, 1 Tropfen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 1 Tropfen Puffer in 2,5 ml Aqua dest.). Die Entwicklung wurde mikroskopisch überwacht und nach max. 30 min mit Wasser gestoppt. Eine Hämatoxylin-Gegenfärbung (60 s), die Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe und die Eindeckung mit Paramount schlossen die Färbung ab.

### **3.2.6.2 Durchflusszytometrische Analysen**

Die Durchflusszytometrie beschreibt eine Methode in der Labormedizin, die es ermöglicht, Zellen in einer Suspension basierend auf spezifischen Oberflächenmarkern, die von den Zellen exprimiert werden, zu quantifizieren (83). Es wurden fluoreszenzmarkierte Antikörper verwendet, um intra- und extrazellulär exprimierte Proteine zu markieren und im Anschluss für die Färbung positive Zellen zu quantifizieren.

In vorhergehenden Arbeiten stellte sich heraus, dass die Antikörpermixe 3, 4,5 und 6 am erfolgversprechendsten in durchflusszytometrischen Analysen waren (84).

Die peripheren mononukleäre Zellen (PBLs) aus Patientenproben wurden in einer 96-Well-Rundbodenplatte aliquotiert. Nach Zentrifugation (3000 rpm, 3 min) und

## Material und Methoden

---

Entfernung des Überstands erfolgte ein Fc-Block (1:20 in FACS-Puffer, 10 min, RT). Anschließend wurden extrazelluläre Marker mit Antikörpermischungen (Mix 3 und 4; vgl. Tabelle 1) oder FACS-Puffer (Kontrollen) für 30 min und bei 4 °C inkubiert. Es folgten zwei Waschschrte mit FACS-Puffer. Die Zellen von Mix 3 und 4 wurden in Fix/Perm-Puffer resuspendiert und über Nacht bei 4 °C fixiert.

Für Mix 5 (Human Th1/Th2/Th17-Kit) wurden die Zellen nach Fc-Block mit Cytofix fixiert (15 min, RT), permeabilisiert (Perm/Wash-Puffer, 15 min, RT), gefärbt (30 min, RT, dunkel), gewaschen und in 1 % PFA über Nacht bei 4 °C gelagert.

Für Mix 6 (Human Th17/Th-reg.-Kit) erfolgte die Fixierung und Permeabilisierung gemäß Herstellerprotokoll unter Verwendung von FoxP3-spezifischem Puffersystem (Puffer A/B/C), gefolgt von intrazellulärer Färbung (30 min, RT, dunkel) und Lagerung in 1 % PFA.

Am Messtag wurden die Zellen aus Mix 3 und 4 mit 1× Saponin-Puffer gewaschen und intrazellulär mit primärem Anti-TNFAIP3-Antikörper (A20, 1:50 in 0,1 % BSA/PBS) für 30 min bei Dunkelheit inkubiert. Nach Waschung erfolgte die sekundäre Färbung mit FITC-konjugiertem Goat-anti-Rabbit-Antikörper (1:200, 30 min, dunkel). Nach abschließender Waschung wurden alle Zellen in 1 % PFA resuspendiert und in vorbeschriftete FACS-Röhrchen überführt.

Die Messung erfolgte mit einem FACSCalibur-Zytometer (BD Biosciences). Pro Probe wurden 10.000–20.000 Ereignisse erfasst. Zellhaufen oder Detritus hätten vereinzelt als Ereignisse registriert werden können, wurden jedoch durch Gating ausgeschlossen.

Mithilfe der Software CellQuest wurden die gesammelten Daten gemessen und ausgegeben, woraufhin die Analyse mittels der Software FlowJo, Version 10.7.2, erfolgte.

	<b>Mix Marker (Konjugat)</b>	<b>Verdünnung</b>
3	TNFAIP3 + Sek. AK, CD11b-PE, CD4-APC	1:20, 1:10, 1:5
4	TNFAIP3 + Sek. AK, CD14-PE, CD3-PerCP, CD19-APC	1:20, 1:10, 1:20, 1:5
5	IFN- $\gamma$ -FITC, IL-17-PE, CD4-PerCP, IL-4-APC	TH1/TH2/TH17 Human Phenotyping Kit (BD Bioscience)
6	IL-17A-PE, CD4-PerCP, FoxP3-AlexaFluor 647, CD25-FITC	TH17/Treg Human Phenotyping Kit (BD Bioscience), CD25 1:5

*Tabelle 1: Durchflusszytometrische Antikörpermixe mit entsprechender Verdünnung*

### 3.2.6.3 Western Blot

Der Western Blot bietet eine semiquantitative Methode zur Identifizierung von Proteinen durch deren Übertragung auf eine Trägermembran, was als „Blotting“ bezeichnet wird. Dieser Schritt ermöglicht die Trennung der Proteine basierend auf ihrer Größe, weil sie während der Elektrophorese im Gel dementsprechend wandern. In der Regel wird ein Polyacrylamid-Gel (SDS-Page) verwendet, weil es eine effiziente Trennung der Proteine nach ihrer Größe ermöglicht (82).

Hier sollten Proteinlysate von zuvor stimulierten Zellen untersucht werden. Hierfür wurden die Zellen nach Beendigung der Stimulation auf Eis gelagert und pro Well mit 200  $\mu$ l RIPA-Lysepuffer (1 $\times$ , mit Proteaseinhibitoren) versetzt. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis, unterstützt durch Resuspendieren und Abkratzen, wurden die Lysate zentrifugiert (15 min, 3000 rpm, 4 °C). Überstände wurden für die Western-Blot-Analyse genutzt. In den hier gezeigten Western Blots wurden fertig gegossene Gele (Gel-Mini-Protean TGX) von BioRad verwendet.

Nach der Elektrophorese mit 130 Volt werden die Proteine in der Regel durch eine Spannung von 100 Volt für zwei Stunden auf die Trägermembran übertragen. Dies ist notwendig, um die Proteine für die anschließende Immunodetektion zugänglich zu machen. Es wurde die Wet-Blotting-Methode verwendet. Hierbei werden die Trägermembran und das Gel mit einer sogenannten Sandwich-Technik zwischen Filtern und Schwämmen positioniert, wobei die Schwämme mit Pufferlösung getränkt sind. Dann wird eine elektrische Spannung von 100 Volt angelegt, um die Proteine auf die Membran zu übertragen (82).

Für die SDS-PAGE wurden 36,5 µl Lysat mit 12,5 µl Lämmli-Puffer und 0,05 M DTT gemischt, 10 min bei 95 °C denaturiert und 15 µl (dies entsprach 10 µg Protein) pro Tasche auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen (Marker: 3 µl). Die Elektrophorese erfolgte bei 80 V (15 min), danach 130 V (90 min). Proteine wurden auf Nitrocellulosemembranen geblottet (100 V, 2 h). Nach Ponceau-S-Färbung und Orientierungsschnitt zwischen 55 und 35 kDa wurden Membranen für A20 (oberer Teil) und GAPDH (unterer Teil) getrennt.

Membranen wurden 1 h in 5 % Milch/TBS-T geblockt, anschließend über Nacht bei 4 °C mit Primärantikörpern gegen A20 bzw. GAPDH inkubiert. Nach vier Waschsritten (2×10 min, 2×3 min in TBS-T) folgte eine einstündige Inkubation mit passenden HRP-konjugierten Sekundärantikörpern bei RT. Nach erneutem Waschen wurde die Detektion mittels des ECL-Reagenzes (Komponenten A:B = 1:1) durchgeführt.

Für GAPDH wurden vier Belichtungsbilder (10–40 s), für A20 sechs Bilder (120–720 s) erstellt. Bei Bedarf wurde die Belichtungszeit angepasst. Die Proteinbänder wurden mithilfe eines digitalen Detektionssystems (BioRad ChemiDoc Imaging System) visualisiert und dokumentiert.

Die Blots wurden im Anschluss bei –20 °C eingefroren.

### **3.2.7 Nukleinsäurebiochemie**

#### **3.2.7.1 RNA- Isolation und qPCR aus FFPE-fixiertem Gewebe**

Der Ablauf der qPCR mit SYBR Green beginnt mit der Extraktion der Gesamt-RNA aus der biologischen Probe. Die RNA-Isolation erfolgte mit dem RNeasy FFPE Kit (Qiagen) gemäß modifiziertem Protokoll. Paraffinschnitte wurden mit 320 µl Deparaffinierungslösung vortexiert, zentrifugiert und 3 min bei 56 °C inkubiert. Nach Abkühlung wurden 240 µl PKD-Puffer hinzugegeben und homogenisiert. Nach erneuter Zentrifugation (1 min, 10.000 rpm) wurden 10 µl Protease K zur unteren Phase gegeben und Inkubationen bei 56 °C und 85 °C (je 15 min) durchgeführt. Die klare Phase wurde in neue Gefäße überführt, 3 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 13.500 rpm für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 25 µl DNase-

## Material und Methoden

---

Boosterpuffer und 10 µl DNase-Lösung behandelt (15 min, RT), gefolgt von der Zugabe von 500 µl RBC-Puffer und 1200 µl Ethanol.

Die Probe wurde schrittweise auf eine Filtersäule aufgetragen und zentrifugiert (10.000 rpm, 15 s). Die Säule wurde zweimal mit 500 µl RPE-Puffer gewaschen. RNA wurde durch Zugabe von 30 µl RNase-freiem Wasser eluiert (max. Speed, 1 min). Die RNA-Konzentrationen wurden spektroskopisch (NanoDrop) bestimmt.

Die quantitative Echtzeit-PCR (qPCR) mit SYBR Green stellt eine molekulare Methode zur quantitativen Messung der mRNA-Expression in biologischen Proben dar, die die Bindung des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR Green an die doppelsträngige DNA nutzt, und so die Detektion sowie die Quantifizierung der amplifizierten Produkte in Echtzeit ermöglicht (85).

Im Zuge einer einschrittigen qPCR (Real-time RT qPCR) erfolgt zunächst die Synthese von cDNA mittels reverser Transkription (RT), wonach die cDNA als Vorlage für die PCR-Reaktion dient, die spezifische Primer für das Ziel- und das Referenzgen enthält. Während der Amplifikation wird SYBR Green in die sich bildenden doppelsträngigen DNA-Fragmente eingebaut und die Fluoreszenz in Echtzeit gemessen, wobei die Menge der fluoreszierenden Signale mit der Anzahl der amplifizierten Produkte, und somit mit der Ausgangsmenge der Ziel-mRNA in der Probe korreliert (85).

Die Expression des Zielgens wird mit einem Housekeeping-Gen wie Aktin als Referenz verglichen, um die relative Expression des Zielgens zu quantifizieren. Housekeeping-Gene finden Anwendung, weil ihre Expression als stabil und konstant in verschiedenen Geweben sowie Zellen betrachtet wird. Durch den Vergleich der Expression des Zielgens mit derjenigen des Referenzgens kann die relative Expression des Ersteren in verschiedenen Proben bestimmt werden (85). Im Fall der A20-mRNA-Expression wurde diese hier gegen Aktin oder Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als Referenz verglichen, um ihre relative Expression zu quantifizieren.

Für die qPCR wurden Proben mit RNase-freiem Wasser auf passende Konzentrationen verdünnt. Ein Reaktionsansatz mit dem QuantiNova SYBR Green RT-PCR Kit (Qiagen) bestand aus SYBR-Green 10 µl, Primer 2 µl, reverse Transkriptase 0,2 µl und RNase freiem Wasser 0,8 µl sowie 10 – 50 ng RNA-Template. Zudem wurde 1x Yellow Template Dilution Buffer verwendet. Die Expression der Zielgene wurde per SYBR-Green-basierter Fluoreszenzmessung analysiert.

Pro PCR-Zyklus wurde dabei in Echtzeit am Ende der Elongationsphase die Intensität der Fluoreszenz gemessen, die sich direkt proportional zur Menge an PCR-Produkten verhält (86). Die qPCR wurde an dem qTOWER3G von Analytik Jena durchgeführt, die Datenanalyse erfolgte mit der qPCRsoft 4.1 Software von Analytik Jena.

### 3.2.7.2 RNA- Isolation und qPCR aus Zelllysaten

Die RNA-Isolation erfolgte mit dem innuPREP RNA Mini Kit (IST Innuscreen AG). Nach Stimulation wurden die Zellen pro Probe in 400 µl Lyse-Solution RL des Isolation-Kits lysiert. Nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Lyse durch zusätzliches Abkratzen unterstützt und die Lysate in Spin-Filter-D-Röhrchen überführt.

Nach Zentrifugation (11.000 rpm, 2 min) wurde das Lysat mit 70 % Ethanol (1:1) gemischt und auf Spin-Filter R überführt. Die RNA wurde durch sukzessive Waschschriffe mit 500 µl Wash-Solution HS und 700 µl Wash-Solution LS gereinigt, jeweils mithilfe von Zentrifugation (1 min, 11.000 rpm). Eine finale Trockenzentrifugation (3 min) entfernte Restethanol. Die RNA wurde mit 80 µl RNase-freiem Wasser eluiert und spektroskopisch (NanoDrop) quantifiziert.

Für die qPCR wurden die RNA-Proben verdünnt und mit 1x YTDB eingefärbt. Ein Reaktionsansatz mit dem QuantiNova SYBR Green RT-PCR Kit (Qiagen) bestand aus SYBR-Green 10 µl, Primer 2 µl, reverse Transkriptase 0,2 µl und RNase freiem Wasser 0,8 µl) sowie 10 – 50 ng RNA-Template. Für jede Probe wurde in die Expression eines Housekeeping Gens (GAPDH oder  $\beta$ -Aktin), oder A20 analysiert. Die Quantifizierung erfolgte mittels SYBR-Green-basierter Fluoreszenzmessung.

Darauffolgend wurde eine qPCR durchgeführt.

### **3.3 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung und die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe von GraphPad Prism Version 10.2.3. Der genutzte statistische Test ist in der entsprechenden Abbildungsinformation angegeben. Bei dem Vergleich zweier Gruppen wurde im Falle einer Normalverteilung ein t-test angewandt, wenn nicht der Mann-Whitney-U-test verwendet werden konnte. Bei dem Vergleich mehrerer Gruppen wurde ein 1-way ANOVA verwendet.

## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Die Rolle des Zinkfingerproteins A20 nach Nierentransplantationen**

#### **4.1.1.1 Das Patientenkollektiv**

Das zu untersuchende Patientenkollektiv war ausnahmslos im Jahr 2020 an der Universitätsmedizin Mainz biopsiert worden. Im Rahmen der Überprüfung der Variablen wurden Datensätze mit fehlenden Variablen exkludiert, wonach insgesamt 17 Datensätze untersucht wurden. Jedoch erlaubt die geringe Fallzahl nur eine deskriptive Bewertung und Einordnung der Ergebnisse; statistisch belastbare Aussagen benötigen eine größere Fallzahl und eine längere Datenerhebung.

In der vorliegenden Population waren 14 Personen männlichen Geschlechts und 3 Personen weiblichen Geschlechts vertreten, wobei das Alter der Empfänger zwischen 18 und 72 Jahren schwankte. Die Vorerkrankungen der Patienten im untersuchten Kollektiv war führend Diabetes mellitus und arterielle Hypertonie.

Die Auswertung der Daten zu den nephrologischen Grunderkrankungen und den Ursachen von Nierenversagen wird im Folgenden präsentiert: Glomeruläre Erkrankungen und die diabetische Nephropathie stellten die am häufigsten festgestellte Ursache für das terminale Nierenversagen dar, während Vaskulitiden und das kardiorenale sowie hepatorenale Syndrom bei drei Patienten auftraten. Andere Ursachen des Nierenversagens wurden in einer variablen Anzahl von Fällen

## Ergebnisse

---

festgestellt, darunter das hämolytisch-urämische Syndrom, toxisches Nierenversagen, Zystenniere, Morbus Fabry und Nierenversagen unklarer Genese (Tabelle 2).

Fallnummer	Diagnose
1	HUS
2	Diabetische Nephropathie
3	Hypertensive Nephropathie
4	<i>Unklare Genese</i>
5	Fokal-segmentale Glomerulosklerose
6	Hepatorenales Syndrom
7	ANCA-Vaskulitis
8	Chronische Glomerulonephritis
9	Refluxnephropathie
10	Membranöse Lupus-Nephritis
11	Zystennieren
12	<i>Unklare Genese</i>
13	ADPKD
14	IgA-Nephropathie
15	IgA-Nephropathie
16	ADPKD
17	Diabetische Nephropathie
18	Morbus Fabry

*Tabelle 2: Diagnose der untersuchten Patientenproben*

Die vorliegende deskriptive Untersuchung bildet das Ergebnis einer umfassenden Analyse verschiedener immunsuppressiver Pharmaka, die in der Transplantationsmedizin eine entscheidende Rolle bei der Verhinderung von Abstoßungsreaktionen spielen.

Alle Patienten erhielten an der Universitätsmedizin Mainz standardmäßig eine Immunsuppression, bestehend aus einer Induktionstherapie mit Basiliximab (Interleukin 2 Antikörper (IL2-mAb), begleitet von einer Behandlung mit einem Calcineurin-Inhibitor (Tacrolimus oder Cyclosporin A) und Mycophenolatmofetil (MMF) sowie Kortikosteroiden (siehe Tabelle 3). Im Verlauf wurde die Induktionstherapie auf eine Erhaltungstherapie umgestellt (siehe Tabelle 4).

## Ergebnisse

Fallnummer	Erstes Medikament Initialtherapie	Zweites Medikament Initialtherapie	Drittes Medikament Initialtherapie	Viertes Medikament Initialtherapie
1	Tacrolimus	MMF	Kortison	IL2 mAb
2	0	0	0	0
3	Tacrolimus	MMF	Kortison	IL2 mAb
4	Tacrolimus	MMF	Kortison	IL2 mAb
5	Tacrolimus	MMF	Kortison	IL2 mAb
6	Tacrolimus	MMF	Kortison	IL2 mAb
7	Everolimus	MMF	Kortison	IL2 mAb
8	0	0	0	0
9	Tacrolimus	MMF	Kortison	IL2 mAb
10	Tacrolimus	MMF	Kortison	Anderes
11	Tacrolimus	MMF	Kortison	IL2 mAb
12	Tacrolimus	MMF	Kortison	IL2 mAb
13	Tacrolimus	MMF	Kortison	IL2 mAb
14	Tacrolimus	MMF	Kortison	IL2 mAb
15	Tacrolimus	MMF	Kortison	IL2 mAb
16	Tacrolimus	MMF	Kortison	IL2 mAb
17	Tacrolimus	MMF	Kortison	0
18	Tacrolimus	MMF	Kortison	IL2 mAb

Tabelle 3: Medikamentöse Initialtherapie pro Patient

Fallnummer	Erstes Medikament Aufrechterhaltung	Zweites Medikament Aufrechterhaltung	Drittes Medikament Aufrechterhaltung
1	Tacrolimus	MMF	Kortison
2	0	0	0
3	Tacrolimus	MMF	Kortison
4	Tacrolimus	MMF	Kortison
5	Tacrolimus	MMF	Kortison
6	Tacrolimus	MMF	Kortison
7	Everolimus	MMF	Kortison
8	0	0	0
9	Tacrolimus	MMF	Kortison
10	Tacrolimus	MMF	Kortison
11	Tacrolimus	MMF	Kortison
12	Tacrolimus	MMF	Kortison
13	Tacrolimus	MMF	Kortison
14	Anderes	MMF	Kortison
15	Tacrolimus	MMF	Kortison
16	Tacrolimus	MMF	Kortison
17	Tacrolimus	Everolimus	Kortison
18	Tacrolimus	MMF	Kortison

Tabelle 4: Medikamentöse Therapie zur Aufrechterhaltung der Immunsuppression pro Patient

#### 4.1.1.2 A20- Expression in Nierenbiopsien bei akuter Nierenschädigung

Im vorliegenden Ergebnisteil werden die immunhistochemischen Befunde präsentiert, um die potenzielle Rolle von A20 akuter Nierenschädigung zu beleuchten. Eine schematische Darstellung zur Zuordnung der Biopsien ist in Abbildung 2A aufgeführt.

Es wurden zunächst zehn Gesichtsfelder ausgezählt und dann ein Mittelwert der A20-positiven, infiltrierenden Zellen gebildet, der in den folgenden Tabellen (5 – 8) dargestellt wird. Ebenfalls sind laborchemische Parameter abgebildet, die den Grad der Nierenfunktion (GFR und Kreatinin) sowie der Entzündung (CRP und Leukozytenzahl) zum Zeitpunkt der Biopsie aufzeigen. Die nachfolgende Abbildung zeigt exemplarisch eine Nierenbiopsie unter verschiedenen Vergrößerungen. Deutlich erkennbar sind die bläulichen Zellkerne sowie die braun angefärbten A20-positiven Zellen (siehe Abbildung 1).

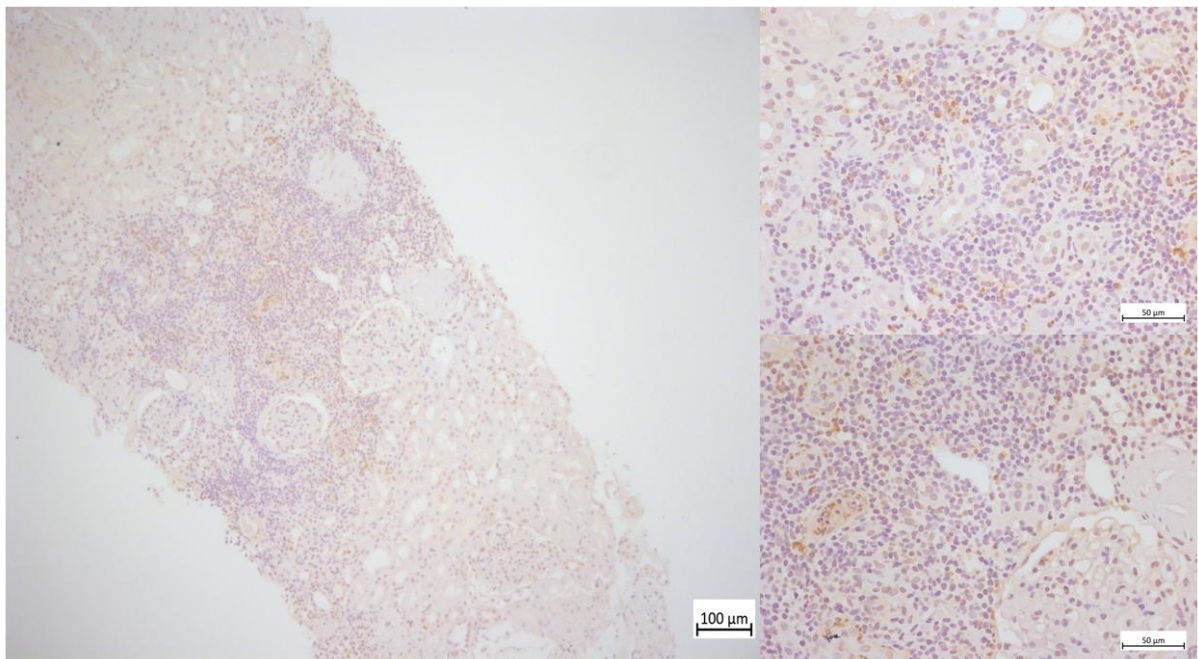


Abbildung 1: Beispielhafte Übersichtsaufnahmen eines immunhistochemischen A20-Nachweises einer Biopsie bei akutem Nierenversagen.

FFPE fixiertes Gewebe von Nierenbiopsien. Immunhistochemischer Nachweis der A20-Expression (positive Zellen in braun), Gegenfärbung der Zellkerne mit Hämalaun (blau). Links Vergrößerung 20x (Balken zeigt 100 µm), rechts Vergrößerung 40x (Balken zeigen 50 µm).

## Ergebnisse

Fallnummer	Biopsie 1	Mittelwert 10 GF Niere	Kreatinin mg/dl Serum	eGFR Serum	CRP mg/l Serum	Leukozytenzahl/ NI Serum
1	1.1	5,4	1,78	45	29	9,68
2	2.1	2	2,82	26	2,5	9,21
3	3.1	3,4	6,63	9	1,2	6,5
4	4.1	2,1	16,91	3	8,9	9,24
5	5.1	1,2	1,58	46	0,4	7,99
6	6.1	1	5,72	9	17	6,47
7	7.1	2	6,79	7	21	8,22
8	8.1	0,4	14,94	3	5,3	6,09
9	9.1	4,3	10,17	6	37	9,39
10	10.1	1,5	3,1	17	14	4,75
11	11.1	1,9	11,72	4	2,4	5,38
12	12.1	15,7	10,28	5	6,1	5,12
13	13.1	0,5	2,41	27	21	4,53
14	14.1	1,4	2,23	31	1,5	9,74
15	15.1	0,5	1,89	44	1,1	5,94
16	16.1	3,4	2	37	2,2	7,8
17	17.1	0,7	1,69	48	5,6	5,05
18	18.1	2,1	1,72	52	1	4,41

Tabelle 5: Immunhistochemische Auswertung der ersten Biopsien, Zeitpunkt „A“

Fallnummer	Biopsie 2	Mittelwert 10 GF Niere	Kreatinin Serum	eGFR Serum	CRP Serum	Leukozytenzahl Serum
1	1.2	0,1	2,29	36	0,66	7,25
4	4.2	0,5	2,56	39	14	7
8	8.2	0	3,19	21	0,4	4,7
11	11.2	2,1	6,76	7	81	8,5
12	12.2	0	7,07	7	18	14,2
13	13.2	1,2	1,8	36	13	4,95
14	14.2	0,6	2,41	28	2,4	12,4
17	17.2	1,3	1,49	56	5,4	6,7
18	18.2	6,9	1,7	52	4,4	4

Tabelle 6: Immunhistochemische Auswertung der zweiten Biopsien, Zeitpunkt „B“

Fallnummer	Biopsie 3	Mittelwert 10 GF Niere	Kreatinin Serum	eGFR Serum	CRP Serum	Leukozytenzahl Serum
1	1.3	0	3,42	21	0,36	5,17
12	12.3	0,2	4,42	12	8,9	8,99
13	13.3	0,7	2,48	26	16	6,6

Tabelle 7: Immunhistochemische Auswertung der dritten Biopsien, Zeitpunkt „C“

Fallnummer	Biopsie 4	Mittelwert 10 GF Niere	Kreatinin Serum	eGFR Serum	CRP Serum	Leukozytenzahl Serum
13	13.4	2,3	2,12	31	7,8	5,9

*Tabelle 8: Immunhistochemische Auswertung der vierten Biopsien, Zeitpunkt „D“*

Zur Analyse wurde der Mittelwert der 10 ausgezählten Gesichtsfelder ermittelt. Hier zeigte sich, dass die Anzahl der A20-positiven Zellen stark variiert, aber, dass A20-positive Zellen insbesondere unter den infiltrierenden Immunzellen zu beobachten waren. Die Anzahl positiver Zellen war zum Zeitpunkt des akuten Nierenversagens (A) im Vergleich zu nach der Transplantation (B – D) erhöht (Abbildung 2A). Es wurde allerdings keine Korrelation der Zahl A20-positiver Zellen zu den Parametern der Nierenfunktion (GFR, Kreatinin) oder zu den Entzündungsparametern im Blut (CRP, Leukozytenzahl) beobachtet. Exemplarisch wurde in Abbildung 2B die Zahl der A20-positiven Zellen abhängig von dem Serum-Kreatinin dargestellt ( $r = 0,2101$ ,  $p = 0,4027$ ). Die Daten wurden mithilfe des Pearson-r-Korrelationskoeffizienten ausgewertet, wobei ein zweiseitiger p-Wert (two-tailed) zur Signifikanzprüfung herangezogen wurde.

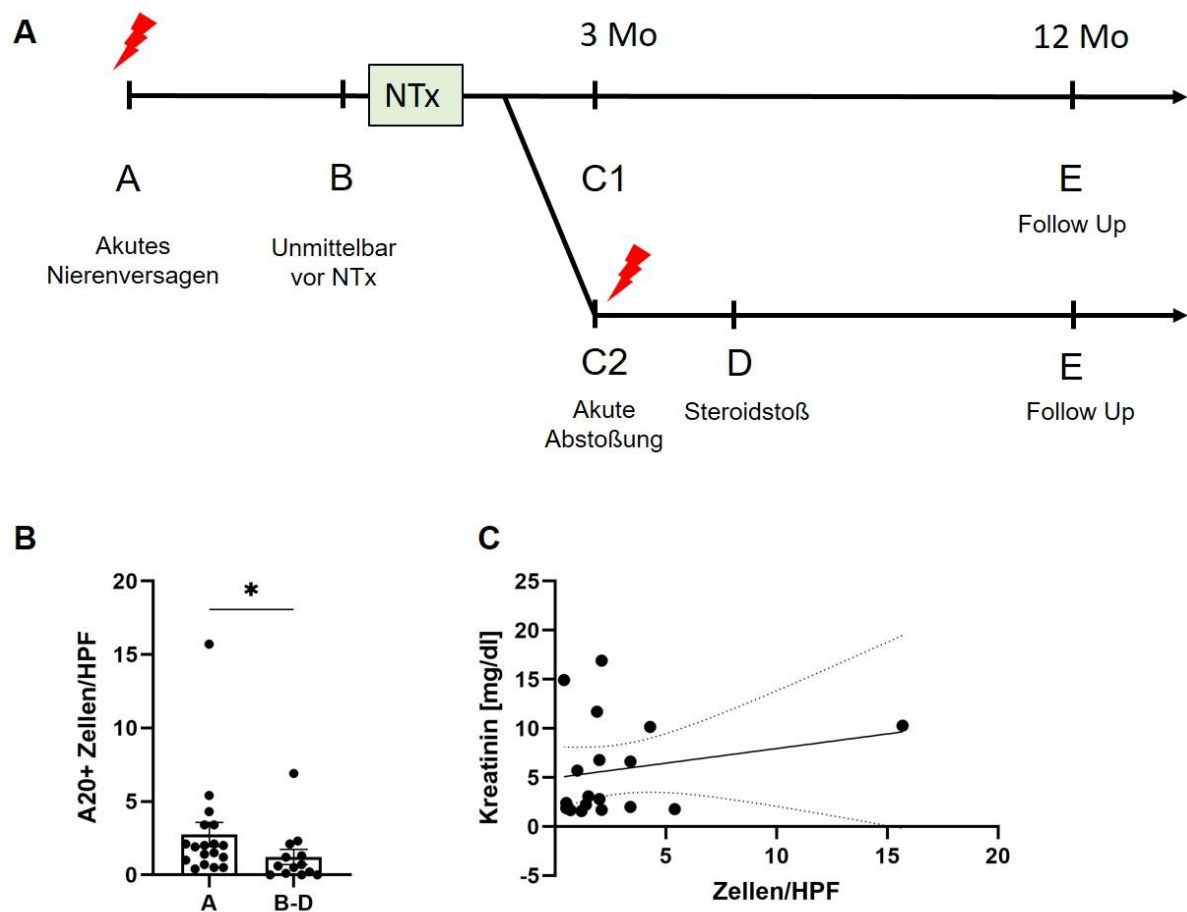


Abbildung 2: Erhöhte Anzahl A20-positiver Zellen in Nierenbiopsien bei akutem Nierenversagen. A: Schematische Darstellung der Probenerhebung. B: Zahl der A20+ Zellen/HPF in Nierenbiopsien bei akutem Nierenversagen (Zeitpunkt A) im Vergleich zu Biopsien von unmittelbar vor bis nach der Transplantation (Zeitpunkt B – D). Statistische Analyse mittels Mann-Whitney-Test. C: Vergleich der Serum-Kreatininkonzentration als Surrogatparameter zum Zeitpunkt der akuten Nierenschädigung mit der Anzahl A20-positiver Zellen pro HPF (high power field) in einer Biopsieprobe.

## 4.2 A20-mRNA Expression bei akuter Nierenschädigung und bei der Transplantatabstoßung

Aus paraffinierten Biopsieschnitten wurde RNA gewonnen und anschließend mittels qPCR die A20-Expression gemessen, wobei sich bei einigen Proben eine erhöhte A20-Konzentration zeigte.

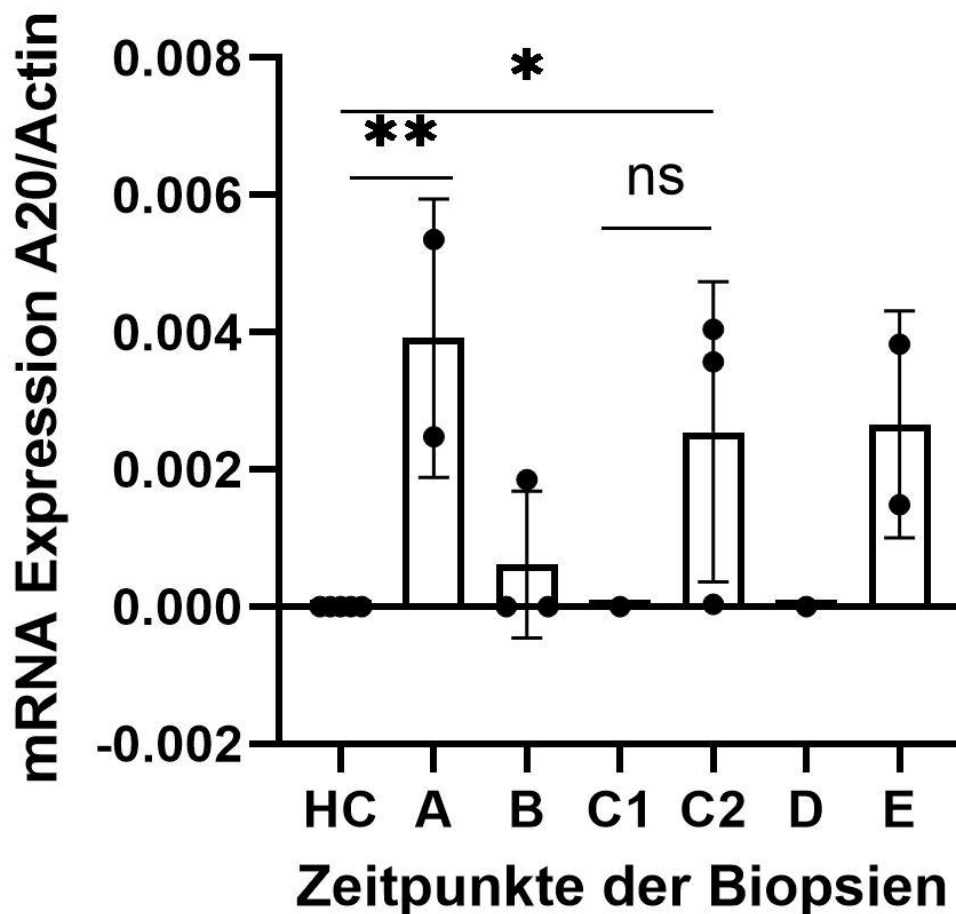


Abbildung 3: Verstärkte A20-Expression bei akutem Nierenversagen und einer Transplantatabstoßung. A20 Expressionsanalyse mittels qPCR in FFPE fixierten Nierenbiopsien. Untersucht wurden gesunde Kontrollen (HC = Healthy Control, n = 5), Akutes Nierenversagen (A, n = 2), Nullbiopsie vor Transplantation (B, n = 3), Keine Abstoßung (C1, n = 1), Abstoßung (C2, n = 3), Steroidstoßtherapie nach Abstoßung (D, n = 1) sowie Follow-up (= ein Jahr nach Transplantation) Proben (E, n = 2). Dargestellt sind die  $\Delta C_p$  Werte von A20, normiert auf Actin als Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die statistische Analyse erfolgte mittels t-test.

Die Proben zum Zeitpunkt A stammen von Patienten mit akuter Nierenschädigung. Der Zeitpunkt B stellt eine Nullbiopsie vor unmittelbarer Nierentransplantation dar. Zu den Zeitpunkten C1 und C2 wurde bei laborchemischem und klinischem Verdacht auf eine Abstoßungsreaktion eine Biopsie durchgeführt. Bei C1 zeigte sich lichtmikroskopisch kein Verdacht auf eine Abstoßungsreaktion. Bei C2 wurde histologisch eine Abstoßung diagnostiziert. Zum Zeitpunkt D erfolgte ein Steroidstoß zur Behandlung einer akuten Abstoßungsreaktion (Abbildung 3).

Im Vergleich zu den gesunden Kontrollen zeigt sich zum Zeitpunkt A eine vermehrte Induktion der A20 Expression. In den fünf gesunden Kontrollen wurde keine A20-Expression nachgewiesen.

Bei den Biopsieproben zum Zeitpunkt C zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen Abstoßungsreaktion und keiner Abstoßungsreaktion. Vergleicht man jedoch C2 mit den gesunden Kontrollen, so findet man bei gesicherter histologischer Abstoßungsreaktion eine erhöhte A20-Expression.

Auffällig ist hierbei, dass die RNA-Expression nicht die Ergebnisse der IHC widerspiegelt. Hier ist der Unterschied in der Stichprobenzahl anzumerken, außerdem ist die Immunhistochemie weniger sensitiv als die qPCR.

### **4.3 Durchflusszytometrische Untersuchungen aus Patientenblut**

Die intrazelluläre A20-Expression in PBLs wurde mittels Durchflusszytometrie ermittelt und mithilfe von Streulicht- sowie Boxplotdiagrammen dargestellt.

Die Untersuchungen zeigten, dass zu allen drei untersuchten Zeitpunkten (unmittelbar vor Transplantation „B“, drei Monate nach Transplantation „C1“, ein Jahr nach Transplantation „E“) eine deutliche A20-Expression in PBLs beobachtbar war. Im untersuchten Kollektiv gab es keine Abstoßungsreaktion.

Durchflusszytometrische Messungen von CD4+/IFN $\gamma$ + Zellen (T<sub>H</sub>1- Zellen) und CD4/FoxP3+ Zellen (Regulatorische T-Zellen, Treg.- Zellen) zeigten keine signifikanten Unterschiede zu den drei untersuchten Zeitpunkten (Abbildung 3).

Abbildung 4.A beschreibt den Anteil CD4+/IFN $\gamma$ + Zellen in Relation zur Gesamtzellzahl, während in Abbildung 4.B der Anteil der CD4+/IFN $\gamma$ + Zellen in Relation zu CD4+ Zellen dargestellt ist. Die Abbildungen 4.C und D entsprechen den vorher beschriebenen Abbildungen und zeigen die CD4+/FoxP3+ Zellen in Relation zur Gesamtzellzahl bzw. zu CD4+ Zellen.

Abbildung 4.E und F zeigen repräsentative durchflusszytometrische Analysen.



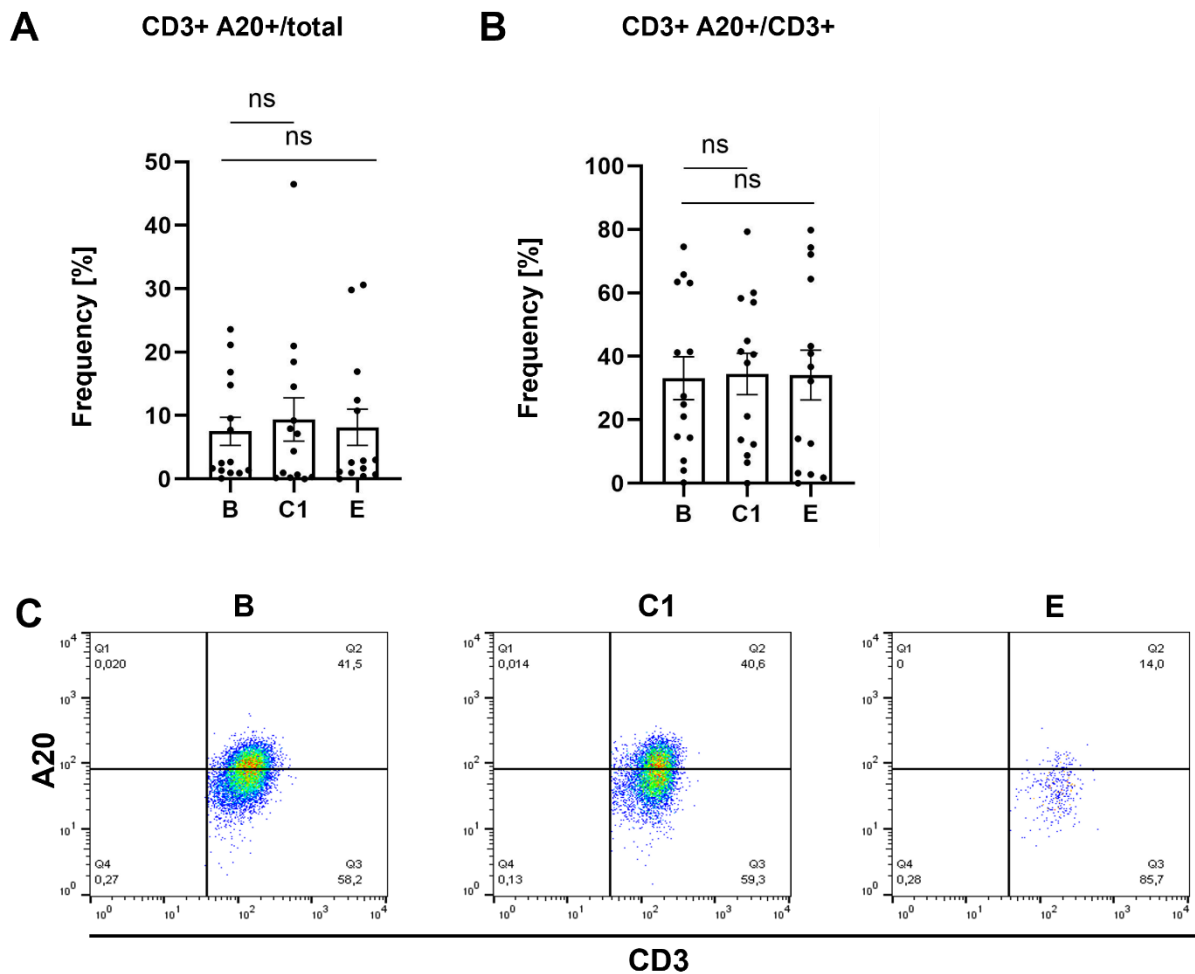


Abbildung 5: Konstante Zahl von A20+ T-Zellen (CD3+) vor und nach Nierentransplantation.

Konstante Zahl von A20+ T-Zellen (CD3+) vor und nach Nierentransplantation

A: CD3+ Zellen mit A20-Expression im Vergleich zur Gesamtzellzahl und B: im Vergleich zu allen CD3+ Zellen zu den drei Zeitpunkten B, C1, E. Dargestellt ist der jeweilige Anteil (Frequency) in Prozent (%). C: Repräsentative durchflusszytometrische Messungen (C). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zu den drei verschiedenen Zeitpunkten. N=14, Mittelwerte ± SEM. Die statistische Analyse erfolgte mittels t-Test.

Der Vergleich der CD3+/A20+ Zellen, anteilig der gesamten Zellzahl oder aller CD3+ Zellen, zeigte ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zwischen den drei untersuchten Zeitpunkten (Abbildung 5).

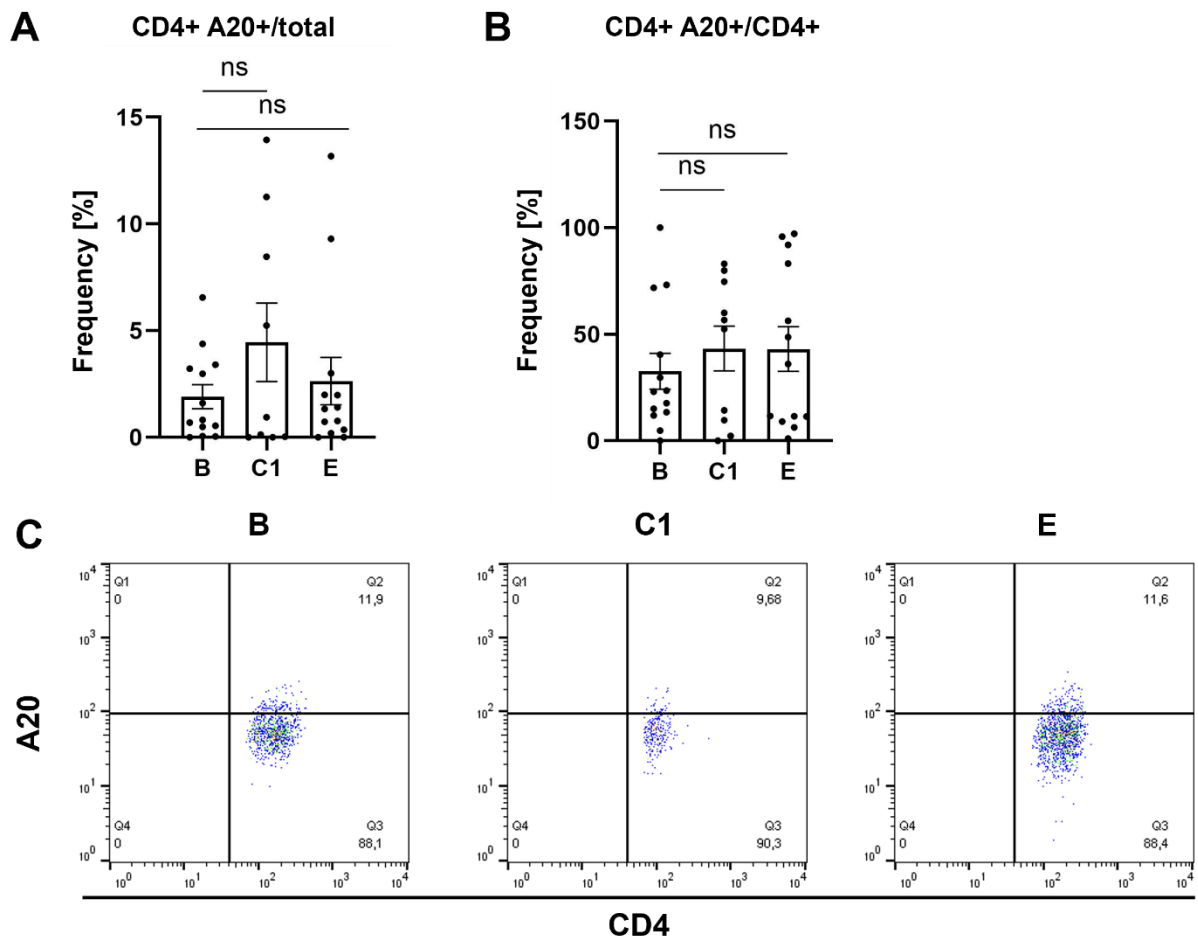


Abbildung 6: Konstante Zahl von A20+ TH-Zellen (CD4+) vor und nach Nierentransplantation. Dargestellt sind CD4+ Zellen mit A20-Expression im Vergleich zur Gesamtzellzahl (A) und im Vergleich zur allen CD4+ Zellen (B) zu den drei Zeitpunkten B, C1, E, sowie die durchflusszytometrischen Messungen (C). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zu den drei verschiedenen Zeitpunkten. N=14, Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die statistische Analyse erfolgte mittel t-Test.

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der durchflusszytometrischen Analyse der CD4+ Zellen mit A20-Expression im Vergleich zu der Gesamtheit der CD4+ Zellen, jeweils durchgeführt zu den drei Zeitpunkten B, C1 und E. Die statistische Analyse erfolgte mittels t-Test. Die Ergebnisse basieren auf N=14 und sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt (Abbildung 6).

Die CD11b+/A20+ Zellen zeigten zu den untersuchten Zeitpunkten ebenfalls keinen signifikanten Unterschied (Abbildung 7).

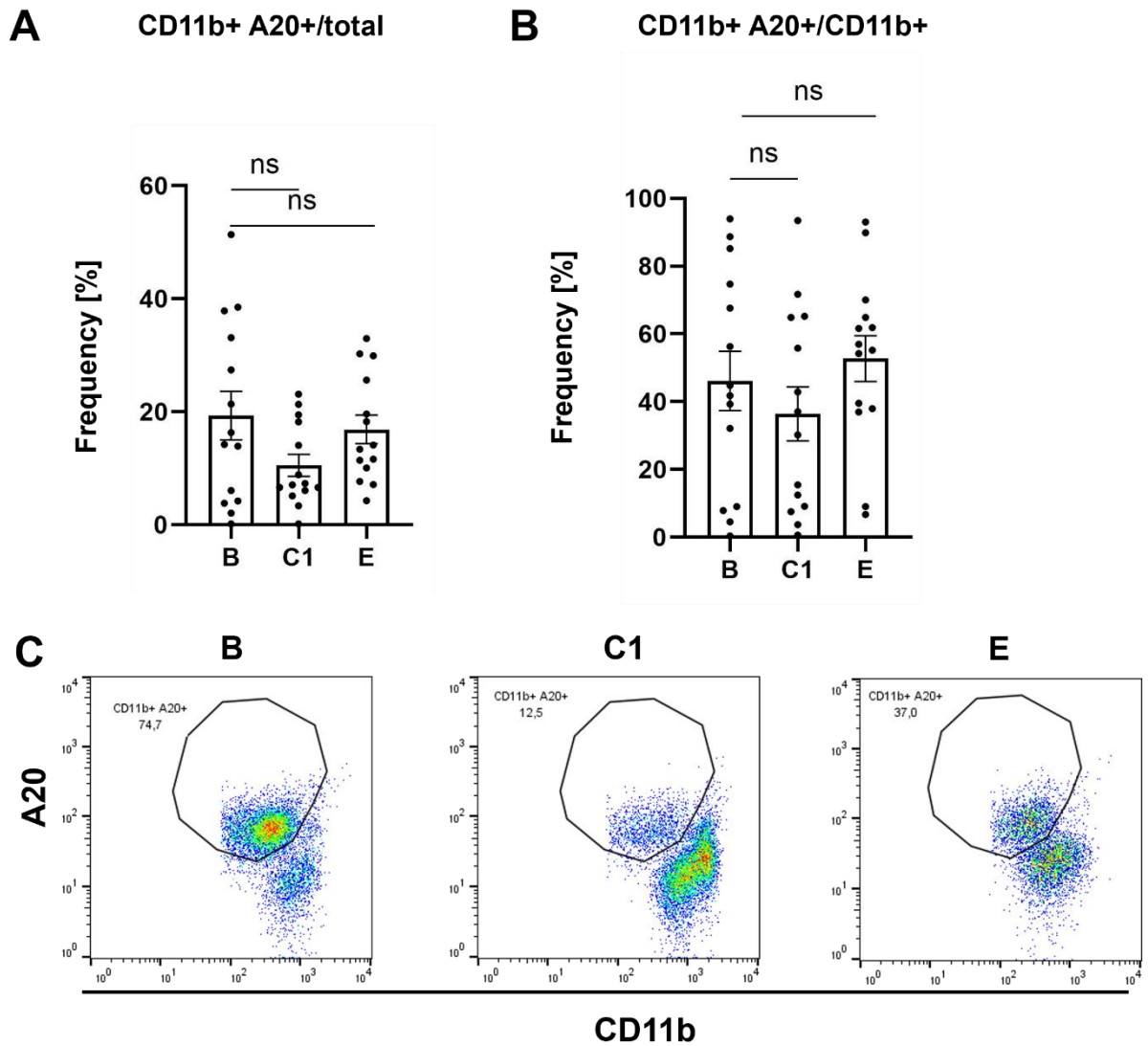


Abbildung 7: Konstante Zahl von A20+ Monozyten/Makrophagen (CD11b+) vor und nach Nierentransplantation.

Dargestellt sind CD11b+ Zellen mit A20-Expression im Vergleich zur Gesamtzellzahl (A) und im Vergleich zur allen CD11b+ Zellen (B) zu den drei Zeitpunkten B, C1, E, sowie die durchflusszytometrischen Messungen (C). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zu den drei verschiedenen Zeitpunkten. N=14, Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die statistische Analyse erfolgte mittels t-Test.

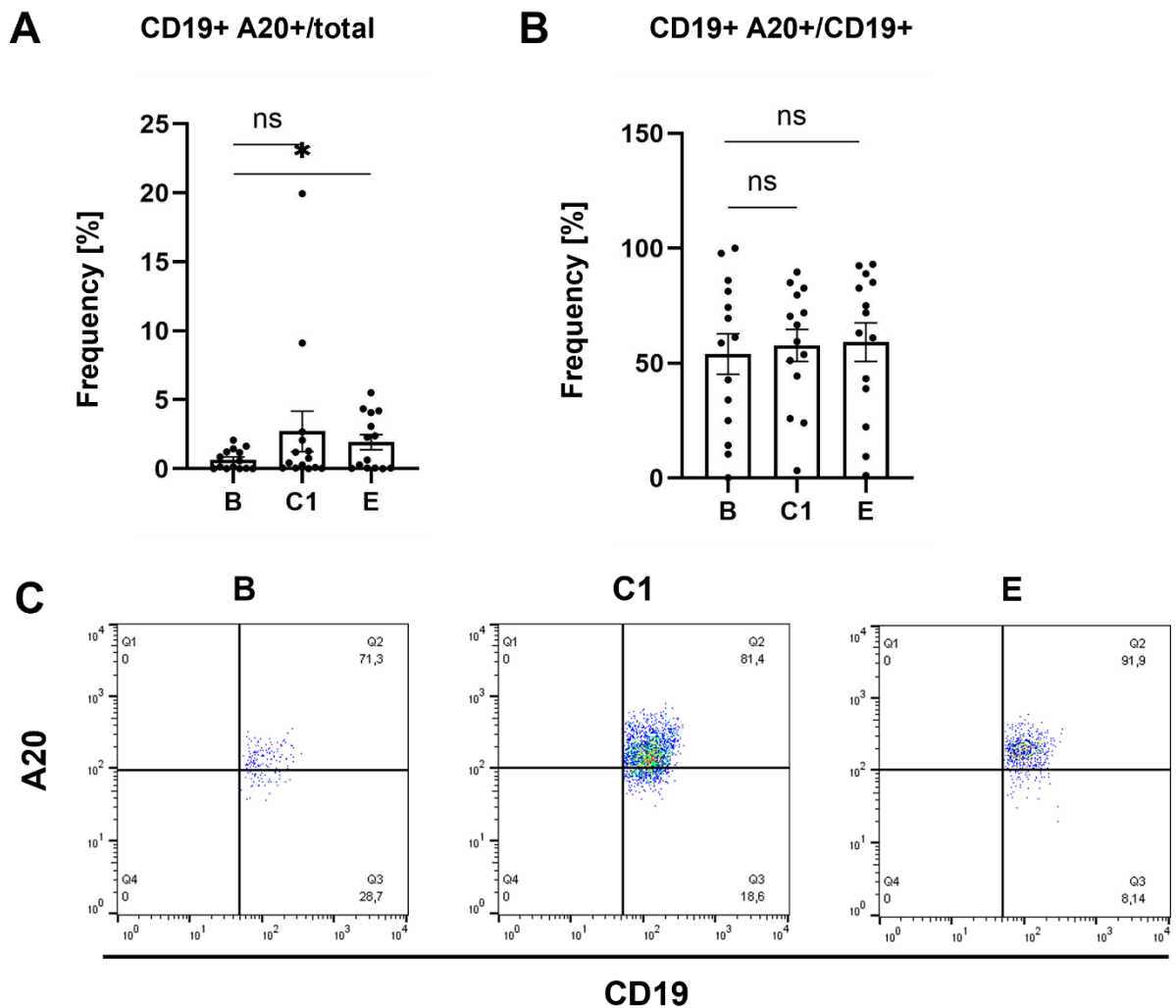


Abbildung 8: Konstante Zahl von A20+ B-Zellen (CD19+) vor und nach Nierentransplantation. Dargestellt sind CD19+ Zellen mit A20-Expression im Vergleich zur Gesamtzellzahl (A) und im Vergleich zur allen CD19+ Zellen (B) zu den drei Zeitpunkten B, C1, E, sowie die durchflusszytometrischen Messungen (C). Hier zeigte sich ein signifikanter Unterschied bei den CD19+ A20 Zellen im Vergleich zu der gesamten Zellzahl, im Vergleich zwischen Zeitpunkt E und B. N=14, Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die statistische Analyse erfolgte mittels t-Test.

Bei den B-Lymphozyten, den CD19+ Zellen, zeigte sich ein signifikanter Unterschied im Anteil der CD19+ A20+ Zellen, im Vergleich mit der Gesamtzellzahl zwischen den untersuchten Zeitpunkten. Hier wurden vermehrt CD19+A20+ Zellen zum Zeitpunkt E, also der Kontrolle ein Jahr nach Transplantation, im Vergleich zum Zeitpunkt B, unmittelbar vor der Transplantation, beobachtet (Abbildung 8.A). Der Anteil der A20+ B-Lymphozyten dagegen blieb konstant (Abbildung 8.B).

#### **4.4 Expressionanalyse von A20 im Kontext der Lupus Nephritis (In-vitro)**

Ein häufiger Grund für eine akute Nierenschädigung sind autoimmunvermittelte Erkrankungen, wie zum Beispiel der systemische Lupus erythematoses. Im Zuge dessen renaler Manifestation, Lupus Nephritis (LN), kommt es zu schubweise verlaufenden Entzündungsreaktionen. Inwiefern A20 im Kontext der LN eine funktionelle Rolle inne hat, sollte im Folgenden anhand von funktionellen In-vitro-Versuchen untersucht werden.

Hierzu wurde die Expression von A20 auf proinflammatorische Stimuli in Makrophagen und renalen Tubulus Epithelzellen untersucht (murin und human).

#### 4.4.1 A20-RNA Induktion in humanen Tubulusepithelzellen (TEZ)

Im Folgenden sind die Ergebnisse der qPCR humaner TEZ nach Stimulation dargestellt, wobei die Kontrolle mit Zellkulturmedium ohne Stimulanz erfolgte.

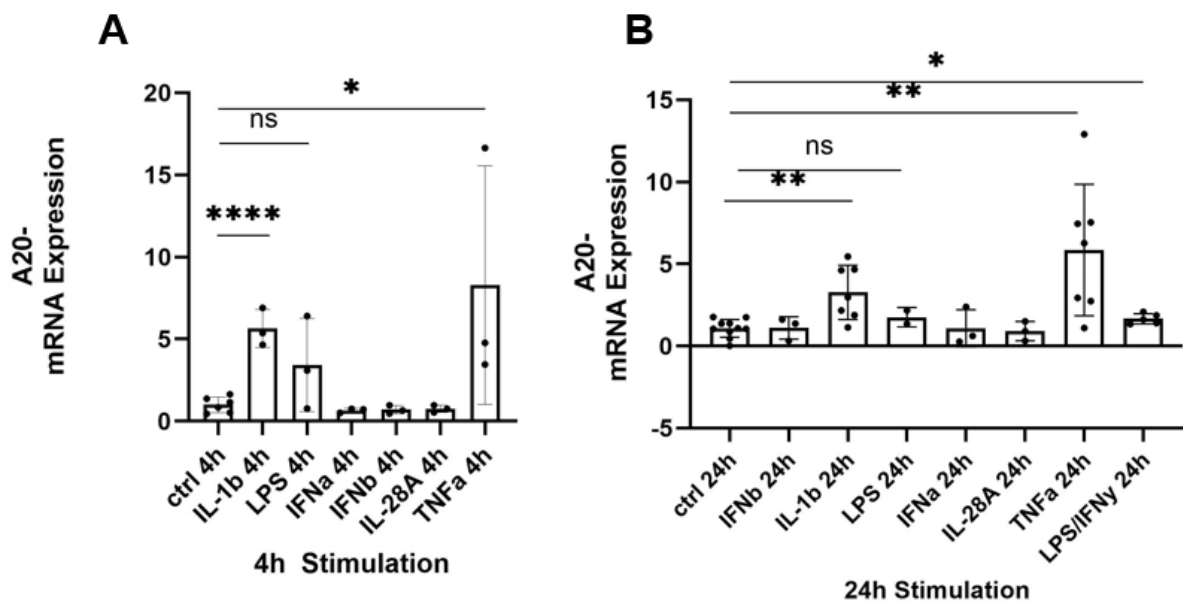


Abbildung 9: A20-Expression in humanen TEZ nach Stimulation mit TNF $\alpha$  sowie LPS/IFN $\gamma$ . A: Stimulation für 4h sowie B: Stimulation für 24h, mit unterschiedlichen proinflammatorischen Mediatoren. Die A20 mRNA Expression wurde anschließend mittels qPCR ermittelt. Hierbei war nach 4-stündiger Stimulation mit IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  ein signifikanter Unterschied in der A20 Expression messbar. Nach 24h zeigte sich nach Stimulation mit IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  und LPS+IFN $\gamma$  eine deutlich signifikante A20-Expression. Die übrigen Stimulationen führten zu keiner gesteigerten A20-Expression. Dargestellt ist die auf Actin normierte A20- Expression, relativ zur jeweiligen unstimulierten Kontrolle (ctrl). Mittelwerte  $\pm$  SEM. Statistische Analyse erfolgte mittels t-test. Ctrl = unbehandelte Kontrolle.

Nach einer vierstündigen Stimulation führte IL-1 $\beta$  zu einem signifikanten Anstieg der A20-Expression im Vergleich zur Kontrolle, worüber hinaus die A20-Expression durch TNF $\alpha$  verstärkt, exprimiert wurde (Abbildung 9.A). Im Gegensatz dazu zeigten LPS sowie die Interferone IFN $\alpha$ , IFN $\beta$  und IL-28A keine signifikanten Veränderungen der A20-Expression im Vergleich zur Kontrolle.

Nach 24-stündiger Stimulation ergab sich ein ähnliches Muster (Abbildung 9.B): Die Zytokine IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  resultierten weiterhin in signifikanten Anstiegen der A20-Expression im Vergleich zur Kontrolle, wobei der Effekt von TNF $\alpha$  besonders ausgeprägt war. Des Weiteren zeigte LPS auch nach 24 Stunden keine signifikante

Wirkung. Jedoch induzierte die Kombination von LPS und IFN $\gamma$  nach 24 Stunden einen signifikanten Anstieg der A20-Expression. Die Interferone IFN $\alpha$ , IFN $\beta$  und IL-28A blieben auch nach 24 Stunden ohne signifikante Auswirkungen auf die A20-Expression. Erwartungsgemäß führte die Stimulation mit vorwiegend über NF- $\kappa$ B wirkenden Signalen zu einer deutlich erhöhten Expression von A20 in den Zielzellen.

### 4.4.2 A20-Protein Induktion in humanen Tubulusepithelzellen

Die A20-Proteinexpression nach Stimulation humaner TEZ wurde mittels Western Blot untersucht und im Folgenden zusammenfassend dargestellt. Es wurden TEZ verwendet, die aus Urin gewonnen wurden (uTEZ).

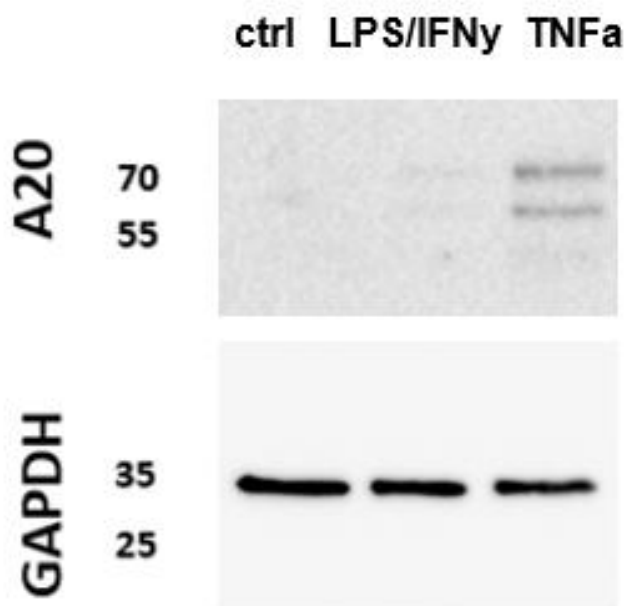


Abbildung 10: Verstärkte A20-Proteinexpression in TEZ nach Stimulation mit TNF $\alpha$ . Exemplarischer Ausschnitt aus einem Western Blot mit aus Urin gewonnenen TEZ (uTEZ). Nach Stimulation über 24h mit TNF $\alpha$  und LPS+IFN $\gamma$  erfolgte der A20-Nachweis. Unstimulierte uTEZ (ctrl) dienten als Vergleich. Bei der Ladekontrolle handelt es sich um GAPDH.

In dem hier durchgeführten repräsentativen Western Blot (Abbildung 10) humaner renaler uTEZ, 48 Stunden lang mit LPS sowie IFN $\gamma$  oder TNF $\alpha$  stimuliert, wurde GAPDH als Ladekontrolle verwendet. Ein erheblicher Anstieg der A20-Expression war unter Stimulation mit TNF $\alpha$  im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle erkennbar, während die Expression unter LPS und IFN $\gamma$  weniger deutlich ausfiel. Bei

unstimulierten Kontrollen zeigten sich kaum Banden in dem Bereich, in dem A20 zu finden wäre. Ähnlich, wie im vorigen Abschnitt gezeigt, führte die Stimulation mit TNFa zu der deutlichsten Steigerung der A20-Expression. In zukünftigen Untersuchungen könnten die hier etablierten Bedingungen genutzt werden, um zu untersuchen, ob ein autoimmuner Hintergrund die A20-Expression nach Stimulation beeinflusst. Da aus Urin gewonnene uTEZ sich in den hier gezeigten Untersuchungen ähnlich verhalten wie aus Gewebe gewonnene TEZ, könnten uTEZ aus gesunden Probanden und LN-Patienten verglichen werden.

#### 4.4.3 A20-RNA Induktion in humanen Makrophagen

Humane Makrophagen, differenziert aus Blut isolierte Monozyten, wurden ebenfalls auf ihr Vermögen hin untersucht, A20 nach Stimulation zu exprimieren.

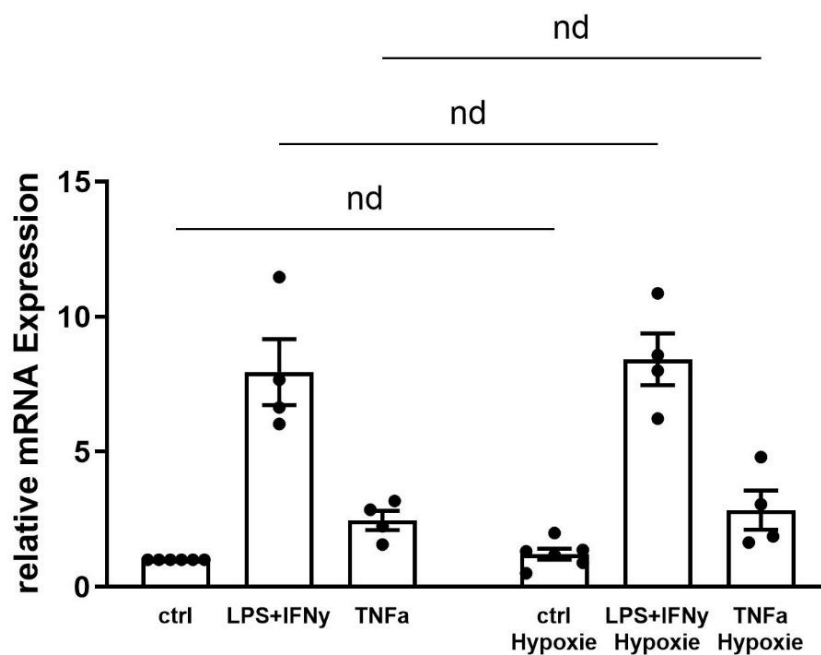


Abbildung 11: Induktion der A20-Expression in humanen Makrophagen mittels LPS+IFNy, unabhängig von hypoxischen Bedingungen.

Humane Makrophagen, nach Differenzierung aus Monozyten, wurden 24h unter Hypoxiebedingungen und BTPS-Bedingungen stimuliert. Mittels qPCR wurde die A20-mRNA-Expression ermittelt, GAPDH diente als Housekeeping Gen. Dargestellt ist, die auf GAPDH normierte A20-Expression, relativ zur unstimulierten Kontrolle. Mittelwerte  $\pm$  SEM. Statistische Analyse erfolgte mittels t-test.

Zunächst wurde die Stimulation mit TNFa zu der mit LPS/IFNy verglichen, sowohl unter hypoxischen als auch unter normoxischen Bedingungen (Abbildung 11).

## Ergebnisse

Die Stimulation mit LPS/IFN $\gamma$  führte zu einer deutlichen Erhöhung der A20-mRNA-Expression ( $p < 0,0001$ ), sowohl unter normoxischen als auch hypoxischen Bedingungen. Während unter Normoxie lediglich ein tendenzieller Anstieg beobachtet wurde ( $p = 0,0516$ ), zeigte sich unter hypoxischen Bedingungen ein signifikanter Anstieg der Expression ( $p = 0,0469$ ).

Interessanterweise ergab die statistische Untersuchung zwischen hypoxischen und normoxischen Bedingungen keinen Unterschied, weshalb der Einfluss von Hypoxie auf die A20-Expression nicht weiter untersucht wurde.

In humanen Makrophagen führte die Stimulation mit LPS/IFN $\gamma$  zu der vergleichsweise höchsten A20-Expression, anders als in humanen TEZ (hier führte TNF $\alpha$  zur deutlichsten Expressionssteigerung).

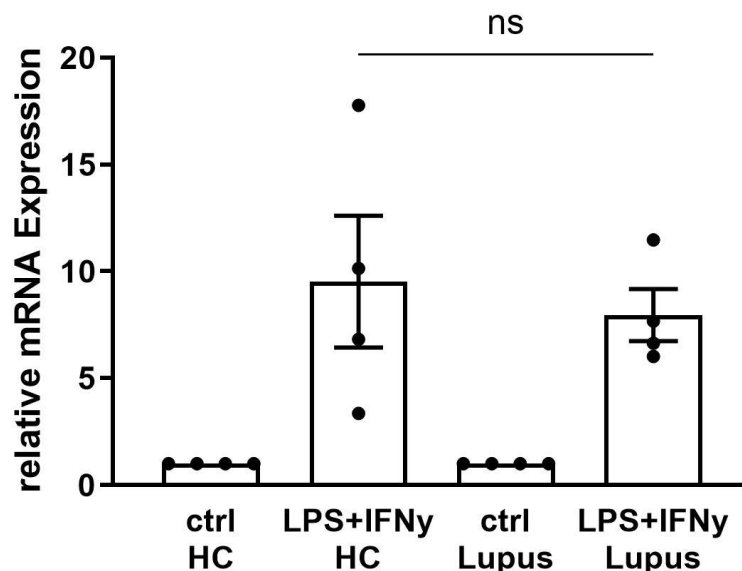


Abbildung 12: Vergleichbare A20-Expression in humanen Makrophagen (SLE) im Vergleich zu gesunder Kontrolle.

Monozyten wurden aus dem Blut gesunder Probanden (HC) und Patienten mit SLE isoliert, diese wurden zu Makrophagen differenziert und anschließend 24h mit TNF $\alpha$  stimuliert. Mittels qPCR wurde die A20-mRNA-Expression ermittelt, GAPDH diente als Housekeeping Gen. Dargestellt ist die auf GAPDH normierte A20-Expression relativ zur unstimulierten Kontrolle. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Mittelwerte  $\pm$  SEM. Statistische Analyse erfolgte mittels t-test.

Zur Untersuchung der A20-Expression in humanen Makrophagen wurden Monozyten aus dem peripheren Blut gesunder Probanden (HC) sowie von Patienten mit systemischem Lupus erythematodes (SLE) isoliert und in-vitro zu Makrophagen differenziert. Anschließend erfolgte eine 24-stündige Stimulation mit TNF $\alpha$ . Die A20-mRNA-Expression wurde mittels quantitativer PCR (qPCR) analysiert, wobei GAPDH

als Housekeeping-Gen zur Normalisierung diene. Die dargestellten Werte geben die A20-Expression relativ zur jeweiligen unstimulierten Kontrolle wieder.

Ein vergleichbarer Versuchsaufbau wurde mit einer alternativen Stimulation durch LPS und IFN $\gamma$  durchgeführt. Auch hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der A20-Expression zwischen den Makrophagen der SLE-Patienten und denen der gesunden Kontrollgruppe (Abbildung 12).

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben, die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test.

#### 4.4.4 A20-RNA Induktion in murinen Tubulusepithelzellen

Um den Einfluss des autoimmunen Hintergrunds auf die A20 Expression zu untersuchen, wurden im Folgenden murine TEZ aus MRL-*Fas<sup>lpr</sup>* Lupus Mäusen stimuliert und mit TEZ, isoliert aus C57BL/6J Mäusen, verglichen.

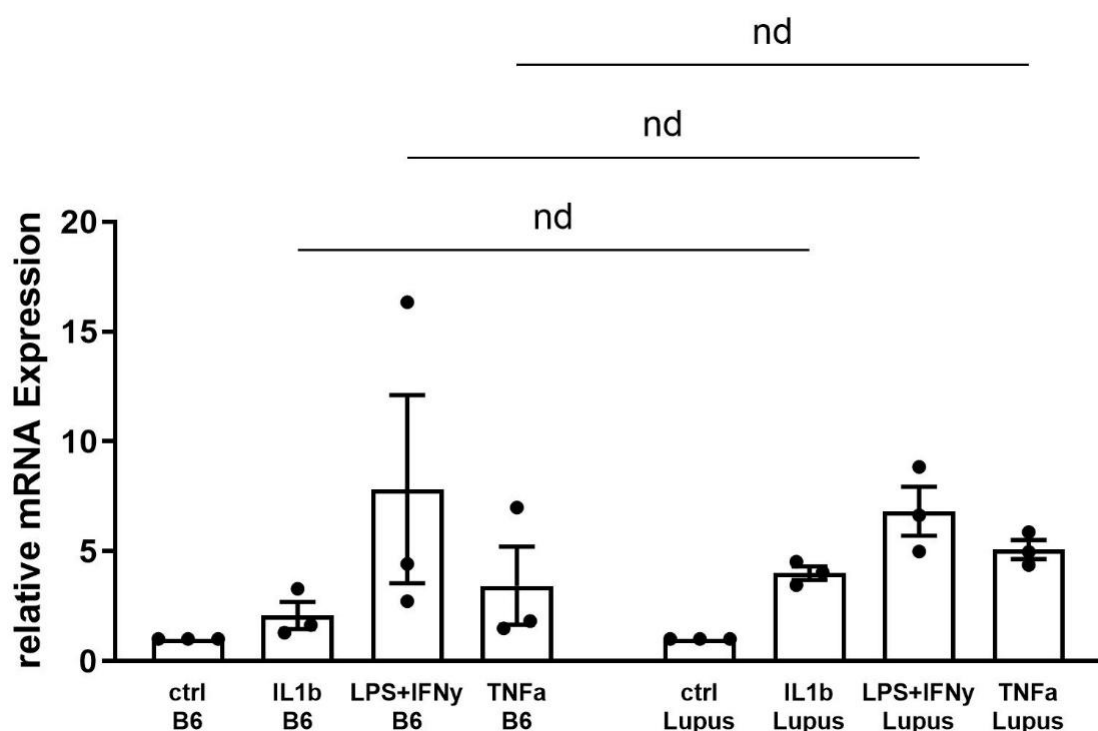


Abbildung 13: Vergleichbare Expression von A20 in renalen TEZ aus Lupus und Kontrollmäusen nach Stimulation.

Es wurden primäre murine TEZ aus Kontroll- und MRL-*Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen 24h stimuliert. Mittels qPCR wurde die A20-mRNA-Expression ermittelt, GAPDH diene als Housekeeping Gen. Dargestellt ist die auf GAPDH normierte A20-Expression relativ zur unstimulierten Kontrolle (ctrl). Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Mittelwerte  $\pm$  SEM. Statistische Analyse erfolgte mittels t-test.

In murinen renalen TEZ wurde mit IL-1b, LPS/IFN $\gamma$  oder TNF $\alpha$  stimuliert, allerdings hatte hierbei der genetische Hintergrund der Donor-Mäuse keinen Einfluss auf die Stärke der A20-Induktion (Abbildung 13). Im Gegensatz zu den Beobachtungen in humanen TEZ führte in murinen TEZ die Stimulation mit LPS/IFN $\gamma$  zur deutlichsten Expressionssteigerung von A20.

#### 4.4.5 A20-RNA Induktion in murinen Makrophagen

Es wurden, äquivalent zu den humanen Makrophagen, murine Knochenmarkszellen erst zu Makrophagen differenziert und anschließend stimuliert. Nach Stimulation wurde anschließend die A20-Expression mittels qPCR ermittelt. Eine Stimulation mit IL-4, führte zur Differenzierung zu M2 Makrophagen, hatte allerdings keinen Einfluss auf die A20-Expression (nicht gezeigt). Die Stimulation mit LPS/IFN $\gamma$  führte zur Differenzierung zu M1 Makrophagen und zur verstärkten Expression von A20 (Abbildung 14,  $p = 0,0016$  für Makrophagen aus C57BL/6J Mäusen).

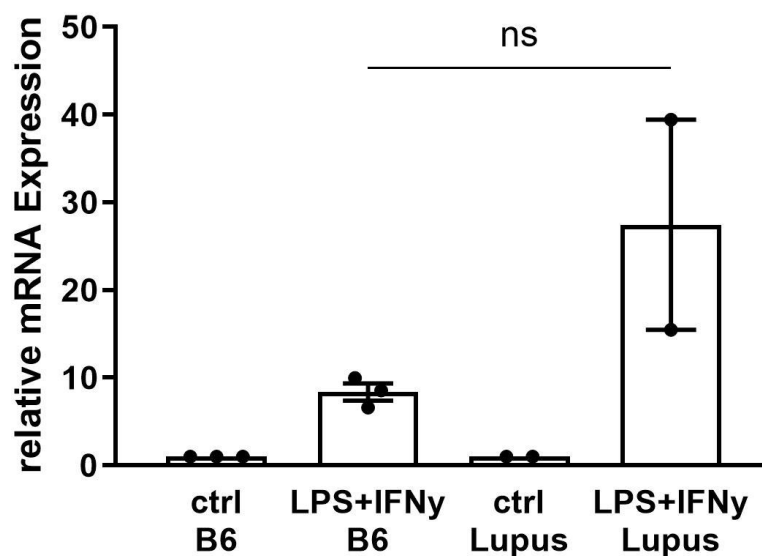


Abbildung 14: Tendenziell verstärkte Expression von A20 in primären Makrophagen aus Lupus im Vergleich zu Makrophagen aus Kontrollmäusen nach Stimulation. Murine Makrophagen, differenziert aus KM-Zellen von nativen (B6-) und MRL-*Fas<sup>lpr</sup>*-Mäusen, wurden 24 Stunden stimuliert. Mittels qPCR wurde die A20-mRNA-Expression ermittelt, GAPDH diente als Housekeeping Gen. Dargestellt ist die auf GAPDH normierte A20-Expression, relativ zur unstimulierten Kontrolle (ctrl). Mittelwerte  $\pm$  SEM. Statistische Analyse erfolgte mittels t-test.

Die Expression von A20 war in Makrophagen aus MRL-*Fas*<sup>lpr</sup> Mäusen im Vergleich zu Makrophagen aus C57BL/6J tendenziell erhöht. Um eine belastbare Aussage treffen zu können, ist eine Erweiterung der Versuche notwendig.

## 5 Diskussion

### 5.1 These

Die vorliegende Doktorarbeit untersucht die protektive Funktion des Zinkfingerproteins A20 im Kontext der Abstoßungsreaktion nach Nierentransplantation sowie die Rolle von A20 in autoimmunen Prozessen wie dem SLE, wobei der Fokus auf der detaillierten Analyse der Funktion und Expression des Zinkfingerproteins A20 während der Nierentransplantation liegt. Es wird postuliert, dass A20 eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Immunantwort spielt und somit als potenzieller Schutzfaktor gegen Abstoßungsreaktionen und autoimmune Prozesse agiert. Die Untersuchungen sollen dazu beitragen, ein tieferes Verständnis für die zugrundeliegenden Mechanismen zu gewinnen und mögliche therapeutische Ansätze zur Modulation von A20 bei der Nierentransplantation und bei Lupus-Nephritis zu identifizieren.

#### 5.1.1 Die Rolle von A20 im Rahmen der Nierentransplantatabstoßungsreaktion

Das TNFAIP3 ist ein Zink-Finger-Protein und ein Ubiquitin-editierendes Enzym, das als zentraler negativer Regulator des NF- $\kappa$ B-Signalwegs fungiert (32).

In dieser Arbeit wurden die Expression von A20 in Nierenbiopsien und Blutzellen während akutem Nierenversagen und nach Transplantation, ggf. unter Abstoßungsreaktionen mittels Immunhistochemie und qPCR, untersucht.

Die Biopsieproben zum Zeitpunkt A mit akuter Nierenschädigung zeigten eine erhöhte A20-Expression, die mit akuter Inflammation assoziiert werden konnte, wobei die gleichzeitige CRP-Erhöhung im Labor im Vergleich zu den folgenden Zeitpunkten die entzündliche Situation zum Zeitpunkt A bestätigt. Dagegen weisen die Nullbiopsien vor unmittelbarer Nierentransplantation keine erhöhte A20-Konzentration auf. Die

anschließenden Biopsieproben zum Zeitpunkt C2, also bei histologisch gesicherter Abstoßungsreaktion, zeigen erhöhte A20-Konzentration in der qPCR, die mit vermehrt infiltrierenden A20-positiven Zellen in der Immunhistochemie übereinstimmt. Jedoch indiziert die nach Steroidstoßtherapie entnommene Probe keine Erhöhung von A20 mehr, was darauf hindeuten könnte, dass die Entzündung durch die Therapie erfolgreich kontrolliert wurde.

Die Analyse der Durchflusszytometrie zum Zeitpunkt B (unmittelbar vor Transplantation) zeigte keine signifikanten Unterschiede in der A20-Expression in PBLs, im Vergleich zu den späteren Zeitpunkten (drei Monate (C1) bzw. ein Jahr nach Transplantation (E)). Dies steht im Einklang mit Studien, die zeigen, dass die Funktion von Lymphozyten bei akuter Nierenschädigung variieren kann, jedoch keine signifikanten Unterschiede in der A20-Expression in stabilen Phasen aufweist (87, 88). Die konstante A20-Expression zum Kontrollzeitpunkt E ist kohärent zu dem Bild einer stabilen Transplantatphase in der Literatur (89, 90).

Dagegen zeigten Vagiotas et al. (91) und Mirzakhani et al. (92), dass in stabilen Phasen nach Transplantation die Immunzellzahl weitgehend konstant blieb, deren A20 Expression allerdings vermindert war.

Die widersprüchlichen Befunde zur Stabilität der Immunzellzahlen und A20-Expression nach Transplantation deuten auf die Komplexität der Immunregulation hin. Weitere Studien sind notwendig, um diese Diskrepanzen zu klären und die Rolle von A20 in der Transplantationsimmunologie besser zu verstehen.

Nach einer Transplantation werden die T-Zell-Antworten primär durch Immunsuppressiva (z. B. Calcineurin-Inhibitoren) kontrolliert, die direkt die IL-2-Signalwege blockieren. A20 spielt hier eine untergeordnete Rolle. In CD4<sup>+</sup>-T-Zellen fördert A20 zwar Autophagie und hemmt mTOR, diese Effekte sind jedoch klinisch weniger relevant, da die T-Zell-Aktivierung bereits pharmakologisch supprimiert wird (4). Das könnte eine Erklärung für die gleichbleibende A20-Expression in CD4<sup>+</sup> Zellen in den hier vorliegenden Untersuchungen darstellen. Posttransplantationsstudien zeigen keine signifikanten A20-Veränderungen in CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, möglicherweise wegen redundanter regulatorischer Mechanismen (4).

A20 wird in myeloischen Zellen basal nur schwach exprimiert, im Gegensatz zu T- und B-Zellen oder Endothelzellen (66, 93, 94). CD11b<sup>+</sup>-Zellen (z. B. Monozyten, Makrophagen) exprimieren somit A20 nur geringfügig, sodass zusätzliche

Regulationen möglicherweise posttransplantatorisch nicht signifikant messbar sind. In Nierentransplantatbiopsien zeigten CD11b<sup>+</sup>-myeloische Zellen eine starke Assoziation mit mikrovaskulärer Entzündung und Abstoßung (95, 96). Hier konnte eine A20-Expression in CD11b<sup>+</sup> Zellen beobachtet werden; da in dem hier untersuchten Kollektiv keine Abstoßungsreaktion vorkam, passt die beobachtete konstante A20-Expression zu der genannten Literatur.

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie konnte hier lediglich eine signifikante Zunahme von A20-exprimierenden CD19<sup>+</sup> Zellen zum Zeitpunkt E, im Vergleich zu Zeitpunkt B beobachtet werden. In vielen Arbeiten wurde bereits beschrieben, dass die Immunzellpopulationen nach einer stabilen Transplantationsphase keine signifikanten Veränderungen aufweisen. Die hier dargestellten Ergebnisse lassen sich als kompensatorisch gesteigerte Expression von A20 in B-Zellen interpretieren, mit dem Ziel, überschießende Antikörperantworten – etwa die Bildung Donor-spezifischer Antikörper – zu unterdrücken und so einer antikörpervermittelten Abstoßung entgegenzuwirken (4, 91, 97, 98). A20 unterdrückt in B-Zellen die NF-κB-Aktivierung und hemmt dadurch deren Proliferation, IL-6-Expression und Autoantikörperproduktion. Patienten mit einer niedrigeren CD19<sup>+</sup> Zellzahl haben ein geringeres Risiko, ein Transplantatversagen zu erleiden (88, 99). Standard-Immunsuppressiva (z. B. Calcineurin-Inhibitoren) hemmen vorwiegend T-Zell-Aktivierung, während B-Zellen weniger effektiv unterdrückt werden (57). Somit könnte eine Erhöhung der A20-Expression in den verbleibenden CD19<sup>+</sup> Zellen ein Schutzmechanismus sein, um deren pathogene Aktivität weiter zu begrenzen (4).

Schäfer (84) zeigte in einer vorhergehenden Arbeit, dass es in den durchgeführten durchflusszytometrischen Analysen keinen signifikanten Unterschied in der Expression von A20 in PBLs von Patienten mit akuter Abstoßungsreaktion und ohne Abstoßungsreaktion gab. Dies passt zu den hier beobachteten konstanten Expression von A20 in PBLs, unabhängig von dem Schädigungsstadium der Nieren.

Es ist bekannt das A20 den NF-κB-Signalweg durch Deubiquitynylierung von Schlüsselmediatoren wie RIP1 und TRAF6 hemmt (6). Bei reduzierter A20-Expression kommt es zu einer unkontrollierten NF-κB-Aktivierung, die durch vermehrte Inflammation die Gewebsschädigung verstärkt. Das Protein A20 unterdrückt die NF-κB-Aktivierung durch Deubiquitynylierung von Schlüsselmediatoren wie RIP1 und TRAF6. Dies reduziert die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und begrenzt Entzündungsschäden im Transplantat (4, 48). Es wurde gezeigt, dass bei akuter

Nierentransplantatabstoßung A20 in den Transplantaten vermehrt exprimiert wurde, um den NF- $\kappa$ B-Signalwege zu hemmen und Gewebeschäden somit zu begrenzen (31, 100, 101).

In verschiedenen Versuchen konnte im Tiermodell ebenfalls nachgewiesen werden, dass eine erhöhte A20-Expression in Endothelzellen vor einer Transplantarteriosklerose schützt (102). Auch stellen die Ischämie-Reperfusionsschäden (IRI) ein erhebliches Risiko für die verzögerte Funktion und Abstoßung transplantierte Nieren dar. Rogers et al. (103) belegten, dass A20 die Homöostase in der Niere aufrechterhält und somit die Niere vor einer Abstoßungsreaktion schützt.

In den hier erhobenen Daten zeigte sich eine vermehrte A20-Expression bei akuter Nierenschädigung und akuter Abstoßungsreaktion. Dies deckt sich mit den wissenschaftlichen Erkenntnissen, dass bei Entzündung A20 als protektiver Faktor vermehrt exprimiert wird.

In der Nierentransplantation wurde A20 als potenzieller Biomarker für das Transplantationsergebnis untersucht. Eine hohe A20-mRNA-Expression in Gefäßendothelzellen (102) und Tubulusepithelzellen (104, 105) korrelierte mit besserem Transplantatüberleben und reduzierter Abstoßungsaktivität (4). Dagegen wurde eine geringere A20-Expression in Tubuluszellen mit Ischämie-Reperfusionsschäden und akuter Abstoßung assoziiert (4, 100, 103).

Grundsätzlich hat A20 Potenzial als Biomarker für die Detektierung einer akuten Abstoßungsreaktion zu fungieren, ebenfalls eignet es sich zur Risikostratifizierung. Jedoch wurde keine solche Regulation der A20-Expression in der vorliegenden Untersuchung beobachtet.

In Studien wurde gezeigt, dass Glukokortikosteroide die A20-Expression in humanen glatten Atemwegsmuskeln induzieren können (106-108). Ebenfalls deutet eine Arbeit von Emal et al. (109) auf eine mögliche Induktion von A20 durch die Gabe von Tacrolimus hin. Auch MMF induziert die vermehrte A20-Expression (110, 111). In den zitierten Studien wurden sowohl Mäuse als auch Ratten verwendet. Die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen ist natürlich nur teilweise möglich. Dennoch decken sich die Ergebnisse mit den hier erhobenen Daten, die eine konstante A20-Expression zum Zeitpunkt E bei stabiler Transplantatfunktion zeigten.

Diese Induktion erschwert eine mögliche Verwendung als Biomarker für die alleinige Detektion einer Abstoßungsreaktion. Möglicherweise ist deshalb eine Nutzung zur Risikostratifizierung anhand der A20-Expression vielversprechender.

Klinische Validierungsstudien sind jedoch notwendig, um einen Nutzen in der Routinediagnostik zu detektieren.

### **5.1.2 Die A20- Expression im Kontext einer Lupus Nephritis**

Bei In-vitro-Versuchen wurden humane und murine Makrophagen und renale Tubulusepithelzellen stimuliert, um die darauffolgende A20-mRNA-Expression zu untersuchen. Zusätzlich wurden die Beobachtungen mittels Western Blot auf Proteinebene bestätigt.

Die verwendeten Zytokine IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  sowie LPS aktivieren den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B in TEZ und Makrophagen, weshalb sie sich als Stimulanzen zur Messung der A20-Expression mittels qPCR eigneten. Dies passte zu den in der Literatur beschriebenen Beobachtungen zu IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  bezüglich ihres Vermögens A20 zu induzieren (6, 31, 112).

Die vorgenommenen Versuche zeigten, dass LPS und IFN $\gamma$  bei unterschiedlichen Zelltypen eine verschieden starke Expression von A20 auslösen konnten. Diese divergente Expression von A20 unter Verwendung abweichender Stimuli könnte auf die differenten Signalwege zurückzuführen sein, die durch LPS und TNF $\alpha$  aktiviert werden: LPS bindet sich an TLR4 und aktiviert NF- $\kappa$ B über MyD88-abhängige sowie unabhängige Signalwege (113), während sich TNF $\alpha$  an seinen Rezeptor (TNF-Rezeptor 2) bindet und NF- $\kappa$ B über die TRAF2-vermittelte Route aktiviert (26, 114). Dies deckt sich mit der im Western Blot beobachteten Zunahme der A20-Expression unter der TNF $\alpha$ -Stimulation im Vergleich zu LPS und IFN $\gamma$ , wobei die erhöhte A20-Expression unter TNF $\alpha$  auf eine effektivere Antwort über den TRAF2-Signalweg hinweist. Wie in der Literatur (115) (116) beschrieben, lässt dies auf eine stärkere Aktivierung des A20-Gens durch TNF $\alpha$ , als durch LPS und IFN $\gamma$  schließen.

Gemäß der Literatur kann die Stimulation von Zellen mit IL-1 $\beta$  und LPS ferner die Expression von A20 induzieren (94). Ebenfalls existieren Studien, die dokumentieren, dass TNF $\alpha$  die Expression von A20 einleiten kann (117). Beispielsweise wurde

gezeigt, dass die Behandlung von Endothelzellen mit TNF $\alpha$  zu einer Erhöhung der Expression von A20 zu führen vermag (118), was die vorliegenden Versuchsergebnisse bestätigen.

Darüber hinaus sind die Zytokine IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  bedeutende Auslöser von Entzündungen, die bei Nierenabstoßungsreaktionen eine Rolle spielen (3, 4, 60)

Gleichzeitig zeigten Western Blots eine höhere A20-Proteinkonzentration nach 24 Stunden Stimulation durch TNF $\alpha$ , als durch LPS und IFN $\gamma$ , wobei bekannt ist, dass A20 eine Rolle bei der Nierenabstoßungsreaktion spielt (4, 6); die Versuche mit menschlichen TEZ sind in diesem Zusammenhang besonders relevant. Ihre Ergebnisse können helfen, die Rolle von A20 bei Nierenabstoßungsreaktionen umfassender zu verstehen und möglicherweise neue therapeutische Ansätze zur Behandlung von Nierenabstoßungen zu entwickeln.

Andere Studien befassen sich mit der Induktion von A20 in Makrophagen und Monozyten; so postulieren beispielsweise Potteti et al. (94) in ihrer Arbeit, dass die Behandlung von Makrophagen mit LPS in Zusammenhang mit IFN $\gamma$  zu einer erhöhten Expression von A20 führt. Ebenfalls zeigten weitere Arbeitsgruppen, dass die Induktion von A20 durch LPS und IFN $\gamma$  Einfluss auf die Aktivität einer Entzündungsreaktion im Sinne einer Regulation in Form der Abschwächung bei Überexpression hat (119, 120). Daraus lässt sich die Rolle des negativen Feedback-Inhibitors von A20 ableiten.

Die Rolle von Hypoxie als Modulator der A20-Expression wurde ebenfalls untersucht, und es wurde dargelegt, dass Hypoxie die A20-Expression nicht signifikant beeinflusst.

Das Zinkfingerprotein A20 wird nicht nur in Immunzellen, sondern auch in vielen verschiedenen Zelltypen exprimiert (5).

Die Rolle von A20 in Makrophagen ist hinreichend bekannt und bereits erwähnt worden. Durch seine hemmende Wirkung begrenzte A20 die NF- $\kappa$ B-Aktivierung und NLRP3-Inflammasom-Aktivierung in Makrophagen. Bei MRL-*Fas*<sup>lpr</sup>- Mäusen konnte gezeigt werden, dass eine A20-Überexpression die I $\kappa$ B- und NF- $\kappa$ Bp65-Phosphorylierung in peritonealen Makrophagen signifikant reduzierte (121, 122).

In Atemwegsepithelzellen wurde eine niedrigere A20-Expression mit Atemwegserkrankungen wie dem Asthma bronchiale, der chronisch obstruktiven

Lungenerkrankung (COPD) oder der Cystischen Fibrose in Verbindung gebracht (6, 39, 123).

A20 wird ebenfalls in Nierenpodozyten exprimiert und ist entscheidend für die Aufrechterhaltung der Nierenfunktion. Köhler et al. (124) legten dar, dass A20-podocyte-Knockout-Mäuse erhöhte Serumharnstoff- und Kreatininspiegel, also eine verringerte Nierenfunktion aufweisen. Auch zeigten sie immunhistochemisch die vermehrten Ansammlungen von inflammatorischen Zellen in den Glomeruli (124).

Die MRL-*Fas<sup>lpr</sup>*-Mäuse dienen als Modell für den SLE und weisen eine gestörte Immunregulation auf, die wiederum zu einer Autoimmunreaktion führt. Es bestehen Hinweise darauf, dass die *Fas<sup>lpr</sup>*-Mutation die Immunregulation und die Reaktion von Makrophagen auf LPS sowie IFN $\gamma$  beeinflussen kann (125). Im Vergleich zu nativen Mäusen konnte in den hier vorgenommenen In-vitro-Versuchen allerdings kein Unterschied in der A20-Expression auf proinflammatorische Stimuli beobachtet werden. Ähnlich verhielt es sich mit den Beobachtungen zur A20-Expression in humanen Makrophagen aus SLE-Patienten, im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Allerdings konnte in mehreren Arbeiten ein Zusammenhang zwischen einer A20-Defizienz und einer Lupus Nephritis hergestellt.

In MRL-*Fas<sup>lpr</sup>*-Mäusen konnte A20 die Aktivierung von NF- $\kappa$ B nicht suffizient beenden, was zu einer Ubiquitin-Akkumulation und dadurch zu einer glomerulären Schädigung durch Proteinakkumulation führt (126). Auch führte ein Mangel an A20 zu erhöhter TNFa induzierten NF- $\kappa$ B- Aktivierung in Podozyten (126) (124).

Bei der Lupus Nephritis ist besonders die Rolle von A20 in Nierenpodozyten von Bedeutung, wo der Funktionsverlust oder die Dysfunktion zur Überaktivierung von NF- $\kappa$ B und zur Nierenschädigung führte. In Lupus-Podozyten blieb die A20-Induktion um 40–50% niedriger als in gesunden Zellen, was zur anhaltenden NF- $\kappa$ B-Aktivierung und glomerulären Schädigung führte (14, 124, 126).

Der derzeitige Stand der Wissenschaft deutet an, dass A20 ein potenzielles therapeutisches Ziel für die Behandlung der Lupus Nephritis darstellen könnte. Über die Rolle von A20 als Biomarker wurde im vorhergehenden Abschnitt bereits diskutiert.

Eine Überexpression von A20 führt im Lupus-Modell zu reduzierten Glomerulosklerosen (127). Hierbei wurde mittels adenoviraler Vektoren A20 gezielt in Mäusen mit Lupus Nephritis vermehrt exprimiert, und so der NF- $\kappa$ B-Signalweg unterdrückt (126). Kang et al. (128) stellten dar, dass Mäuse mit inflammatorischen

Atemwegserkrankungen nach der Inhalation von A20 cDNA in adenoviralen Vektoren eine deutlich reduzierte pulmonale Inflammation zeigten.

Ein weiterer Ansatz ist die Blockade von miRNAs, die A20-mRNA binden und deren Translation hemmen. Dadurch erhöht sich die A20-Expression in T-Zellen und Podozyten (25). Diese Erkenntnisse stellen vielversprechende Ziele für mögliche Biologika da (5).

## 6 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit untersuchte die Expression und Funktion des Zinkfingerproteins A20 im Kontext der Nierentransplantation, insbesondere bei Patienten mit Lupus-Nephritis und anderen autoimmunen Prozessen. Dabei reguliert A20 den NF- $\kappa$ B-Signalweg, der eine zentrale Rolle bei der Entzündungsreaktion spielt. Das Ziel der Arbeit bestand darin, die protektive Funktion von A20 gegen Abstoßungsreaktionen und autoimmune Prozesse zu analysieren.

Zur Prüfung der These, dass A20 als Marker für ein akutes Nierenversagen dienen könnte, wurden Nierenbiopsieschnitte immunhistochemisch und mithilfe von qPCR auf ihre A20-Expression untersucht, sowie anschließend die Ergebnisse mit klinischen Daten verglichen. Zusätzlich fanden durchflusszytometrische Analysen mit peripheren Blutlymphozyten von Nierenbiopsie- sowie Transplantationspatienten statt. Während die A20 Expression bei akutem Nierenversagen oder einer Transplantatabstoßung in den Nieren durchaus verstärkt im Vergleich zu gesunden Kontrollen exprimiert wurde, konnte keine Regulation der A20-Expression in peripheren Leukozyten im zeitlichen Verlauf von vor bis einem Jahr nach der Transplantation beobachtet werden, sodass sich anhand einer solchen Untersuchung wohl kein Rückschluss auf akute Nierenschädigungen ziehen lässt. Im nächsten Schritt erfolgte der Transfer zu In-vitro-Versuchen, in deren Zuge humane und murine Makrophagen sowie renalen TEZ mit Zytokinen stimuliert wurden, um mittels qPCR und Western Blot die A20-Expression zu bestimmen. Hierbei beeinflusste der autoimmune Hintergrund die Höhe der A20-Expression nicht. Da es dennoch Studien gibt, die auf eine funktionelle Rolle von A20 in der Pathogenese der Lupus Nephritis hinweisen, könnten die hier vorliegenden Beobachtungen bedeuten, dass die, bei der LN relevanten Zellen in Bezug auf A20 möglicherweise nicht die untersuchten TEZ und Makrophagen sind.

Die Inhibition von NF- $\kappa$ B-Signalen über eine verstärkte A20-Expression kann als kompensatorischer Mechanismus dienen, um einerseits entzündliche Reaktion nach Transplantation zu begrenzen und die Transplantatüberlebenszeit zu verlängern oder andererseits chronische entzündliche Erkrankungen wie beispielsweise die Lupus Nephritis regulierend zu beeinflussen.

Weitere zusätzliche Studien müssten folgen, um die genauen Mechanismen von A20 in verschiedenen Nierenerkrankungen zu klären und die klinische Relevanz zu validieren. Wobei sie insbesondere die Analyse der zur Aktivierung und Regulation von A20 führenden Mechanismen sowie die zeitliche Dynamik der A20-Expression und die Entwicklung gezielter Therapien umfassen sollten.

Langzeitstudien sind entscheidend, um die klinische Relevanz von A20 zu definieren und seine Rolle in der Nierenfunktion nach Transplantation zu verstehen. Die diskutierten Forschungsrichtungen könnten dazu beitragen, A20 als potenzielles therapeutisches Ziel für die Steigerung der Nierenfunktion nach Transplantationen zu definieren und neue Behandlungsmethoden für Nierenkrankheiten zu entwickeln.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Nephrologie DGf. DGFN-Fakten-Nephrologie-2024. Deutsche Gesellschaft für Nephrologie. 2024.
2. Middel C-D. Organspende und Organtransplantation in Deutschland: Bestandsaufnahme und Bewertung. Deutscher Ärzteverlag: Deutscher Ärzteverlag; 2011.
3. Anders H-J, Saxena R, Zhao M-h, Parodis I, Salmon JE, Mohan C. Lupus nephritis. *Nature Reviews Disease Primers*. 2020;6(1):7.
4. Kommer A, Meineck M, Classen P, Weinmann-Menke J. A20 in Kidney Transplantation and Autoimmunity. 2024;25(12):6628.
5. Malynn BA, Ma A. A20: A multifunctional tool for regulating immunity and preventing disease. *Cellular immunology*. 2019;340:103914.
6. Catrysse L, Vereecke L, Beyaert R, van Loo G. A20 in inflammation and autoimmunity. *Trends in immunology*. 2014;35(1):22-31.
7. Shembade N, Harhaj EW. Regulation of NF- $\kappa$ B signaling by the A20 deubiquitinase. *Cellular & molecular immunology*. 2012;9(2):123-30.
8. Aeschlimann FA, Laxer RM. Haploinsufficiency of A20 and other paediatric inflammatory disorders with mucosal involvement. *Current opinion in rheumatology*. 2018;30(5):506-13.
9. Yurochko AD, Huang ES. Human cytomegalovirus binding to human monocytes induces immunoregulatory gene expression. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1999;162(8):4806-16.
10. Dietrich T. Untersuchung des entzündungsregulierenden Zinkfingerproteins A20 im Verlauf nach Nierentransplantation. 2019.
11. Dixit VM, Green S, Sarma V, Holzman LB, Wolf FW, O'Rourke K, et al. Tumor necrosis factor-alpha induction of novel gene products in human endothelial cells including a macrophage-specific chemotaxin. *The Journal of biological chemistry*. 1990;265(5):2973-8.
12. Verstrepen L, Verhelst K, van Loo G, Carpentier I, Ley SC, Beyaert R. Expression, biological activities and mechanisms of action of A20 (TNFAIP3). *Biochemical pharmacology*. 2010;80(12):2009-20.
13. Büchel S. Der NF-kappaB-Signalweg: Regulation zahlreicher Komponenten des Immunsystems und deren Beitrag zur Immunhomöostase. *Trillium Immunologie*. 2021;Heft 1/2021.
14. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF- $\kappa$ B signaling in inflammation. *Signal transduction and targeted therapy*. 2017;2:17023-.
15. Pipari AW, Jr., Boguski MS, Dixit VM. The A20 cDNA induced by tumor necrosis factor alpha encodes a novel type of zinc finger protein. *The Journal of biological chemistry*. 1990;265(25):14705-8.
16. Evans PC, O'Vaah H, Hamon M, Kilshaw PJ, Hamm S, Bauer S, et al. Zinc-finger protein A20, a regulator of inflammation and cell survival, has de-ubiquitinating activity. *The Biochemical journal*. 2004;378(Pt 3):727-34.
17. Wertz I, Dixit V. A20--a bipartite ubiquitin editing enzyme with immunoregulatory potential. *Advances in experimental medicine and biology*. 2014;809:1-12.
18. Shembade N, Harhaj E. A20 inhibition of NF $\kappa$ B and inflammation: targeting E2:E3 ubiquitin enzyme complexes. *Cell cycle (Georgetown, Tex)*. 2010;9(13):2481-2.

19. Tewari M, Wolf FW, Seldin MF, O'Shea KS, Dixit VM, Turka LA. Lymphoid expression and regulation of A20, an inhibitor of programmed cell death. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1995;154(4):1699-706.
20. Juilland M, Thome M. Role of the CARMA1/BCL10/MALT1 complex in lymphoid malignancies. *Current opinion in hematology*. 2016;23(4):402-9.
21. Sedlacek H-H. *Onkologie- Die Tumorerkrankungen des Menschen Band 1*. Berlin, Boston: De Gruyter; 2021.
22. Aksentijevich I, Zhou Q. NF- $\kappa$ B Pathway in Autoinflammatory Diseases: Dysregulation of Protein Modifications by Ubiquitin Defines a New Category of Autoinflammatory Diseases. *Frontiers in immunology*. 2017;8:399.
23. Abbott DW, Yang Y, Hutti JE, Madhavarapu S, Kelliher MA, Cantley LC. Coordinated regulation of Toll-like receptor and NOD2 signaling by K63-linked polyubiquitin chains. *Molecular and cellular biology*. 2007;27(17):6012-25.
24. Chandel NS, Trzyna WC, McClintock DS, Schumacker PT. Role of oxidants in NF-kappa B activation and TNF-alpha gene transcription induced by hypoxia and endotoxin. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2000;165(2):1013-21.
25. Ma A, Malynn BA. A20: linking a complex regulator of ubiquitylation to immunity and human disease. *Nature reviews Immunology*. 2012;12(11):774-85.
26. Shembade N, Harhaj NS, Liebl DJ, Harhaj EW. Essential role for TAX1BP1 in the termination of TNF-alpha-, IL-1- and LPS-mediated NF-kappaB and JNK signaling. *The EMBO journal*. 2007;26(17):3910-22.
27. Shembade N, Parvatiyar K, Harhaj NS, Harhaj EW. The ubiquitin-editing enzyme A20 requires RNF11 to downregulate NF-kappaB signalling. *The EMBO journal*. 2009;28(5):513-22.
28. Lee EG, Boone DL, Chai S, Libby SL, Chien M, Lodolce JP, et al. Failure to regulate TNF-induced NF-kappaB and cell death responses in A20-deficient mice. *Science (New York, NY)*. 2000;289(5488):2350-4.
29. Hutti JE, Turk BE, Asara JM, Ma A, Cantley LC, Abbott DW. IkappaB kinase beta phosphorylates the K63 deubiquitinase A20 to cause feedback inhibition of the NF-kappaB pathway. *Molecular and cellular biology*. 2007;27(21):7451-61.
30. Düwel M, Welteke V, Oeckinghaus A, Baens M, Kloo B, Ferch U, et al. A20 negatively regulates T cell receptor signaling to NF-kappaB by cleaving Malt1 ubiquitin chains. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2009;182(12):7718-28.
31. Priem D, van Loo G, Bertrand MJM. A20 and Cell Death-driven Inflammation. *Trends in immunology*. 2020;41(5):421-35.
32. Martens A, van Loo G. A20 at the Crossroads of Cell Death, Inflammation, and Autoimmunity. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2020;12(1).
33. Wertz IE, O'Rourke KM, Zhou H, Eby M, Aravind L, Seshagiri S, et al. De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kappaB signalling. *Nature*. 2004;430(7000):694-9.
34. Vereecke L, Beyaert R, van Loo G. Genetic relationships between A20/TNFAIP3, chronic inflammation and autoimmune disease. *Biochemical Society transactions*. 2011;39(4):1086-91.
35. Yu MP, Xu XS, Zhou Q, Deutch N, Lu MP. Haploinsufficiency of A20 (HA20): updates on the genetics, phenotype, pathogenesis and treatment. *World journal of pediatrics : WJP*. 2020;16(6):575-84.
36. Zhou Q, Wang H, Schwartz DM, Stoffels M, Park YH, Zhang Y, et al. Loss-of-function mutations in TNFAIP3 leading to A20 haploinsufficiency cause an early-onset autoinflammatory disease. *Nature genetics*. 2016;48(1):67-73.
37. Zhang M, Peng LL, Wang Y, Wang JS, Liu J, Liu MM, et al. Roles of A20 in autoimmune diseases. *Immunologic research*. 2016;64(2):337-44.

38. Berteau F, Rouviere B, Delluc A, Nau A, Le Berre R, Sarrabay G, et al. Autosomic dominant familial Behçet disease and haploinsufficiency A20: A review of the literature. *Autoimmunity reviews*. 2018;17(8):809-15.
39. Bannon A, Zhang SD, Schock BC, Ennis M. Cystic Fibrosis from Laboratory to Bedside: The Role of A20 in NF- $\kappa$ B-Mediated Inflammation. *Medical principles and practice : international journal of the Kuwait University, Health Science Centre*. 2015;24(4):301-10.
40. Kato M, Ogawa S. [Significance of A20 in B-cell lymphomas]. [*Rinsho ketsueki*] *The Japanese journal of clinical hematology*. 2011;52(4):190-7.
41. Shi Y, Wang X, Wang J, Wang X, Zhou H, Zhang L. The dual roles of A20 in cancer. *Cancer letters*. 2021;511:26-35.
42. Parvatiyar K, Harhaj EW. Regulation of inflammatory and antiviral signaling by A20. *Microbes and infection*. 2011;13(3):209-15.
43. Heinrich PC, Müller M, Graeve L. *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*: Springer Berlin Heidelberg; 2014.
44. Murphy K, Weaver C, Seidler L. *Janeway Immunologie*: Springer Berlin Heidelberg; 2018.
45. Tavares RM, Turer EE, Liu CL, Advincula R, Scapini P, Rhee L, et al. The ubiquitin modifying enzyme A20 restricts B cell survival and prevents autoimmunity. *Immunity*. 2010;33(2):181-91.
46. Hövelmeyer N, Reissig S, Xuan NT, Adams-Quack P, Lukas D, Nikolaev A, et al. A20 deficiency in B cells enhances B-cell proliferation and results in the development of autoantibodies. *European journal of immunology*. 2011;41(3):595-601.
47. Pujari R, Hunte R, Khan WN, Shembade N. A20-mediated negative regulation of canonical NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Immunologic research*. 2013;57(1-3):166-71.
48. Bosanac I, Wertz IE, Pan B, Yu C, Kusam S, Lam C, et al. Ubiquitin binding to A20 ZnF4 is required for modulation of NF- $\kappa$ B signaling. *Molecular cell*. 2010;40(4):548-57.
49. Luo H, Liu Y, Li Q, Liao L, Sun R, Liu X, et al. A20 regulates IL-1-induced tolerant production of CXC chemokines in human mesangial cells via inhibition of MAPK signaling. *Scientific reports*. 2015;5:18007.
50. Anzenberger A-K. *Postmortale Nierentransplantation : Einflussfaktoren auf das Transplantationsergebnis*. München2021.
51. Staeck O. *Einflussfaktoren auf das Outcome nach Nierentransplantation*. Berlin2020.
52. Chadban SJ, Ahn C, Axelrod DA, Foster BJ, Kasiske BL, Kher V, et al. KDIGO Clinical Practice Guideline on the Evaluation and Management of Candidates for Kidney Transplantation. *Transplantation*. 2020;104(4S1 Suppl 1):S11-s103.
53. Augustine J. *Kidney transplant: New opportunities and challenges*. *Cleveland Clinic journal of medicine*. 2018;85(2):138-44.
54. Hauk L. *Kidney transplantation*. *AORN journal*. 2018;107(5):P11-p3.
55. Hartrath JL. *Retrospektive Untersuchung zur Lebensqualität nach Nierentransplantation*. Mainz2019.
56. Beimler J. *Referenz Nephrologie*. In: Alscher MD, editor. Stuttgart2019.
57. Karow T, Lang-Roth R. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie : vorlesungsorientierte Darstellung und klinischer Leitfaden für Studium und Praxis* 2020. 28. Auflage ed. Köln2019.
58. Herold G. *Innere Medizin 2023: De Gruyter*; 2022.
59. Fuquay R, Renner B, Kulik L, McCullough JW, Amura C, Strassheim D, et al. Renal ischemia-reperfusion injury amplifies the humoral immune response. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2013;24(7):1063-72.

60. Nagarajan M, Ramanathan S, Dhanapriya J, Dineshkumar T, Subramaniyan TB, Gopalakrishnan N. Impact of acute kidney injury on renal allograft survival. *Renal failure*. 2017;39(1):40-4.
61. Reinold J, Rohn H, Witzke O, Feldkamp T. Vermeidung und Behandlung von T-Zell- und antikörpervermittelter Abstoßung. *Der Nephrologe*. 2018;13(3):154-60.
62. Di Benedetto P, Ruscitti P, Vadasz Z, Toubi E, Giacomelli R. Macrophages with regulatory functions, a possible new therapeutic perspective in autoimmune diseases. *Autoimmunity reviews*. 2019;18(10):102369.
63. Orecchioni M, Ghosheh Y, Pramod AB, Ley K. Macrophage Polarization: Different Gene Signatures in M1(LPS+) vs. Classically and M2(LPS-) vs. Alternatively Activated Macrophages. 2019;10.
64. Yang S, Zhao M, Jia S. Macrophage: Key player in the pathogenesis of autoimmune diseases. 2023;14.
65. Mills CD, Ley K. M1 and M2 macrophages: the chicken and the egg of immunity. *Journal of innate immunity*. 2014;6(6):716-26.
66. Ordikhani F, Pothula V, Sanchez-Tarjuelo R, Jordan S, Ochando J. Macrophages in Organ Transplantation. *Frontiers in immunology*. 2020;11:582939.
67. Strizova Z, Benesova I, Bartolini R, Novysedlak R, Cecdlova E, Foley LK, et al. M1/M2 macrophages and their overlaps - myth or reality? *Clinical science (London, England : 1979)*. 2023;137(15):1067-93.
68. Li D, Wang L, Fan Y, Song L, Guo C, Zhu F, et al. Down-Regulation of A20 mRNA Expression in Peripheral Blood Mononuclear Cells from Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Journal of clinical immunology*. 2012;32(6):1287-91.
69. Peng P, Li Z, Liu X. Reduced Expression of miR-23a Suppresses A20 in TLR-stimulated Macrophages. *Inflammation*. 2015;38(5):1787-93.
70. Wei P, Cui G, Lu Q, Yang L, Guan Z, Sun W, et al. A20 promotes Brucella intracellular growth via inhibition of macrophage cell death and activation. *Veterinary microbiology*. 2015;175(1):50-7.
71. Holgado A, Liu Z, Aidarova A, Mueller C, Haegman M, Driege Y, et al. A20 is a master switch of IL-33 signaling in macrophages and determines IL-33-induced lung immunity. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2023.
72. Pu T, Liu W, Wu Y, Zhao Y. A20 functions as a negative regulator in macrophage for DSS-induced colitis. *International Immunopharmacology*. 2021;97:107804.
73. Wang J, Luo P, Zhao J, Tan J, Huang F, Ma R, et al. Profiling the Resident and Infiltrating Monocyte/Macrophages during Rejection following Kidney Transplantation. *Journal of immunology research*. 2020;2020:5746832.
74. Yu S, Lu J. Macrophages in transplant rejection. *Transplant immunology*. 2022;71:101536.
75. Bodonyi-Kovacs G, Strom TB, Putheti P. A20--a biomarker of allograft outcome: a showcase in kidney transplantation. *Advances in experimental medicine and biology*. 2014;809:103-16.
76. Mistry P, Kaplan MJ. Cell death in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus and lupus nephritis. *Clinical immunology (Orlando, Fla)*. 2017;185:59-73.
77. Mok CC, Teng YKO, Saxena R, Tanaka Y. Treatment of lupus nephritis: consensus, evidence and perspectives. *Nature Reviews Rheumatology*. 2023;19(4):227-38.
78. Rizk MM, Elsayed ET, ElKeraie AF, Ramzy I. Association of Tumor Necrosis Factor Alpha-Induced Protein 3 Interacting Protein 1 (TNIP1) Gene Polymorphism (rs7708392) with Lupus Nephritis in Egyptian Patients. *Biochemical Genetics*. 2018;56(5):478-88.

79. Zhang C, Han X, Sun L, Yang S, Peng J, Chen Y, et al. Novel loss-of-function mutations in TNFAIP3 gene in patients with lupus nephritis. *Clinical Kidney Journal*. 2022;15(11):2027-38.
80. Aeschlimann FA, Batu ED, Canna SW, Go E, Gül A, Hoffmann P, et al. A20 haploinsufficiency (HA20): clinical phenotypes and disease course of patients with a newly recognised NF- $\kappa$ B-mediated autoinflammatory disease. *Annals of the rheumatic diseases*. 2018;77(5):728-35.
81. Liu X, Quan N. Immune Cell Isolation from Mouse Femur Bone Marrow. *Bio-protocol*. 2015;5(20).
82. Luttmann W, Bratke K, Küpper M, Myrtek D. *Der Experimentator: Immunologie*. 4., vollst. überarb. u. korr. Aufl. 2014 ed. Bratke K, Küpper M, Myrtek D, editors. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum; 2014.
83. Renz H, Gierten B. Durchflusszytometrie. In: Gressner AM, Arndt T, editors. *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2019. p. 735-.
84. Schäfer KA-M. Expression und Funktion des Proteins A20 : Nierentransplantierte, Dialysepatienten und Gesunde im Vergleich [Dissertation]. Mainz2022.
85. Mülhardt C. *Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics*. 7., aktualisierte Auflage ed. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum; 2013.
86. Mülhardt C. *Der Experimentator: Molekularbiologie / Genomics: Spektrum Akademischer Verlag*; 2009.
87. Daniel V, Naujokat C, Sadeghi M, Weimer R, Renner F, Yildiz S, et al. Observational support for an immunoregulatory role of CD3+CD4+CD25+IFN-gamma+ blood lymphocytes in kidney transplant recipients with good long-term graft outcome. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation*. 2008;21(7):646-60.
88. Zhang QQ, Xie YL, Zhang WJ, Wang F, Luo Y, Chen S, et al. Lymphocyte function based on IFN- $\gamma$  secretion assay may be a promising indicator for assessing different immune status in renal transplant recipients. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2021;523:247-59.
89. Mai HL, Degauque N, Lorent M, Rimbert M, Renaudin K, Danger R, et al. Kidney allograft rejection is associated with an imbalance of B cells, regulatory T cells and differentiated CD28-CD8+ T cells: analysis of a cohort of 1095 graft biopsies. *Frontiers in immunology*. 2023;14:1151127.
90. McRae JL, Chia JS, Pommey SA, Dwyer KM. Evaluation of CD4(+) CD25(+/-) CD39(+) T-cell populations in peripheral blood of patients following kidney transplantation and during acute allograft rejection. *Nephrology (Carlton, Vic)*. 2017;22(7):505-12.
91. Vagiotas L, Lioulios G, Panteli M, Ouranos K, Xochelli A, Kasimatis E, et al. Kidney Transplantation and Cellular Immunity Dynamics: Immune Cell Alterations and Association with Clinical and Laboratory Parameters. *Journal of clinical medicine*. 2024;13(17).
92. Mirzakhani M, Shahbazi M, Akbari R, Oliaei F, Asgharpour M, Nikoueinejad H, et al. Reduced CD4(+) CD25(++) CD45RA(-) Foxp3(hi) activated regulatory T cells and its association with acute rejection in patients with kidney transplantation. *Transplant immunology*. 2020;60:101290.
93. Momtazi G, Lambrecht BN, Naranjo JR, Schock BC. Regulators of A20 (TNFAIP3): new drug-able targets in inflammation. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2019;316(3):L456-l69.

94. Potteti HR, Venkareddy LK, Noone PM, Ankireddy A, Tamatam CR, Mehta D, et al. Nrf2 Regulates Anti-Inflammatory A20 Ubiquitinase Induction by LPS in Macrophages in Contextual Manner. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*. 2021;10(6).
95. Callemeyn J, Lamarthée B, Koenig A, Koshy P, Thauinat O, Naesens M. Allorecognition and the spectrum of kidney transplant rejection. *Kidney international*. 2022;101(4):692-710.
96. Lamarthée B, Callemeyn J, Van Herck Y, Antoranz A, Anglicheau D, Boada P, et al. Transcriptional and spatial profiling of the kidney allograft unravels a central role for FcyRIII+ innate immune cells in rejection. *Nature communications*. 2023;14(1):4359.
97. Oleinika K, Mauri C, Salama AD. Effector and regulatory B cells in immune-mediated kidney disease. *Nature reviews Nephrology*. 2019;15(1):11-26.
98. Fleig SV, Konen FF, Schröder C, Schmitz J, Gingele S, Bräsen JH, et al. Long-term B cell depletion associates with regeneration of kidney function. *Immunity, inflammation and disease*. 2021;9(4):1479-88.
99. Dujardin A, Lorent M, Foucher Y, Legendre C, Kerleau C, Brouard S, et al. Time-dependent lymphocyte count after transplantation is associated with higher risk of graft failure and death. *Kidney international*. 2021;99(5):1189-201.
100. Wei L, Zhang X, Ye Q, Yang Y, Chen X. The transfection of A20 gene prevents kidney from ischemia reperfusion injury in rats. *Molecular medicine reports*. 2017;16(2):1486-92.
101. Zammit NW, Grey ST. Emerging roles for A20 in islet biology and pathology. *Advances in experimental medicine and biology*. 2014;809:141-62.
102. Kunter U, Floege J, von Jürgensonn AS, Stojanovic T, Merkel S, Gröne HJ, et al. Expression of A20 in the vessel wall of rat-kidney allografts correlates with protection from transplant arteriosclerosis. *Transplantation*. 2003;75(1):3-9.
103. Rogers NM, Zammit N, Nguyen-Ngo D, Souilmi Y, Minhas N, Meijles DN, et al. The impact of the cytoplasmic ubiquitin ligase TNFAIP3 gene variation on transcription factor NF- $\kappa$ B activation in acute kidney injury. *Kidney international*. 2023;103(6):1105-19.
104. Lidberg KA, Muthusamy S, Adil M, Patel RS, Wang L, Bammler TK, et al. Multi-omic Characterization of Human Tubular Epithelial Cell Response to Serum. 2021:2021.01.29.428186.
105. Kunter U, Daniel S, Arvelo MB, Choi J, Shukri T, Patel VI, et al. Combined expression of A1 and A20 achieves optimal protection of renal proximal tubular epithelial cells. *Kidney international*. 2005;68(4):1520-32.
106. Sasse SK, Altonsy MO, Kadiyala V, Cao G, Panettieri RA, Gerber AN. Glucocorticoid and TNF signaling converge at A20 (TNFAIP3) to repress airway smooth muscle cytokine expression. 2016;311(2):L421-L32.
107. Ratman D, Vanden Berghe W, Dejager L, Libert C, Tavernier J, Beck IM, et al. How glucocorticoid receptors modulate the activity of other transcription factors: A scope beyond tethering. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2013;380(1):41-54.
108. Altonsy MO, Mostafa MM, Gerber AN, Newton R. Long-acting  $\beta$ 2-agonists promote glucocorticoid-mediated repression of NF- $\kappa$ B by enhancing expression of the feedback regulator TNFAIP3. 2017;312(3):L358-L70.
109. Emal D, Rampanelli E, Claessen N, Bemelman FJ, Leemans JC, Florquin S, et al. Calcineurin inhibitor Tacrolimus impairs host immune response against urinary tract infection. *Scientific reports*. 2019;9(1):106.
110. Teng D, Lu Y, Gao R, Xin Y, Cao G, Li X, et al. Conversion From Cyclosporine to Mycophenolate Mofetil Improves Expression of A20 in the Rat Kidney Allografts Undergoing Chronic Rejection. *Transplantation Proceedings*. 2006;38(7):2164-7.

111. Shimizu H, Takahashi M, Takeda S-i, Inoue S, Fujishiro J, Hakamata Y, et al. Conversion from cyclosporine A to mycophenolate mofetil protects recipient kidney and prevents intimal hyperplasia in rat aortic allografts. *Transplant immunology*. 2004;13(3):219-27.
112. Lappas M. A20, an essential component of the ubiquitin-editing protein complex, is a negative regulator of inflammation in human myometrium and foetal membranes. *Molecular human reproduction*. 2017;23(9):628-45.
113. Cohen P, Strickson S. The role of hybrid ubiquitin chains in the MyD88 and other innate immune signalling pathways. *Cell death and differentiation*. 2017;24(7):1153-9.
114. Xuan NT, Wang X, Nishanth G, Waisman A, Borucki K, Isermann B, et al. A20 expression in dendritic cells protects mice from LPS-induced mortality. *European journal of immunology*. 2015;45(3):818-28.
115. Mooney EC, Sahingur SE. The Ubiquitin System and A20: Implications in Health and Disease. *Journal of dental research*. 2021;100(1):10-20.
116. Vettters J, van Helden MJ, Wahlen S, Tavernier SJ, Martens A, Fayazpour F, et al. The ubiquitin-editing enzyme A20 controls NK cell homeostasis through regulation of mTOR activity and TNF. *The Journal of experimental medicine*. 2019;216(9):2010-23.
117. Das T, Chen Z, Hendriks RW, Kool M. A20/Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ -Induced Protein 3 in Immune Cells Controls Development of Autoinflammation and Autoimmunity: Lessons from Mouse Models. *Frontiers in immunology*. 2018;9:104.
118. Guo S, Messmer-Blust AF, Wu J, Song X, Philbrick MJ, Shie JL, et al. Role of A20 in cIAP-2 protection against tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )-mediated apoptosis in endothelial cells. *International journal of molecular sciences*. 2014;15(3):3816-33.
119. Hu J, Wang G, Liu X, Zhou L, Jiang M, Yang L. A20 is critical for the induction of Pam3CSK4-tolerance in monocytic THP-1 cells. *PLoS One*. 2014;9(1):e87528.
120. Hou L, Ye Y, Gou H, Tang H, Zhou Y, Xu X, et al. A20 inhibits periodontal bone resorption and NLRP3-mediated M1 macrophage polarization. *Experimental cell research*. 2022;418(1):113264.
121. Sun L, Zou LX, Han YC, Zhu DD, Chen T, Wang J. Role of A20/TNFAIP3 deficiency in lupus nephritis in MRL/lpr mice. *Clinical and experimental nephrology*. 2020;24(2):107-18.
122. Schile A, French R, Serrano J, Leighton K. Longitudinal Phenotyping Studies of MRL/MpJ-FasIpr/J and NZBWF1/J Mouse Lupus Models. *The Journal of Immunology*. 2020;204(1\_Supplement):218.7-7.
123. Hu WH, Liu ZQ, Hu TY, Ma L, Zhang H, Chen D, et al. [The role of zinc finger protein A20 in airway allergic diseases]. *Lin chuang er bi yan hou tou jing wai ke za zhi = Journal of clinical otorhinolaryngology, head, and neck surgery*. 2018;32(20):1599-602.
124. Köhler P, Ribeiro A, Honarpisheh M, von Rauchhaupt E, Lorenz G, Li C, et al. Podocyte A20/TNFAIP3 Controls Glomerulonephritis Severity via the Regulation of Inflammatory Responses and Effects on the Cytoskeleton. *Cells*. 2025;14(5).
125. Kikawada E, Lenda DM, Kelley VR. IL-12 deficiency in MRL-Fas(lpr) mice delays nephritis and intrarenal IFN-gamma expression, and diminishes systemic pathology. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2003;170(7):3915-25.
126. Sun L, Zou LX, Han YC, Wu L, Chen T, Zhu DD, et al. A20 overexpression exerts protective effects on podocyte injury in lupus nephritis by downregulating UCH-L1. *Journal of cellular physiology*. 2019;234(9):16191-204.
127. Li M, Shi X, Qian T, Li J, Tian Z, Ni B, et al. A20 overexpression alleviates pristane-induced lupus nephritis by inhibiting the NF- $\kappa$ B and NLRP3 inflammasome activation in macrophages of mice. *International journal of clinical and experimental medicine*. 2015;8(10):17430-40.

128. Kang NI, Yoon HY, Lee YR, Won M, Chung MJ, Park JW, et al. A20 attenuates allergic airway inflammation in mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2009;183(2):1488-95.

# Anhang

## Auflistung der verwendeten Materialien

### 1) Verwendete Reagenzien

Chemikalien	Katalognummer	Firma
Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> Cl) (0,15 M)	Kat.-Nr. 1.01145.1000	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
ABC-Complex Standard	Kat.-Nr. PK-6100	Vector Laboratories, Inc., Newark, USA
Aqua dest. Ampuwa (1000 ml)	Kat.-Nr. 0123	B. Braun SE, Melsungen, Deutschland
Avidin/Biotin Blocking Kit	Kat.-Nr. SP-2001	Vector Laboratories, Inc., Newark, USA
MiniProtean TGX PreCast Gels 4–20 %, 10-Well Combs, 30 µl/Well	Kat.-Nr. #4561093	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Deutschland
MiniProtean TGX PreCast Gels 4–20 %, 10-Well Combs, 30 µl/Well	Kat.-Nr. #4568093	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Deutschland
Mini Protean TGX PreCast Gels 4–20 %, 15-Well Combs, 15 µl/Well	Kat.-Nr. #4561094	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Deutschland
Bovines Serumalbumin Fraction V (BSA)	Kat.-Nr. 11930.03	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Citrat-Puffer pH 6,0 (0,01mol/l)	Kat.-Nr. 71497	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland

3,3'-Diaminobenzidin (DAB)	Kat.-Nr. SK-4100	Vector Laboratories, Inc., Newark, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Kat.-Nr. 472301-1L	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
PBS – Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (500 ml)	Kat.-Nr. D 8537	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Ethanol	Kat.-Nr. 1613.2500 PE	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS)	Kat.-Nr. 10270-106	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Ficoll Histopaque 1077 (500 ml)	Kat.-Nr. 10771	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Fixationspuffer Cytifix	Kat.-Nr. 51-9006613	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Goat-Serum (Normalserum)	Kat.-Nr. X0907	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
L-Glutamine (500 ml)	Kat.-Nr. 31870-025	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Glycin	Kat.-Nr. 11454894	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Golgi-Stop (Protein Transport Inhibitor)	Kat.-Nr. 51-2092 KZ	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Hemalaun (Mayer's Hemalaun)	Kat.-Nr. A0884.1000	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Hydrogen Chloride Solution (HCl) (30 %)	Kat.-Nr. 100337	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland

Ionomycin	Kat.-Nr. 10634	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO <sub>3</sub> )	Kat.-Nr. 4852	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Methanol	Kat.-Nr. 8388.5	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Milchpulver	Kat.-Nr. T145.5	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumazide (NaN <sub>3</sub> )	Kat.-Nr. S2002-100G	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Kat.-Nr. 1T4P.1	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Kat.-Nr. 223A.2	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
PageRuler™ ungefärbte Proteinleiter	Kat.-Nr. 26619	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Paraformaldehyd (4 %)	Kat.-Nr. E 1644	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Permout Mounting Media	Kat.-Nr. SP 15-100	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Permwash	Kat.-Nr. 51-2091 KE	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Phorbol-12-Myristate-13-Acetate (PMA) (1 mg/ml)	Kat.-Nr. P1585	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland

Puffer A Human FoxP3 Buffer	Kat.-Nr. 51-9005451	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Puffer B Human FoxP3 Buffer	Kat.-Nr. 51-9005450	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
RNA-Isolations-Qiagen- Kit RNeasy	Kat.-Nr. 172016677	Qiagen, Venlo, Niederlande
RPMI Roswell Park Memorial Institute 1640	Kat.-Nr. Medium 1640	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Saponin	Kat.-Nr. 34655	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Sodium (Na)	Kat.-Nr. E 1644	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Tris(2,3- dibrompropyl)phosphat	Kat.-Nr. S365343	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Tris-gepufferte Kochsalzlösung (TBS)	Kat.-Nr. T6664	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Tween-20	Kat.-Nr. 11332465001	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Wasserstoffperoxid	Kat.-Nr. 9681.4	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Xylol	Kat.-Nr. 9713.3	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

## 2) Verwendete Puffer

Puffer	Zusammensetzung
ACK-Lyse-Puffer	0,15 M NH <sub>4</sub> Cl, 10 mM KHCO <sub>3</sub> , 0,1 mM Na <sub>2</sub> EDTA in H <sub>2</sub> O (Aqua dest. Ampuwa), pH=7,4
10x Blot-Puffer	30 g Tris (250 mM), 144 g Glycin (1,92 M)
1x Blot-Puffer	70 % Aqua dest. Ampuwa, 20 % Methanol, 10X-Blot-Puffer
FACS-Puffer	5 % FCS, 0,09 % NaN <sub>3</sub> in 1x PBS
Fix-/Perm-Puffer	5 % FCS, 4 % Formalin, 0,09 % NaN <sub>3</sub> , 0,5 % (w/v) Saponin in 1x PBS
Laufpuffer (1 L)	30 g Tris (250mM), 144 g Glycin (1,92 M), 10 g SDS (1 %)
5 % Milch in TBS/T (100 ml)	5 g Milchpulver, 10 ml 10X-TBS, 90 ml Aqua dest. Ampuwa, 50 µl Tween-20
Saponin-Puffer	5 % FCS; 0,09 % NaN <sub>3</sub> ; 0,5 % (w/v) Saponin in 1x PBS
TBS (1 L)	60,5 g Tris, 87,6 g NaCl in 1000 ml Aqua dest. Ampuwa, pH 7,5 (mit 30 % HCl)
TBS/T (1 L)	100 ml 10X-TBS, 900 ml Aqua dest. Ampuwa, 500 µl Tween-20
Wash-Buffer aus PBS und 0,1 % BSA	PBS – Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Bovines Serumalbumin Fraction V (BSA), Goat-Serum (Normalserum), ABC-Complex Standard, 3,3'-Diaminobenzidin (DAB), Aqua dest. Ampuwa, Hemalaun, Permount Mounting Media

### 3) Verwendete Medien

Medium	Zusammensetzung/Firma
DMEM (1x) - GlutaMax™ - I	31966-021 Gibco, Life Technologies, Thermo Fischer Scientific Waltham, USA
DMEM (1x) / Hams F12 (1:1)	11320-074 Gibco, Life Technologies
K1-Medium komplett DMEM Hams F12	10 % FBS, 5 % P/S, 5 % Glutamin, 5 % Hormon Mix, 5 % HEPES, huEGF
KM-Zellmedium komplett DMEM GlutaMax	10 % FBS, 5 % P/S, 5 % Glutamin

### 4) Antikörper

Antikörper	Katalognummer	Firma
Biotinylated rabbit anti-goat	Kat.-Nr. BA-500	Vector Laboratories, Inc., Newark, USA
CD11b PE mouse anti-human	Kat.-Nr. B228654	BioLegend Inc., Amsterdam, Niederlande
CD4 APC mouse anti-human	Kat.-Nr. 7137857	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
CD14 PE mouse anti-human	Kat.-Nr. 7156942	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
CD3 PerCP mouse anti-human	Kat.-Nr. 9171504	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
CD19 APC mouse anti-human	Kat.-Nr. 7335510	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
CD25 FITC mouse anti-human	Kat.-Nr. 4177912	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

Goat anti-human-TNFAIP3 (A20)	Kat.-Nr. 111192	Abcam Limited, Cambridge, UK
Sekundär-AK (Antikörper) – FITC goat anti-rabbit IgG	Kat.-Nr. ab96899	Abcam Limited, Cambridge, UK
TH1/TH2/TH17 Human Phenotyping Kit (IFN-γ FITC, IL-17 PE, CD4 PerCP, IL-4 APC)	Kat.-Nr. 560751	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
TH17/Treg Human Phenotyping Kit (IL-17A PE, CD4 PerCP, FoxP3 Alexa Flour 647)	Kat.-Nr. 560762	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
TNFAIP3 (A20) rabbit anti-human	Kat.-Nr. ab92324	Abcam Limited, Cambridge, UK

### 5) Primer (QuantiTect Primer Kits, Qiagen)

QuantiTect Primer Kits		Katalognummer	Firma
Human beta-Actin	Hs_ACTB_2_SG	QT01680476	Qiagen, Venlo, Niederlande
Human GAPDH	Hs_GAPDH_1_SG	QT00079247	Qiagen, Venlo, Niederlande
Human TNFAIP3/A20	Hs_TNFAIP3	QT00041853	Qiagen, Venlo, Niederlande
Murin beta-Actin	Mm_Actb_2_SG	QT01136772	Qiagen, Venlo, Niederlande
Murin GAPDH	Mm_Gapdh_3_SG	QT01658692	Qiagen, Venlo, Niederlande
Murin A20 (Tnfaip3)	Mm_Tnfaip3_1_SG	QT00134064	Qiagen, Venlo, Niederlande

## 6) Labormaterialien und -gerätschaften

Labormaterialien und -gerätschaften	Bezugsquelle/Hersteller
Brutschrank, Kat.-Nr. 51029325/24	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Combitips (2,5 ml)	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
Deckgläser (18 x 14, 24 x 32, 24 x 50)	Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland
EDTA-Monovetten (9 ml)	SARSTEDT AG & Co. KG, Wiesloch, Deutschland
FACS-Gerät, Kat.-Nr. 202785000	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
FACS-Röhrchen (5 ml)	SARSTEDT AG & Co. KG, Wiesloch, Deutschland
Falcon, Zentrifugenröhrchen (15 ml/50 ml)	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Gefrieröhrchen (2 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Gefriertruhen, 360, TSX500	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Glasküvetten	DWK Life Science GmbH, Mainz, Deutschland
Handschuhe Latex Einmalhandschuhe	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Kühlschränke, 4120-22, 5723-22	Liebherr-International AG, Bulle, Schweiz
Mehrwegpipetten Research plus (0,5–10 µl/10–100 µl/100–1000 µl)	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
Mikroskop, Kat.-Nr. 451887	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Multiwell-Platte (6-Well/12-Well/96-Well)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
NanoDrop, ND-2000	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA

Parafilm® „M“ 4 in X 125 Ft. Roll	Pechiney Plastic Packaging Inc., Akron, USA
Pipetten, Kat.-Nr. 343817A, Kat.-Nr. 354111A, Kat.-Nr. 364264A	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe, Kat.-Nr. 8806295	Hirschmann Laborgeräte GmbH Co. KG, Eberstadt, Deutschland
Pipettenspitzen (200 µl/1000 µl)	SARSTEDT AG & Co. KG, Wiesloch, Deutschland
Pipettenspitzen (0,5–20 µl)	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße Safe-Lock Tubes (0,5 ml/1,5 ml/2 ml)	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
Serologische Pipetten (5 ml/10 ml/25 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Sterilbank, 1300 Serie A2	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Thermocycler, LigthCycler 480/2	Roche Holding AG, Basel, Schweiz
Vortexer, Modell Reax control	Heidolph Scientific Products GmbH, Schwabach, Deutschland
Wasserbad, Kat.-Nr. 7753494	Fleischhacker GmbH & Co. KG, Schwerte, Deutschland
Wärmeschrank, L002900	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Zentrifuge (Heraeus Multifuge X3R/Heraeus Multifuge 16), Kat.-Nr. 75004515, Kat.-Nr. 75004230	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Zentrifugenröhrchen (15 ml/50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

# Danksagung

# Tabellarischer Lebenslauf