Aus der Medizinischen Poliklinik-Innenstadt
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Arbeitsgruppe Klinische Biochemie
Kommissarischer Direktor: Prof. Dr. med. Martin Reincke

Funktion der Pathogen-Erkennungsrezeptoren des angeborenen Immunsystems auf Mesangialzellen bei der experimentellen Immunkomplex-Glomerulonephritis

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Julia Lichtnekert
aus München

2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter:	Priv. Doz. Dr. H.-J. Anders
2. Berichterstatter:	Priv. Doz. Dr. R. Zeidler
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. L. Klein
	Prof. Dr. M. F. Bauer
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Priv. Doz. Dr. V. Vielhauer
Dekan:	Prof. Dr. Dr. h. c. M. Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	07.05.2009

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung ix

1 Einleitung 1
- 1.1 Klinische Aspekte der Glomerulonephritis . . . 1
- 1.2 Pathophysiologie glomerulärer Erkrankungen . . . 3
  - 1.2.1 Allgemeine Pathologie des Glomerulus . . . 3
  - 1.2.2 Nephrotisches Syndrom . . . 5
  - 1.2.3 Nephritisches Syndrom . . . 7
  - 1.2.4 Nierenbeteiligung bei Systemerkrankungen . . . 9
- 1.3 Die Immunkomplex-Glomerulonephritis . . . 10
  - 1.3.1 Pathophysiologie der Immunkomplex-Glomerulonephritis . . . 10
  - 1.3.2 Bedeutung glomerulärer Mesangialzellen . . . 12
  - 1.3.3 Modell der nephrotoxischen Serumnephritis . . . 14
- 1.4 Das Immunsystem . . . 15
  - 1.4.1 Angeborene und erworbene Immunabwehr . . . 15
  - 1.4.2 Pathogen-Erkennungsrezeptoren und ihre Liganden . . . 17
  - 1.4.3 Signaltransduktion der Pathogen-Erkennungsrezeptoren . . . 23
  - 1.4.4 Endogene Liganden . . . 24
  - 1.4.5 Toll-like Rezeptoren und Nierenerkrankungen . . . 27
- 1.5 Fragestellung . . . 29

2 Material und Methoden 31
- 2.1 Material . . . 31
  - 2.1.1 Geräte . . . 31
  - 2.1.2 Chemikalien, Puffer und Lösungen . . . 32
  - 2.1.3 Materialien für die Zellkultur . . . 33
  - 2.1.4 TLR-Liganden, Zytokine und Stimulanzien . . . 33
  - 2.1.5 Reagenziensätze . . . 34
  - 2.1.6 Antikörper . . . 34
  - 2.1.7 Primer für die *real-time* RT-PCR . . . 34
  - 2.1.8 Zelllinien . . . 36
  - 2.1.9 Versuchsmäuse . . . 36
- 2.2 Zellkultur . . . 36
  - 2.2.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen . . . 36
  - 2.2.2 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität . . . 36
  - 2.2.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen . . . 37

2.2.4 Gewinnung und Kultivierung von primären Mesangialzellen . . . 37
2.2.5 Gewinnung von Zellüberstand nekrotischer Zellen 38
2.2.6 Gewinnung und Aufreinigung von apoptotischen Thymozyten . 38
2.2.7 Gewinnung von Splenozyten 38
2.2.8 T-Zell-Aktivierungs-Assay 39
2.2.9 Stimulationsexperimente 39
2.3 Tierexperimente 40
2.3.1 Tierhaltung 40
2.3.2 Studiendesign der nephrotoxischen Serumnephritis 40
2.4 Immunologische Methoden 42
2.4.1 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) 42
2.4.2 Proliferationsassay 43
2.4.3 Durchflusszytometrie (FACS) 43
2.5 Molekularbiologische Methoden 45
2.5.1 RNA-Isolierung 45
2.5.2 Bestimmung des RNA-Gehalts 45
2.5.3 cDNA-Synthese 45
2.5.4 *Real-time* quantitative PCR 46
2.6 Morphologische und histologische Untersuchungen 47
2.6.1 Färbung der primären Mesangialzellen zur Charakterisierung . . 47
2.6.2 Aufbereitung und Analyse von Nierengewebe 47
2.7 Statistische Analyse 48

3 Ergebnisse **49**
3.1 Charakterisierung der Mesangialzellen und Expression der Pathogen-Erkennungsrezeptoren 49
3.1.1 Charakterisierung der primären Mesangialzellen 49
3.1.2 Expression der Pathogen-Erkennungsrezeptoren auf primären Mesangialzellen 50
3.2 Aktivierung der primären Mesangialzellen durch exogene und endogene Liganden 51
3.2.1 Stimulation der primären Mesangialzellen mit Liganden der Pathogen-Erkennungsrezeptoren 52
3.2.2 Nachweis der Zell-Proliferation durch Liganden der Pathogen-Erkennungsrezeptoren 53
3.2.3 Apoptotische und nekrotische Zellen als endogene Liganden . . . 54
3.3 Effekt der nephrotoxischen Serumnephritis in Trif- und Myd88-defizienten Mäusen 61
3.3.1 Proteinurie 61
3.3.2 Serumchemie 62
3.3.3 Nachweis von autologen Anti-Kaninchen-Immunglobulinen . . . 63
3.3.4 T-Zell-Aktivierung 63
3.3.5 Nachweis der renalen Leukozyteninfiltration 64
3.3.6 Histologische Auswertung 68

4 Diskussion **71**
4.1 Übersicht über die experimentellen Befunde 71
4.2 Interpretation der Ergebnisse im Vergleich mit der Literatur 71
4.2.1 Bedeutung der Pathogen-Erkennungsrezeptoren in Mesangialzellen 71
4.2.2 Bedeutung endogener Liganden bei der Toll-like Rezeptor-abhängigen inflammatorischen Aktivierung glomerulärer Mesangialzellen 75
4.2.3 Bedeutung der Signaladaptermoleküle TRIF und MyD88 bei der Pathogenese der Immunkomplex-Glomerulonephritis 80

Literaturverzeichnis **85**

Abkürzungsverzeichnis **103**

Danksagung **105**

Veröffentlichungen **107**

Lebenslauf **109**

Abbildungsverzeichnis

1.1 Prävalenz und Inzidenz der chronischen Nierenersatztherapie 1
1.2 Diagnoseverteilung der Patienten mit chronischer Niereninsuffiziez bei Therapiebeginn (Inzidenz) im Jahresvergleich 2
1.3 Indikationen für eine Nierentransplantation 3
1.4 Membranöse Glomerulopathie 5
1.5 Membranoproliferative Glomerulonephritis 6
1.6 Fokal segmentale Glomerulosklerose 7
1.7 Antibasalmembran-Glomerulonephritis 9
1.8 Schematische Darstellung der Immunkomplex-Glomerulonephritis . . . 11
1.9 Entstehung der Immunkomplex-Glomerulonephritis 12
1.10 Struktur der Toll-like Rezeptoren 20
1.11 Signaltransduktion der Toll-like-Rezeptoren 24
1.12 Signaltransduktion der RNA-Helikasen 25
1.13 Das Danger-Modell 26

2.1 Modell der nephrotoxischen Serumnephritis 41

3.1 Morphologie und Immunfluoreszenzfärbung der Mesangialzellen 50
3.2 Expression der Pathogen-Erkennungsrezeptoren auf Mesangialzellen . . 51
3.3 Effekt der Liganden der Pathogen-Erkennungsrezeptoren auf Mesangialzellen 53
3.4 Effekt von Poly(I:C)-RNA und 3P-RNA auf Mesangialzellen 54
3.5 Proliferation der Mesangialzellen durch TLR-Liganden 55
3.6 Anreicherung von apoptotischen Thymozyten 56
3.7 Stimulation der Mesangialzellen mit apoptotischen Zellen 56
3.8 Stimulation der Mesangialzellen mit aufgereinigter RNA 57
3.9 Stimulation der Mesangialzellen mit Mediumüberständen nekrotischer Zellen 59
3.10 Stimulation primärer Mesangialzellen aus Wildtyp-, Trif-defizienten, Myd88-defizienten und Tlr2-defizienten Mäusen mit Mediumüberständen nekrotischer Zellen 60
3.11 Nachweis der CXCL9/MIG-Freisetzung nach Stimulation mit Mediumüberständen nekrotischer Zellen 60
3.12 Proteinurie im Verlauf der experimentellen Immunkomplex-Glomerulonephritis 61
3.13 Serumchemie 62
3.14 Nachweis autologer Immunglobulin G-Antikörper 63

3.15 Nachweis der Interferon-γ-Freisetzung aus Splenozyten 64
3.16 Nachweis der CD69-Expression auf CD8-positiven Splenozyten 65
3.17 Auswertung der CD69-Expression auf CD8-positiven Splenozyten . . . 66
3.18 Nachweis der renalen Leukozyteninfiltration 67
3.19 Auswertung der renalen Leukozyteninfiltration 68
3.20 Histologie der nephrotoxischen Serumnephritis 69
3.21 Histologie-Auswertung 70

4.1 Expression der Pathogen-Erkennungsrezeptoren in der Niere 73
4.2 Mechanismus der sterilen Inflammation 78
4.3 Pathogen- und *Hidden-self*-Erkennung 80

Tabellenverzeichnis

1.1 Angeborenes und erworbenes Immunsystem 17
1.2 Pathogen-Erkennungsrezeptoren und ihre Liganden 22
1.3 Endogene Liganden 27

2.1 Verwendete *real-time* PCR-Primer 35

3.1 Mesangialzellcharakterisierung 49

Zusammenfassung

Es ist bekannt, dass Infektionen eine Glomerulonephritis auslösen und verschlechtern können. Die Pathogen-Erkennungsrezeptoren, von denen die Toll-like Rezeptoren die bekanntesten sind, spielen dabei eine wichtige Rolle. Sie erkennen sowohl exogene Liganden, die von Viren und Bakterien stammen, als auch endogene Moleküle, die durch Zelltod freigesetzt werden. Von besonderem Interesse sind dabei die zwei Signaladapterproteine MyD88 und TRIF, die an Toll-like Rezeptoren binden und deren Aktivierung intrazellulär weiterleiten. Während MyD88 an alle bekannten Toll-like Rezeptoren außer TLR3 bindet, interagiert TRIF nur mit TLR3 und TLR4. Virale RNA oder bakterielle Bestandteile können glomeruläre Mesangialzellen über Rezeptoren des angeborenen Immunsystems aktivieren. Die Hypothese dieser Arbeit war, dass auch endogene Liganden glomeruläre Mesangialzellen über Toll-like Rezeptoren aktivieren. Somit könnten Toll-like Rezeptoren durch die Vermittlung nicht-infektiöser, „steriler“ Entzündungsmechanismen an der Pathogenese der Immunkomplex-Glomerulonephritis maßgeblich beteiligt sein.
Aus Trif-, Myd88- und Tlr2-Knockout-Mäusen wurden zunächst primäre glomeruläre Mesangialzellen gewonnen, um Toll-like Rezeptor-abhängige Effekte im Vergleich zu Wildtyp-Zellen zu untersuchen.
Die Expressions-Analyse der Pathogen-Erkennungsrezeptoren primärer glomerulärer Mesangialzellen aus C57BL/6-Mäusen zeigte eine deutliche Expression der Toll-like Rezeptoren 2, 3 und 4 sowie der RNA-Helikasen MDA-5 und RIG-I. *In vitro*-Stimulationen mit TLR-Liganden führten zu einer Freisetzung des proinflammatorischen Zytokins Interleukin-6 aus Mesangialzellen. Apoptotische Zellen konnten ebenfalls Mesangialzellen zu einer IL-6-Produktion aktivieren, die in Myd88- und Tlr2-defizienten Mesangialzellen jedoch nicht nachweisbar war. Stimulationsexperimente mit aufgereinigter RNA aus apoptotischen Zellen zeigten eine Trif-abhängige Signalweiterleitung. Die Stimulation mit Mediumüberständen nekrotischer Zellen führte hingegen zu einer starken TLR2- und MyD88-abhängigen Aktivierung primärer Mesangialzellen. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass apoptotische und nekrotische Zellen glomeruläre Mesangialzellen via TLR2/MyD88 aktivieren, während die Stimulation mit aufgereinigter RNA apoptotischer Zellen über TLR3/TRIF zu einer proinflammatorischen Antwort in Mesangialzellen führte.
In dieser Arbeit konnte somit erstmals nachgewiesen werden, dass auch nicht-Pathogen-assoziierte Liganden glomeruläre Mesangialzellen über Toll-like Rezeptoren aktivieren.
Um die funktionelle Relevanz der Toll-like Rezeptoren in der Pathogenese der Glomerulonephritis zu untersuchen, wurden Knockout-Mäuse verwendet, denen entweder das Gen für TRIF oder MyD88 fehlte und dadurch die entsprechende

Toll-like Rezeptor-Signalkaskade unterbrochen war.
Als experimentelle Grundlage diente das Modell der nephrotoxischen Serumnephritis. Mäusen wurden dabei im Kaninchen gewonnene und gegen die murine glomeruläre Basalmembran gerichtete Antikörper verabreicht. Dies führte zur Induktion einer Immunantwort gegen die fremden Antikörper mit Bildung und Ablagerung von glomerulären Immunkomplexen. Nach drei Wochen zeigte sich das klinische und histologische Vollbild einer Immunkomplex-Glomerulonephritis.
Während in Wildtyp- und Trif-defizienten Mäuse nach drei Wochen eine signifikante Proteinurie und Retention von Harnstoff nachweisbar waren, fanden sich in den Myd88-Knockout-Mäusen normale Werte. Ebenso zeigten sich bei den Wildtyp- und Trif-defizienten Mäusen typische Veränderungen in der Histologie mit deutlicher Sklerosierung und Halbmondbildung der Glomeruli, während Myd88-defiziente Tiere ein unauffälliges histologisches Bild boten. Auch in der Immunhistochemie konnten entsprechende Veränderungen in Wildtyp- und Trif-Knockout-Mäusen nachgewiesen werden. Im Vergleich zu den Myd88-defizienten Mäusen fand sich eine vermehrte Infiltration von Makrophagen und T-Lymphozyten.
Sowohl klinisch als auch histologisch zeigten somit Trif-defiziente Mäuse im Gegensatz zu Myd88-defizienten Mäusen eine dem Wildtyp vergleichbar ausgeprägte Glomerulonephritis.
Um die immunologischen Komponenten der Pathogenese weiter zu differenzieren, wurde zunächst die humorale Immunantwort der Mäuse untersucht. Im Serum aller Versuchstiere konnten Antikörper gegen die injizierten Kaninchen-Immunglobuline in vergleichbaren Mengen nachgewiesen werden. Folglich führte eine Deaktivierung von MyD88 oder TRIF nicht zu einer Verminderung der humoralen Immunantwort.
Somit könnte der klinische Unterschied in der zellulären Immunantwort begründet sein. Diesen Gedanken unterstützte eine signifikant und vergleichbar hohe Interferon-γ-Sekretion der mit Kaninchen-IgG reaktivierten Splenozyten von Wildtyp- und Trif-defizienten Mäusen, bei normalen Werten der Myd88-Knockout-Tiere. Zudem konnte eine deutliche Reaktivierung der zytotoxischen T-Zellen ebenfalls nur in den Wildtyp- und Trif-defizienten Mäusen nachgewiesen werden. Somit wirkte der Schutz vor der Entwicklung einer Immunkomplex-Glomerulonephritis bei den Myd88-Knockout-Mäusen wahrscheinlich über die zelluläre Immunantwort.
Mit diesen Versuchen konnte gezeigt werden, dass die durch TRIF weitergeleitete Aktivierung von TLR3 keine Rolle in der Pathogenese der Immunkomplex-Glomerulonephritis spielt, da eine Deaktivierung des Gens keinen Einfluss auf die Ausbildung der Erkrankung im Modell der nephrotoxischen Serumnephritis hatte. Allerdings konnte durch Unterbrechung der Myd88-vermittelten TLR-Signalkaskade die Induktion der Glomerulonephritis vollständig verhindert werden, ebenso die Aktivierung von T-Lymphozyten, welche maßgeblich an der Pathogenese im Modell der nephrotoxischen Serumnephritis beteiligt sind.

1 Einleitung

1.1 Klinische Aspekte der Glomerulonephritis

Die Glomerulonephritis ist eine der häufigsten Ursachen für die Entwicklung einer terminalen Niereninsuffizienz. Viele Glomerulonephritiden bleiben unerkannt, da sie erst zu Symptomen führen, wenn eine chronische Niereninsuffienz bereits eingetreten ist. Ein Weiterleben des betroffenen Patienten ist dann nur mit Hilfe einer Nierenersatztherapie oder Nierentransplantation möglich.
Laut QuaSi-Niere Jahresbericht 2006/2007 wurden in Deutschland mehr als 90.000 Patienten mit einer Nierenersatztherapie versorgt. Davon waren etwa 65.000 Patienten dialysepflichtig und etwa 25.000 befanden sich in Nachsorge nach Nierentransplantation. Dies entspricht einer Gesamtprävalenz (Dialysepatienten und Patienten in Nachsorge nach Nierentransplantation) von 1114 pro Million Einwohner. 2006 wurden mehr als 17.000 Patienten erstmalig in das Verfahren einer dauerhaften Nierenersatztherapie aufgenommen. Dies entspricht einer Inzidenz von 213 pro Million Einwohner. Analysen über den Zeitraum von 1995 bis 2006 ergaben einen jährlichen Zuwachs der Prävalenz von durchschnittlich 4,4% und ein Anstieg der Inzidenz von 5,1% (siehe Abbildung 1.1) [1].

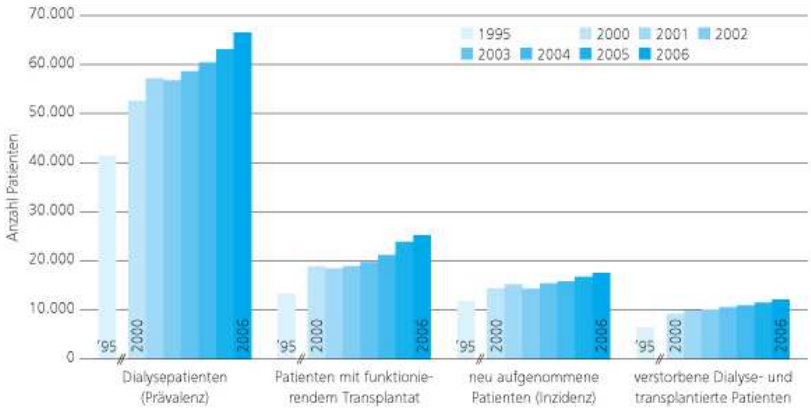

Abbildung 1.1: Prävalenz und Inzidenz der chronischen Nierenersatztherapie: Dargestellt sind die steigende Prävalenz der Dialysepatienten und Patienten in Transplantatnachsorge über den Zeitraum von 1995 bis 2006, eine steigende Inzidenz der neu behandelten Dialysepatienten pro Jahr und die seit 1995 steigende Anzahl verstorbener dialysepflichtiger oder transplantierter Patienten [1].

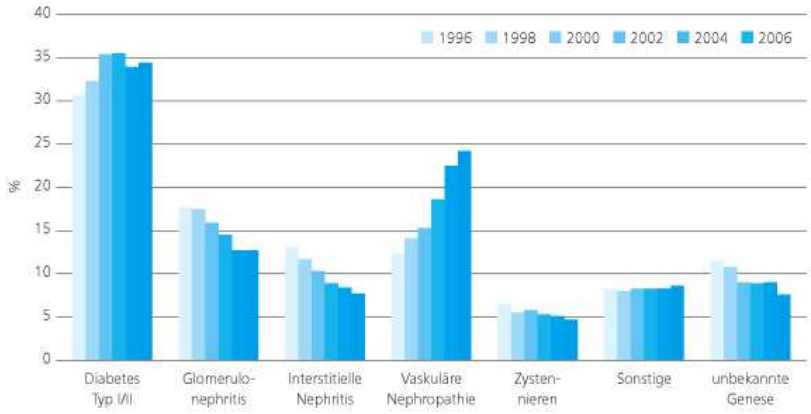

Abbildung 1.2: Diagnoseverteilung der Patienten mit chronischer Niereninsuffiziez bei Therapiebeginn (Inzidenz) im Jahresvergleich: Die prozentuale Verteilung zeigt einen Anstieg von Diabetes mellitus und der vaskulären Nephropathie über den Zeitraum von 1996 bis 2006. Insgesamt ist Diabetes mellitus gefolgt von der vaskulären Nephropathie die häufigste Grunderkrankung bei terminaler Niereninsuffizienz. Die Glomerulonephritis ist mit 13% dritthäufigste Ursache einer chronischen Niereninsuffizienz [1].

In den USA verzeichnet das United States Renal Data System (URDS) einen ähnlichen Anstieg der Prävalenz und Inzidenz der terminalen Niereninsuffizienz. Gemäß Hochrechnungen des URDS werden die Patientenzahlen in den USA weiter zunehmen. So wird die Inzidenz von 110.000 im Jahre 2006 bis zum Jahre 2020 auf 150.000 anwachsen, während sich die Prävalenz von 506.000 (2006) auf 784.000 (2020) erhöhen wird [2]. In Deutschland und in den USA ist die chronische Glomerulonephritis nach diabetischer und hypertensiver Nephropathie die dritthäufigste Ursache einer chronischen Niereninsuffizienz. Die Diagnoseverteilung in Deutschland von 1996 bis 2006 zeigt, dass Diabetes mellitus und die vaskuläre Nephropathie als Grunderkrankung immer mehr an Bedeutung gewinnen (siehe Abbildung 1.2). Dies lässt sich durch das immer höhere Alter der Patienten erklären, die eine höhere Inzidenz für vaskuläre Erkrankungen und Diabetes mellitus Typ II aufweisen.
Chronisch niereninsuffiziente und dialysepflichtige Patienten weisen eine höhere Komorbidität und Mortalität im Vergleich zur Gesamtbevölkerung auf. Kardiale Erkrankungen und Infektionen zählen zu den häufigsten Todesursachen [1].
Somit entsteht ein gesellschaftliches und volkswirtschaftliches Problem, da einerseits die chronische Nierenersatztherapie zu einer gravierenden Einschränkung der Lebensqualität des Patienten als auch seiner Angehörigen führt. Andererseits entstehen enorme Kosten durch die Behandlung der chronischen Niereninsuffizienz und ihrer Folgeerkrankungen.
Die Nierentransplantation gilt als die beste Alternative zur Nierenersatztherapie. Laut Angaben der Deutschen Stiftung Organtransplantation (DSO) war die Hauptindikation für eine Nierentransplantation im Jahre 2007 mit mehr als 700

transplantierten Patienten eine Glomerulonephritis (siehe Abbildung 1.3). Trotz einer leicht gestiegenen Transplantationsrate warteten 2007 dreimal mehr Patienten auf eine Niere als Nierentransplantate zur Verfügung standen [3]. Dieser Zustand wird sich angesichts der steigenden Inzidenz dialysepflichtiger Patienten nicht wesentlich ändern. Daher sind neue Therapieansätze zur Prävention und Verhinderung eines weiteren Fortschreitens der chronischen Niereninsuffizienz unbedingt erforderlich.

Indikationen für eine Nierentransplantation

GRUNDERKRANKUNGEN DER NEUANMELDUNGEN OHNE WIEDERHOLUNGSANMELDUNGEN

Glomerulonephritis	728
Unbekannte Ursache	457
Diabetische Nephropathie	381
Zystennieren	409
Interstitielle Nephritis	176
Vaskuläre Erkrankungen	218
Immunologische Systemerkrankungen	289
Andere	183
Kongenitale Veränderungen	46
Hereditäre Nierenerkrankung	35
HUS	17
Amyloid- u. Plasmozytomnieren	17
	2956

Abbildung 1.3: Indikationen für eine Nierentransplantation: Die Glomerulonephritis ist mit einem Anteil von 25% der transplantierten Patienten in Deutschland die häufigste zugrunde liegende Erkrankung bei terminaler Niereninsuffizienz, die auf die Warteliste für Nierentransplantation gesetzt wird [3].

1.2 Pathophysiologie glomerulärer Erkrankungen

1.2.1 Allgemeine Pathologie des Glomerulus

Als Glomerulus bezeichnet man ein Kapillarknäuel, das jeweils am Anfang der kleinsten funktionellen Einheit, dem Nephron steht. In ihrer Gesamtheit pressen die Glomeruli täglich 120-180 Liter Ultrafiltrat aus dem Plasma in die Bowmansche Kapsel ab. Dabei ist die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) abhängig von einer ausreichend hohen Durchblutungsrate der Glomeruli, dem Filtrationsdruck, der Filtrationsfläche und der Zusammensetzung der Filtrationsbarriere. Diese Parameter werden streng durch Tonusänderungen in den Widerstandsgefäßen reguliert, um einen gleichbleibenden Blutfluss und Filtrationsdruck in den Glomeruli zu gewähren. Die Mesangialzellen, die sich überwiegend in der glomerulären Matrix befinden, sorgen dabei durch ihre Kontraktionsfähigkeit für eine konstante Filtrationsfläche. Die Filtrationsbarriere setzt sich aus einem fenestriertem Endothel, der glomerulären

Basalmembran (GBM) und Podozyten zusammen. Auf Grund physiochemischer und elektrostatischer Eigenschaften der Filtrationsbarriere ist der abgepresste Primärharn weitgehend frei von Blutzellen und Plasmaproteinen. Eine glomeruläre Läsion hat daher fast immer eine erniedrigte GFR und/oder eine als pathologisch zu wertende Ausscheidung von Plasmaproteinen und Blutzellen im Urin zur Folge.
Verschiedene Kriterien charakterisieren eine Schädigung der Glomeruli: Zellproliferation, Vermehrung der extrazellulären Matrix, Sklerose, Halbmondbildung, Migration und Einlagerung des Mesangiums sowie eine Veränderung der Epithelzellen in ihrer Morphologie.
Vermehrte Zellproliferation im Glomerulus kann sowohl Folge einer Zellvermehrung von intrinsischen Nierenzellen wie Mesangial-, Epithel- und Endothelzellen als auch einer Ansammlung von Leukozyten in den Kapillaren oder im Mesangium sein.
Eine Vermehrung der extrazellulären Matrix entsteht durch die Zunahme von mesangialen Matrixkomponenten und von Bestandteilen der Basalmembran.
Die glomeruläre Sklerose resultiert durch eine Zunahme der extrazellulären Matrix und/oder Plasmaprotein-Insudate, die wiederum zu einer Obliteration der Kapillaren und somit zu einer Verfestigung bzw. Sklerosierung der Kapillarschlingen führt. Wenn das gesamte Glomerulus von der Narbenbildung betroffen ist, spricht man von einer kompletten Sklerose. Bei einer segmentalen Sklerose sind nur Teile des glomerulären Schlingenapparates involviert.
Halbmondbildung (Crescent) bedeutet eine Ansammlung von Zellen und extrazellulären Zellmaterial im extrakapillären Teil des Glomerulus. Sie ist Folge einer schweren Schädigung der Kapillaren mit Unterbrechung der Gefäßwand und subsequenter Ausschüttung von Fibrin von der Innenseite der geschädigten Gefäßwand nach außen in den extrakapillären Teil des Glomerulus. Dies ist von Gefäßzellproliferation und einer Ansammlung von Monozyten und anderen Blutzellen begleitet. Die zelluläre Zusammensetzung der Halbmonde hängt von der Art der Schädigung der Basalmembran der Bowmanschen Kapsel ab. Sind Zellen und Kollagen an der Halbmondbildung beteiligt, so wird dies als fibrozellulär bezeichnet. Ist nur Kollagen im extrakapillären Teil des Glomerulus zu finden, wird das Crescent als fibrotisch deklariert.
Die Migration des Mesangiums wird folgendermaßen beschrieben: Mesangialzellen und mesangiale Matrix breiten sich vom zentralen Teil der Kapillarschlingen des Glomerulus in die Peripherie aus, indem sie zwischen Edothelzellen und Basalmembran entlangwandern, sich dort einlagern und so zur Verdickung der Kapillarwände beitragen.
Veränderungen der Epithelzellmorphologie können nur im Elektronenmikroskop nachgewiesen werden. Im Zusammenhang mit dem Proteinverlust über die geschädigten Kapillaren kommt es meist zu einem Verlust der Fußfortsätze der Zellen [4].

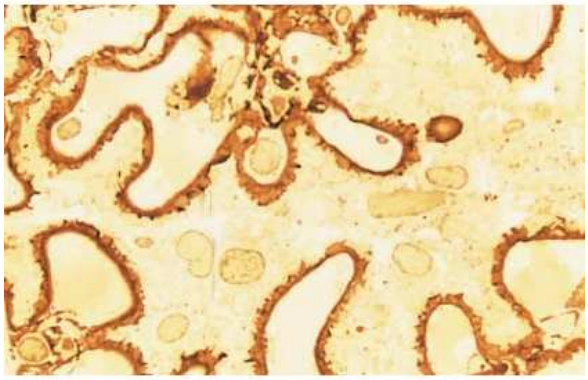

Abbildung 1.4: Membranöse Glomerulopathie: sichtbare subepitheliale Ablagerungen der Immunkomplexe (Silber Methenamin Färbung) [6].

1.2.2 Nephrotisches Syndrom

Das nephrotische Syndrom ist durch eine Proteinurie von mehr als 3,5g/Tag definiert. Wenn die Albumin-Syntheseleistung der Leber den renalen Eiweißverlust nicht mehr kompensieren kann, entwickeln sich Hypalbuminämie, Hyperlipoproteinämie, Ödeme und Hyperkoagulabilität. Ursache des nephrotischen Syndroms ist die erhöhte Permeabilität der Filtrationsbarriere für Plasmaproteine.
Im folgenden werden die Glomerulonephritiden aufgeführt, die überwiegend mit einem nephrotischen Syndrom einhergehen.

Membranöse Glomerulopathie Die Membranöse Glomerulopathie ist eine der Hauptursachen des nephrotischen Syndroms. Sie ist meist idiopathisch, kann aber auch sekundär bei Hepatitis B, Sjögren Syndrom, Transplantation, Systemischen Lupus Erythematodes, Diabetes mellitus, Sarkoidose, Syphilis sowie bei bösartigen Tumoren [5] auftreten. Ebenso kann eine Belastung mit bestimmten Pharmazeutika und Schwermetallen (z.B. Penicillamine, Gold) eine membranöse Glomerulopathie auslösen [6]. Die membranöse Glomerulopathie tritt meist bei Erwachsenen in der 4.-5. Lebensdekade auf. Männer sind häufiger als Frauen betroffen. Etwa 30% der Patienten entwickeln ein chronisches Nierenversagen mit entsprechend erniedrigter glomerulärer Filtrationsrate (GFR) [7]. Klinisch auffällig ist meist das nephrotische Syndrom, seltener eine asymptomatische Proteinurie oder Hämaturie. Die Diagnose wird mittels Nierenbiopsie gestellt und stützt sich auf morphologische Veränderungen im Glomerulus. Die typischen histologischen Veränderungen sind eine im Mikroskop sichtbare Verdickung der glomerulären Basalmembran und immunhistologisch nachweisbare subepitheliale Immunkomplex-Ablagerungen (siehe Abbildung 1.4). Durch die Immunkomplexe wird das Komplementsystem aktiviert, eine Einwanderung von Entzündungszellen und glomeruläre Zellproliferation können jedoch nicht nachgewiesen werden [8].

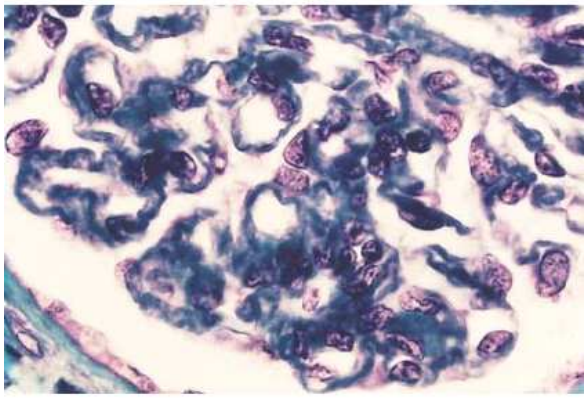

Abbildung 1.5: Membranoproliferative Glomerulonephritis: deutlich sichtbare Kapillarwandverdickungen bei der MPGN Typ II durch Immunkomplex-Ablagerungen in der Basalmembran (Masson Trichrom Färbung) [6].

Membranoproliferative Glomerulonephritis Die membranoproliferative Glomerulonephritis (MPGN) ist klinisch meist durch ein kombiniertes nephritisches/ nephrotisches Syndrom mit Hypokomplementämie, d.h. einer Verminderung der Komplementfaktoren, gekennzeichnet. Die MPGN ist nur selten Ursache eines nephrotischen Syndroms und tritt meist bei Kindern auf. Anhand des mikroskopischen Befundes werden Typ I, II und III mit abnehmender Häufigkeit unterschieden. Charakteristisch für die MPGN Typ I sind subendotheliale und mesangiale Immunkomplexablagerungen, eine Expansion der Mesangiums und eine Verdickung der glomerulären Basalmembran. Mesangialzellen und infiltrierende Monozyten lagern sich zwischen Endothel und Basalmembran, was zu einer Doppelkonturierung der Basalmembran führt. Die Proliferation ist meist uniform und diffus bei der idiopathischen MPGN, während eine unregelmäßige Proliferation eher auf eine Lupusnephritis bei systemischen Lupus Erythematodes (SLE) hinweist. Bei der MPGN Typ II imponieren die fortlaufenden, dichten Immunkomplex-Ablagerungen in der Basalmembran (dense deposit disease) (siehe Abbildung 1.5). Bei Typ III sind neben subendothelialen auch subepitheliale Ablagerungen nachweisbar. Sekundär tritt die MPGN bei verschiedenen chronischen Infektionen wie Hepatitis B und C, Syphilis oder bakterieller Endokarditis, bei Autoimmunerkrankungen wie SLE, bei thrombotischen Mikroangiopathien und bei Paraproteinablagerungen auf [9][10].

Minimal-Change-Glomerulopathie Die Minimal-Change-Glomerulopathie ist in 90% der Fälle bei Kindern und 10-15% der Fälle bei Erwachsenen Ursache eines nephrotischen Syndroms [11]. Im Mikroskop lassen sich meist normale Glomeruli darstellen. Immunkomplexe sind nicht nachweisbar und auch sklerotische Umbauvorgänge finden nicht statt. Einzig im Elektronenmikroskop kann eine veränderte Morphologie der Epithelzellen (Podozyten) mit Verlust der Fußfortsätze nachgewiesen werden. In den meisten Fällen ist die Ätiologie unklar, selten sind Arzneimittel wie Nichtsteroidale Antirheumatika (NSAID) oder maligne

Abbildung 1.6: Fokal segmentale Glomerulosklerose: deutlich sichtbare segmentale Obliteration des Kapillarlumens angrenzend am vaskulären Pol des Glomerulus mit Vermehrung der mesangialen Matrix, Kapseladhäsionen, und hyalinen Ablagerungen (rot) (Chromotrope 2R–Silber Methenamin Färbung) [6].

Erkrankungen wie Morbus Hodgkin Ursache einer Minimal-Change-Glomerulopathie [12].

Fokal segmentale Glomerulosklerose Die Fokal segmentale Glomerulosklerose gehört mittlerweile zu den häufigsten Ursachen des nephrotischen Syndroms bei Erwachsenen in den USA. Dabei ist eine steigende Inzidenz vor allem in der afroamerikanischen und spanischen Bevölkerung bei Kindern und Erwachsenen zu beobachten [13]. Die Glomeruli sind bei der fokalen Glomerulosklerose nur teilweise, d.h. segmental, von einer Sklerosierung betroffen (siehe Abbildung 1.6). Ein weiteres Kennzeichen ist die Hyalinose, welche durch Plasmaprotein-Insudate verursacht wird. Adhäsionen oder Synechien am tubulären Pol der Glomeruli sind Zeichen einer frühen Sklerosierung [4]. Wie bei der Minimal-Change-Glomerulopathie können keine Immunkomplexe nachgewiesen werden. Ein Verlust der Fußfortsätze der Epithelzellen kann im Elektronenmikroskop sichtbar sein, ist jedoch weniger ausgeprägt als bei der Minimal-Change-Glomerulopathie [12].

1.2.3 Nephritisches Syndrom

Das nephritische Syndrom ist durch ein aktives Sediment mit glomerulärer Hämaturie und Erythrozytenzylindern gekennzeichnet, während die Proteinurie nur gering ausgeprägt ist. Je nach Ausdehnung und Progressionstendenz der Entzündung kann ein langsamer oder ein rascher Abfall der GFR eintreten. Des Weiteren führt die Natrium- und Wasserretention zu einer Volumenexpansion mit Ödembildung und Hypertension. Im folgenden werden die Glomerulonephritiden aufgelistet, die mit einem nephritischen Syndrom assoziiert sind.

Akute postinfektiöse Glomerulonephritis Die akute postinfektiöse Glomerulonephritis (APGN) ist eine Immunkomplex-Glomerulonephritis mit granulären Ablagerungen von IgG und C3 im Mesangium und in der glomerulären Basalmembran. Sie tritt vor allem bei Kindern im Alter von 2-12 Jahren ca. 6-30 Tage im Anschluss einer abgelaufenen Infektion auf und heilt meist spontan aus [14]. Die häufigsten Auslöser sind Infektionen mit β-hämolysierenden Streptokokken der Gruppe A der oberen Luftwege (Pharyngitis, Tonsillitis) oder der Haut (Impetigo). Seltener entwickelt sich eine APGN durch persistierende Infektionen wie bakterielle Endokarditis, tiefe Abszesse, oder infizierte ventrikuloatriale Shunts (Therapie des Hydrozephalus). Häufige klinische Kennzeichen sind neben dem akuten nephritischen Syndrom eine Oligurie bis hin zum akuten Nierenversagen, das durch die Abnahme der glomerulären Filtrationsrate begründet ist. Zudem kommt es zur Natrium- und Wasserretention mit Ödembildung und daraus resultierender Hypertonie [15]. Im Mikroskop sind in der Regel eine diffus proliferative und exudative Glomerulonephritis mit Proliferation des Mesangiums, eine Infiltration des Interstitiums (v.a. neutrophile Granulozyten und Makrophagen) sowie ein interstitielles Ödem nachweisbar. Elektronenmikroskopisch lassen sich subepitheliale Immunkomplexablagerungen, sogenannte „humps“ , nachweisen. Immunfluoreszenzfärbungen zeigen meist diffuse unregelmäßige granuläre Ablagerungen von IgG und C3 entlang der glomerulären Basalmembran [4].

Immunglobulin-A-(IgA-)Nephropathie Bei der IgA-Nephropathie handelt es sich um eine proliferative Glomerulonephritis bisher unklarer Genese, die nach ihrem Erstbeschreiber Jean Berger auch Morbus Berger genannt wird. Sie wird durch die Anwesenheit von IgA-Ablagerungen im Mesangium definiert. Differentialdiagnostisch ist zu beachten, dass IgA-Ablagerungen auch bei der Purpura Schönlein-Henoch, SLE, bei Leberzirrhose sowie einer Reihe von inflammatorischen Erkrankungen wie M. Bechterew, Psoriasis, M. Reiter auftreten können. Das lichtmikroskopische Bild der IgA-Nephropathie variiert sehr (am häufigsten findet sich eine diffuse oder fokal segmentale mesangioproliferative GN) und es bestehen auch mehrere Klassifikationen, von denen das System nach Lee, das System nach Haas und die WHO-Einteilung für Lupusnephritis die gebräuchlichsten sind. Im Elektronenmikroskop finden sich Immunkomplex-artige elektronendichte Ablagerungen im Mesangium. Epidemiologisch ist die IgA-Nephropathie die häufigste Glomerulonephritis weltweit, wobei unterschiedliche Prävalenzen bezüglich der einzelnen Bevölkerungen vorhanden sind [16]. Die höchste Prävalenz findet sich bei asiatischer oder amerikanischer (nativ), mittlere Prävalenz bei kaukasicher und die niedrigste Prävalenz bei afrikanischer Abstammung. Die IgA-Nephropathie tritt doppelt so häufig bei Männern als bei Frauen auf. Die Erkrankung wird meist im späten Kindesalter bzw. im jungen Erwachsenenalter diagnostiziert. Typisch für den initialen Krankheitsbeginn sind eine asymptomatische Hämaturie oder eine intermittierende große Hämaturie oder die Kombination aus beidem.

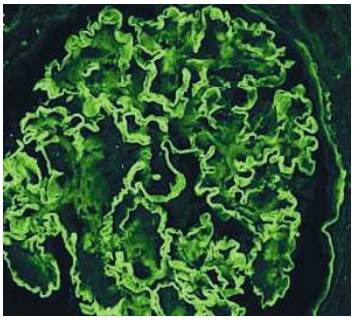

Abbildung 1.7: Antibasalmembran-Glomerulonephritis: Die Fluoreszenz-Färbung zeigt eine lineare IgG-Färbung entlang der Basalmembran [20].

1.2.4 Nierenbeteiligung bei Systemerkrankungen

Systemischer Lupus Erythematodes Beim systemischen Lupus Erythematodes (SLE) handelt es sich um eine Autoimmunerkrankung unklarer Ätiologie. Diese Systemerkrankung kann in jedem Lebensalter auftreten, betrifft aber überwiegend Frauen im Alter von 20-40 Jahren. Bis zu 70% der Patienten entwickeln eine klinisch oder morphologisch nachweisbare Nierenerkrankung. In Autopsiestudien von Lupuspatienten konnten bei fast 90% renale Veränderungen nachgewiesen werden. Die niedrigste 5-Jahres-Überlebensrate haben Patienten mit renaler und zentralnervöser Beteiligung. Somit sind Schwere und Art der Nierenbeteiligung wesentliche Faktoren für die Prognose der Lupuspatienten. Die Lupusnephritis wird nach histologischen Kriterien in sechs verschiedene Klassen eingeteilt. Entscheidend für die Diagnose des SLE sind neben der typischen Klinik der serologische Nachweis von Autoantikörpern gegen Doppelstrang-DNA, nukleäre Antigene wie Smith, Ro, La sowie positive Befunde von antinukleären Antikörpern (ANA), Anti-RNP und Anti-Phospholipid Antikörper. Es wird angenommen, dass die Lupusnephritis durch Ablagerung von zirkulierenden Immunkomplexen hervorgerufen wird. Dabei spielen die Anti-dsDNA-Antikörper, die an freie DNA binden eine wesentliche Rolle bei der Entstehung dieser Immunkomplex-Glomerulonephritis [17].

Antibasalmembran-Glomerulonephritis Bei der Antibasalmembran-Glomerulonephritis (Anti-GBM-GN) handelt es sich um eine systemische Vaskulitis der kleinen Gefäße. Zirkulierende Anti-GBM-Antikörper führen bei 30-40% der Patienten zu einer rasch progredienten Glomerulonephritis ohne Lungebeteiligung während bis zu 70% zusätzlich im Rahmen des Goodpasture Syndroms pulmonale Symptome aufweisen. Die Autoantikörper sind gegen die α3-Kette des TypIV-Kollagens gerichtet [18]. Bei etwa einem Drittel der Patienten sind auch ANCA positiv [19]. Immunhistologische Untersuchungen ergeben den Nachweis subendothelialer, linearer IgG-Ablagerungen (siehe Abbildung 1.7).

ANCA- und Pauci-Immun-Glomerulonephritis Vaskulitiden sind entzündliche Gefäßerkrankungen mit granulozytärer Infiltration der Gefäßwände und des perivaskulären Gewebes. Folgen sind Gewebeblutungen und ischämisch-nekrotische Organschäden. Bei den ANCA-assoziierten systemischen Vaskulitiden wie der Wegener Granulomatose und dem Churg-Strauss-Syndrom trägt zusätzlich die granulomatöse Entzündung zur Organschädigung bei. Eine renale Beteiligung wird vor allem beobachtet, wenn kleine Gefäße betroffen sind. In der Immunhistologie sind keine oder nur minimale Immunglobulinablagerung nachweisbar (Pauci-Immun GN).

1.3 Die Immunkomplex-Glomerulonephritis

1.3.1 Pathophysiologie der Immunkomplex-Glomerulonephritis

Ein Glomerulus kann durch verschiedene Ursachen geschädigt werden. Auslöser können Stoffwechselstörungen, Durchblutungsstörungen, toxische Substanzen und Infektionen sein. Die meisten glomerulären Erkrankungen werden durch Störungen des Immunsystems ausgelöst und sind daher entzündlicher Natur. Immunvermittelte glomeruläre Erkrankungen sind charakterisiert durch Bildung und Ablagerung von Immunkomplexen (IK) im Glomerulus, und werden daher auch als Immunkomplex-Glomerulonephritiden zusammengefasst (siehe Abbildung 1.8). Zu den häufigsten Formen zählen die IgA-Nephropathie, akute postinfektiöse GN, membranoproliferative GN und die sekundär durch Systemischer Lupus Erythematodes entstehende Lupusnephritis. Zwei wesentliche Mechanismen werden für die Entstehung eines IK-vermittelten glomerulären Schadens verantwortlich gemacht. Zum einen können sich die Immunkomplexe in situ bilden, indem Antikörper an gewebeständige Antigene binden. Andererseits können Immunkomplexe auch in der Blutzirkulation entstehen und durch ihre positive Ladung an der negativ geladenen GBM anlagern [23][24]. Kleine kationische Immunkomplexe lagern sich subepithelial der GBM ab und können so eine membranöse Nephropathie verursachen, während größere Immunkomplexe in der Regel zusammen mit anderen Molekülen wie Komplementfaktoren und Matrixproteinen im Mesangium und entlang der Kapillaren akkumulieren und so eine proliferative Glomerulonephritis auslösen [25]. Immunkomplexe im Glomerulus führen unter anderem zu einer Aktivierung von Mesangialzellen. So geht man davon aus, dass eine Entzündungsreaktion im Mesangium von einer Interaktion der Immunkomplexe mit Mesangialzellen abhängig ist, die eine Aktivierung des Komplementsystems und anderer Entzündungsprozesse zur Folge hat. Nach dieser initialen Aktivierung synthetisieren Mesangialzellen verschiedene Entzündungsmediatoren wie Zytokine und Chemokine und tragen so zu einer Verstärkung der glomerulären Entzündung bei (siehe Abbildung 1.9) [22]. Histologisch ist eine Glomerulonephritis durch Leukozyteninfiltration, Zellproliferation, Matrix-Ablagerungen in den Glomeruli, Halbmondbildung und glomeruläre Sklerose gekennzeichnet.

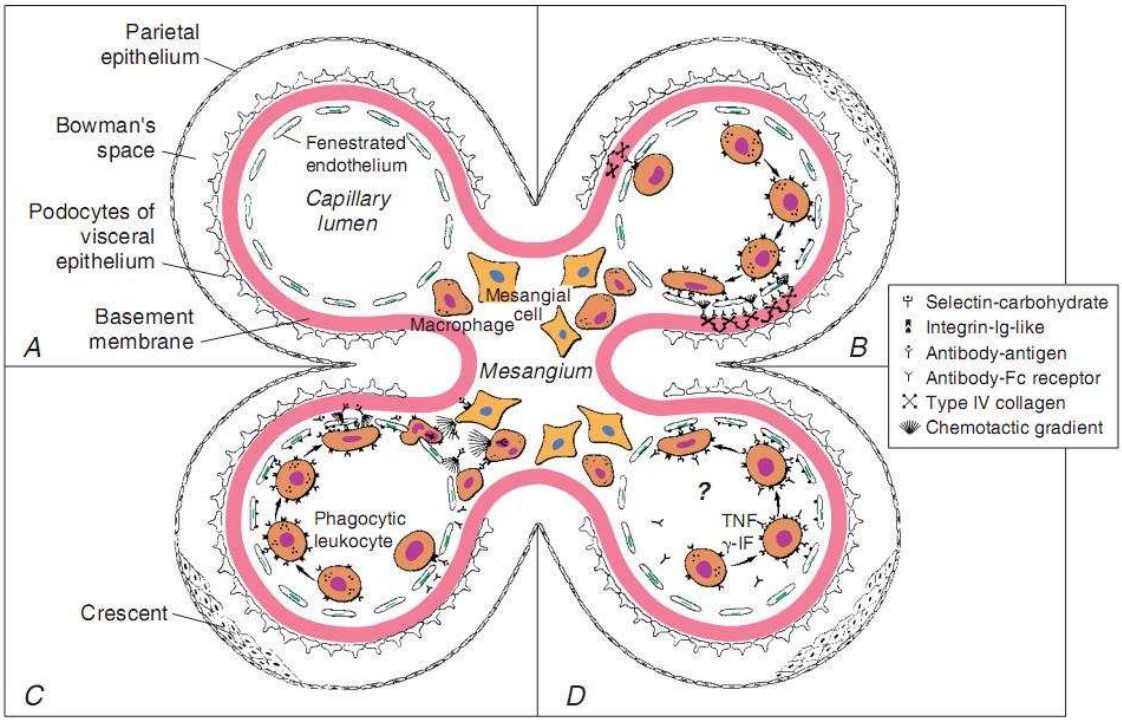

Abbildung 1.8: Schematische Darstellung der Antibasalmembran-Antikörper-GN und der Immunkomplex-Glomerulonephritis: A. Normales Glomerulus: Die Kapillarschlingen sind von der glomerulären Basalmembran, die sich aus gefenstertem Endothel, der Basalmembran und Podozytenfortsätze zusammensetzt, umgeben. Die Bowman'sche Kapsel bildet die äußerste Schicht des Glomerulus. Das Mesangium liegt zentral und bildet sich aus Mesangialzellen und extrazellulärer Matrixproteine. B. Im Blut zirkulierende Antibasalmembran-Antikörper binden linear an Basalmembranantigene (Goodpasture-Autoantigene sind Bestandteile des Typ-IV-Kollagens, gegen die der Organismus Antikörper der IgG-Klasse bildet). C. Immunkomplex-Glomerulonephritis: Zirkulierende Antikörper, die z.B. bei der akuten postinfektiösen Glomerulonephritis oder Lupusnephritis vorkommen, binden sich an den Kapillaren und der innneren Basalmembran. In B und C kommt es durch Komplementaktivierung, Chemokine und andere Entzündungsmediatoren zur Freisetzung leukotaktischer Faktoren und damit zur Einwanderung von Entzündungszellen. Crescent/Halbmondbildung entsteht durch Proliferation der Kapselepithelzellen. D. ANCA (antineutrophile cytoplasmatische Antikörper)-assoziierte Glomerulonephritis (Wegener Granulomatose) [21].

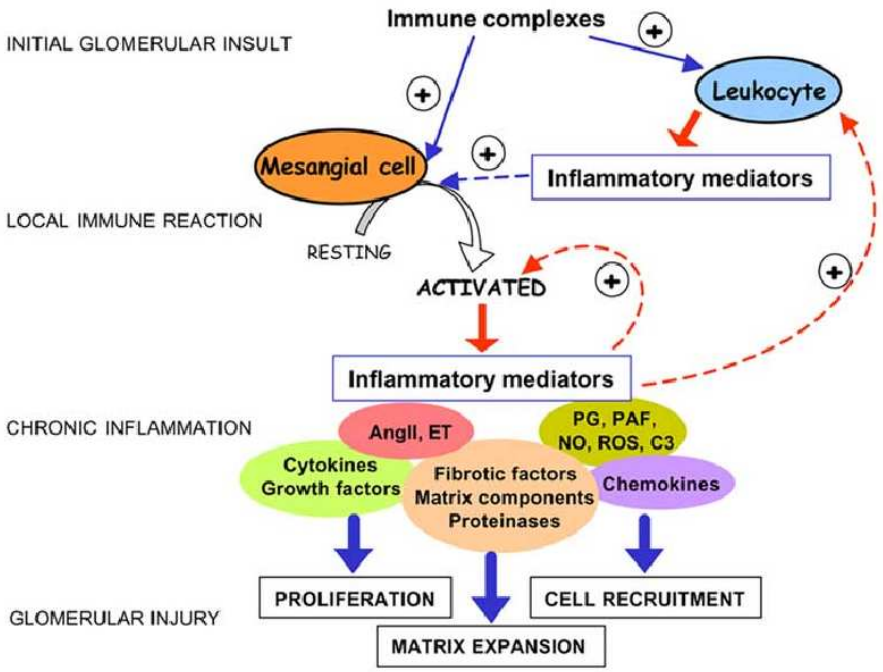

Abbildung 1.9: Entstehung der Immunkomplex-Glomerulonephritis: Immunkomplexe können glomeruläre Mesangialzellen aktivieren, die wiederum Entzündungsmediatoren wie Chemokine und proinflammatorische Zytokine freisetzen. Dies führt schließlich zu einer Schädigung des glomerulären Filterapparates [22].

1.3.2 Bedeutung glomerulärer Mesangialzellen bei der Glomerulonephritis

Das Mesangium liegt zentral im Glomerulus zwischen fenestrierten Endothelzellen der Kapillaren und der glomerulären Basalmembran. Es besteht aus Mesangialzellen, die in die mesangiale Matrix eingebettet sind [26][27]. Durch seine zentrale Lage spielt das Mesangium eine wesentliche Rolle bei der Entwicklung und Progression glomerulärer Erkrankungen. So können Mesangialzellen sowohl systemisch über das kapilläre Endothel als auch lokal durch infiltrierende Leukozyten proinflammatorische Signale und Stimuli erhalten. Bei allen chronischen und progressiven Nierenerkrankungen wird eine Expansion des Mesangiums durch Zellproliferation und Vermehrung der extrazellulären Matrix als typisches histologisches Merkmal beschrieben [28]. Im Allgemeinen ist eine Aktivierung von Mesangialzellen durch pathologische Stimuli mit den Hauptmerkmalen eines glomerulären Schadens wie Infiltration von Leukozyten, Zellproliferation und

Fibrose vergesellschaftet. Durch Adhäsionsmoleküle und Chemokin-Freisetzung aus Mesangialzellen wird die Leukozytenmigration in das Glomerulus vermittelt, was den Beginn eines glomerulären Schadens charakterisiert. Die Expansion des Mesangiums, welche schließlich zu einer irreversiblen Glomerulosklerose führen kann, ist meist eine Folge eines Ungleichgewichts zwischen Matrixproduktion und -degradation, das wiederum von Wachstumfaktoren und proinflammatorischen Zytokinen abhängig ist. Mesangialzellen produzieren eine Vielzahl von Entzündungmediatoren und spielen somit eine zentrale Rolle in der Pathogenese immunvermittelter glomerulärer Erkrankungen [29][30][31].
Glomeruläre Mesangialzellen besitzen Eigenschaften glatter Muskelzellen. Neben *Smooth Muscle Actin* bestehen die Zellen aus den Intermediärfilamenten Desmin und Vimentin. Durch ihre Kontraktilität können sie die glomeruläre Filtration beeinflussen und entsprechend auf Vasokonstriktoren und -relaxantien reagieren.
Zusätzlich besitzen Mesangialzellen Eigenschaften antigenpräsentierender Zellen mit der Fähigkeit zur Phagozytose und Synthese von Immunmediatoren [32]. Zudem wurde die Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 nachgewiesen [33][34][35]. Diese Moleküle sind essentiell für die Aufnahme zirkulierender Leukozyten in das Gewebe. Zytokine wie TNF-α und IL-1β, aber auch LPS führen zu einer verstärkten Expression dieser Adhäsionsproteine und damit zu einer vermehrten Interaktion von Leukozyten und Mesangialzellen [36].
Verschiedene Faktoren tragen zur Leukozyteninfiltration in das Glomerulus bei. Dazu zählen neben Komplementfaktoren (C5a), *Platelet Activating Factor* (PAF), Leukotriene (LTB4) auch die proinflammatorischen Zytokine und Chemokine [37]. Chemokine können lokal sezerniert werden und vermitteln die Rekrutierung von Leukozyten während der Initiation und Progressionsphase der renalen Entzündung. Sie sind dabei an der Adhäsion, Migration und Chemotaxis beteiligt. Chemokine werden vor allem von intrinsischen renalen Zellen gebildet, aber auch die infiltrierenden Leukozyten können Quelle einer lokalen Chemokin-Produktion sein [38][39]. Eine Expression von CC-Chemokinen wie MCP-1, RANTES, MIP-1α, CXC-Chemokine wie IL-8, IP-10 und MIP-2 auf Mesangialzellen konnte nachgewiesen werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass proinflammatorische Stimuli wie TNFα, IL-1β, IFN-γ eine Produktion von MCP-1, IL-8, IP-10 und MIP-2 in Mesangialzellen induzieren [40][41][42]. Ebenso führen vasoaktive Substanzen wie Angiotensin II zu einer vermehrten Expression von IP-10, MIP-1α und MCP-1 [43].
Glomeruläre Mesangialzellen exprimieren auch Chemokin-Rezeptoren wie CXCR3, CCR1 und CCR7, was darauf hinweist, dass intrinsische renale Zellen auch auf Chemokine reagieren können, die während der initialen Phase der glomerulären Schädigung sezerniert werden [44]. IP-10 induziert Proliferation und Migration, CXCL9/MIG führt ebenfalls zu einer Proliferation, während RANTES Migration beeinflusst und MIP-2 wiederum die Expression von MCP-1 und RANTES in Mesangialzellen fördert[45][46].
Das Kennzeichen vieler Glomerulonephritiden ist die Proliferation der Mesangialzellen im Mesangium. Eine Reihe von Faktoren regulieren die Mesangialzellreplikation indem sie Zellproliferation, Überleben/Fortbestand und Apoptose kontrollieren. Es wurde

beschrieben, dass Wachstumfaktoren wie PDGF, EGF und IGF, proinflammatorische Zytokine wie TNF-α, IL-1 und IL-6 neben Angiotensin II und anderen die Zellfunktionen in Mesangialzellen parakrin und autokrin beeinflussen und so zur Proliferation anregen können[47][48]. Eine Hochregulation dieser proliferativen Faktoren konnte bei verschiedenen entzündlichen Prozessen in der Niere sowie bei kultivierten Mesangialzellen nachgewiesen werden.
Proinflammatorische Zytokine wie IL-1, TNF-α und IL-6 aktivieren auch T-Helfer-Zellen. TNF-α wird bei entzündlichen glomerulären Läsionen von Mesangialzellen wie auch von infiltrierenden Makrophagen ausgeschüttet [49]. IL-6 induziert Zellproliferation und Differenzierung unter anderem auch in Mesangialzellen [50]. Bei Patienten mit mesangioproliferativer Glomerulonephrtitis konnte IL-6 vermehrt nachgewiesen werden [51][52]. Radeke et al. konnten außerdem zeigen, dass Interleukin-6 die Progression chronischer, entzündlicher Prozesse im Glomerulus durch Induktion von ROS (Reactive oxygen species), Proteinasen und Matrixmolekülen begünstigt [29].
Weiterhin konnten Fc-Rezeptoren für IgG und IgA auf Mesangialzellen nachgewiesen werden [53]. Sogenannte Fc-Rezeptoren können den Fc-Teil von Immunglobulinen und damit auch Immunkomplexe erkennen. Experimentelle Studien konnten zeigen, dass Fc-Rezeptoren (FcR) eine wichtige Rolle bei der Entstehung der Immunkomplex-GN spielen [54]. Kultivierte Mesangialzellen können IgA bzw. IgG-Immunkomplexe nicht nur binden, sondern auch aufnehmen. Dies führt zu einer Produktion verschiedener Moleküle, die schließlich Inflammation, Proliferation, Migration und Matrixproduktion beeinflussen können. Immunkomplexe können die Synthese von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF-α, IL-1 oder IL-6 bewirken. Die IgG-Bindung und Aufnahme kann durch Stimulation der Mesangialzellen mit IFN-γ, Komplement- und Wachstumsfaktoren sowie Angiotensin II hochreguliert werden. Auch die Fc-Rezeptor-Expression in Mesangialzellen kann durch Zytokine wie IFN-γ und IL-10 stimuliert werden [55].
Die genannten Mechanismen zeigen somit, dass glomeruläre Mesangialzellen von zentraler Bedeutung in der Pathogenese der immunvermittelten Glomerulonephritiden sind.

1.3.3 Modell der nephrotoxischen Serumnephritis

Das Modell der nephrotoxischen Serumnephritis (NSN), einer experimentellen Antibasalmembran-Glomerulonephritis wurde erstmals von Masugi 1934 [56] beschrieben und wird bis heute als experimentelle Methode verwendet, um *in vivo* immunvermittelte glomeruläre Erkrankungen zu untersuchen.
Bei diesem Mausmodell wird ein nephrotoxisches Serum, das Antikörper gegen die glomeruläre Basalmembran enthält, den Versuchstieren appliziert. Dies führt zu einer histologisch wie klinisch nachweisbaren schweren Glomerulonephritis in einem Zeitraum von zwei bis drei Wochen (siehe auch Methodenteil und Abbildung 2.1). In der akuten Phase der experimentellen Antibasalmembran-Glomerulonephritis kommt es durch Antikörperablagerung im Glomerulus zu einer Aktivierung von Komplement

und einer Ansammlung von Entzündungszellen. Die Induktion des NSN-Modells in Mäusen und Ratten ergab zudem eine verstärkte Expression von Chemokinen im Zusammenhang mit der Einwanderung von Leukozyten [57][41]. Des Weiteren wurde eine Akkumulation der extrazellulären Matrix und eine Mesangialzellproliferation nachgewiesen, die von einer Hochregulation proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 und TNF-α, von Wachstumsfaktoren und der induzierbaren NO Synthase (iNOS) begleitet waren [30][43][58].

1.4 Das Immunsystem

Der menschliche Körper ist zeitlebens der Gefahr ausgesetzt, sowohl von „außen“ durch umgebende Mikroorganismen als auch von „innen“ durch entartete eigene Zellen in seiner Integrität gestört zu werden. Trotz dieser ständigen Exposition wird ein gesunder Mensch selten krank. Dies ist auf die Leistung unseres Immunsystems zurückzuführen, die darin besteht, den Organismus in seiner Unversehrtheit zu bewahren. Das Immunsystem muss eindringende Pathogene erkennen und effektiv beseitigen, ohne den eigenen Organismus dabei anzugreifen. Die Unterscheidung von „fremd“ und „eigen“ ist dabei eine wesentliche Aufgabe der Immunabwehr. Weiterhin soll ein verbesserter Schutz bei erneutem Kontakt mit demselben infektiösen Agens gewährleistet werden.
Dazu bedient sich das Immunsystem zweier unterschiedlich organisierter, aber miteinander in Kontakt stehender Effektorsysteme: dem angeborenen und erworbenen Immunsystem. Das Zusammenspiel beider gewährleistet eine effektive Immunabwehr des menschlichen Körpers. Viele Infektionen werden erfolgreich von der angeborenen Immunität abgefangen und verhindern so eine Erkrankung. Solche Infektionen, die nicht vom angeborenen Immunsystem allein abgewehrt werden können, lösen eine Immunantwort der erworbenen Abwehr aus und führen in der Regel zu einem immunologischen Gedächtnis, welches im Falle einer Reinfektion für eine schnellere und effizientere Abwehr verantwortlich ist.

1.4.1 Angeborene und erworbene Immunabwehr

Der Hauptunterschied zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem besteht in den verschiedenen Erkennungsmechanismen und Rezeptoren (siehe auch Tabelle 1.1). Das angeborene Immunsystem stellt die erste wirksame Abwehrreaktion gegen eindringende Krankheitserreger dar, indem es eine Infektion unter Kontrolle bringen und sogar vollständig beseitigen kann, bevor das erworbene Immunsystem aktiv wird. Zum angeborenen Immunsystem zählen die Epithelien, die als Barriere für Krankheitserreger dienen, zelluläre Bestandteile, die sowohl im Blut als auch im Gewebe agieren, und Plasmaproteine. Die Epithelien bedecken die inneren und äußeren Oberflächen des Körpers. Durch chemische, mechanische oder mikrobielle Eigenschaften bilden sie eine Schutzbarriere und stellen damit die erste Abwehrfunktion gegen eindringende Mikroorganismen dar.

Die zellulären Bestandteile der angeborenen Immunabwehr sind Makrophagen und neutrophile Granulozyten, die auch als Phagozyten zusammengefasst werden und für die Aufnahme und Abtötung der Erreger verantwortlich sind. Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) haben eine wichtige Rolle in der Abwehr von intrazellulären Erregern wie Viren. Daneben trägt auch das Komplementsystem zur Beseitigung von Krankheitserregern bei. So sind Komplementfaktoren an einer wirksamen Phagozytose und Lyse von Mikroorganismen beteiligt, aber spielen auch eine wichtige Rolle in der Antikörperproduktion nach Aktivierung des erworbenen Immunsystems. Die Abwehrstrategie des angeborenen Immunsystems unterscheidet sich vom erworbenen Immunsystem in sofern, dass es nicht die Erkennung von jedem möglichen Antigen als Ziel hat, sondern sich auf die Erkennung von wenigen, im höchsten Maße konservierte Strukturen spezialisiert hat, die in einer großen Gruppe von verschiedenen Mikroorganismen vorhanden sind. Diese Strukturen nennt man Pathogen-assoziierte molekulare *Patterns* (PAMP) und die entsprechenden Rezeptoren des angeborenen Immunsystems *Pattern-Recognition*-Rezeptoren (PRRs)/ Pathogen-Erkennungsrezeptoren. Rezeptoren des angeborenen Immunsystems sind in der genomischen DNA kodiert, wodurch die Spezifität jeder dieser Rezeptoren genetisch determiniert ist. Vorteil dieser Keimbahn-kodierten Rezeptoren ist, dass sie durch natürliche Selektion eine definierte Spezifität zur Abwehr von Mikroorganismen entwickelt haben. Pathogen-Erkennungsrezeptoren können Pathogene unabhängig ihres Lebenszyklus erkennen, sind auf allen Zellen exprimiert und unabhängig vom immunologischen Gedächtnis. Die einzelnen Pathogen-Erkennungsrezeptoren reagieren auf spezifische PAMP, aktivieren eine spezifische Signalweiterleitung und führen so zu einer Abwehrantwort. Die Basis des angeborenen Immunsystems ist ihre Konservierung von der Pflanze über die Fruchtfliege bis hin zu den Säugetieren.
Bekannte molekulare Pathogen-assoziierte *Patterns* sind bakterielle Lipopolysaccharide, Peptidoglykane, bakterielle DNA oder Doppelstrang RNA. Obwohl sich diese Strukturen chemisch sehr voneinander unterscheiden, haben die molekularen Pathogen-assoziierten Strukturen gemeinsame Eigenschaften. Pathogen-assoziierte Strukturen werden in der Regel von Mikroorganismen produziert und nicht vom Menschen bzw. Wirt. Zum Beispiel kommen Lipopolysaccharide (LPS) nur in Bakterien vor. Die von den Pathogen-Erkennungsrezeptoren erkannten Strukturen sind zudem meist essentiell für das Überleben der Mikrorganismen, d.h. sie ändern sich wenig in der Evolution. Weiterhin finden sich molekulare Pathogen-assoziierte *Patterns* gleichzeitig bei einer großen Anzahl verschiedener Mikroorganismen. LPS beispielsweise ist ein Hauptbestandteil der äußeren Zellwand der Gruppe der gramnegativen Bakterien. Der LPS-Rezeptor TLR4 kann somit Infektionen durch gramnegative Bakterien erkennen und die Immunantwort aktivieren.
Das erworbene Immunsystem ist erst in der späteren Phase der Immunabwehr an der Elimination von Pathogenen beteiligt. Es zeichnet sich durch seine Antigen-Spezifität aus, die durch klonale Selektion aus einem immensen Angebot von Lymphozyten mit verschiedenen Antigen-spezifischen Rezeptoren gebildet wird. Diese Antigen-spezifischen Rezeptoren werden durch Gen-Rearrangement gebildet,

so dass jeder Lymphozyt mit einem strukturell einzigartigen Rezeptor ausgestattet ist. Diese Rezeptoren werden nicht vererbt und müssen daher von jedem Individuum neu gebildet werden. Nach Antigenkontakt kommt es zur Proliferation der einzelnen Lymphozytenklone und schließlich zur Aktivierung von Antikörper-produzierenden B-Zellen. Ein Teil der proliferierenden Lymphozyten differenzieren zu Gedächtniszellen und bilden so ein immunologisches Gedächtnis aus, um einen verstärkten Schutz gegen eine erneute Infektion zu gewährleisten.

Tabelle 1.1: Allgemeine Unterschiede zwischen angeborenem und erworbenen Immunsystem, modifiziert nach Janeway et al. [59].

	Angeboren	**Erworben**
Rezeptoren:	im Genom kodiert	kodiert in Genabschnitten
	Rearrangement nicht notwendig	notwendig
Distribution:	nicht-klonal	klonal
	alle Zellen einer Klasse identisch	verschieden
Erkennung:	konservierte molekulare Patterns	Struktureinheiten
	(z.B. LPS)	(Proteine, Peptide, KH)
Fremd-Eigen-		
Unterscheidung:	ausgereift:	nicht ausgereift:
	Selektion während Evolution	Selektion in Somazellen
Reaktionszeit:	sofort	verzögert
Immunanwort:	kostimulatorische Moleküle	klonale Expansion
	Zytokine: IL-6, IL-1β	IL-2
	Chemokine: IL-8	Effektor-Zytokine: IL-4, IFN-γ

1.4.2 Pathogen-Erkennungsrezeptoren und ihre Liganden

Das angeborene Immunsystem bedient sich einer Reihe von Pathogen-Erkennungsrezeptoren, die auch *Pattern-Recognition*-Rezeptoren (PRR) genannt werden und auf der Zelloberfläche, in intrazellulären Kompartments oder im Zytosol exprimiert sind. Die bisher am besten untersuchten Pathogen-Erkennungsrezeptoren sind die sogenannten Toll-like Rezeptoren (TLR). TLR findet man als evolutionär konservierte Rezeptoren vom Wurm Caenorhabditis elegans bis hin zu den Säugetieren [60][61][59]. Das Protein Toll, Namensgeber der TLR, wurde erstmals 1985 in der Arbeitsgruppe von Christiane Nüsslein-Volhard als ein Genprodukt, das für Entwicklung der dorso-ventralen Achse in Drosophila-Embryos von Bedeutung ist, entdeckt [62][63]. Das Toll-Gen kodiert ein Transmembran-Protein, das Leucinreiche Wiederholungen enthält [64]. Nach Endeckung des humanen IL-1 Rezeptors (IL-1R) stellte sich heraus, dass sowohl Toll als auch IL-1R über die gleiche zytoplasmatische Toll/Interleukin-1 Rezeptor (TIR)-Domäne verfügen [65]. Außerdem konnten beide Rezeptoren

Transkriptionsfaktoren der NF-κB (nuclear factor–κB)-Familie aktivieren, welche eine wichtige Rolle bei der Induktion der Immunantwort bei Säugetieren spielt. Des Weiteren konnte bei der adulten Fliege nachgewiesen werden, dass Toll eine wesentliche Bedeutung bei der Abwehr von Pilzinfektionen hat [66].
Die Entdeckung der Toll-like Rezeptoren (TLR) in Säugern als homologes Protein des Toll-Rezeptors der Taufliege offenbarte neue Perspektiven für das Verständnis der Immunreaktion und Infektabwehr. So gelang es erstmals Ruslan Medzhitov 1997 in der Arbeitsgruppe von Charles A. Janeway Jr. das menschliche Homolog des Toll-Rezeptors (hToll, jetzt TLR4) nachzuweisen [67]. Bis heute sind 10 Toll-like Rezeptoren beim Menschen (TLR1-10) und 12 in Mäusen (TLR1-9, TLR11-13) identifiziert worden. Toll-like Rezeptoren sind integrale Typ I-Membran-Glykoproteine, deren extrazelluläre hufeisenförmige Domäne verschiedene Leucin-reiche Motive enthält [68]. Die intrazelluläre Domäne ist homolog zu der des IL-1 Rezeptors und wird daher als Toll/IL-1R (TIR)-Domäne bezeichnet [69]. Mikrobielle Pathogene werden von TLR über bestimmte Mustererkennungsmoleküle erkannt (siehe Tabelle 1.2). Im Zuge der Erforschung der Toll-like Rezeptoren wurde die Aufmerksamkeit auch vermehrt auf die TLR-unabhängigen Abwehrmechanismen des angeborenen Immunsystems gelenkt. So wurde durch die Entdeckung der NOD (nukleotide-binding oligomerization domain)-like Rezeptoren (NLR) sowie der RIG (retinoic-acid-inducible protein)-like Rezeptoren (RLR) neue Grundsteine für das Verständnis der Immunabwehr in den einzelnen Zellkompartments gelegt. Während die Toll-like Rezeptoren auf der Zellmembran oder endosomalen Membran lokalisiert sind, befinden sich die NLR und RLR im Zytosol der Zelle und können so verschiedene Pathogen-assoziierte Moleküle unterscheiden.

TLR1 TLR1 bildet zusammen mit TLR2 ein Heterodimer, welches Triacyllipopeptide erkennt. Diese Coexpression von TLR1 und 2 wurde erstmals von Wyllie et al. [70] in HeLa-Zellen beschrieben, welche erst durch Expression beider TLR auf lösliche Strukturen von Neisseria meningitides reagierten. Studien mit Tlr1-Knockout-Mäusen konnten die Erkennung von Triacyllipopeptiden und Lipoproteinen von Mykobakterien sowie von Borrelia Burgdorferi nachweisen [71][72]. Tlr1-defiziente Makrophagen wiesen dagegen eine normale Immunanwort nach Stimulation mit Diacyllipoproteinen auf, so dass TLR1 eine wesentliche Rolle bei der Unterscheidung von Diacyl- und Triacyllipoproteine spielt. Diacyllipoproteine werden von dem strukturell ähnlichen Heterodimer TLR2 und 6 erkannt (siehe unten).

TLR2 TLR2 kann verschiedene Pathogene erkennen: Lipoproteine von gram-negativen Bakterien, Mycoplasmen, Treponema pallidum und Borrelia Burgdorferi, Peptidoglykane wie Lipoteichonsäure von gram-positiven Bakterien, Lipoarabinmannan von Mykobakterien, Glycosylphosphatidylinositol von Trypanosoma cruzi [73], Phenol-lösliches Modulin von Staphylococcus epidermis [74], Zymosan von Pilzen, Glykolipide von Treponema maltophilum [75][76]. Diese große Breite und Vielfalt der Pathogen-Erkennung wird derzeit durch die Möglichkeit

von TLR2 erklärt, Herterodimere mit TLR1 oder TLR6 zu bilden. So werden Diacyllipoproteine aus Mykoplasmen, Lipoteichonsäure (LTA) aus Streptokokken der Gruppe B und Zymosan von dem Heterodimer TLR2/6 erkannt [77], während das TLR1/2-Heterodimer auf Triacyllipoproteine aus Mykobakterien reagiert [78].

TLR3 Lena Alexopoulou konnte 2001 in der Arbeitsgruppe von Richard Flavell nachweisen, dass Doppelstrang-RNA (dsRNA) Ligand von Toll-like Rezeptor 3 ist [79]. DsRNA wird während der Replikation und Vermehrung von Viren gebildet und spielt so eine wichtige Rolle bei der Erkennung von Virusinfektionen. So ergaben Studien mit Tlr3-Knockout-Mäusen, dass diese gegenüber Infektionen mit West Nile Virus, LCMV (lymphocytic choriomeningitis virus), VSV (vesicular stomatitis virus), MCMV (murine cytomegalie virus) und Reovirus im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle empfindlicher reagieren [80][81]. Ein synthetisches Analogon für dsRNA stellt die Polyriboinosin-Polyribocytidyl-Säure, verkürzt poly(I:C) dar, das wie virale dsRNA TLR3 aktiviert und zu einer Induktion von Typ I-Interferonen führt. Trotz der bisher publizierten Daten zu TLR3 bleibt unklar welche Rolle TLR3 bei der Erkennung und Abwehr von Viren spielt. So gibt es auch Rezeptoren, welche im Zytosol lokalisiert sind und TLR-unabhängig dsRNA und damit Viren erkennen können (siehe RNA-Helikasen).

TLR4 Durch Versuche mit Tlr4-Knockout-Mäusen konnte gezeigt werden, dass TLR4 eine essentielle Rolle für die Signalweiterleitung von Lipopolysacchariden (LPS), welche in den Zellwänden von gramnegativen Bakterien vorkommen, spielt [82]. Für die Erkennung von LPS sind noch das LPS-binding Protein (LBP), CD14 und MD-2 notwendig [83]. So bindet LPS zuerst an das LPS-binding Protein, welches wiederum mit CD14, einem GPI-Anker-Molekül assoziiert ist. LPS ist ein äußerst potentes Immunstimulanz, welches bei entsprechender Exposition bis zum Schock führen kann. Weitere Liganden von TLR4 sind Taxol, das aus der Eibenrinde gewonnen und klinisch gegen Tumoren eingesetzt wird [84], das Fusionsprotein des Respiratory Syncytial Virus (RSV) [85] und das *Envelope*-Glykoprotein des Mouse Mammary tumor Virus (MMTV) [86]. Mehrere sogenannte endogene Liganden wie *Heat-Shock*- Proteine wurden ebenfalls als Liganden von TLR4 beschrieben (siehe unten).

TLR5 TLR5 erkennt Flagellin, ein monomerer Bestandteil von Flagellen auf Bakterien [87]. Zudem konnte gezeigt werden, dass Flagellin Lungenepithelzellen aktiviert [88] und so die These untersützt, dass TLR5 eine bedeutende Rolle bei der Immunabwehr in Mucosazellen spielt. Im Darm ist TLR5 vor allem auf intestinalen CD11c-positiven Lamina propria-Zellen exprimiert. Diese Zellen erkennen pathogene Bakterien, die nicht der normalen Darmflora entsprechen. In Tlr5-Knockout-Mäusen konnte der verminderte Transport von Salmonella typhimurium vom Intestinum zu mesenterischen Lymphknoten nachgewiesen werden [89]. Zudem scheint TLR5 auch bei der Immunabwehr im Harntrakt eine wesentliche Bedeutung zu haben, da Tlr5-defiziente Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Tieren anfälliger gegenüber

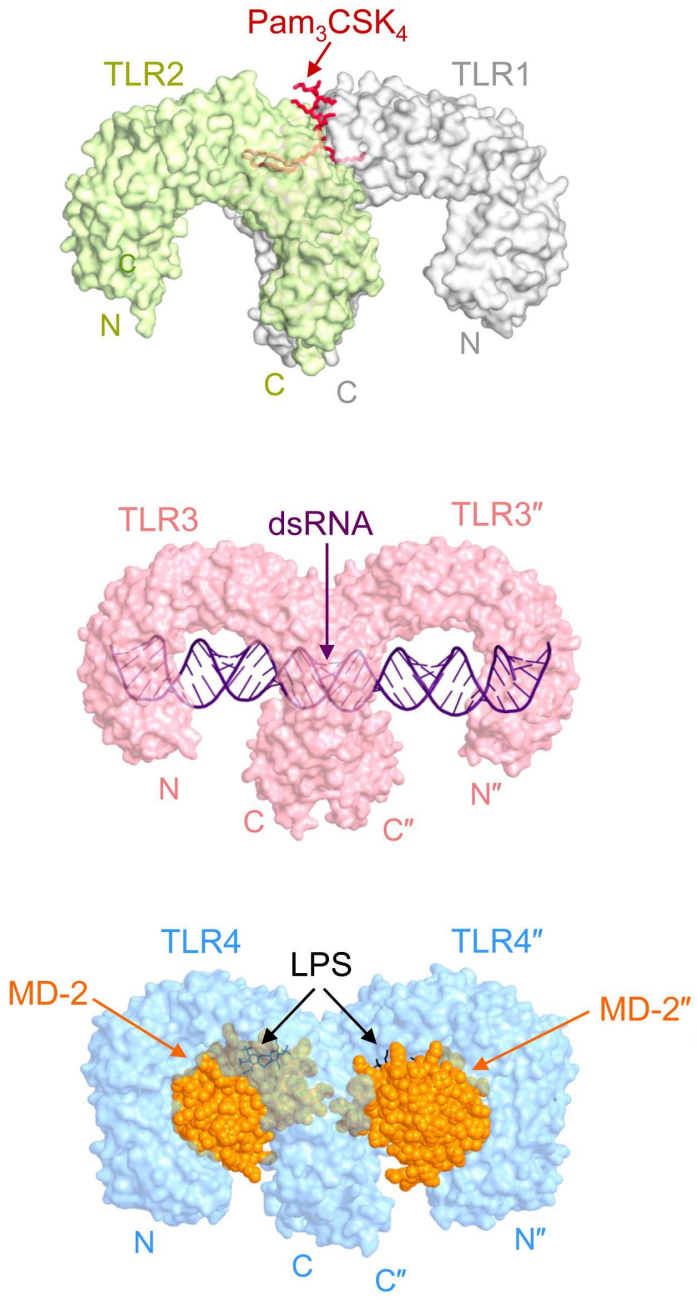

Abbildung 1.10: Struktur der Toll-like Rezeptoren 2, 3 und 4 und ihre Interaktion mit Liganden: Pam3CSK4 ist ein synthetisches tripalmityliertes Lipopeptid, das das azetylierte Aminoterminus bakterieller Lipopeptide imitiert. Es bindet an das Heterodimer TLR2/1. Virale Doppelstrang-RNA (dsRNA) bindet an TLR3 und Lipopolysaccharide gramnegativer Bakterien binden an TLR4 und MD2 [68].

transurethralen Escherichia coli-Infektionen sind [90].

TLR6 Wie TLR1 bildet auch TLR6 ein Heterodimer mit TLR2, so dass TLR6 für die Erkennung und Unterscheidung von TLR2-Liganden von Bedeutung ist [91]. So zeigten Tlr6-Knockout-Mäuse keine Immunantwort nach Gabe von Diacyllipoproteinen aus Mykoplasmen, während durch Gabe von Triacyllipoproteinen aus gramnegativen Bakterien eine dem Wildtyp entsprechende Immunantwort ausgelöst wurde [77].

TLR7 Imidazoquinoline wie Imiqumod und R-848 sind *low-molecular-weight* Moleküle, welche eine Immunantwort durch IFN-α-Synthese und Ausschüttung anderer Zytokine in verschiedenen Zellenarten hervorrufen können. Hemmi et al. konnten 2001 nachweisen, dass Imidazoquinoline Liganden für TLR7 sind, da weder Tlr7- noch Myd88-Knockout-Mäuse eine Immunantwort nach Gabe von Imidazoquinolinen zeigten [92]. Anschließende Studien ergaben, dass TLR7 Einzelstrang-RNA (ssRNA) erkennt, welche aus verschiedenen Viren wie HIV (human immunodeficiency virus), VSV (vesicular stomatitis virus) und Influenza-Virus stammt [93][94][95]. SsRNA kann auch vom Menschen selbst gebildet werden. Die Unterscheidung zwischen viraler und eigener ssRNA wird durch die Lokalisation von TLR7 erklärt. So liegen TLR7 wie auch TLR9 in der endosomalen Membran, wo eigene ssRNA unter normalen Bedingungen nicht hingelangt.

TLR9 TLR9 erkennt wie TLR3 und TLR7 Nukleinsäuren. Während TLR3 und 7 durch RNA aktiviert wird, kann TLR9 DNA aus Viren und Bakterien detektieren und eine Signalkaskade zur Abwehr initiieren. Für die Erkennung der DNA sind sogenannte CpG-Motive von Bedeutung [96]. Zwei verschiedene Motive wurden bis heute als Liganden für TLR9 identifiziert: CpG-A und CpG-B. Das zuerst endeckte konventionelle CpG-B-Motiv ist ein potentes Immunstimulanz für die Induktion von IL-12 und TNF-α, während CpG-A eine vermehrte IFN-α-Freisetzung und weniger eine IL-12-Ausschüttung von pDCs (plasmacytoid dendritic cells) zur Folge hat [97]. TLR9 ist wie TLR7 im endosomalen Kompartment der Zelle lokalisiert.

TLR11 Der murine Toll-like Rezeptor 11 ist im Blasenepithel exprimiert und reguliert die Immunabwehr gegen pathogene Bakterien im Harntrakt [98]. Des weiteren konnte Profilin, das aus Toxoplasma gondii gewonnen wurde, als Ligand für TLR11 identifiziert werden [99].

RNA-Helikasen Kato et al. konnte 2005 zeigen, dass Viren auch TLR-unabhängig das Immunsystem aktivieren kann. So werden die RNA-Helicasen RIG-I und MDA-5 durch virale RNA aktiviert, das über eine Signalkaskade eine NF-κB-Aktivierung zur Folge hat. Während TLR virale RNA im endosomalen Kompartment der Zelle erkennen, sind die Helikasen im Zytosol lokalisiert und detektieren dort eine Virus-Infektion [112]. Studien mit RIG-I-Knockout-Mäusen zeigten eine verminderte Interferon-Antwort nach Infektion mit *Newcastle Disease* Virus, *Vesicular*

Tabelle 1.2: Pathogen-Erkennungsrezeptoren (PRR) und ihre Liganden: Pathogen-Erkennungsrezeptoren erkennen spezifische Pathogen-assoziierte molekulare Strukturen (PAMP).

PRR	Ligand/PAMP	Herkunft	Referenz
TLR1	Triacyl Lipopeptide	(Myko)Bakterien	[71]
TLR2	Peptidoglycane,	gram-pos. Bakterien	[100][76][101]
	Lipoteichonsäure(LTA),	gram-pos. Bakterien	
	Lipoarabinomannan,	Mykobakterien	[102]
	GPI-Anker-Proteine,	Trypanosoma	
	Phenol-lösliches Modulin,	Staphylococcus epidermis	
	Zymosan,	Saccharomyces	[91]
	Glycolipide	Treponema maltophilum	
TLR3	dsRNA	Viren	[79]
TLR4	LPS	gram-neg. Bakterien	[82]
	Taxol	Eibenrinde	[84]
	RSV Fusionsprotein	RSV	[85]
	MMTV envelope protein		[86]
TLR5	Flagellin	Bakterien	[87]
TLR6	Diacyllipopeptide	Mykoplasmen	[77]
TLR7,8	ssRNA,	Viren	[92]
	Imidazoquinoline	Viren	
TLR9	CpG DNA		[96]
TLR11	Profilin		[99]
RIG-I	3P-RNA	Viren	[103]
MDA-5	dsRNA	Viren	[104]
NOD1,2	Peptidoglykane	Bakterien	[105][106]
IPAF,NAIP5	Flagellin	Bakterien	[107][108]
NALP3	RNA,	Bakterien	[109]
	ATP,		[110]
	Harnsäurekristalle		[111]

TLR8 ist nur beim Menschen kodiert. Liganden für TLR10, 12 und 13 sind bislang noch nicht identifiziert worden. Bisher bekannte RIG-like Rezeptoren sind RIG-I und MDA-5. Die wichtigsten NOD-like Rezeptoren sind NOD1 und 2, IPAF, NAIP5 und NALP3.

Stomatitis Virus, Influenza-Virus, Sendai-Virus sowie dem japanischen Enzephalitis Virus. MDA-5-Knockout-Mäuse wiesen eine verminderte Immunantwort gegen Picorna-Viren wie dem Enzephalomyokarditis-Virus, Theiler's Virus und Mengo-Virus auf [113]. Hornung und Pilchelmair konnten schließlich 2006 5'-Triphosphat-RNA als spezifischen Liganden für RIG-I identifizieren [103][114]. Für MDA-5 konnte bisher nur die synthetische dsRNA Poly(I:C) als Ligand nachgewiesen werden [113].

NOD-like Rezeptoren NOD-like Rezeptoren (NLR) sind wie die RNA-Helicasen im Zytosol lokalisiert. Bislang sind 20 Rezeptoren dieser Familie bekannt, von denen

die bekanntesten NOD1, NOD2, IPAF, NAIP5 und NALP3 sind. NOD1 und NOD2 erkennen wie TLR2 Peptidoglykane [105][106], während IPAF und NAIP5 durch Flagellin aus Salmonella typhimurium (IPAF) und Legionella pneumophila (NAIP5) aktiviert werden [108][107]. Nalp3 ist essentiell für die Erkennung bakterieller RNA [109], ATP [110] und von Harnsäurekristallen [111].

1.4.3 Signaltransduktion der Pathogen-Erkennungsrezeptoren

TLR-abhängige Signaltransduktion Mit Ausnahme von TLR3 bedienen sich alle Toll-like Rezeptoren des *Myeloid Differentiation* Faktors 88 (MyD88) als Adaptermolekül zur Signalweiterleitung. So führt eine Aktivierung der Toll-like Rezeptoren über MyD88, IRAK-4 (IL-1R-assoziierte Kinase 4), IRAK-1 (IL-1R-assoziierte Kinase 1), TRAF6 (TNFR-assoziierten Faktor 6) zu einer Aktivierung des IKK-Komplexes (inhibitor of kappa B kinase) mit subsequenter Degradation von Iκ-B. Dies hat schließlich eine Translokation des Transkriptionsfaktors NF-κB in den Zellkern und die Produktion inflammatorischer Zytokine zur Folge. Darüber hinaus scheint das Adapterprotein TIRAP (TIR-domain adaptor protein) zusammen mit MyD88 eine wesentliche Bedeutung in der Signalweiterleitung von TLR2 und 4 zu haben [115]. Einzigartig in pDCs führt die Aktivierung von TLR7 und 9 über eine Interaktion mit IRF7 zu einer Induktion von IFN-α/β [116]. Kawai et al. konnte schon 1999 zeigen, dass es noch einen MyD88-unabhängigen Transduktionsweg gibt. So führte eine Stimulation von TLR4 in MyD88-defizienten Makrophagen immer noch zu einer, wenn auch verspäteten Aktivierung von NF-κB [117]. Etwas später konnte schließlich das Adapterprotein TRIF (TIR domain-containing adaptor inducing IFN-β) identifiziert werden [118]. TRIF leitet die Aktivierung von TLR3 und 4 weiter und führt über zwei verschiedene Signalwege zu einer Translokation der Transkriptionsfaktoren NF-κB- und IRF3. Die Aktivierung von IRF3 hat die Induktion von IFN-β zur Folge. TRIF ist somit einziges Adaptermolekül für Toll-like Rezeptor 3, während sich TLR4 beider Adapterproteine bedient (siehe Abbildung 1.11).

TLR-unabhängige Signaltransduktion Nach Aktivierung der RNA-Helikasen werden die Signale über IPS-1 (in der Literatur auch als Cardif, MAVS und VISA beschrieben) weitergeleitet [120]. IPS-1 ist durch seine spezielle Struktur in der Mitochondrien-Membran verankert und führt über zwei verschiedene Signalwege zu einer Translokation von NF-κB und Transkription von inflammatorischen Zytokinen und über die Aktivierung von IRF3 und 7 zu einer IFN-α/β-Ausschüttung (siehe Abbildung 1.12).
Auch die NOD-like Rezeptoren haben unterschiedliche Signalwege. So führt die Stimulation von NOD 1 und 2 zu einer Translokation von NF-κB, während die Aktivierung von NAIP5, IPAF und NALP3 eine Induktion der Zytokine IL-1β und IL-18 zur Folge hat [106][111].

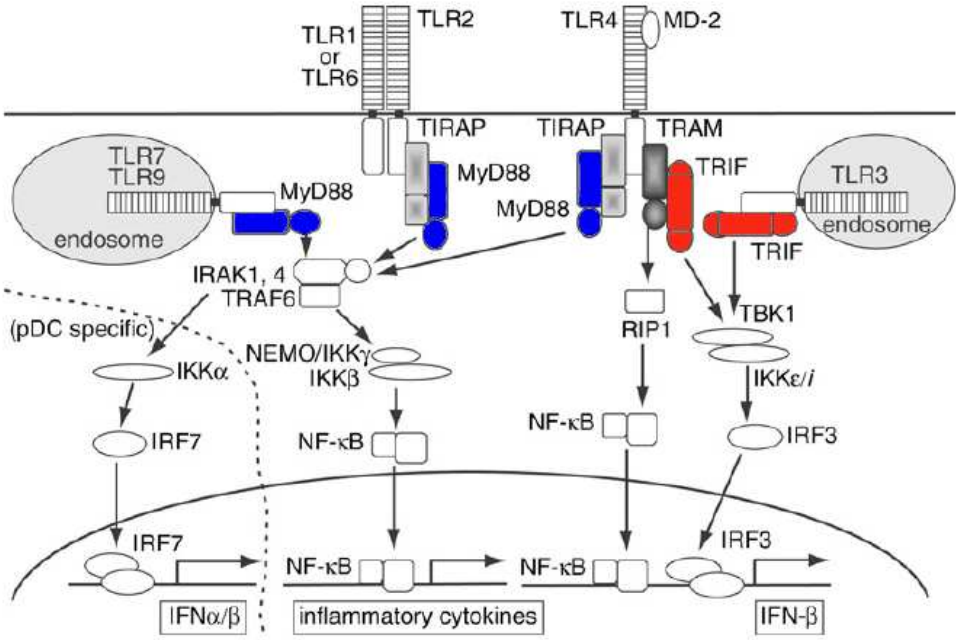

Abbildung 1.11: Signaltransduktion der Toll-like-Rezeptoren: Die Singalweiterleitung erfolgt über die zwei Adapterproteine MyD88 und TRIF. MyD88 vermittelt die Translokation von NF-κB durch Aktivierung aller TLR mit Ausnahme von TLR3. TLR3 und 4 führen über TRIF zu einer Translokation von NF-κB und IRF3. Einzig in pDCs führt die Stimulation von TLR7 und 9 zu einer Aktivierung von IRF7 (interferon regulatory factor 7) und damit zur Produktion von IFN-α/β [119].

1.4.4 Endogene Liganden

Wie beschrieben sind Toll-like Rezeptoren essentiell für die Erkennung von Pathogen-assoziierten molekularen Patterns (PAMP) und die darauf erfolgende Aktivierung des (erworbenen) Immunsystems. Eine weitere wichtige Rolle scheinen die TLR bei der Erkennung von sogenannten endogenen Liganden zu spielen. Diese endogenen Liganden stammen vom Wirt selbst, es handelt sich also um eine „sterile Infektion“. Die bisher in der Literatur beschriebenen endogenen Liganden stammen meist aus toten bzw. sterbenden Zellen und entzündetem Gewebe. Daher werden diese Liganden auch als *Danger/Damage-associated Molecular Patterns* (DAMP) bezeichnet. Polly Matzinger postulierte schon 1994, dass das Immunsystem neben Infektionen auch auf nicht-physiologischen Zelltod, Gewebeschaden oder Stress reagiert und stellte damit die so genannte „Danger Hypothese“ auf (siehe Abbildung 1.13)[122][121].

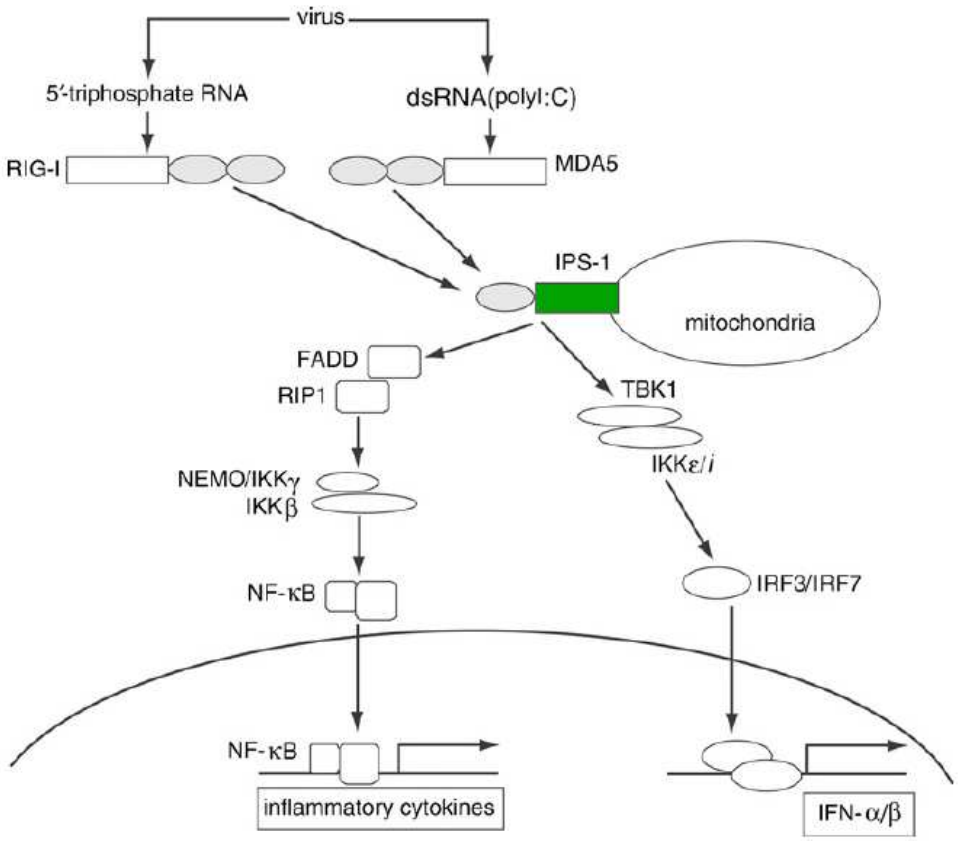

Abbildung 1.12: Signaltransduktion der RNA-Helikasen: Bei einer Virus-Infektion treten während der viralen Replikation Doppelstrang-Ribonukleinsäuren auf. Diese können von den RNA-Helikasen RIG-I und MDA-5 erkannt werden und lösen über IPS-1, das in der Mitochondrien-Membran verankert ist, eine Signalkaskade aus, die letzlich zu einer Induktion von IFN-α/β und anderen Zytokinen führt [119].

Demnach ist ein abnormer Zelltod, der entweder durch eine Infektion oder durch andere pathologische Prozesse wie Tumorwachstum ausgelöst werden kann, eine potentielle Bedrohung für den Organismus. Spätere Studien konnten diese These schließlich unterstützen. So konnte Gallucci in der Arbeitsgruppe von Matzinger eine Aktivierung von Dendritischen Zellen nach Stimulation mit nekrotischem Zellmaterial nachweisen [123]. Ebenso zeigte Shi et al., dass Zellschaden oder -tod eine Stimulation von zytotoxischen T-Lymphozyten bewirkt und damit ein potentes Adjuvans des Immunsystems darzustellen scheint [124]. Das Immunsystem kann somit sowohl durch infektiöse wie auch durch nicht-infektiöse Stimuli aktiviert werden: einerseits durch die schon beschriebenen PAMP aus Mikroorganismen und andererseits durch DAMP aus geschädigten Zellen oder Gewebe. In der Tabelle 1.3 sind die in dieser Arbeit relevanten *Danger-associated Molecular Patterns* aufgeführt.
Die meisten endogenen Liganden wurden bisher für TLR2 und 4 beschrieben. Hyaluronsäure und Heparansulfat sind degradierte Moleküle aus der extrazellulären

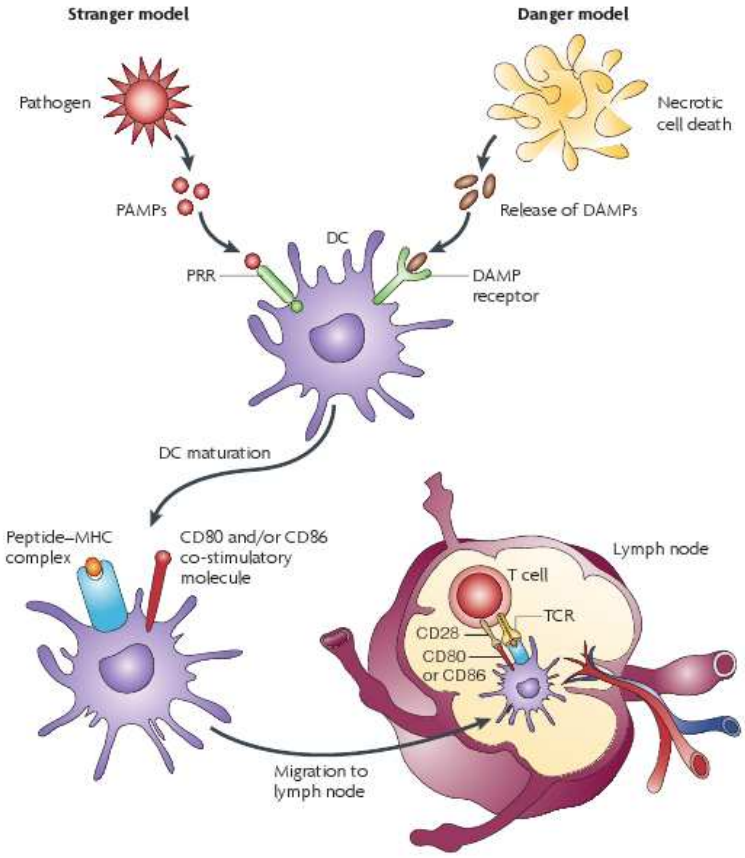

Abbildung 1.13: Das „Danger-Modell“ als Alternative zum „Stranger-Modell“: *Danger Associated Molecular Patterns* (DAMP) aus totem Zellmaterial können dendritische Zellen stimulieren, so dass diese in Lymphknoten wandern, ihre Antigene präsentieren und schließlich das erworbene Immunsystem aktivieren [121].

Matrix und können bei allgemeinen Entzündungen oder Arthritis auftreten. Das *High-mobility Group Box* 1-Protein (HMGB1) wird von nekrotischen Zellen ausgeschüttet und aktiviert neben TLR2 und 4 auch den Rezeptor RAGE (receptor for advanced glycation end-products). Ebenso werden die Moleküle Fibronektin, Fibrinogen und *Heat Shock* Proteine (HSP) aus toten oder sterbenden Zellen freigesetzt. Einige dieser Moleküle treten vermehrt in Gelenken von Patienten mit rheumatoider Arthritis auf, was auf eine Beteiligung endogener Liganden bei der Entstehung dieser Krankheit hindeutet. Karikó et al. konnten RNA aus nekrotischen Zellen sowie mRNA als endogene Liganden für TLR3 nachweisen [125]. Ebenso konnten Brentano et al. eine TLR3-abhängige Induktion von Zytokinen durch RNA aus nekrotischem Zellmaterial zeigen. So führte die Koinkubation von RASFs (rheumatoid arthritis synovial fibroblast) mit nekrotischen Synoviazellen von Patienten mit Rheumatoider Arthritis zu einer Ausschüttung von IL-6 und IFN-β, welche durch zusätzliche Gabe von Benzonase (degradiert Nukleinsäuren) oder Hydroxychloroquin (verhindert die Bildung von Endosomen) verringert war [126]. TLR7 und 9 erkennen

nicht nur virale oder bakterielle Nukleinsäuren, sie können auch eigene DNA oder RNA detektieren und so eine Immunantwort auslösen. Dies hat bei der Entwicklung und Manifestation von Autoimmunerkrankungen wie dem Systemischen Lupus Erythematodes (SLE) eine zentrale Bedeutung. Versuche mit Knockout-Mäusen in einem SLE-Modell zeigten, dass TLR7-Defizienz eher zu einer Verbesserung von SLE, während ein Gen-Knockout von TLR9 zu einer Verschlechterung führte [127].

Tabelle 1.3: Exemplarische Übersicht der endogenen Liganden bzw. sogenannter *Damage/Danger Associated Molecular Patterns* (DAMP)

TLR	Ligand/DAMP	Herkunft	Referenz
TLR2		Nekrotische Zellen	[128][129]
TLR2/4		renale Ischemie/Reperfusion	[130][131]
	HSP60/70	Zellschaden	[132]
	HMGB1	Nekrotische Zellen	[133]
	Hyaluronsäure	Zell-/Gewebeschaden	[134][135]
TLR4	Fibronektin	Zell-/Gewebeschaden	[136]
	Heparansulfat	Zell-/Gewebeschaden	[137]
	Fibrinogen	Zell-/Gewebeschaden	[138]
TLR3	dsRNA	Nekrotische Zellen	[125][126]
TLR7	ssRNA/Immunkomplexe	apoptotische/nekrotische Zellen	[139][140][141]
TLR9	DNA/Immunkomplexe	apoptotische/nekrotische Zellen	[142][143]

1.4.5 Toll-like Rezeptoren und Nierenerkrankungen

Es ist bekannt, dass Infektionen und Störungen des Immunsystems bei einer Reihe von Nierenerkrankungen eine wesentliche Rolle spielen. Mit der Endeckung der Toll-like Rezeptoren und ihrer Liganden ergaben sich neue Konzepte zur Interpretation und Analyse sowohl immunologisch als auch nicht-immunologisch bedingter Nierenerkrankungen. Trotz vermehrter Erforschung des angeborenen Immunsystems im Bereich der Nephrologie sind viele Fragen zu den molekularen Mechanismen der Pathogenerkennung in der Niere und der immunvermittelten Schädigung der Niere noch unbeantwortet. Des Weiteren ist das Zusammenspiel von Immun- und nicht-Immunzellen in der Niere und deren Rolle bei Nierenerkrankungen von großem Interesse. Die bisherigen Daten in der Literatur unterstützen gleichzeitig den hohen Stellenwert des angeborenen Immunsystems bei Nierenerkrankungen.
Im Rahmen bakterieller Infektionen können Zellwandbestandteile der Bakterien in den Blutkreislauf freigesetzt werden. Lipopolysacharide der bakteriellen Zellwand können über die Aktivierung von Toll-like Rezeptor 4 und MyD88 zu einer systemischen Ausschüttung von Zytokinen führen, die wiederum ein akutes Nierenversagen und sogar einen septischen Schock auslösen können [144].
Des Weiteren kann ein akutes Nierenversagen durch Ischämie oder nephrotoxische Substanzen ausgelöst werden. Dies führt in der Regel zu einer Schädigung

der Tubuluszellen. Nekrotische Tubuluszellen können dann potentielle endogene TLR-Liganden freisetzen und so das angeborene Immunsystem in der Niere aktivieren. Vor allem TLR2 und TLR4 scheinen eine wesentliche Rolle bei oxidativen Stress zu spielen [145]. Man geht davon aus, dass hier endogene Liganden im Sinne einer „sterilen Entzündung“ während der Ischämie gebildet bzw. freigesetzt werden und durch Aktivierung der Toll-like Rezeptoren zu einer Nierenschädigung beitragen [130]. Weiterhin führt die systemische Gabe von TLR2-Liganden im Modell der nephrotoxischen Serumnephritis zu einer Aggravation der Glomerulonephritis und einer verstärkten Produktion von Antikörpern und spezifischen T-zellen gegen glomeruläre Antigene [146].
Bei Harnwegsinfektionen scheint die Erkennung von E.coli über TLR4 von Bedeutung zu sein. So konnte gezeigt werden, dass in TLR4-defizienten renalen Zellen die Abwehr gegen uropathogene E.coli-Bakterien beeinträchtigt ist [147].
Bakterien und Viren können DNA-Moleküle freisetzen. Extrazelluläre DNA-Partikel werden meist durch DNasen abbgebaut. Intrazellulär gibt es mehrere Rezeptoren, die DNA erkennen. Diese Rezeptoren befinden sich entweder im Zytosol oder wie TLR9 im Endosom. Systemische Virusinfektionen können mit einer Nierenbeteiligung einhergehen. Häufige DNA-Viren, die mit einer Nierenschädigung assoziiert sind, sind beispielsweise Herpes-Viren, Ebstein-Barr-Virus, Adenoviren oder Polyomaviren. Experimentell führte die systemische Gabe von CpG-DNA (TLR9-Ligand) zu einem deutlich früheren Ausbruch der Lupusnephritis im Mausmodell der Lupusnephritis mit $MRL^{lpr/lpr}$-Mäusen sowie zu einer Aggravation einer schon bestehenden Glomerulonephritis [148].
Bei der transplantierten Niere können Infektionen mit CMV oder Polyomavirus vom BK-Typ eine Transplantatdysfunktion oder Abstoßungsreaktion hervorrufen. Bisher konnte TLR9 auf dendritischen Zellen als ein Rezeptor für CMV identifiziert werden [149]. Die Relevanz von TLR9 in renalen dendritischen Zellen bei der Abwehr von Viren ist bislang allerdings noch ungeklärt. Erwähnenswert ist, dass auf intrinsischen renalen Zellen wie Mesangial- oder Tubuluszellen die Toll-like Rezeptoren 7 und 9 im Gegensatz zu Immunzellen nicht exprimiert werden. Dies muss bei der Interpretation von *in vivo*-Experimenten mit entsprechenden Knockout-Mäusen berücksichtigt werden.
Neben DNA können auch RNA-Moleküle von Viren insbesondere bei deren Replikation freigesetzt werden. Ein für die Niere relevantes RNA-Virus ist das Hepatitis C-Virus, das sich im Mesangium der Glomeruli anreichert und oft mit einer Glomerulonephritis assoziiert ist. Wörnle et al. konnten zeigen, dass TLR3-mRNA bei einer Hepatitis C-assoziierten Glomerulonephritis hochreguliert wird. Weiterhin konnte eine vermehrte Expression von TLR3 auf glomerulären Mesangialzellen nach Stimulation mit den proinflammatorischen Zytokinen INF-γ und TNF-α nachgewiesen werden. Die systemische Gabe des synthetischen TLR3-Liganden Poly(I:C) führte zu einer Anreicherung der dsRNA in den Endosomen der Mesangialzellen sowie zu einer vermehrten Expression von IL-1, IL-6, IL-8 und MCP-1. Diese Daten lassen somit eine TLR3-vermittelte Aktivierung lokaler und systemischer Immunmechanismen durch Mesangialzellen bei der Hepatitis-C-assoziierten Glomerulonephritis vermuten [150].

Diese Daten bilden derzeit die Grundlage für neue Konzepte in der nephrologischen Forschung. Wir wissen, dass die Rezeptoren des angeborenen Immunsystems durch entsprechende Liganden-Interaktion Immunzellen aktivieren. Eine solche extrarenale Aktivierung des Immunsystems z.B. durch Infektionen kann eine Schädigung der Niere durch Zytokinfreisetzung oder Bildung von zirkulierenden Immunkomplexen verursachen. Bakterien oder Viren, die die Niere erreichen, aktivieren dabei sowohl intrarenale Immunzellen als auch intrinsische nicht-Immunzellen der Niere.

1.5 Fragestellung

Die Spezifität der wenigen Rezeptoren des angeborenen Immunsystems für universelle Pathogen-assoziierte Moleküle ist nicht absolut. Es ist bekannt, dass *Pattern-Recognition*-Rezeptoren auch durch „Selbst"-Moleküle aktiviert werden und entsprechend eine Abwehrsignalkaskade in Gang setzen. Die Rolle und Bedeutung dieser Rezeptoren bei der Aktivierung dieser nicht-infektiösen, „sterilen" Entzündungsmechanismen, insbesondere bei der Pathogenese der Glomerulonephritis sind Gegenstand vorliegender Arbeit.
Zu Beginn dieser Arbeit 2005 wurde insbesondere die Ligand-Rezeptor-Interaktion von Toll-like Rezeptor 3 kontrovers diskutiert. Die intrazelluläre Helikase MDA-5 war als weiterer Rezeptor für dsRNA und damit auch für Poly(I:C) noch unbekannt.
Die Daten von Karikó et al. zeigten, dass endogene mRNA sowie RNA aus nekrotischen Zellen zu einer TLR3-vermittelten Immunaktivierung führen [125]. Ebenso konnten Brentano et al. eine TLR3-abhängige Induktion von Zytokinen durch RNA aus nekrotischem Zellmaterial von Patienten mit Rheumatoider Arthritis nachweisen. Gleichzeitig ließen die Daten von Wörnle et al. einen hohen Stellenwert von Toll-like Rezeptor 3 bei der Aktivierung lokaler und sytemischer Immunmechanismen durch Mesangialzellen vermuten [150].
Eine genaue Analyse von möglichen endogenen Liganden, insbesondere von möglichen endogenen RNA-Molekülen und ihrer Interaktion mit Toll-like Rezeptoren auf Mesangialzellen sollte daher die Mechanismen der sterilen Entzündung in der Niere identifizieren. *In vivo* sollte die funktionelle Relevanz von Toll-like Rezeptoren im Modell der nephrotoxischen Serumnephritis (Antibasalmembran-Glomerulonephritis) überprüft werden.
Gegenstand dieser Arbeit war somit zunächst, primäre glomeruläre Mesangialzellen aus TLR-defizienten Mäusen zu gewinnen, um Toll-like Rezeptor-abhängige Effekte im Vergleich zu Wildtyp-Zellen zu untersuchen. Dabei sollten folgende Fragestellungen beantwortet werden:

1. Können in glomerulären Mesangialzellen durch Toll-like Rezeptor-Liganden entsprechend ihrem Expressionsprofil Immunmechanismen vergleichbar den Immunzellen ausgelöst werden?

2. Gibt es eine Toll-like Rezeptor-abhängige Aktivierung von Mesangialzellen durch endogene Liganden?

3. Wenn ja, spielen diese endogenen TLR-Liganden eine Rolle bei der Pathogenese der Glomerulonephritis *in vivo*?

Zur Beantwortung der letzten Frage wurde das Modell der nephrotoxischen Serumnephritis in TLR-defizienten Mäusen herangezogen. Um alle Toll-like Rezeptoren gleichzeitig untersuchen zu können, bedienten wir uns Trif- und Myd88-Knockout Mäusen. TRIF und MyD88 sind die Signaladapterproteine aller bisher gefundenen Toll-like Rezeptoren.
Wir gingen davon aus, dass die Unterbrechung der Signalweiterleitung TLR-vermittelter Aktivierung einen verzögerten Krankheitsverlauf der Glomerulonephritis zur Folge habe. Mögliche endogene Liganden - beispielsweise aus nekrotischem Zellmaterial- , die TLR-vermittelt zu einer Verschlechterung der Glomerulonephritis beitragen, hätten durch die Depletion der TLR-Adaptermoleküle nur eine abgeschwächte oder sogar keine Wirkung. Dies könnte letztendlich zu einer Verbesserung des Krankheitsbildes beitragen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Durchflußzytometer	
FACSCalibur	Becton Dickinson, San Jose, USA
ELISA-Reader	
Tecan, GENios Plus	Tecan, Crailsheim, D
ELISA-Wascher	
Microplate-Washer Elx50	Biotek, Bad Friedrichshall, D
Fluoreszenz-Mikroskop	
Leica DC 300F	Leica Mycrosystems, Cambridge, UK
Olympus BX50	Olympus Mikroskope, Hamburg, D
Spektrophotometer	
Beckman DU 530	Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA
TaqMan Sequence Detection System	
ABI Prism 7700 Sequence Detector	PE Biosystems, Weiterstadt, D
Zellinkubator	
Typ B5060 EC-CO2	Heraeus Sepatech, München, D
Zentrifugen	
Heraeus, Minifuge T	VWR International, Darmstadt, D
Heraeus, Biofuge primo	Kendro Laborprodukte GmbH, Hanau, D
Heraeus, Sepatech Biofuge A	Heraeus Sepatech, München, D
sonstige Geräte	
Kryostat RM2155	Leica Microsystems, Bernsheim, D
Homogenisator ULTRA-TURRAX T25	IKA GmbH, Staufen, D
MidiMACS	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
pH-Meter WTW	WTW GmbH, Weilheim, D
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg, D
Vortex Genie 2	Bender&Hobein AG, Zürich, Schweiz
Waage BP 110 S	Sartorius, Göttingen, D
Waage Mettler PJ 3000	Mettler-Toledo, Greifensee, Schweiz

2.1.2 Chemikalien, Puffer und Lösungen

Chemikalien

Äther	Merck, Darmstadt, D
Albustix Teststreifen	Bayer, D
Bovines Serum Albumin (BSA)	Roche, Mannheim, D
4'-6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI)	Vector lab., Burlingame, USA
DEPC	Fluka, Buchs, Schweiz
DNase Typ III	Sigma, Deisenhofen, D
DMSO	Merck, Darmstadt, D
EDTA	Calbiochem, SanDiego, USA
Einbettmedium	Jung, Leica Microsystems, Nussloch, D
Eosin	Sigma, Deisenhofen, D
Ethanol	Merck, Darmstadt, D
FACSFlow	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Formalin	Merck, Darmstadt, D
HCl (5N)	Merck, Darmstadt, D
Kollagenase Typ I	Sigma, Deisenhofen, D
β-Merkaptoethanol	Roth, Karlsruhe, D
Trypan Blau	Sigma, Deisenhofen, D

Puffer

FACS Lysing Solution	BD/Becton Dickinson, Heidelberg, D

MACS-Puffer:
2mM EDTA
0,5% BSA
pH 7,2

Tris-Ammoniumchlorid (TAC)-Puffer:
50ml Tris-Puffer
450ml 0,83% Ammoniumchlorid
pH 7.2

FACS-Puffer:
PBS
0,1% Na Azid
0,2% BSA

Paris-Puffer:
20 mM Tris-HCl
125 mM NaCl
10 mM KCl
10 mM Na-Acetat
5 mM Glukose
pH 7,4

10x HBSS ohne Ca, Mg:
für 1l:
4g KCl
0,6g KH2PO4
80g NaCl
0,621g Na2HPO4x2H2O

10x HBSS mit Ca, Mg:
für 1l zu HBSS(10x) ohne Ca, Mg:
3,5g NaHCO3
1,4g CaCl2
1g MgCl2x6H2O
1g MgSO4x7H2O
10g D-Glukose

Lösungen
Präimmunisierungs-Lösung:
0,1mg/ml Rabbit IgG gelöst in *Complete Freund's Adjuvans*

Kollagenase-Lösung/DNAse-Lösung:
1mg/ml Kollagenase, 0,1 mg/ml DNase in 1x HBSS ohne Ca,Mg

Nephrotoxisches Serum:
Hitzeinaktiviert und sterilfiltriert, eigene Herstellung durch V. Vielhauer

2.1.3 Materialien für die Zellkultur

DMEM-Medium	GIBCO/Invitrogen, Paisley, UK
RPMI-1640-Medium	GIBCO/Invitrogen, Paisley, UK
Opti-MEM-Medium	GIBCO/Invitrogen, Paisley, UK
Fötales Kälberserum (FCS)	Biochrom KG, Berlin, D
ITS, Insulin, Transferrin, Selenium	Roche, Mannheim, D
Dulbecco's PBS (1x)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
EDTA	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
Zellkulturschalen	
Preseperation Filter	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
LS-Säulen	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
Stahlsiebe	
Cell Strainer 70 μm Nylon	BD Biosciences, Erembodegem, Belgien
Kollagenase Typ IV	Worthington, Lakewood, NY

2.1.4 TLR-Liganden, Zytokine und Stimulanzien

Poly(I:C), dsRNA	Invivogen, Toulouse, FR
Pam3CysSK4	Invivogen, Toulouse, FR
Ultrapure lipopolysaccharide(LPS)	Invivogen, Toulouse, FR
Imiquimod	Sequoia Research Products Ltd, Oxford, UK
CpG-ODN 1668	TIB Molbiol, Berlin, D
IFN-γ	PeproTech, Rocky Hill, NJ
TNF-α	PeproTech, Rocky Hill, NJ
Polymyxin B	Invivogen, Toulouse, FR
Dexamethasone	Ratiopharm, D
Lipofectamin 2000 Reagent	Invitrogen, Paisley, UK
Complete Freund's Adjuvans	Sigma Aldrich, Steinheim, D
Rabbit IgG Chrome Pure	Jackson Immunoresearch, Suffolk, UK
Rat IgG Chrome Pure	Jackson Immunoresearch, Suffolk, UK
Sheep IgG Chrome Pure	Jackson Immunoresearch, Suffolk, UK
Hamster IgG Chrome Pure	Jackson Immunoresearch, Suffolk, UK

2.1.5 Reagenziensätze

ELISA-Kits	
Maus IL-6	BD/Becton Dickinson, Heidelberg, D
Maus IFN-γ	BD/Becton Dickinson, Heidelberg, D
Maus MIG/CxCl 9	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, D
Albumin	Bethyl Laboratories, Montgomery, USA
MACS-Zellanreicherung	
Annexin V MicroBead Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
Annexin V FACS Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
RNA Isolation	
RNeasy Mini Kit	Quiagen, Hilden, D
Zellproliferation	
Cell Titer 96 Proliferation Assay	Promega, Mannheim, D

2.1.6 Antikörper

(Immun-)Histologie	
Smooth Muscle Actin (SMA)	Chemicon International, Hampshire, UK
Zytokeratin 18	Chemicon International, Hampshire, UK
Phalloidin	Invitrogen, Karlsruhe, D
CD3	Serotec, Oxford, UK
IgG	Caltag Laboratories, Burlingame, USA
C3	Nordic Immunological Laboratories, Tilburg, NL
F4/80	Serotec, Oxford, UK
Mac2	Cederlane, Ontario, CAN
FACS	
CD4-APC	BD/Becton Dickinson, Heidelberg, D
CD8a-PE-Cy5	BD/Becton Dickinson, Heidelberg, D
CD3e-FITC	BD/Becton Dickinson, Heidelberg, D
CD45-PE	BD/Becton Dickinson, Heidelberg, D
CD69-PE	BD/Becton Dickinson, Heidelberg, D
F4/80-FITC	BD/Becton Dickinson, Heidelberg, D
ELISA	
IgG-FITC, *goat-anti-mouse*	Jackson Immunoresearch, Suffolk, UK

2.1.7 Primer für die *real-time* RT-PCR

Die Primer für die *real-time* RT-PCR wurden von der Firma ABI Biosystems, Weiterstadt in Deutschland bezogen. In Tabelle 2.1 sind die in dieser Arbeit verwendeten Primer aufgeführt. Als Referenzgene wurden 18-RNA und GAPDH herangezogen.

Referenzgen	Sequenz
mGAPDH	Forward: 5'-CATGGCCTTCCGTGTTCCTA-3'
	Reverse: 5'-ATGCCTGCTTCACCACCTTCT-3'
	FAM: 5'-CCCAATGTGTCCGTCGTGGATCTGA-3'
18s rRNA	Forward: 5'-GCAATTATTCCCCATGAACG-3'
	Reverse: 5'-AGGGCCTCACTAAACCATCC-3'

Tabelle 2.1: Verwendete *real-time* PCR-Primer für die Expressions-Analyse der Toll-like Rezeptoren und RIG-like Rezeptoren.

Gen	Accession code	Sequenz
TLR1	AF316985	Forward: 5'-GTCAAAGCTTGGAAAGAATCTGAAG-3'
		Reverse: 5'-AATGAAGGAATTCCACGTTGTTTC-3'
		FAM: 5'-ATCTTACCCTGAACAATG-3'
TLR2	AF124741	Forward: 5'-CACCGGTCAGAAAACAACTTACC-3'
		Reverse: 5'-CAAGATCCAGAAGAGCCAAAGAG-3'
		FAM: 5'-AGACAAAGCGTCAAATC-3'
TLR3	AF355152	Forward: 5'-CGAAAGTTGGACTTGTCATCAAATC-3'
		Reverse: 5'-ACTTGCCAATTGTCTGGAAACAC-3'
		FAM: 5'-CACTTAAAGAGTTCTCCC-3'
TLR4	AF110133	Forward: 5'-TTCAGAACTTCAGTGGCTGGATT-3'
		Reverse: 5'-CCATGCCTTGTCTTCAATTGTTT-3'
		FAM: 5'-ATCCAGGTGTGAAATT-3'
TLR5	AF186107	Forward: 5'-CCCAGCTTGGATGAAATATCTGTAA-3'
		Reverse: 5'-CCCAGTCTTTTCTTCTTGAACACTTA-3'
		FAM: 5'-CGGGCACCAGTACT-3'
TLR6	AB020808	Forward:
		5'-TGAATGATGAAAACTGTCAAAGGTTAA-3'
		Reverse: 5'-GGGTCACATTCAATAAGGTTGGA-3'
		FAM: 5'-TGGTGAGTTCTGATAAAA-3'
TLR7	AY035889	Forward:
		5'-TGCCACCTAATTTACTAGAGCTCTATCTTTAT-3'
		Reverse: 5'-TAGGTCAAGAACTTGCAACTCATTG-3'
		FAM: 5'-CCAAGAAAATGATTTTAATAAC-3'
TLR9	NM031178	Forward: 5'-CAATCTGACCTCCCTTCGAGTACTT-3'
		Reverse: 5'-GCCACATTCTATACAGGGATTGG-3'
		FAM: 5'-ATTGCCGTCGCTGCGACCATG-3'
Ddx58/ RIG-I	Mm554529	FAM 5'-CCAAACCAGAGGCCGAGGAAGAGCA-3'
Ifih1/ MDA-5	Mm459183	FAM 5'-GACACCAGAGAAAATCCATTTAAAG-3'

2.1.8 Zelllinien

Zelllinie	Zellart	Referenz
MMC	murine Mesangialzellen	[35]
NIH3T3	Fibroblasten	[151]
TFB	Tubulus Fibroblasten	
MTC	murine Tubuluszellen	

2.1.9 Versuchsmäuse

Mausstamm	Referenz
C57BL/6 Wildtyp	Charles River, Sulzfeld, D
Trif-mutant(C57BL/6)	[152]
Myd88-/-(C57BL/6)	[153]
Tlr2-/-(C57BL/6)	[76]

Die Knockout-Mäuse wurden mindestens bis zur F6-Generation mit C57BL/ 6-Mäusen rückgekreuzt.

2.2 Zellkultur

2.2.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen

Die Kultivierung von primären Zellen und Zelllinien erfolgte im Brutschrank bei 37°C und einer 5% CO_2-Begasung. Zellkulturen wurden für die Passage und die Stimulationsexperimente ausschließlich unter einer Sterilbank gehandhabt. Hier sorgen Filter und ein laminarer Luftstrom für eine keimfreie Umgebung. Oberflächen der Werkbank und sämtliche Gebrauchsgegenstände wie Medium, Pipetten, etc. wurden vor Ingebrauchnahme zusätzlich mit Desinfektionsmittel behandelt.

2.2.2 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität

Zellzahl und Vitalität wurden mittels Neubauer Zählkammer und Färbung mit Trypanblau bestimmt. Beim Vitaltest mit Trypanblau dringt der Farbstoff selektiv in das Zytoplasma toter Zellen ein, da deren Membran durchlässig geworden ist. Während lebende Zellen im Mikroskop hell erscheinen, werden die toten Zellen tiefblau gefärbt und können so voneinander unterschieden gezählt werden. Die Zellzahl wird anhand folgender Formel berechnet: Zellzahl (Mittelwert aus vier Großquadraten) x Verdünnungsfaktor x 10^4 = Zellzahl/ml.

2.2.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Einfrieren Um die Zellen einfrieren zu können, wurden die Zellen zunächst wie bei der Passage durch EDTA abgelöst und zetrifugiert. Nach Resuspendieren mit dem Einfriermedium (FCS mit 10% DMSO) mit einer Konzentration von ungefähr 1 Mio Zellen/ml wurde jeweils 1 ml Zellsuspension in vorbeschriftete Kryoröhrchen überführt und in einer speziellen Kühlbox bei -80°C für 24 Stunden eingefroren. Schließlich wurden die eingefrorenen Zellen im Flüssigstickstoff konserviert.

Auftauen Die aufzutauenden Zellen wurden im 37°C warmen Wasserbad erwärmt bis die Eiskristalle aufgelöst waren. Anschließend wurde die Zellsuspension unter sterilen Bedingungen in Zellkulturschalen mit vorgewämten Medium überführt. Nach 24 Stunden konnte das Medium gewechselt werden.

2.2.4 Gewinnung und Kultivierung von primären Mesangialzellen

Primäre Mesangialzellen wurden aus Nieren folgender Mausstämme gewonnen: Wildtyp, Trif-/-, Myd88-/-, Tlr2-/-.

Mesangialzellisolation Für die Isolation von glomerulären primären Mesangialzellen wurden 4-6 Wochen alte Mäuse durch zervikale Dislokation getötet. Nach medianer Laparatomie wurden die Nieren dargestellt und die Nierenkapsel mittels eines kleinen Schnittes am Nierenpol entfernt. Die Nieren wurden bis zur weiteren Verwendung in RPMI-Medium überführt und auf Eis gelagert. Unter sterilen Bedingungen wurde mit einem Skalpell die Nierenrinde vom Nierenmark getrennt und die Rindenanteile in kleine Stücke bis zu einer breiartigen Konsistenz zerkleinert. Die Nierenmasse wurde durch 4 Stahlsiebe mit 150, 106, 63 und 45/50μm Maschenweite mit Hilfe eines Spatels und Nachspülen von 4°C kalten PBS gepresst. Die vom umliegenden Gewebe isolierten Glomeruli wurden im vierten Sieb (45/50μm) aufgefangen. Die Nierenglomeruli wurden mit RPMI-Medium in ein 50ml-Falcon gespült und für 10 Minuten bei 900g und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurden die Glomeruli mit Kollagnase IV (100μg/ml) in RPMI-Medium im 37°C warmen Wasserbad für 15 min inkubiert. Nach weiterem Zentrifugieren wurden die angedauten Glomeruli resuspendiert und in 6-Well-Platten ausgesät. Die Kultivierung erfolgte in RPMI-1640 Medium mit stabilem Glutamat (GlutamaX), 20% FCS (Fötales Kälber-Serum), 1% Penicillin-Streptomycin und ITS (Insulin, Transferrin, Selenium).

Kultivierung und Passage der primären Mesangialzellen Nach 3 bis 6 Tagen konnte ein radiäres Auswachsen von Mesangialzellen und Epithelzellen aus den Glomeruli beobachtet werden. Der erste Mediumwechsel erfolgte nach 3 bis 4 Tagen, als die ersten Zellen ausgewachsen und die Glomeruli adhärent waren. Nach 14 bis 20 Tagen waren die Zellen konfluent gewachsen und die Epithelzellen von den primären

Mesangialzellen verdrängt. Für die Passage wurden die Zellen mit 1ml 1,5mM EDTA in PBS pro Well für 10 min im Brutschrank inkubiert, um die Zellen vom Boden abzulösen. Durch Beklopfen und mit Hilfe eines Zellspatels wurden die restlichen Zellen abgelöst. Die Zellsuspension wurde in ein 15ml-Falcon überführt und bei 800rpm für 5 min zentrifugiert, in RPMI-Medium (+20% FCS, 1% PS, ITS) resuspendiert und mit der Verdünnung 1:2 erneut in 6-Well-Platten ausgesät. Das Medium wurde bis zur Konfluenz alle 3 bis 4 Tage gewechselt.

2.2.5 Gewinnung von Zellüberstand nekrotischer Zellen

Zur Gewinnung von nekrotischem Zellüberstand wurde die von Scaffidi et al. beschriebende Methode [154] herangezogen. Konfluent gewachsene Zellen in 10cm-Zellkulturschalen wurden 3-4 mal jeweils für 30-40 Sekunden bei -80°C eingefroren und im 37°C warmen Brutschrank wieder aufgetaut. Nach dieser Prozedur waren die adhärenten Zellen abgelöst und wurden bei 2000g herunterzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Röhrchen überführt, mit 10mM HEPES gepuffert und bei -20°C gelagert. Nach erneutem Auftauen für Stimulationsexperimente wurden die Reste jeweils verworfen.

2.2.6 Gewinnung und Aufreinigung von apoptotischen Thymozyten

Aus 6-Wochen alten Wildtyp-Mäusen wurde der Thymus herauspräpariert und durch eine 70μm-Sieb gespült, um eine Einzelzellsuspension zu gewinnen. Die isolierten Thymozyten wurden mit 100μM Dexamethason in RPMI-Medium ohne FCS für 3-4 Stunden im Brutschrank inkubiert, um die Zellen in Apoptose zu treiben. Die so behandelten Thymozyten wurden mit Annexin V MicroBeads inkubiert, um Annexin V-postive Zellen mittels MicroBead-Technik anzureichern. Annexin V MicroBeads binden an Phosphatidylserin, das nur bei apoptotischen oder nekrotischen Zellen außen auf der Zellmembran nachweisbar ist. Die magnetisch gebundenen Zellen werden dann in LS-Säulen mittels einem Magneten aufgefangen, während alle nicht gebundenen Zellen verworfen werden. Das Ergebnis wurde anschließend mittels Durchflusszytometrie kontrolliert.

2.2.7 Gewinnung von Splenozyten

Für die Präparation von Splenozyten wurde die Milz unter sterilen Bedingungen entnommen und durch ein 70μm Zellsieb in ein 50ml Falcon gepresst. Das Sieb wurde mit gekühltem sterilen PBS nachgespült und die so gewonnene Zellsuspension herunterzentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann mit TAC-Puffer resuspendiert und im 37°C-Wasserbad für exakt 5 Minuten inkubiert, um die Erythrozyten zu lysieren. Die Lyse wurde mit MACS-Puffer gestoppt und die Zellsuspension erneut durch ein 70μm Zellsieb gespült. Anschließend wurden die Zellen gezählt und nach Bedarf entweder für den adoptiven Transfer oder T-Zell-Aktivierungs-Assay weiterverwendet.

2.2.8 T-Zell-Aktivierungs-Assay

Die präparierten Milzzellen wurden mit DMEM-Medium mit 5% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin resuspendiert und auf 24-Well Zellkulturschalen in einer Konzentration von $3x10^6$ Zellen/Well ausgesät. Die Zellen wurden mit 20μg/ml Kaninchen-IgG, das den Versuchsmäusen zur Präimmunisierung gespritzt wurde, stimuliert. Als Kontrollen dienten Ratten-IgG, Schaf-IgG und Hamster-IgG. Nach 72 Stunden wurde der Zellüberstand gewonnen und bis zur IFN-γ-Bestimmung bei -20°C aufbewahrt. Die Zellen wurden für die FACS-Analyse präpariert (siehe unten).

2.2.9 Stimulationsexperimente

Stimulation der Toll-like- und RIG-like-Rezeptoren Die primären Mesangialzellen (pMC) wurden in 24-Well Zellkulturschalen stimuliert, sobald die Zellen eine 80-90% Konfluenz zeigten. Für die Stimulationsversuche wurde RPMI-Medium mit 1% FCS ohne Penicillin/Streptomycin verwendet und die Zellen jeweils für 24 inkubiert. Folgende komerziell erwerblichen PRR-Liganden wurden in dieser Arbeit verwendet: TLR2: Pam3CysSK4, TLR3: Poly(I:C)-RNA, TLR4: ultrapures LPS, TLR7: Imiquimod, TLR9: CpG-DNA 1668, MDA-5: Poly(I:C)-RNA. Zur Stimulation von RIG-I wurde 3P-RNA freundlicherweise von V. Hornung zur Verfügung gestellt. Da MDA-5 und RIG-I intrazelluläre Rezeptoren sind, mussten die Liganden mit dem Transfektionsreagenz Lipofectamin 2000 inkubiert werden. Dazu wurden für eine Stimulation in 2 verschiedene 1,5 ml-Röhrchen je 25μl Opti-MEM vorpipettiert, 1μg Ligand in das eine Röhrchen und 1µl Lipofectamin 2000 in das andere Röhrchen gegeben, einzeln gemischt und schließlich zusammengeführt für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Vor der Stimulation mit den Liganden wurden den Zellen jeweils mit 10μg/ml Polymyxin B (außer Stimulation mit LPS) für mindestens 30 Minuten behandelt, um eine LPS-Kontamination und damit eine falsch positive Reaktion zu unterdrücken. Nach 24 Stunden Inkubation wurde der Mediumüberstand gesammelt und bei -20°C aufbewahrt, um die Zytokin-Ausschüttung mittels ELISA später zu analysieren. Für manche Stimulationsversuche wurden die Zellen mit IFN-γ und TNF-α vorstimuliert. Dies geschah 24 Stunden vor der eigentlichen Stimulation mit RPMI-Medium mit 1% FCS mit Penicillin/Streptomycin. Soweit nicht anders angegeben, erfolgte die Vorstimulation mit 200 U/ml IFN-γ und 500 U/ml TNF-α. Nach 24 Stunden Inkubation wurden die Zellen mit PBS gewaschen und das Medium für den eigentlichen Stimulationsversuch gewechselt.

Stimulation mit apoptotischen Thymozyten Die aufgereinigten Thymozyten wurden in RPMI-Medium resuspendiert und in einem Verhältnis von 1:1, 1:10 und 1:50 (Anzahl der Zellen pMC:Thymozyten) auf vorstimulierte primäre Mesangialzellen gegeben, für 24 Stunden inkubiert, die Zellüberstände geerntet und bei -20°C bis zur weiteren Analyse gelagert.

Stimulation mit Gesamt-RNA aus Zellen Gesamt-RNA aus primären Mesangialzellen und apoptotischen Thymozyten wurden mittels RNAeasy Kit extrahiert und die Konzentration bestimmt. Je 1μg RNA wurde mit 1μl Lipofectamin 2000 inkubiert und auf die primären Mesangialzellen gegeben. Nach 24 Stunden wurden die Zellüberstände gewonnen und bei -20℃ aufbewahrt.

Stimulation mit nekrotischen Zellüberständen Die gewonnenen Zellüberstände nekrotischer Zellen wurden in einem Verhältnis 1:10, 1:5 und 1:1 (Volumen Medium:nekrotischer Zellüberstand) auf die primären Mesangialzellen gegeben und für 24 Stunden inkubiert. Die Zellüberstände wurden geerntet und bei -20℃ aufbewahrt.

2.3 Tierexperimente

2.3.1 Tierhaltung

Für die Experimente wurden jeweils 5 Mäuse unter sterilen Bedingungen in autoklavierten Filter-Top-Käfigen, bei einem 12-stündigen Hell-Dunkel Rhythmus und freiem Zugang zu Wasser und Futter gehalten. Alle experimentellen Verfahren wurden nach den Vorschriften des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt und sind durch die Regierung von Oberbayern genehmigt worden.

2.3.2 Studiendesign der nephrotoxischen Serumnephritis

Das Modell der nephrotoxischen Serumnephritis wurde an folgenden Maus-Stämmen in Gruppen zu je 10 Tieren untersucht: C57BL/6-Wildtyp, Trif-/-, Myd88-/-. Die Induktion der nephrotoxischen Serumnephritis (NSN) erfolgte in 7-10 Wochen alten männlichen Mäusen. Dazu mussten die Mäuse zunächst präimmunisiert werden bevor das neprotoxische Serum appliziert werden konnte. Innerhalb 3 Wochen entwickelten die Tiere eine histologisch nachweisbare Glomerulonephritis mit Proteinurie. Die Tiere wurden nach 21 Tagen getötet, um Nierengewebe zu gewinnen. Gleichzeitig wurden Nierenzellen zur FACS-Analyse präpariert sowie Serum und Urin zur laborchemischen Diagnostik gewonnen (siehe Abbildung 2.1).

Präimmunisierung Für die Präimmunisierung wurde eine Emulsion aus *Complete Freund's Adjuvans* und Kaninchen-IgG mittels Homogenisator hergestellt. Je 100μl der Präimmunisierungs-Lösung wurde in die rechte und linke Flanke subkutan unter sterilen Bedingungen appliziert.

Induktion der nephrotoxischen Serumnephritis Drei Tage nach der Präimmunisierung wurden den Tieren intravenös 100 µl nephrotoxisches Serum, das gegen die glomeruläre Basalmembran (GBM) gerichtet ist, unter sterilen Bedingungen injiziert.

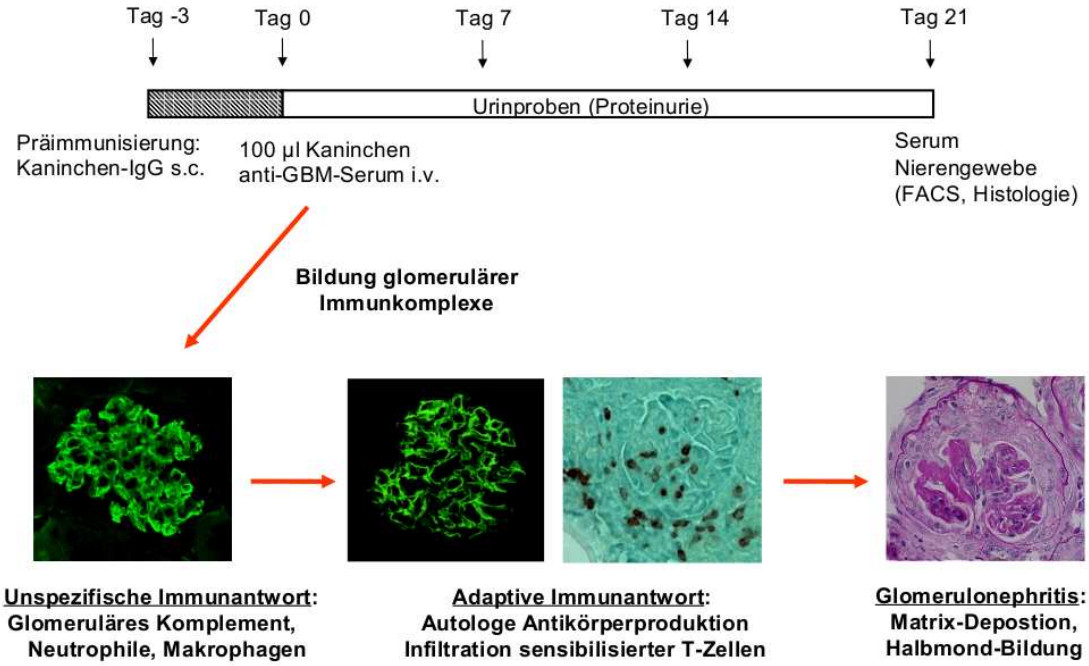

Abbildung 2.1: Das Modell der nephrotoxischen Serumnephritis: drei Tage nach Präimmunisierung wird das nephrotoxische Serum intravenös appliziert. Es kommt zur Bildung von glomerulären Immunkomplexen und es folgt die Aktivierung des Komplementsystems und des erworbenen Immunsystems. Innerhalb von 21 Tagen entwickelt sich eine histologisch und klinisch nachweisbare Glomerulonephritis mit einer ausgeprägten Lymphozyteninfiltration.

Urin-, Blut- und Gewebeentnahme Zur Darstellung des Proteinurie-Verlaufs wurde alle 7 Tage (Tag 0, 7, 14, 21) Urin unter sterilen Bedingungen abgenommen. Am Tag 21 nach Gabe des nephrotoxischen Serums wurden die Versuchstiere mit Methoxyfluran narkotisiert, so dass die Blutabnahme retroorbital erfolgen konnte. Anschließend wurden die Nieren mit PBS über die linke Herzkammer bis zur gänzlichen Blutleere gespült. Danach wurden die Nieren herauspräpariert und die Kapsel entfernt. Für die histologische Aufbereitung wurden Nierenschnitte in Histokasetten in 10% Formalin über Nacht aufbewahrt. Für die Nierenzellisolation zur anschließenden FACS-Analyse wurden Teile der Niere auf Eis gegeben. Zudem wurde die Milz zur Gewinnung von Splenozyten für den T-Zell-Aktivierungs-Assay herauspräpariert und in steriles PBS auf Eis gegeben. Serum wurde durch Herunterzentrifugieren (5000rpm) von Vollblut gewonnen und bis zur Analyse bei -20°C gelagert.

2.4 Immunologische Methoden

2.4.1 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Zur Bestimmung von Proteinen in den Zellkulturüberständen wurden verschiedene *Enzyme-linked Immunosorbent Assays*(ELISA) durchgeführt. Der ELISA ist ein häufig angewendeter quantitativer Immunoassay, bei dem man sich eines Enzyms als Marker bedient und die Antigenkonzentration anhand des Substratsumsatztes bestimmt. Antikörper oder Antigen sind dabei an einen festen Träger, d.h. auf einer ELISA-Platte gebunden (coating). Durch verschiedene Waschschritte werden freie Antigene von gebundenen Antigenen getrennt. In dieser Arbeit wurde der ELISA nach der Sandwich-Methode (das gemessene Antigen befindet sich zwischen zwei spezifischen Antikörpern) angewendet, bei der das gemessene Signal proportional zur Proteinkonzentration ist. Hierzu wurden 96-Well-Platten verwendet, welche mit einem bestimmten Fängerantikörper über Nacht im Kühlschrank bei 4℃ beschichtet werden. Nach Abblocken freier Proteinbindestellen werden die Proben sowie eine Standardreihe pipettiert und für 2 Stunden inkubiert. Es wird nun der biotinylierte Detektionsantikörper mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase/HRP) hinzugegeben und je nach Assay für 1-2 Stunden inkubiert. Nach mehreren Waschschritten erfolgt die Enzymreaktion mit TMB (3,3´,5,5´-Tetramethylbenzidin) welche durch Zugabe einer Stopplösung (H_2SO_4) nach 20-30 Minuten beendet wird. Die Messung der Farbreaktion erfolgt mittels ELISA-Reader, welcher die Absorption proportional zur gebundenen Proteinmenge mißt. Anhand des pipettierten Standards mit gegebener Proteinmenge kann die Konzentration der Proben errechnet werden.

IL-6, MIG/CXCL9, IFN-γ In den Zellüberständen stimulierter Zellen wurden folgende Zytokine mittels ELISA-Kits nachgewiesen: IL-6, MIG/CXCl9 und IFN-γ. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben und wurde durch einen ELISA-*Plate-Washer* erleichtert. Mittels ELISA-*Reader* wurde die Absorption der Proben bei 450 nm gemessen und mit Hilfe MS-Excel ausgewertet.

Autologer IgG-ELISA Zum Nachweis der Induzierbarkeit des Modells der nephrotoxischen Serumnephritis wurde die Menge an gebildetem IgG im Serum der Versuchsmäuse (Tag 21) gegen das injizierte Kaninchen anti-GBM-Serum gemessen. Dazu wurden schwarze 96-Well-Platten mit Kaninchen-IgG über Nacht bei 4℃ inkubiert. Das Mäuse-Serum wurde in verschiedenen Verdünnungsstufen (1: 100, 1: 200, 1: 400, 1: 800) und in dreifacher Ausführung auf die Platten gegeben. Als Sekundärantikörper wurde anti-Maus-IgG-FITC verwendet, dessen Emission im ELISA-Reader bei 535 nm gemessen wurde.

Albumin-ELISA Um die Albumin-Konzentration im Urin der Mäuse zu bestimmen wurde ein komerzielles ELISA-Kit nach Herstellerangaben verwendet. Es wurde jeweils

eine Urin-Verdünnungsreihe von 10^2-10^7 angesetzt und diese in 3-facher Ausführung bestimmt.

2.4.2 Proliferationsassay

Die Messung der Zellproliferation primärer Mesangialzellen nach Stimulation mit verschiedenen TLR-Liganden erfolgte mittels *Cell Titer 96 Proliferation Assay* nach Herstellerangaben. Dieser Assay beruht auf einer kolorimetrischen Messung zur Bestimmung der lebenden Zellen. Dazu wird eine stabile wässrige Lösung bestehend aus MTS (3- (4,5-Dimethyl-2-yl)- 5- (3-Carboxymethoxyphenyl)- 2- (4-sulfophenyl)- 2H- Tetrazolium, Inner Salt) und PES (Phenazin Ethosulfat), direkt auf die Zellen gegeben. Nach Inkubation von 1-4 Stunden wird die Absorption mit dem ELISA-Reader bei 490nm gemessen. Die gemessene Absorption entspricht der Menge des durch Reduktion von MTS gebildeten löslichen Formazanproduktes. Die Reduktion kann nur bei Vorhandensein von NADH/NADPH ablaufen, das wiederum nur von stoffwechselaktiven Zellen gebildet werden kann. Die gemessene Absorption ist dadurch direkt proportional zur Anzahl lebender Zellen.

2.4.3 Durchflusszytometrie (FACS)

Zur Bestimmung von Oberflächenantigenen wurde die Durchflusszytometrie bzw. FACS (fluorescence activated cell sorter)- Analyse angewendet. Die FACS-Analyse wurde mit dem Gerät FACSCalibur und entsprechender CellQuest Software durchgeführt.

Allgemeines Funktionsprinzip Das Prinzig der Durchflusszytometrie beruht darauf, dass Zellen oder auch andere Mikropartikel anhand ihrer Größe, Struktur, Oberflächeneigenschaften und intrazellulären Zusammensetzung unterschieden werden können. Dabei werden mehrere tausend Zellen in einem laminaren Flüssigkeitsstrom einzeln an einem Laser vorbei durchgespült. Für die meisten Anwendungen ist eine Markierung der Zellen mit Antikörpern, die gegen bestimmte Zellstrukturen gerichtet sind, nötig. Diese Antikörper sind entweder direkt an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt oder werden indirekt mittels einem fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörper nachgewiesen. Die so markierten Zellen werdem im Durchflusszytometer durch den Laserstrahl erfasst und angeregt. Die angeregten Fluoreszenzfarbstoffe emmitieren Licht einer bestimmten Wellenlänge, die vom FACS-Gerät detektiert wird. Die verschiedenen Farbstoffe emmitieren jeweils ein spezifisches Signal, so dass die einzelnen Fluoreszenzen im FACS unterschieden werden können. Durch das sogenannte Vorwärtsstreulicht (forwardscatter) lässt sich eine Aussage über die Zellgröße treffen und über das in einem 90° Winkel abgestrahlte Seitwärtsstreulicht (sidescatter) die Granularität der Zelle bestimmen. Bei Messung mehrerer Antikörper gleichzeitig und somit auch verschiedener Fluorchrome kann es zur Überlappung der Emissionswellenlänge der einzelnen Fluoreszenzfarbstoffe kommen. Für eine aussagekräftige Analyse ist dann eine Kompensation notwendig,

welche die Überlappung korrigiert. Für die Kompensationseinstellungen verwendet man einfach markierte Zellen als Kontrollen, um den Teil, der in andere Detektionskanäle hineinstreut zu subtrahieren. In dieser Arbeit wurden folgende Fluorchrome verwendet: FITC, PE, APC, Cy5.5, PI.

Nachweis von apoptotischen und nekrotischen Zellen Um apoptotische und nekrotische Zellen darzustellen, wurde das Annexin V-FITC Kit nach Herstellerangaben verwendet. Die mit Dexamethason behandelten Thymozyten wurden mit Annexin V und Propidium Iodid angefärbt und im FACS ausgewertet. Mittels Dot-Plot-Analyse konnte zwischen lebenden, apoptotischen und nekrotischen Zellen unterschieden werden.

Bestimmung von Oberflächenmarkern auf Nierenzellen Um die immunologischen Vorgänge nach Induktion einer Glomerulonephritis durch Gabe von nephrotoxischem Serum nachweisen und quantifizieren zu können, wurden Nieren- und Blutzellen der Mäuse nach 21 Tagen präpariert und mittels Durchflusszytometrie analysiert.
Hierzu wurden die Nieren in eine Petrischale auf Eis mit einigen Tropfen gekühltem Paris-Puffer gegeben und mit einem Skalpell zu etwa 0,5mm große Stücke zerkleinert. Nach 2-maligem Waschen der gewonnenen Nierensuspension mit HBSS mit Ca, Mg erfolgte ein Verdau mit einer vorgewärmten Kollagenase/DNase-Lösung im 37°C-Wasserbad für 20 Minuten. Im Anschluss an einen weiteren Waschschritt wurde die Zellsuspension mit 2mM EDTA in HBSS ohne Ca, Mg im 37°C-Wasserbad für 20 Minuten inkubiert. Daraufhin erfolgte ein erneuter Verdau mit Kollagenase-Lösung. Um nun eine Einzelzellsuspension zur FACS-Analyse zu erhalten, wurden die Nierenzellsuspensionen wiederholt durch eine 19G-Kanüle, gefolgt von einer 26G- und 30G-Kanüle ausgespritzt. Nach weiteren Waschschritten mit PBS wurden die Zellsuspensionen mit FACS-Puffer resuspendiert und schließlich mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern gefärbt. Es wurde pro Probe jeweils eine 4-fach Färbung mit CD3e-FITC, CD45-PE, CD4-APC und CD8-PE-Cy5.5 sowie eine 2-fach Färbung mit F4/80-FITC und CD45-PE durchgeführt. Für die Kompensation der einzelnen Fluorchrome wurden zusätzlich Einzelfärbungen angefertigt.

Bestimmung der T-Zell-Aktivierung mittels CD69-Färbung Nach 3-tägiger Inkubation der Splenozyten mit Ratten-, Schaf- und Kaninchen-IgG wurden die Zellen in FACS-Puffer gewaschen und mit folgenden Fluoreszenzgekoppelten Antikörpern gefärbt: Anti-CD3-FITC, Anti-CD4-APC, Anti-CD8-PE-Cy5.5 und Anti-CD69-PE. Nach 2 weiteren Waschschritten mit FACS-Puffer wurden die Proben lichtgeschützt bis zur FACS-Analyse aufbewahrt.

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 RNA-Isolierung

Die Isolierung der RNA aus primären Mesangialzellen erfolgte mittels RNeasy Mini Kit nach Herstellerangaben. Die adhärenten pMCs wurden in 6-Well Zellkulturplatten bewachsen und stimuliert. Zur Gewinnung der RNA wurden die Zellen zunächst mit sterilem PBS gewaschen und Medium sowie Zelldebris entfernt. Nach Zugabe von 350μl RLT-Puffer mit 10μg/ml β-Merkaptoethanol in die Wells werden die Zellen durch wiederholtes Resuspensieren lysiert. Das so gewonnene visköse Zellmaterial kann nun bis zur eigentlichen RNA-Aufreinigung bei -80℃ gelagert werden. Nach Wiederauftauen werden den Proben 350μl 70% Ethanol hinzugegeben und vermischt. Das Lysat-Ethanol-Gemisch wird auf eine RNeasy Mini Säule mit einem 2ml Röhrchen pipettiert und diese bei 8000g für 30 Sekunden zentrifugiert. Der DNase-Verdau erfolgte mittels DNase Digestion Kit durch Zugabe von DNase-Lösung auf die Säule. Ein weiterer Zentrifugationsschritt wird mit 700μl RW1-Puffer durchgeführt und die jeweils durch die Säule gelaufene Flüssigkeit verworfen. Die 2ml Röhrchen werden gegen neue ausgetauscht und die Säulen mit 500μl RPE-Puffer zentrifugiert. Nach einmaliger Wiederholung dieses letzten Schrittes wird auf die Membran der Säulen 40μl RNase freies Wasser pipettiert und die Säule schließlich mit einem neuen 1,5 ml Röhrchen zentrifugiert, um die RNA zu eluieren. Die extrahierte RNA wurde bei -80℃ aufbewahrt. Alle verwendeten Materialien und Lösungen, die nicht im Hersteller-Kit enthalten waren, wurden mit Diethylpyrocarbonat (DEPC), einem starken RNase-Inhibitor vorbehandelt.

2.5.2 Bestimmung des RNA-Gehalts

Die RNA-Konzentration wurde mittels eines Spektrometers bestimmt. Dazu wurden 2μl RNA-Lösung 50fach in DEPC behandeltem Wasser verdünnt und die OD bei 260 nm bzw. 280 nm gemessen. Die Rechnung Extinktion x Verdünnungsfaktor ergibt die RNA-Konzentration in μg/ml pro Probe. Ab einer Ratio (260 nm/280 nm) von 1,6 kann die RNA-Probe als rein angesehen werden.

2.5.3 cDNA-Synthese

Da für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) DNA zur Amplifizierung benötigt wird, muss die aufgereinigte RNA in revers in eine *complementary*-Einzelstrang-DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Hierzu wurden die RNA-Proben zunächst auf 1μg/20μl DEPC-Wasser verdünnt. Ein Master Mix wurde aus 9μl 5x-Puffer, 1μl 25mM dNTP-Mischung, 2μl 0,1M DTT, 1μl 40U/μl RNasin, 0,5μl Acrylamid [15μg/ml], 0,5 μ l Hexanukleotide, 1μ l Superscript hergestellt. Zur Kontrolle einer Amplifizierung von genomischer DNA, wurde anstelle des Enzyms Superscript RNase freies Wasser verwendet (sogenannte RT minus Probe). Die 15μl Mastermix wurden zu den 1μg/20μl

RNA-Proben hinzugegeben und für eine Stunde bei 42℃ in einem Schüttler inkubiert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die cDNA-Proben bei -20℃ aufbewahrt.

2.5.4 *Real-time* quantitative PCR

Zur Quantifizierung der mRNA-Expression wurde eine *real-time* quantitative PCR durchgeführt. Dazu wurde das Gerät TaqMan ABI PRISM 7700 Sequence Detection System verwendet. Das Prinzip der *real-time* PCR besteht darin, dass im Gegensatz zur konventionellen PCR die Amplifiktionsreaktion unter fortlaufender Überwachung mittels Fluoreszenzmarkierung und photometrischer Messung steht. Dabei ist die gemessene Floureszenzintensität in jedem Zyklus direkt porportional zur Menge des amplifizierten DNA-Produkts. Dies erlaubt den Rückschluss auf die Menge an eingesetzter Nukleinsäure. Für jede Probe wird ein sogenannter CT-Wert (Cycle Treshold) aufgezeichnet. Dieser entspricht der Zyklusanzahl, welche einen festgesetzten Schwellenwert überschreitet und sich somit Hintergrund-Signal unterscheidet. Je mehr Substrat am Anfang vorhanden ist, desto weniger Zyklen sind notwendig um eine signifikante Fluoreszenz zu messen. Es wurde eine relative Quantifizierung eingesetzt, welche das zahlenmäßige Verhältnis der Zielsequenz zu einer Referenzsequenz bestimmt. Dazu wurden sogenannte *Housekeeping*-Gene (18S rRNA oder GAPDH) als endogene Referenzgene herangezogen, welche in allen Proben gleichermaßen enthalten sind. Die Fluoreszenz-Markierung erfolgt bei Verwendung des TaqMan durch sequenzspezifische Primer, die mit einem Reporterfarbstoff und Quencher konjugiert sind. Solange der Reporterfarbstoff mit dem Quencher verbunden ist, wird die Fluoreszenz blockiert (quenching). Wird während der PCR das Konjugat durch die Taq DNA Polymerase gespalten, wird der Reporter-Farbstoff freigesetzt und es entsteht eine entsprechende Fluoreszenz.
Zur Durchführung der TaqMan-PCR wurden die cDNA-Proben 1:10 verdünnt. Der TaqMan universal PCR Master Mix enthält PCR Puffer, dNTP und AmpliTaqGold. Forward und Reverse Primer wurden bei einer Endkonzentration von 300 nM und die Proben bei einer Konzentration von 100 nM verwendet. Je 18μl Master Mix und je 2μl der verdünnten cDNA-Probe wurden in die Wells einer 96-Well-Platte pipettiert. Die Platte wurde gut verschlossen und bei 280 g zentrifugiert bevor die TaqMan-Analyse gestartet wurde. Folgende Temperatur-Einstellungen wurden für die Proben und *Housekeeper*-Gene verwendet: 2 Minuten 50℃, 10 Minuten 95℃, dann 40 Zyklen jeweils 15 Sekunden 95℃ gefolgt von 1 Minute Inkubation bei 60℃. Die CT-Werte wurden mit Hilfe der ABI PRISM Sequence Detection Software Version 1.0 aufgezeichnet und im Verhältnis zu den Housekeeper-Genen quantifiziert. Die Kontrollläufe (RT minus-Proben) zeigten weder für Zielgene noch *Housekeeper*-Gene eine Amplifikationsreaktion, so dass eine Verunreinigung mit genomischer DNA ausgeschlossen werden konnte.

2.6 Morphologische und histologische Untersuchungen

2.6.1 Färbung der primären Mesangialzellen zur Charakterisierung

Für die Färbung wurden die primären Mesangialzellen auf sterilen Deckgläschen ausgesät. Die auf dem Deckgläschen konfluent gewachsenen primären Mesangialzellen wurden für die Immunfluoreszenzfärbung zunächst 2 mal mit PBS (4℃) gewaschen und anschließend für 5 Minuten mit Ethanol (100%, -20℃) fixiert. Erneut wurden die Zellen 1-mal mit PBS und dann 3-mal mit PBS (0,1% BSA, 0,02% NaN3) gewaschen. Die Inkubation mit den Primärantikörpern anti-SMA (smoth muscle actin), anti-Zytokeratin und anti-Phalloidin erfolgte für 2 Stunden bei Raumtemperatur. Nach wiederholtem Waschen mit PBS (0,1% BSA, 0,02% NaN3) wurden die primären Mesangialzellen mit dem flourochromkonjugierten Zweitantikörper anti-Ratte-FITC für eine Stunde lichtgeschützt inkubiert. Schließlich wurden die Zellen mit Einbettmedium (Mountingmedium) und 4,6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI, Zellkernfärbung) eingebettet und bis zur Analyse mit dem Floureszenzmikroskop lichtgeschützt bei 4℃ aufbewahrt.

2.6.2 Aufbereitung und Analyse von Nierengewebe

Das entnommene Nierengewebe wurde in Histokasetten überführt, mit 10% Formalin in PBS über Nacht fixiert und in Paraffin eingebettet. 2 µm dicke Schnitte wurden mit einem Schneidegerät angefertigt, auf mit APES vorbehandelten Objektträgern aufgetragen und für 12 Stunden in einem Trockenschrank bei 37℃ aufbewahrt. Als erster Schritt bei jeder Färbung wurden die Schnitte in Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 96%, 70%, 50%) entparaffiniert und schließlich mit PBS gespült. Für die HE-Färbung wurden die entparaffinierten Nierenschnitte für 5 Minuten in Mayer's Hämalaun getaucht und anschließend in Wasser gebläut. Die Eosin-Färbung erfolgte mit 2% Eosin-Lösung für 5 Minuten. Mittels aufsteigender Alkoholreihe und Xylol wurden die Schnitte dehydriert und schließlich eingedeckt. Für die immunhistologischen Färbungen wurden folgende Antikörper und Antikörperkonzentrationen verwendet: Ratte-Anti-Mac2 (glomeruläre Makrophagen, 1: 50), Ratte-Anti-F4/80 (Makrophagen, 1: 50) und Ratte-Anti-CD3 (Lymphozyten, 1: 50). Um die glomeruläre Sklerose zu quantifizieren wurde die *Periodic Acid* Schiff (PAS)-Färbung verwendet. Die sklerotischen Läsionen wurden semiquantitativ bestimmt: 0=keine Läsion, 1=<25% Sklerose, 2=25-49% Sklerose, 3=50-74% Sklerose, 4=75-100% Sklerose. Für die Analyse wurden pro Schnitt jeweils 50 Glomeruli ausgewertet.

2.7 Statistische Analyse

Die dargestellten *in vitro* Ergebnisse repräsentieren jeweils das Mittel aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen. Bei den Tierexperimenten wurden jeweils 10 Tiere pro Versuchsgruppe getestet. Die Daten sind als Mittelwert mit Standardabweichung (SD) angegeben. Für die Berechnung der statistischen Signifikanz wurde der zweiseitige Student's T-Test für paarige Stichproben angewendet. Ein P-Wert von $p<0{,}05$ bzw. $p<0{,}01$ wurde als signifikant angenommen und entsprechend mit „* “ bzw. „** “ markiert. Statistische Berechnungen und graphische Darstellung wurden mit dem Programm GraphPad Prism durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Mesangialzellen und Expression der Pathogen-Erkennungsrezeptoren

3.1.1 Charakterisierung der primären Mesangialzellen

Bis heute konnte kein spezieller Marker für glomeruläre Mesangialzellen identifiziert werden, so dass die Charakterisierung durch eine Reihe von Ein- und Ausschlusskriterien erfolgen muss (siehe Tabelle 3.1) [155].
In Zellkultur wachsende Mesangialzellen erscheinen im Mikroskop als sternförmige, adhärente Zellen mit spindelförmigen Ausläufern. Die Zellen tendieren dazu, in Aggregaten zu wachsen und kleine Hügel zu bilden, wenn sie konfluent werden. Sie enthalten unter anderem die Intermediärfilamente Desmin und Vimentin sowie α-Smooth Muscle Actin (α-SMA), ein Bestandteil glatter Muskelzellen. Zytokeratine werden eigentlich als Epithelzellmaker angesehen, konnten aber auch auf Mesangialzellen nachgewiesen werden. Dagegen sind Endothelzellcharakteristika eindeutige Ausschlusskriterien: Faktor VIII, Weibel-Palade-Körperchen und ACE-Aktivität können in Mesangialzellen nicht nachgewiesen werden.

Tabelle 3.1: Ein- und Ausschlusskriterien zur Charakterisierung der glomerulären Mesangialzellen [155].

Kriterium:	
Morphologie:	sternförmig, spindelförmig, hügeliges Wachstum bei Konfluenz, kein epithelzellartiges Aussehen: Kopfsteinpflaster-artige Anordnung der Zellen mit kuppelartigen Rundungen, keine Weibel-Palade-Körperchen wie in Endothelzellen
positive Färbung:	Fibronektin, Vimentin, Thy 1.1, Zytokeratin, α-Smooth Muscle Actin (α-SMA), Desmin, Myosin
negative Färbung:	Faktor VIII, AC-LDL; CD45, Ia Antigene
Enzyme:	kein ACE
Toxine:	+ Mitomyzin C, - Puromyzin
Wachstum:	+ D-Valin-haltiges Medium
Kontraktilität:	+ Angiotensin II, Vasokonstriktoren

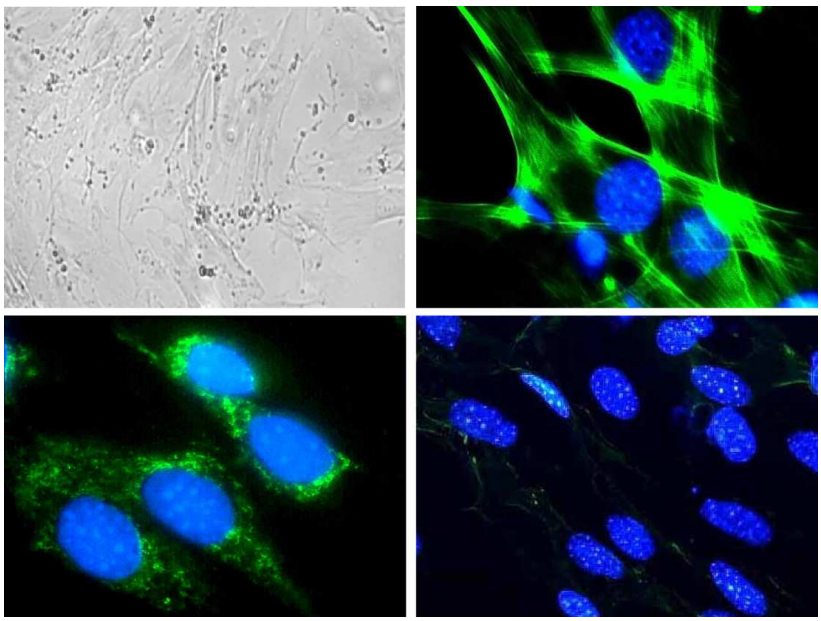

Abbildung 3.1: Morphologie und Immunfluoreszenzfärbung der primären Mesangialzellen. Links oben: primäre Mesangialzellen in Zellkultur Rechts oben: Phalloidinfärbung. Links unten: *Smooth Muscle Actin*-Färbung. Rechts unten: Zytokeratin-Färbung.

Eine Kopfsteinpflaster-artige Anordnung der Zellen mit kuppelartigen Rundungen und Zilien spricht für eine Epithelzellkultur und lässt sich somit eindeutig von der stern- und spindelförmigen Mesangialzellmorphologie abgrenzen.
Ab der 6. Passage wurden die gewonnenen primären Mesangialzellen durch Beurteilung der Morphologie im Mikroskop und mittels Immunfluoreszenzfärbungen charakterisiert. Die Zellen wuchsen adhärend und wiesen die für Mesangialzellen charakteristische Zellmorphologie auf. Die isolierten primären Mesangialzellen waren als sternförmige Zellen mit langen spindelförmigen Zellausläufern erkennbar, wie in der Zellkulturabbildung und in der Fluoreszenzfärbung mit dem Zytoskelettmarker Phalloidin sichtbar ist. In der Immunfluoreszenzfärbung sind die primären Mesangialzellen positiv für α-SMA und negativ für Zytokeratin (siehe Abbildung 3.1).

3.1.2 Expression der Pathogen-Erkennungsrezeptoren auf primären Mesangialzellen

Schon in früheren Studien konnte gezeigt werden, dass Toll-like Rezeptoren in der Niere exprimiert werden. Dabei konnten verschiedene Expressionsmuster der einzelnen Zellarten nachgewiesen werden. Bisher ist die TLR-Expression der Mesangialzellen nur in einer murinen Zelllinie belegt worden [148]. Mesangialzellen exprimieren die Toll-like Rezeptoren 1 bis 6 und 11. TLR7 und 9 konnten nicht nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis konnte nun auch in den primären Mesangialzellen mittels *real time* RT-PCR

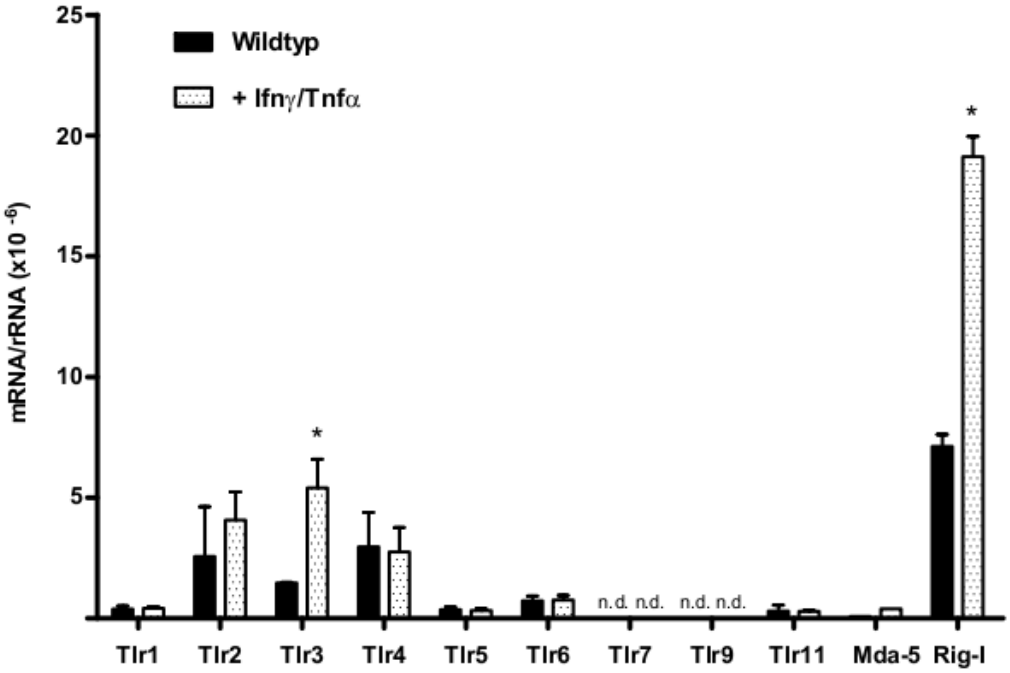

Abbildung 3.2: Expression der Pathogen-Erkennungsrezeptoren auf primären Mesangialzellen: RNA wurde aus kultivierten primären Mesangialzellen mit und ohne Stimulation mit 200 U/ml Ifn-γ and 500 U/ml Tnf-α über 24 Stunden gewonnen und in cDNA umgeschrieben. Die mRNA-Expression wurde mittels *real-time* RT-PCR bestimmt. Es wurden die Primerpaare für TLR1-7, 9, 11, MDA-5 und RIG-I eingesetzt. Dargestellt sind die Ergebnisse aus 2 unabhängigen Experimenten. * $p<0.05$ versus Medium.

bestätigt werden (siehe Abbildung 3.2). Die mRNA-Expressionsanalyse zeigte zudem die Expression der Helikasen MDA-5 und RIG-I. Die Stimulation der Zellen mit den proinflammatorischen Zytokinen IFN-γ (200U/ml Medium) und TNF-α (500U/ml Medium) über 24 Stunden bewirkte eine signifikante Hochregulation der mRNA für TLR3 und RIG-I, während die Expression der restlichen Toll-like Rezeptoren weitgehend gleich blieb.

3.2 Aktivierung der primären Mesangialzellen durch exogene und endogene Liganden *in vitro*

Wie schon frühere Studien zeigten, können Mesangialzellen durch eine Reihe von Substanzen aktiviert werden und proinflammatorische Zytokine freisetzen (siehe Einleitung). Liganden der Toll-like Rezeptoren wurden schon in älteren Publikationen, noch bevor die Toll-like Rezeptoren beim Menschen entdeckt worden sind, als Stimulanzien glomerulärer Mesangialzellen beschrieben. So wurde von unterschiedlichen Gruppen Ende der 1980'er gezeigt, dass eine Koinkubation mit

LPS, heute als TLR4-Ligand bekannt, zu einer Ausschüttung verschiedener Zytokine und Chemokine wie TNF-α, IL-1 und RANTES führt [156] [157] [40]. Weitere *in vitro*-Experimente mit der murinen Mesangialzelllinie zeigten, dass auch andere TLR-Liganden wie Poly(I:C) und Pam3Cys eine Aktivierung der Zellen bewirken können [148].

3.2.1 Stimulation der primären Mesangialzellen mit Liganden der Pathogen-Erkennungsrezeptoren

Um die bisherigen Daten mit der murinen Mesangialzelllinie in primären Mesangialzellen zu bestätigen, wurden diese mit den kommerziell erwerblichen TLR-Liganden Pam3Cys, Poly(I:C), LPS, Imiquimod und CpG-DNA koinkubiert und die induzierte IL-6-Ausschüttung mittels ELISA gemessen. Entsprechend dem TLR-Expressionsprofil reagierten die aus C57BL/6 Wildtyp-Mäusen gewonnenen primären Mesangialzellen positiv auf Pam3Cys (TLR1 und 2), Poly(I:C) (TLR3) und LPS (TLR4), während die Stimulation mit Imiquimod und CpG-DNA zu keiner nachweisbaren Zytokinfreisetzung führte, da weder TLR7 noch TLR9 auf Mesangialzellen exprimiert werden (siehe Abbildung 3.3 und 3.4). Zudem wurden auch primäre Mesangialzellen aus Myd88-, Trif- und Tlr2-Knockout-Mäusen mit den Liganden stimuliert. Pam3Cys-Stimulation der Trif-defizienten primären Mesangialzellen bewirkte eine mit den Wildtyp-pMC vergleichbare IL-6-Freisetzung, während in den Myd88- und Tlr2-defizienten Zellen kein IL-6 detektiert werden konnte. Die Koinkubation mit LPS ergab eine vergleichbare IL-6-Induktion in Wildtyp- und Tlr2-defizienten pMC, welche in Myd88-defizienten Zellen nicht nachweisbar war. Die Trif-defizienten Mesangialzellen hingegen zeigten im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen eine niedrigere IL-6-Ausschüttung nach LPS-Stimulation (siehe Abbildung 3.3).
Poly(I:C) wurde in unterschiedlichen Konzentrationen verwendet. So ergab die Koinkubation mit 100μg/ml Poly(I:C) im Verlgeich zur Medium-Kontrolle keine signifikante Zytokin-Freisetzung. Erst die Vorstimulation mit TNF-α und IFN-γ über 24 Stunden bewirkte eine im Vergleich zu anderen Liganden wie LPS und Pam3Cys niedrige IL-6-Ausschüttung in Wildtyp- und Myd88-defizienten pMC, die in den Trif-defizienten pMC vollständig fehlte. Zusätzlich wurden die primären Mesangialzellen mit jeweils 1μg komplexierter Poly(I:C)- und 3P-RNA inkubiert, um die zytosolischen RNA-Helikasen MDA-5 und RIG-I respektive in Mesangialzellen zu aktivieren. Dazu musste die RNA mit kationischen Lipiden (Lipo/Lipofectamin 2000) umhüllt werden, um eine Transfektion der Liganden in das Zytolsol zu gewährleisten. Die Stimulation mit komplexierter RNA ergab eine vergleichbare hohe IL-6-Freistzung in Wildtyp-, Trif-defizienten und Myd88-defizienten primären Mesangialzellen. Die Ergebnisse zeigen somit, dass komplexierte RNA TLR-unabhängig Mesangialzellen stimulieren kann. Dies lässt sich am wahrscheinlichsten durch die Bindung an die zytosolischen RNA-Helikasen MDA-5 und RIG-I erklären, die eine TLR-unabhängige Signalweiterleitung vermitteln. In den Medium-Kontrollen mit und ohne Vorstimulation mit TNF-α und IFN-γ

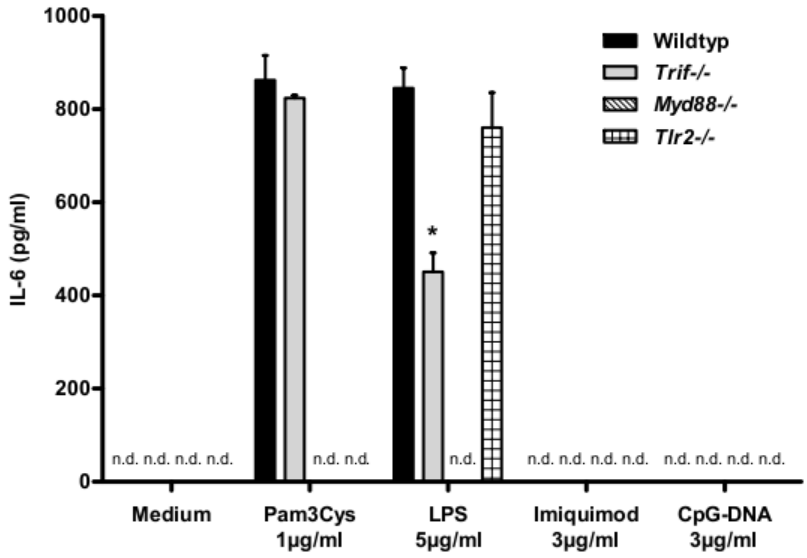

Abbildung 3.3: Effekt der Liganden der Pathogen-Erkennungsrezeptoren auf primäre Mesangialzellen: Primäre Mesangialzellen aus Wildtyp, Trif-defizienten, Myd88-defizienten und Tlr2-defizienten Mäusen wurden mit Pam3Cys, LPS, Imiquimod und CpG-DNA über 24 Stunden stimuliert. IL-6 wurde im Zellüberstand mittels ELISA gemessen. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte mit Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten, die jeweils in dreifacher Ausführung analysiert worden sind. LPS = Lipopolysaccharid, n.d. = nicht detektierbar. * $p<0.05$ versus Wildtyp.

und nach Gabe von kationischen Lipiden allein konnte keine IL-6-Freisetzung der Mesangialzellen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.4).

3.2.2 Nachweis der Zell-Proliferation durch Liganden der Pathogen-Erkennungsrezeptoren

Um weitere Effekte der TLR-Liganden bei primären Mesangialzellen zu untersuchen, wurde anhand eines Proliferations Assay die Zellproliferation nach Liganden-Stimulation bestimmt. Wildtyp-Mesangialzellen wurden wie in Abbildung 3.3 und 3.4 mit den Liganden Pam3Cys, LPS und Poly(I:C) für 24 Stunden inkubiert. Die Gabe von Pam3Cys und LPS bewirkte eine deutliche Proliferation der Zellen im Vergleich zu nicht-stimulierten primären Mesangialzellen, wobei die Zellvermehrung durch LPS im Vergleich zu Pam3Cys stärker induziert wurde (siehe Abbildung 3.5). Interessanterweise konnte dieses Ergebnis nach Vorstimulation mit TNF-α und IFN-γ nicht reproduziert werden. Es konnte zwar nach Ligandenstimulation eine Zellproliferation nachgewiesen werden, aber in wesentlich geringerem Ausmaß als ohne Vorstimulation. Die Stimulation mit TNF-α und IFN-γ ergab nur eine leichte Zunahme der Zellaktivität. Durch Stimulation mit Poly(I:C) (100μg/ml nach Vorstimulation mit TNF-α und IFN-γ) konnte kein vermehrtes Zellwachstum induziert

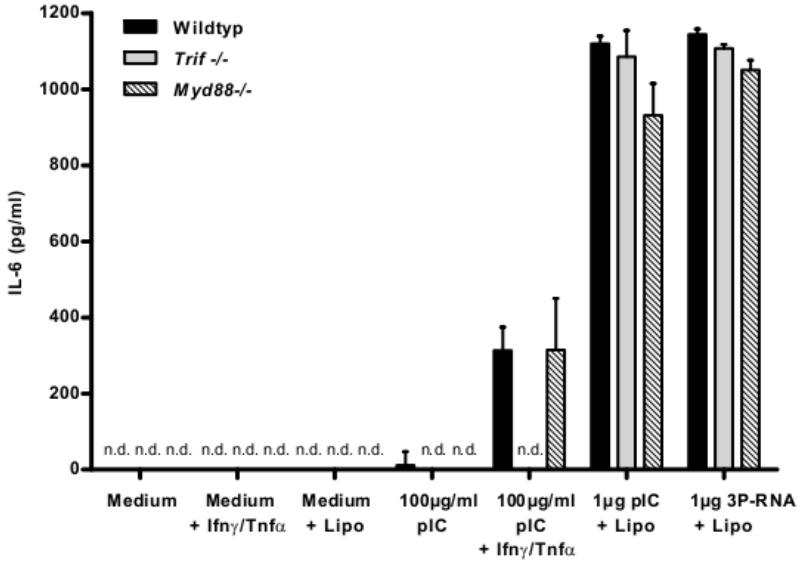

Abbildung 3.4: Effekt von Poly(I:C)-RNA und 3P-RNA auf primäre Mesangialzellen: Mesangialzellen aus Wildtyp, Trif-defizienten und Myd88-defizienten Mäusen wurden mit Poly(I:C)-RNA (pIC) und 3P-RNA über 24 Stunden stimuliert. Zur Vorstimulation wurden die Mesangialzellen mit 200 U/ml Ifn-γ and 500 U/ml Tnf-α über 24 Stunden inkubiert. Zur Komplexierung der RNA wurde Lipofectamin2000 verwendet. IL-6 wurde im Zellüberstand mittels ELISA gemessen. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte mit Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten, die jeweils in dreifacher Ausführung analysiert worden sind. Lipo = Lipofectamin2000, n.d. = nicht detektierbar.

werden, im Gegenteil, die Zellaktivität nahm im Vergleich zu den Kontrollzellen deutlich ab. Die Vorstimmulation mit TNF-α und IFN-γ für die Stimulation mit Poly(I:C) war nötig, da die primären Mesangialzellen durch Poly(I:C)-Gabe allein kein IL-6 freisetzten (siehe Abbildung 3.4).

3.2.3 Apoptotische und nekrotische Zellen als endogene Liganden

In der Pathogenese der Glomerulonephritis werden häufig fokale glomeruläre Zellnekrosen beobachtet. Daher kann man davon ausgehen, dass Mesangialzellen mit absterbenden Zellen und deren Derivaten in Kontakt kommen und durch diese aktiviert werden können. Wie in der Einleitung schon beschrieben, werden von apoptotischen und nekrotischen Zellen verschiedene Moleküle freigesetzt, die unter anderem über TLR-Aktivierung Antigen-präsentierende Zellen stimulieren können [158][121]. Mesangialzellen besitzen auch Eigenschaften Antigen-präsentierender Zellen und sind zur Phagozytose fähig. Auf diese Befunde aufbauend sollte untersucht werden, ob die primären Mesangialzellen durch totes Zellmaterial aktiviert werden können.

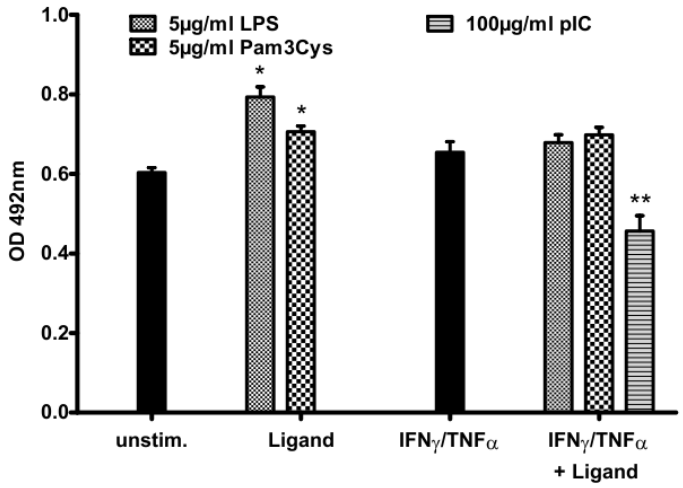

Abbildung 3.5: Proliferation der primären Mesangialzellen durch TLR-Liganden: Primäre Mesangialzellen aus Wildtyp Mäusen wurden mit Pam3Cys, LPS, und Poly(I:C)-RNA (pIC) mit und ohne Vorstimulation mit 200 U/ml Ifn-γ und 500 U/ml Tnf-α über 24 Stunden stimuliert. Die gemessene Absorption entspricht der Menge stoffwechselaktiver Zellen. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte mit Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten, die jeweils in dreifacher Ausführung analysiert worden sind. LPS = Lipopolysaccharid, n.d. = nicht detektierbar. * $p<0.05$ versus Medium, ** $p<0{,}05$ versus IFN-γ/Tnf-α-Stimulation.

Apoptotische Thymozyten Hierzu wurden Thymozyten aus 4 Wochen alten Wildtyp-Mäusen gewonnen und mittels Dexamethason in Apoptose getrieben. Anschließend wurden die Annexin V-positiven Zellen mit Hilfe der MicroBead-Technik angereichert. Die nicht-selektierte Zellsuspension bestand aus 53% lebenden (Annexin V-, Propidium Iodid-negativ), 37% apoptotischen (Annexin V-positiv, Propidium Iodid negativ) und 9% (sekundär) nekrotischen (Annexin V-, Propidium Iodid-positiv) Zellen. Der prozentuale Anteil der rein apoptotischen Zellen konnte durch Anreicherung der Annexin V-positiven Zellen von 37% auf 90% angehoben werden, während lebende Zellen fast vollständig aussortiert wurden. Das Mengenverhältnis der nekrotischen Thymozyten blieb mit 9% gleich (siehe Abbildung 3.6).

Nach Vorstimulation mit IFN-γ und TNF-α für 24 Stunden wurden die primären Mesangialzellen mit den Annexin V-angereicherten Thymozyten für weitere 24 Stunden inkubiert. Die Zellen wurden in folgenden Mengenverhältnissen stimuliert: 1:1, 1:10 und 1:50 (Zellzahl der pMC : Zellzahl der Thymozyten), d.h. es wurde eine bis zu 50-fache Anzahl apoptotischer bzw. nekrotischer Zellen auf die kultivierten Mesangialzellen gegeben, so dass diese fast vollständig von Thymozyten bedeckt waren (Thymozyten sind um ein Vielfaches kleiner als primäre Mesangialzellen). Die Koinkubation ergab eine Dosis-abhängige IL-6-Freisetzung der Wildtyp-Mesangialzellen, die aber im Vergleich zur Stimulation mit komplexierter Poly(I:C)-RNA um ein 5-faches niedriger war (siehe Abbildung 3.7). Kultivierte

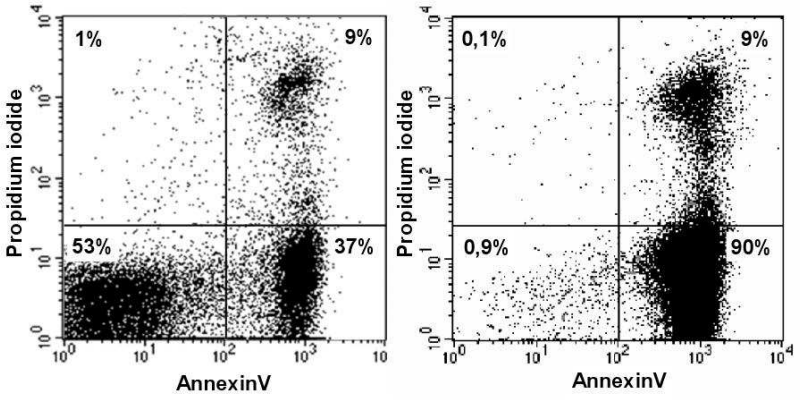

Abbildung 3.6: Anreicherung von apoptotischen Thymozyten: Apoptotische Thymozyten wurden mittels Dexamethason-Behandlung gewonnen und durch magnetische Beads gegen Annexin V angereichert. Mittels Durchflusszytometrie wurde die Anreicherung nachgewiesen. Die FACS-Daten zeigen den prozentualen Anteil von Propidium Iodid- und Annexin V-positiven Thymozyten vor (links) und nach magnetischer Bead-Anreicherung (rechts).

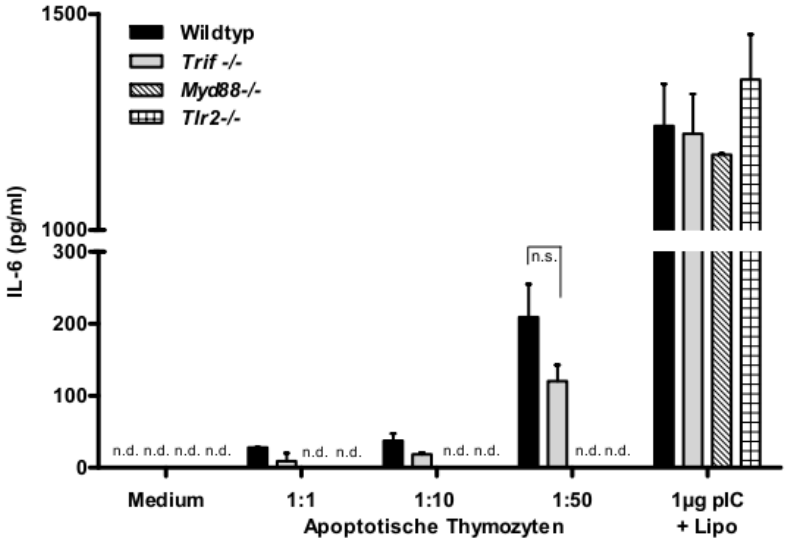

Abbildung 3.7: Stimulation der primären Mesangialzellen mit apoptotischen Zellen: Primäre Mesangialzellen von Wildtyp-, Trif-defizienten, Myd88-defizienten und Tlr2-defizienten Mäusen wurden mit ansteigender Anzahl apoptotischer Zellen für 24 Stunden inkubiert. Als Kontrolle diente Poly(I:C)-RNA komplexiert mit Lipofectamin2000. IL-6 wurde im Zellüberstand mittels ELISA gemessen. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte mit Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten, die jeweils in dreifacher Ausführung analysiert worden sind. Lipo = Lipofectamin2000, n.d. = nicht detektierbar, n.s. = nicht signifikant.

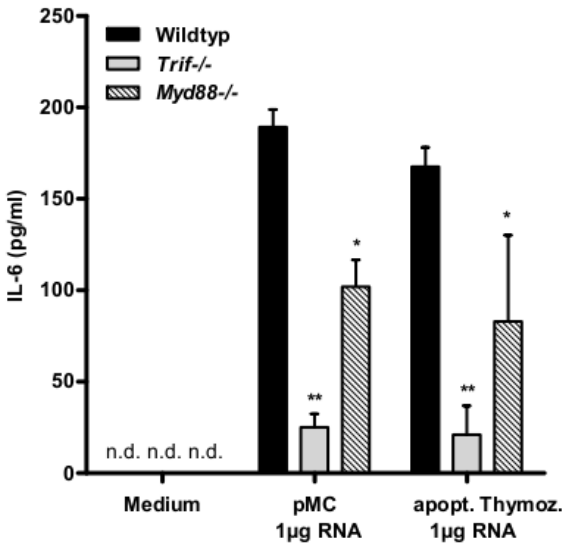

Abbildung 3.8: Stimulation der primären Mesangialzellen mit aufgereinigter RNA: Primäre Mesangialzellen (pMC) aus Wildtyp-, Trif-defizienten und Myd88-defizienten Mäusen wurden mit präparierter Gesamt-RNA aus primären Mesangialzellen und apoptotischen Thymozyten komplexiert mit kationischen Lipiden stimuliert. IL-6 wurde im Zellüberstand mittels ELISA gemessen. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte mit Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten, die jeweils in dreifacher Ausführung analysiert worden sind. n.d. = nicht detektierbar. * $p<0.05$ versus Wildtyp, ** $p<0.01$ versus Wildtyp.

Thymozyten alleine setzten kein IL-6 frei (Daten nicht gezeigt). Die Stimulation der Knockout-pMC ergab, dass MyD88 und TLR2 wesentlich an der Aktivierung von primären Mesangialzellen durch apoptotische/nekrotische Zellen beteiligt sind. Dagegen zeigten Trif-defiziente pMC nur eine geringe, nicht signifikante Verminderung der IL-6-Ausschüttung im Vergleich zu den Wildtyp-pMC. Als Kontrolle der Viabilität aller Zellpopulationen diente die TLR-unabhängige Stimulation mit komplexierter Poly(I:C)-RNA (ohne Vorstimulation), welche eine vergleichbar hohe IL-6-Ausschüttung bewirkte und somit eine vergleichbare Zellaktivität der einzelnen Zellarten belegte. Ohne TNF-α/IFN-γ-Vorstimulation der Zellen konnte keine Induktion von IL-6 durch apoptotische Thymozyten nachgewiesen werden. Die Vorstimulation allein ergab keine IL-6-Produktion (Daten nicht gezeigt).

Aufgereinigte RNA Nachdem die Stimulations-Experimente eine geringe, wenn auch nicht signifikante Verringerung der IL-6-Freisetzung in den Trif-defizienten Mesangialzellen zeigten, erschien es plausibel, dass RNA-Moleküle aus den apoptotischen Zellen TRIF-abhängig Mesangialzellen aktivieren könnten. Um diese Hypothese zu prüfen, wurden aufgereinigte RNA-Extrakte aus apoptotischen Thymozyten und primären Mesangialzellen gewonnen und für weitere *in vitro*-Stimulationen verwendet. Die RNA-Extrakte wurden vor Stimulation mit kationischen Lipiden inkubiert, um die geringe RNA-Menge (1μg) vor einem Abbau

durch RNasen im Zellkulturmedium zu schützen. Die aufgereinigte RNA bewirkte bei den Wildtyp-pMC eine im Vergleich zu anderen TLR-Liganden niedrige Induktion von IL-6, die als überwiegend TRIF-abhängig gesehen werden kann, da die Trif-defiziente Zellen im Vergleich zu den Wildtyp-pMC signifikant weniger IL-6 freisetzten (siehe Abbildung 3.8). Die erniedrigte IL-6-Induktion in Myd88-defizienten pMC lässt sich am wahrscheinlichsten dadurch erklären, dass die präparierte RNA nicht ganz frei von anderen TLR-Liganden war, welche einen gemeinsamen Signalweg über das Adapterprotein MyD88 haben.

Überstand nekrotischer Zellen Weiterhin sollte untersucht werden, ob Substanzen, die durch Apoptose bzw. Nekrose freigesetzt werden, eine Aktivierung glomerulärer Mesangialzellen bewirken. Somit könnten Moleküle, die nur von sterbenden Zellen freigesetzt werden, mögliche endogene Liganden darstellen und so durch Aktivierung intrinsischer renaler Zellen zur Pathogenese der Glomerulonephritis beitragen. Dazu wurden verschiedene Zelllinien durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen nekrotisch gemacht, der Mediumüberstand gewonnen und für Stimulationszwecke verwendet. Als Quelle nekrotischer Zellüberstände wurde die murine Mesangialzelllinie (MMC), die Fibroblastenzelllinie NIH3T3, die Tubulus-Fibroblastenzelllinie (TFB) und die murine Tubuluszelllinie (MTC) eingesetzt. Mediumüberstände nekrotischer NIH3T3-Zellen bewirkten eine mit den TLR-Liganden LPS und Pam3Cys vergleichbare IL-6-Induktion in den primären Mesangialzellen. Es wird davon ausgegangen, dass eine glomeruläre Zellschädigung in einem entzündlichen Umfeld stattfindet, d.h. dem Absterben von Zellen geht eine Einwanderung von Entzündungszellen und damit Freisetzung proinflammatorischer Zytokine voraus. Dieser Zustand kann *in vitro* durch Gabe der proinflammatorischen Zytokine TNF-α und IFN-γ imitiert werden. Tatsächlich konnte durch Vorstimulation ein synergistischer Effekt proinflammatorischer Zytokine und nekrotischen Zellmaterials erzielt werden. Die Vorstimulation bewirkte bei allen Stimulationen mit nekrotischen Überständen eine signifikante Dosis-abhängige Anhebung der IL-6-Produktion in den primären Mesangialzellen aus Wildtyp-Mäusen (siehe Abbildung 3.9). In den nekrotischen Zellüberständen konnte kein IL-6 nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).
Wie schon in früheren Publikationen gezeigt werden konnte, setzen absterbende Zellen Moleküle frei, die unter anderem TLR-abhängig Antigen-präsentierende Zellen aktivieren können (siehe Einleitung). Um dies in der Niere speziell an Mesangialzellen zu untersuchen, wurden primäre Myd88-, Tlr2-, und Trif-defiziente Mesangialzellen mit den nekrotischen Zellüberständen inkubiert. Es wurden die Zellüberstände der NIH3T3-Fibroblastenzelllinie verwendet, da diese den stärksten Stimulus für eine IL-6-Ausschüttung in Mesangialzellen darstellten. Die Mesangialzellen wurden mit unterschiedlichen Mengenverhältnissen inkubiert: 1:10, 1:2 und 1:1 (nekrotischer Zellüberstand : Zellkulturmedium der pMC). Es konnte somit eine Dosis-abhängige Stimulation durch nekrotisches Zellmaterial nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.10).

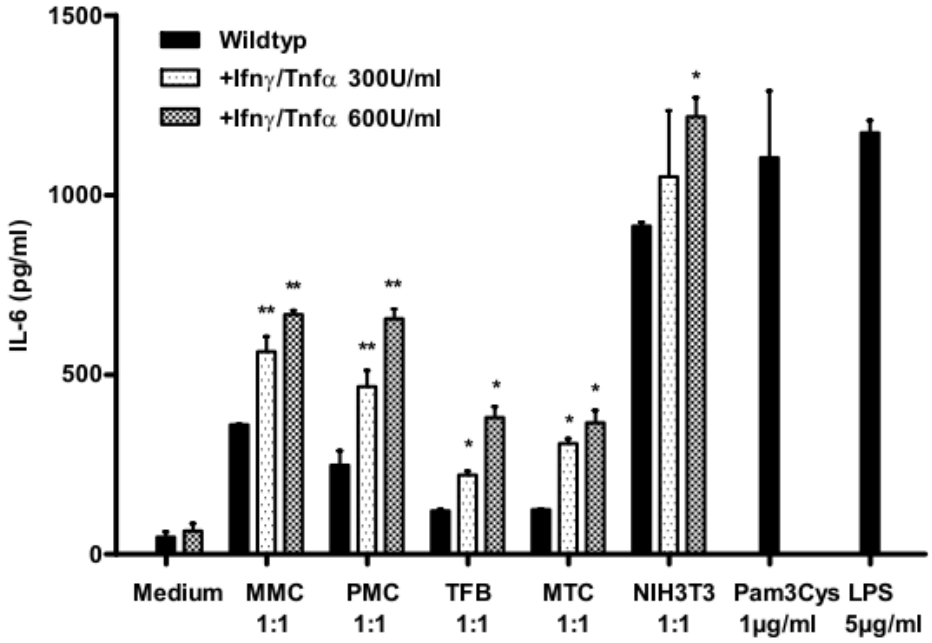

Abbildung 3.9: Stimulation der primären Mesangialzellen mit Mediumüberständen nekrotischer Zellen: Nekrose wurde durch mehrmaliges Einfrieren und Auftauen in Zellen induziert und der Mediumüberstand gewonnen. Primäre Mesangialzellen wurden mit den Mediumüberständen nekrotischer Zellen im Verhältnis 1:1 zu frischem Zellkulturmedium mit und ohne Vorstimulation mit mit TNF-α und IFN-γ für 24 Stunden inkubiert. Nekrotische Zellüberstände wurden aus MMC (murine Mesangialzelllinie), primären Mesangialzellen, TFB (Tubulusfibroblastenzelllinie), MTC (murine Tubuluszelllinie), NIH3T3 (Fibroblastenzelllinie) gewonnen. Als Kontrollen wurden Pam3Cys und LPS verwendet. IL-6 wurde im Zellüberstand mittels ELISA gemessen. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte mit Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten, die jeweils in dreifacher Ausführung analysiert worden sind. * $p<0.05$ versus Wildtyp, ** $p<0.01$ versus Wildtyp.

Wie Abbildung 3.10 zeigt, können Myd88- und Tlr2-defiziente Mesangialzellen nicht durch die Stimulation mit Zellmedium nekrotischer Zellen aktiviert werden. Die Trif-defizienten primären Mesangialzellen zeigten im Vergleich zu den Wildtyp-pMC eine signifikant verminderte IL-6-Ausschüttung. Als Kontrolle der Zellviabilität diente die TLR-unabhängige Stimulation mit komplexierter Poly(I:C)-RNA.
Auch die Freisetzung des Chemokins CXCL9/MIG (Monokine Induced by Interferon-γ) zeigte eine MyD88-Abhängigkeit nach Stimulation mit Mediumüberständen nekrotischer NIH3T3-Fibroblasten. Jedoch konnte dieses Resultat nur nach Vorstimulation mit Interferon-γ und TNF-α gezeigt werden (siehe Abbildung 3.11). Ohne Vorstimulation konnte MIG in Mesangialzellüberständen nach Stimulation mit TLR-Liganden nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

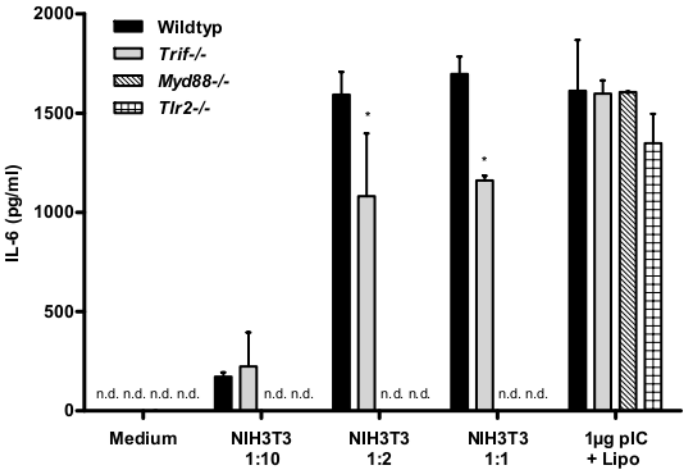

Abbildung 3.10: Stimulation primärer Mesangialzellen aus Wildtyp-, Trif-defizienten, Myd88-defizienten und Tlr2-defizienten Mäusen mit Mediumüberständen nekrotischer Zellen: Primäre Mesangialzellen wurden mit Mediumüberständen nekrotischer NIH3T3-Zellen im ansteigendem Verhältnis zu frischem Zellkulturmedium für 24 Stunden inkubiert. Als Kontrolle diente die Stimulation mit komplexierter Poly(I:C)-RNA (pIC). IL-6 wurde im Zellüberstand mittels ELISA gemessen. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte mit Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten, die jeweils in dreifacher Ausführung analysiert worden sind. Lipo = Lipofectamin2000 n.d. = nicht detektiert. * $p<0.05$ versus Wildtyp.

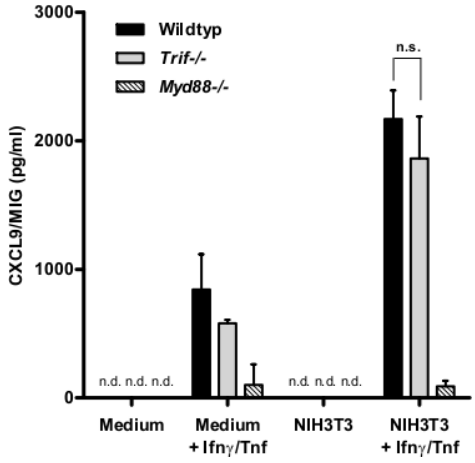

Abbildung 3.11: Nachweis der CXCL9/MIG-Freisetzung nach Stimulation mit Mediumüberständen nekrotischer Zellen: Stimulation primärer Mesangialzellen aus Wildtyp-, Trif- und Myd88-defizienten Mäusen mit Mediumüberständen nekrotischer NIH3T3-Zellen. Für die Vorstimulation wurden 300 U/ml IFN-γ und TNF-α verwendet. CXCL9/MIG wurde im Zellüberstand mittels ELISA gemessen. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte mit Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten, die jeweils in dreifacher Ausführung analysiert worden sind. n.d. = nicht detektiert.

3.3 Effekt der nephrotoxischen Serumnephritis in Trif- und Myd88-defizienten Mäusen

Bei dem Modell der nephrotoxischen Serumnephritis wird durch systemische Gabe von Antiserum gegen die glomeruläre Basalmembran eine mesangioproliferative Immunkomplex-Glomerulonephritis induziert. Vor dem Hintergrund der *in vitro* erhaltenen Ergebnisse sollte die *in vivo*-Relevanz der Signal-Adapterproteine TRIF und MyD88 untersucht werden.

3.3.1 Proteinurie

Die Proteinurie wurde aus wöchentlichen Urinproben bestimmt. Wildtyp-Mäuse zeigten nach Gabe des nephrotoxischen Serums eine progrediente Albuminurie im Verlauf von drei Wochen. Die Trif-defizienten Mäuse entwickelten eine den Wildtyptieren vergleichbare Proteinurie (Tag 14 und 21). Der anfänglich verzögerte Verlauf der Albuminurie (Tag 7) war nicht signifikant unterschiedlich. Im Gegensatz dazu konnte bei den Myd88-defizienten Mäusen in keiner der gewonnenen Urinproben Albumin nachgewiesen werden. Während Wildtyp- und Trif-defiziente Mäuse somit eine massive Proteinurie innerhalb von 21 Tagen entwickelten, blieben die Myd88-defizienten Tiere vollständig davor bewahrt.

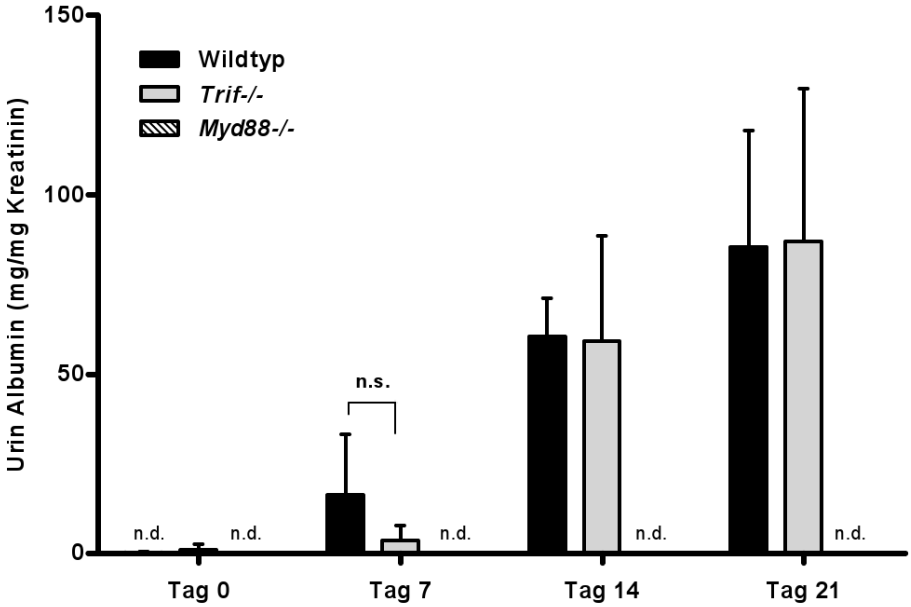

Abbildung 3.12: Proteinurie im Verlauf der experimentellen Immunkomplex-Glomerulonephritis: Urinalbumin/Kreatinin-Ratio wurde von den Mäusen am Tag 0, 7, 14 und 21 bestimmt. Pro Versuchsgruppe wurden je 10 Mäuse analysiert. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte mit Standardabweichung. n.d. = nicht detektiert, n.s. = nicht signifikant.

3.3.2 Serumchemie

Serum der behandelten Mäuse wurde am Tag 21 nach Gabe des nephrotoxischen Serum gewonnen und analysiert. Eine Hypalbuminämie und Hypercholesterinämie konnte in den Wildtyp-Mäusen festgestellt werden, was mit dem Ergebnis der Proteinurie übereinstimmte. Des Weiteren waren die Werte für Serum-Kreatinin und Harnstoff-N erhöht. Entsprechend den Proteinurie-Daten, zeigte die Laboranalyse der Serumproben keine signifikanten Unterschiede der Trif-defizienten Mäuse gegüber den Wildtyp-Tieren. Wie in Abbildung 3.13 erkennbar, konnte in den Trif-defizienten Mäusen ebenfalls eine Hypalbuminämie, Hypercholesterinämie, ein erhöhtes Serum-Kreatinin und erhöhter Harnstoff-N nachgewiesen werden. Im Unterschied dazu zeigte das Labor der Myd88-defizienten Mäuse analog zu den Proteinurie-Daten normale Werte.

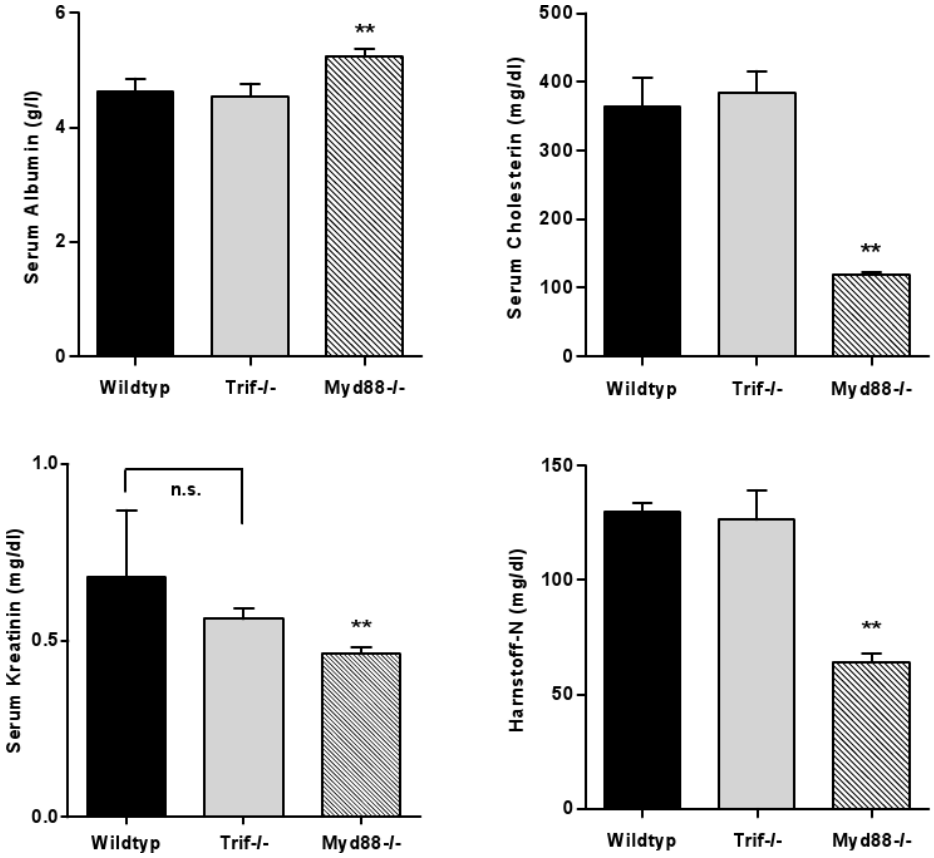

Abbildung 3.13: Serumchemie: 21 Tage nach Induktion der nephrotoxischen Serumnephritis wurde Serum gewonnen und Albumin, Cholesterin, Kreatinin und Harnstoff-N analysiert. Pro Versuchsgruppe wurden je 10 Mäuse analysiert. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte mit Standardabweichung. n.d. = nicht detektiert, n.s. = nicht signifikant. ** $p<0.01$ versus Wildtyp.

3.3.3 Nachweis von autologen Anti-Kaninchen-Immunglobulinen

Zur Induktion der nephrotoxischen Serumnephritis wurde ein im Kaninchen gewonnenes Serum appliziert, das gegen die glomeruläre Basalmembran gerichtet ist. Zusätzlich erfolgte 3 Tage vor Serumgabe eine Präimmunisierung mit Kanichen-IgG. Bei erfolgreicher Induktion der Nephrotoxischen Serum Nephritis bilden die Mäuse Antikörper gegen Kaninchen-Immunglobulin G. Diese zirkulierenden Antikörper wurden in den Serumproben am Tag 21 mittels ELISA in allen Versuchstieren nachgewiesen. Diese Daten bestätigen, dass in allen getesteten Tieren das NSN-Modell gleichermaßen induziert worden ist. Weder TRIF noch MyD88 scheinen somit eine Rolle bei der humoralen Immunantwort nach Gabe des nephrotoxischen Serums zu spielen. In den Kontrollmäusen (Wildtyp naiv) konnten hingegen keine Antikörper nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.14).

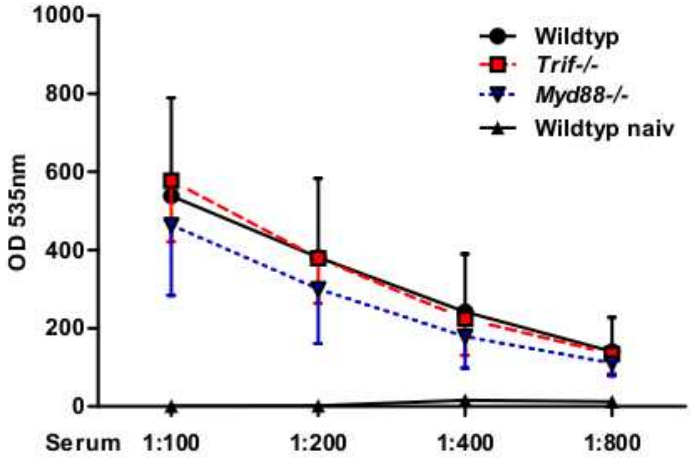

Abbildung 3.14: Nachweis autologer Immunglobulin G-Antikörper: Zirkulierende Anti-Kaninchen-IgG wurden im Serum 21 Tage nach Induktion der Nephrotoxischen Serum Nephritis mittels ELISA nachgewiesen. Die Serumwerte der Verdünnungsstufen wurden in arbiträren Einheiten angegeben. Pro Versuchsgruppe wurden je 10 Mäuse analysiert. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte mit Standardabweichung. OD = Optische Dichte.

3.3.4 T-Zell-Aktivierung

Um die zelluläre Immunantwort nach Gabe des nephrotoxischen Serums zu testen wurden Splenozyten am Tag 21 gewonnen und *in vitro* mit Kaninchen-Immunglobulin G restimuliert. Der Mediumüberstand wurde nach 72 Stunden mittels ELISA auf IFN-γ getestet und die Splenozyten mit Anti-CD69, einem Marker der T-Zell-Aktivierung gefärbt. Die Oberflächenexpression von CD69-positiven Splenozyten wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Zellen der Wildtyp-Mäuse produzierten spezifisch nach Kaninchen-IgG-Stimulation IFN-γ,

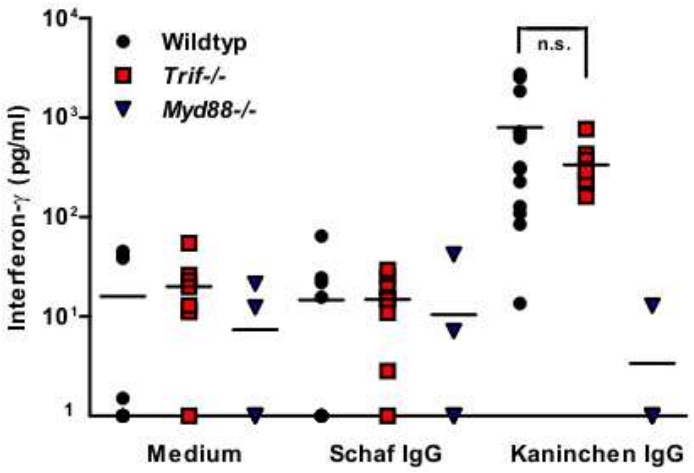

Abbildung 3.15: Nachweis der Interferon-γ-Freisetzung aus Splenozyten als Marker der T-Zell-Aktivierung: Splenozyten wurden 21 Tage nach Induktion der nephrotoxischen Serumnephritis gewonnen und mit Kaninchen-IgG für 72 Stunden restimuliert. Die spezifische T-Zell-Antwort gegen Kaninchen-IgG wurde durch Interferon-γ-Nachweis im Zellkulturmedium mittels ELISA nachgewiesen. Als Kontrolle diente die Stimulation mit Schaf-IgG. Pro Versuchsgruppe wurden je 10 Mäuse analysiert. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte mit Standardabweichung. n.s. = nicht signifikant.

während hingegen in Überständen nach Stimulation mit Schaf-Immunglobulin G sowie in der Mediumkontrolle kein IFN-γ nachweisbar war (siehe Abbildung 3.15). Zellen der Trif-defizienten Tiere zeigten eine den Wildtyp-Zellen vergleichbare IFN-γ-Ausschüttung, während hingegen in den Myd88-defizienten Splenozyten kein IFN-γ nachweisbar war. Analog zu den ELISA-Daten konnte in der FACS-Analyse eine vermehrte CD69-Expression der CD8-positiven T-Zellen nach Gabe von Kanichen-IgG gezeigt werden (siehe Abbildungen 3.16 und 3.17). Die Stimulation mit dem unspezifischen Schaf-IgG führte zu einer der Mediumkontrolle vergleichbaren CD69-Expression. In den restimulierten Splenozyten der behandelten Trif-Mäuse konnte eine T-Zell-Aktivierung verlgeichbar mit den Wildtyp-Zellen nachgewiesen werden. Splenozyten der behandelten Myd88-defizienten Tiere konnten hingegen nicht reaktiviert werden, was darauf hindeutet, dass MyD88 durch die fehlende T-Zell-Aktivierung in dem NSN-Modell eine wesentliche Bedeutung hat.

3.3.5 Nachweis der renalen Leukozyteninfiltration

Um renale Leukozyteninfiltrate bei der nephrotoxischen Serumnephritis besser quantifizieren zu können, wurde eine Oberflächenfärbung der Nierenzellen durchgeführt. Dazu wurde zunächst eine Einzelzellsuspension aus Nierengewebe der Mäuse mit induzierter Serum Nephrits gewonnen. Nach Färbung mit den Oberflächenmarkern für CD45, CD3, CD4, CD8 und F4/80 wurden die Nierenzellen mittels Durchflusszytometrie analysiert (siehe Abbildungen 3.18 und

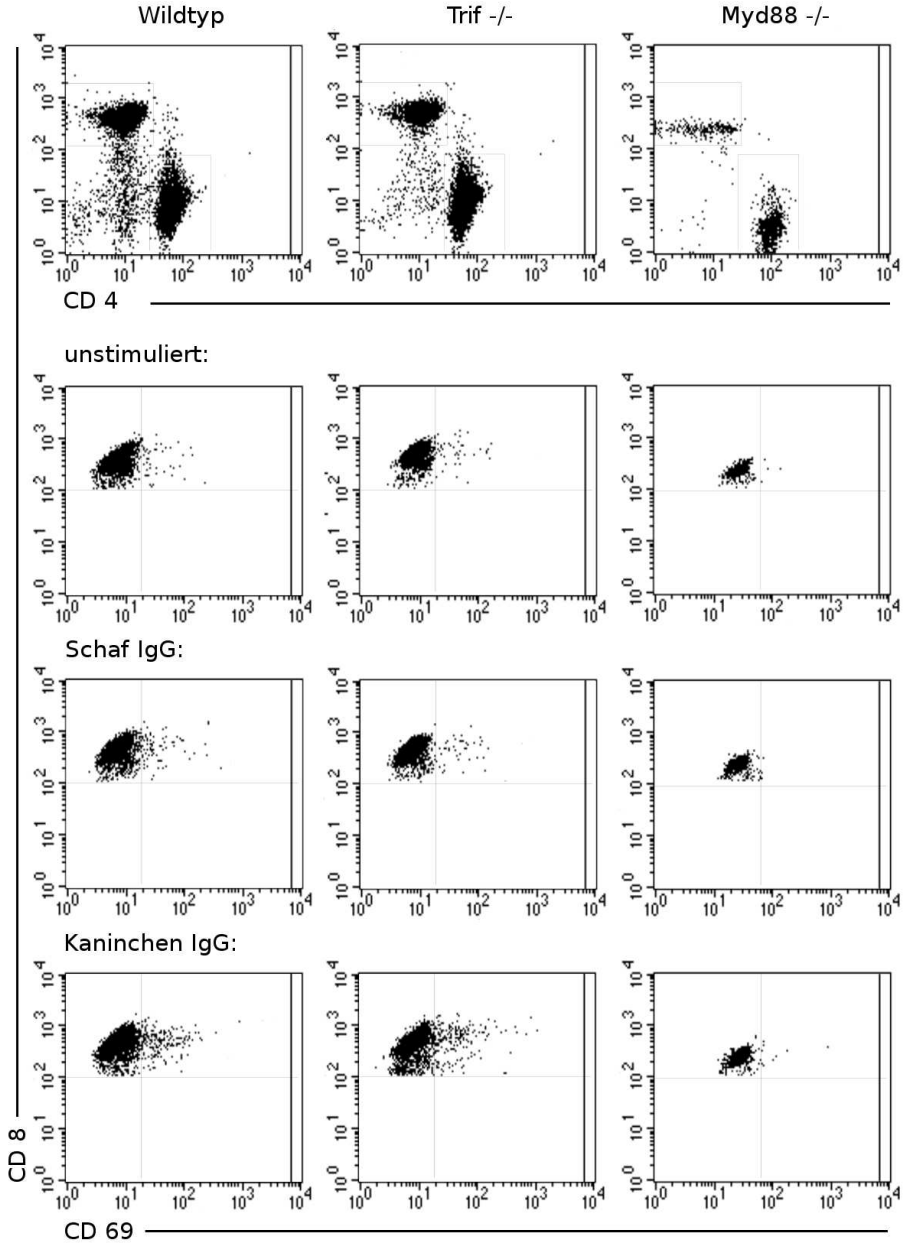

Abbildung 3.16: Nachweis der CD69-Expression auf CD8-positiven Splenozyten als Marker der T-Zell-Aktivierung: Splenozyten wurden 21 Tage nach Induktion der nephrotoxischen Serumnephritis gewonnen und mit Kaninchen-IgG für 72 Stunden restimuliert. Die spezifische T-Zell-Antwort gegen Kaninchen-IgG wurde durch $CD8^+CD69^+$-Zellen mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen. Als Kontrolle diente die Stimulation mit Schaf-IgG.

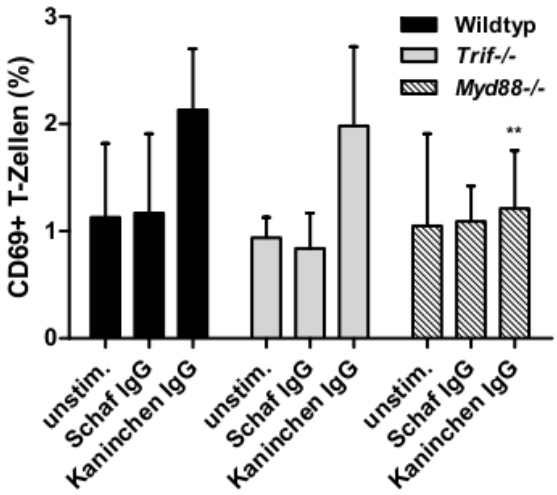

Abbildung 3.17: Auswertung der CD69-Expression auf CD8-positiven Splenozyten: Splenozyten wurden 21 Tage nach Induktion der nephrotoxischen Serumnephritis gewonnen und mit Kaninchen-IgG für 72 Stunden restimuliert. Die spezifische T-Zell-Antwort gegen Kaninchen-IgG wurde durch $CD8^+CD69^+$-Zellen mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen. Als Kontrolle diente die Stimulation mit Schaf-IgG. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung des prozentualen Anteils der $CD8^+CD69^+$-Zellen aus je 10 Tieren pro Versuchsgruppe. Pro Probe wurden 100.000 Events analysiert. ** $p<0.01$ versus Wildtyp.

3.19). In der FACS-Analyse wurden zunächst die CD45-positiven Zellen markiert, um das gesamte Leukozyteninfiltrat zu quantifizieren. Im Mittel wiesen die Wildtyp-Mäuse 13% CD45-positiven Zellen auf. In Trif-defizienten Tieren konnte 8% Leukozyteninfiltration der Nierenzellsuspension nachgewiesen werden. Dieser Unterschied war in der statistischen Analyse jedoch nicht signifikant. Hingegen wurde in Myd88-Knockout-Mäusen eine Leukozyteninfiltration von unter 5% nachgewiesen, welche im Vergleich mit den Wildtyp-Mäusen signifikant erniedrigt war. Die Auswertung der CD4- und CD8-T-Zellen ergaben jeweils einen Anteil von höchstens 2% der CD4-postiven Zellen und höchstens 1% der CD8-positiven Zellen der Gesamtnierenzellzahl. Hier konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchgruppen festgestellt werden. Für die Analyse der renalen Makrophagen-Infiltration wurden die Nierenzellsuspensionen mit F4/80- und CD45-Antikörpern gefärbt. In den Nieren der Wildtyp-Mäuse waren im Mittel 10% Makrophagen nachweisbar, während Trif-defiziente Mäuse einen Makrophagenanteil von 7% und die Myd88-defiziente Tiere von 2% aufwiesen. Ein signifikanter Unterschied in der Makrophageninfiltration konnte zwischen Wildtyp- und Trif-defizienten Mäusen nicht nachgewiesen werden. Dagegen war der renale Makrophagenanteil in den Myd88-defizienten Mäusen nach Induktion der nephrotoxischen Serumnephritis minimal und somit signifikant geringer im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen.

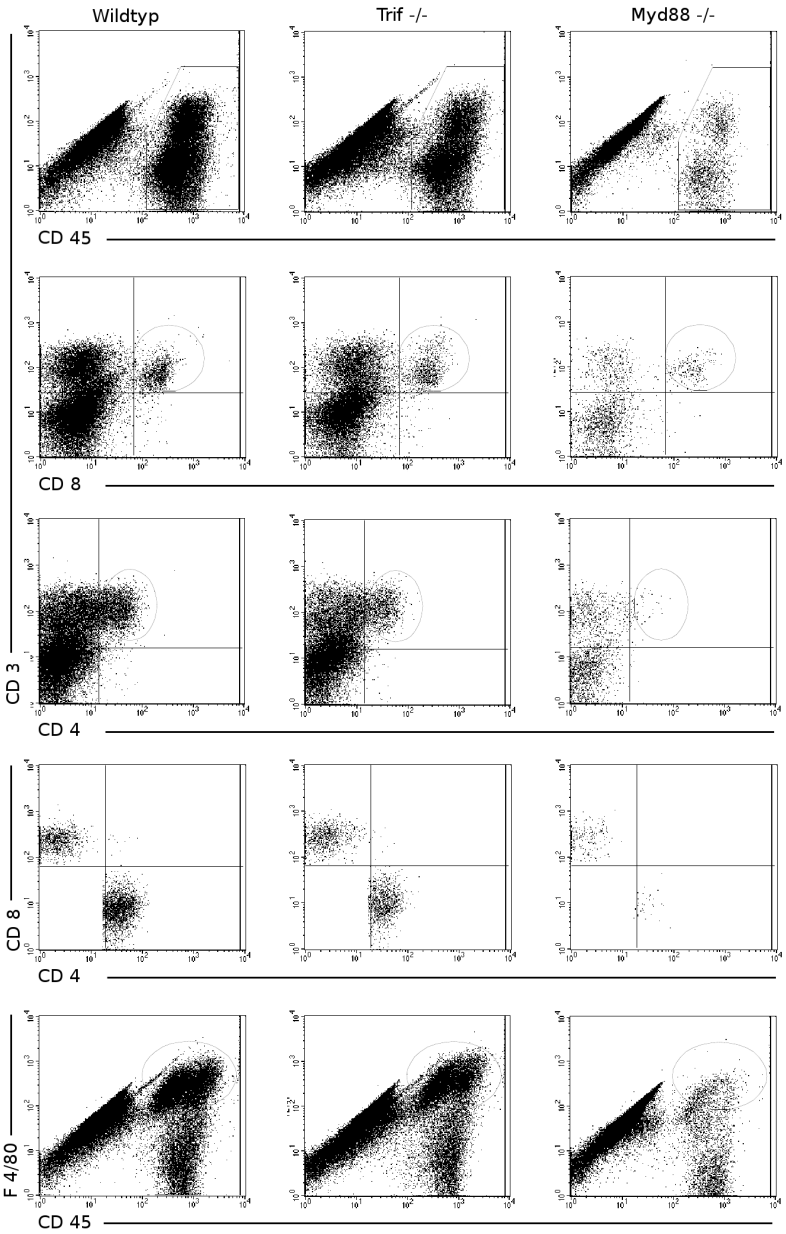

Abbildung 3.18: Nachweis der renalen Leukozyteninfiltration: Zum Nachweis der T-Zellen und Makrophagen in der Niere nach Induktion der nephrotoxischen Serumnephritis wurde eine Einzelzellsuspension aus Nierengewebe gewonnen und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Es wurden zunächst die $CD45^+$-Zellen markiert, um aus dieser Zellpopulation die $CD3^+CD4^+$ und die $CD3^+CD8^+$-Zellen darzustellen. In einer weiteren Analyse wurden die $CD45^+F4/80^+$-Makrophagen nachgewiesen.

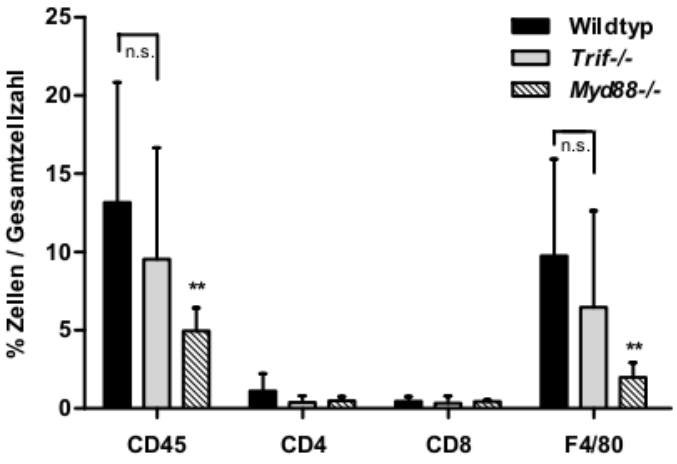

Abbildung 3.19: Auswertung der renalen Leukozyteninfiltration bei der nephrotoxischen Serumnephrits: prozentuale Verteilung der $CD45^+$-, $CD4^+$-, $CD8^+$- Zellen und $F4/80^+$-Makrophagen. Jeweils 10 Mäuse pro Versuchsgruppe wurden analysiert. Pro Probe wurden 100.000 Events gemessen. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte mit Standardabweichung. n.s. = nicht signifikant. ** $p<0.01$ versus Wildtyp.

3.3.6 Histologische Auswertung

Die histologische Aufbereitung erfolgte 21 Tage nach Gabe des nephrotoxischen Serums. Die Induktion der nephrotoxischen Serumnephritis führte in den Wildtyp-Mäusen zu einer mesangioproliferativen Glomerulonephritis mit Halbmondbildung. In der PAS-Färbung lassen sich glomeruläre und periglomeruläre Ablagerungen nachweisen. Zur Beurteilung der Leukozyten-Infiltration wurden immunhistologische Färbungen angefertigt, die jeweils Mac-2-positive Makrophagen oder CD3-positive T-Lymphozyten darstellten. Es fanden sich glomeruläre, periglomeruläre und diffus interstitielle Makrophagen-Infiltrate. T-Lymphozyten waren hauptsächlich periglomerulär im Bereich von Halbmonden sowie interstitiell lokalisiert. Eine Schädigung der Tubuli im Interstitium wird durch den Nachweis der Tubulusatrophie, intratubulärer Proteinablagerungen sowie einer diffuser interstitieller Fibrose deutlich. Die histologische Färbung der Nieren der Trif-defizienten Mäuse ergab keinen signifikanten Unterschied zu der Wildtyp-Kontrollgruppe. Im Gegensatz dazu waren die histologischen Schnitte der Myd88-defizienten Tiere unauffällig. Somit waren die morphologischen Merkmale der Wildtyp- und Knockout-Mäuse mit den funktionellen Befunden in der Serumchemie und der Proteinurie konsistent. Wildtyp- und Trif-defiziente Mäuse entwickelten eine histologisch und klinisch nachweisbare Glomerulonephritis, während in Myd88-defizienten Mäuse keine glomeruläre Schädigungen nachweisbar waren. In der IgG-Färbung ist eine deutliche Ablagerung der Immunglobuline entlang der glomerulären Basalmembran sichtbar. Dies zeigt, dass in allen 3 Versuchsgruppen das nephrotoxische Serum gleichermaßen gegen die glomeruläre Basalmembran gerichtet ist.

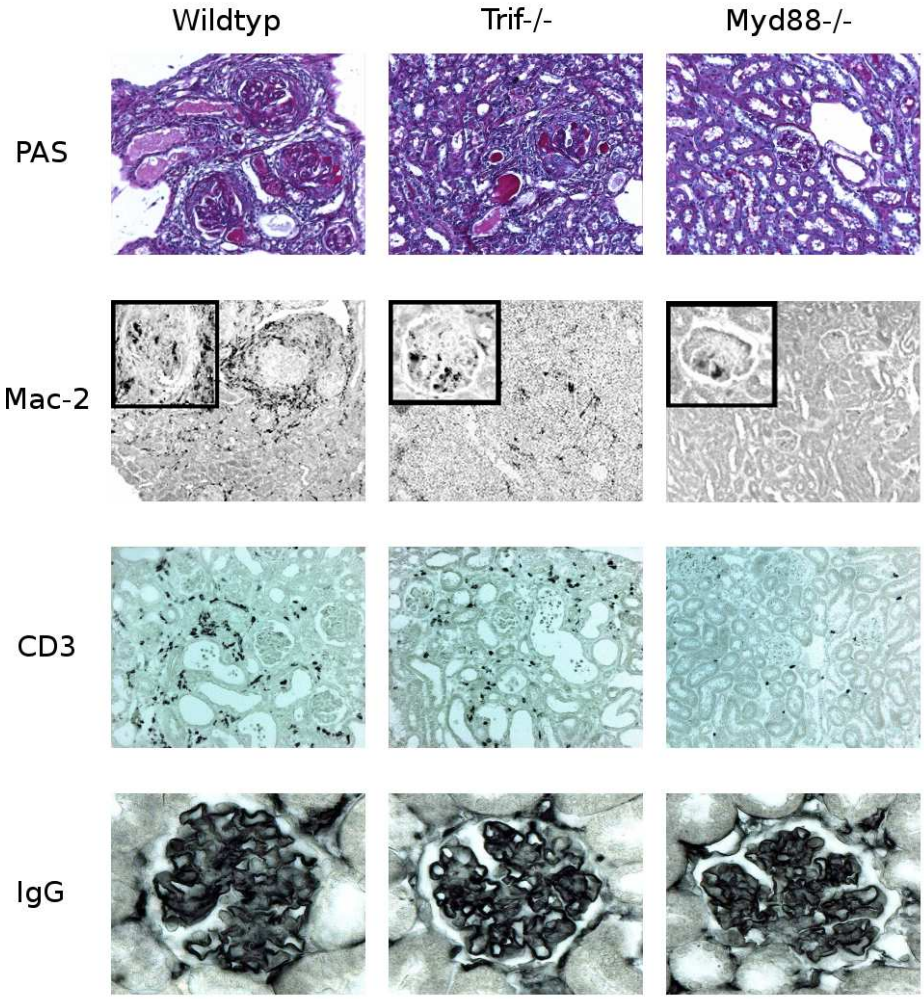

Abbildung 3.20: Histologie der nephrotoxischen Serumnephritis: Nieren wurden am Tag 21 nach Induktion der nephrotoxischen Serumnephritis in Formaldehyd fixiert und histologisch aufbereitet. Es wurden von jedem Tier jeweils eine *Periodic Acid Schiff* (PAS)-Färbung, Mac-2-Färbung, CD3-Färbung und IgG-Färbung durchgeführt. Gezeigt werden repräsentative Bilder jeder Versuchsgruppe (n=10 pro Gruppe).

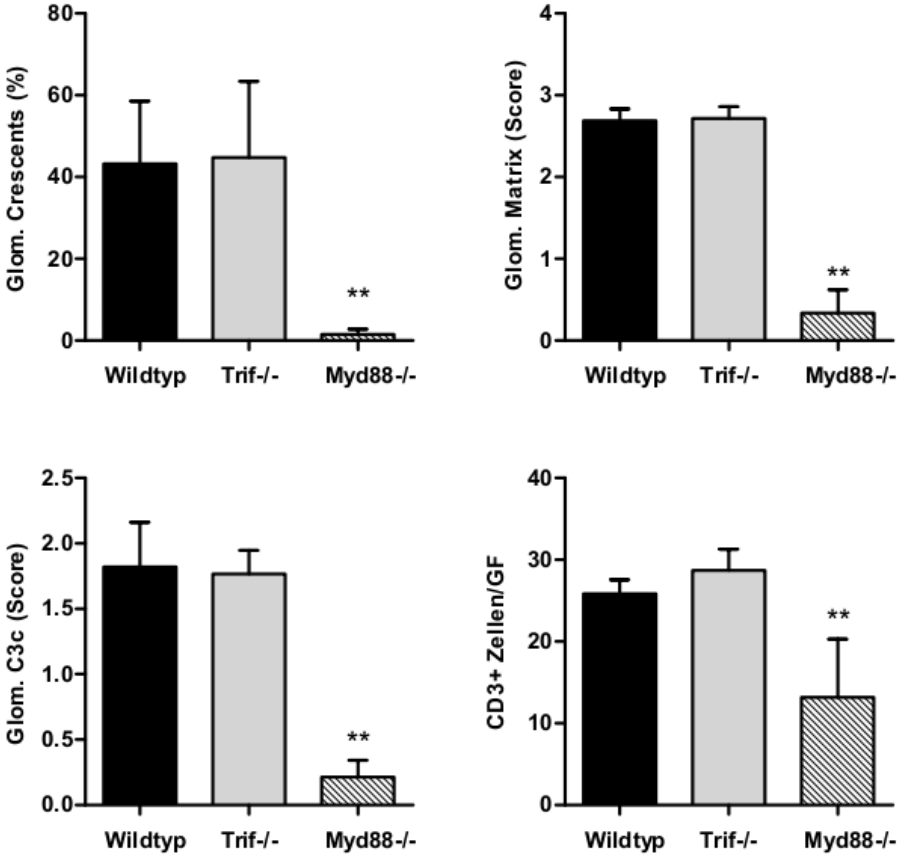

Abbildung 3.21: Histologie-Auswertung: Die Nierenschnitte geben den Tag 21 nach Induktion der nephrotoxischen Serumnephritis wieder. In der *Periodic Acid Schiff* (PAS)-Färbung wurde der prozentuale Anteil glomerulärer Crescents aller Versuchstiere evaluiert. Das Ausmaß der glomerulären Matrixablagerungen wurde durch einen semiquantitativen Score (0-3) aus 50 Glomeruli pro Schnitt bestimmt. Glomeruläre C3c Ablagerungen wurden durch einen semiquantitativen Score (0-3) aus 50 Glomeruli pro Schnitt analysiert. Renale T-Zell-Infiltrate wurden mittels CD3-Färbung nachgewiesen und im Gesichtsfeld bei größter Auflösung quantifiziert. Pro Versuchsgruppe wurden je 10 Mäuse analysiert. ** $p<0.01$ versus Wildtyp. GF = Gesichtsfeld.

4 Diskussion

4.1 Übersicht über die experimentellen Befunde

Die Analyse der Toll-like- und Rig I-like Rezeptor-Expression muriner glomerulärer Mesangialzellen zeigte eine deutliche Expression der Toll-like Rezeptoren 2, 3 und 4 sowie von MDA-5 und RIG-I. *In vitro*-Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen ergab eine signifikante Hochregulation von TLR3 und RIG-I.
Funktionelle Untersuchungen bestätigten, dass Mesangialzellen durch die TLR-Liganden Pam3Cys, Poly(I:C), und LPS entsprechend ihrer Rezeptorexpression aktiviert werden konnten.
Ebenso war es möglich, kultivierte Mesangialzellen durch apoptotische oder nekrotische Zellen oder deren Zellmaterial zu stimulieren.
Ausgehend von der Hypothese, dass bestimmte Moleküle aus sterbenden Zellen freigesetzt werden, die über die Aktivierung von Mesangialzellen an der Pathogenese der Immunkomplex-Glomerulonephritis beteiligt sind, sollte im zweiten Teil dieser Arbeit daher die Rolle von endogenen Liganden oder auch „Danger"-Molekülen *in vivo* untersucht und die zugrunde liegenden Mechanismen skizziert werden.
Bei dem Modell der nephrotoxischen Serumnephritis geht man von einer durch Antikörper-vermittelten „sterilen„ Inflammation aus. Während der Entzündungsphase können so genannte Danger-Moleküle freigesetzt werden und intrinsische renale Zellen wie beispielsweise Mesangialzellen über Toll-like Rezeptoren aktivieren.
Hierbei zeigten sich unterschiedliche Effekte im Modell der nephrotoxischen Serumnephritis in Knockout-Mäusen der TLR-Adaptermoleküle TRIF und MyD88. So wiesen Trif-defiziente Tiere nach der Induktion der nephrotoxischen Serumnephritis eine dem Wildtyp vergleichbare Glomerulonephritis auf. Im Gegensatz dazu konnte durch Unterbrechung der MyD88-vermittelten TLR-Signalkaskade die Induktion der Glomerulonephritis vollständig verhindert werden.

4.2 Interpretation der Ergebnisse im Vergleich mit der Literatur

4.2.1 Bedeutung der Pathogen-Erkennungsrezeptoren in Mesangialzellen

Die glomerulären Mesangialzellen sind während des glomerulären Filtrationsprozess ständig zirkulierenden Mikro- und Makromolekülen mit pathogenen und nicht

pathogenen Eigenschaften ausgesetzt. Die Immunantwort, die ein solches Molekül auslöst, wird durch die Reaktionsmöglichkeiten der Zelle bestimmt, die mit dem korrespondierenden Erkennungsmechanismus ausgestattet ist. Daher ist die genaue Charakterisierung der Expressionsverteilung der Pathogen-Erkennungsrezeptoren auf Zellen essentiell für das Verständnis der Pathogen-Wirt-Interaktion und die darauf folgende Immunantwort. Die Kenntnis der Expressionsanalyse unterschiedlicher Pathogen-Erkennungsrezeptoren lässt Rückschlüsse auf die Funktion und mögliche Stellung einer Zelle in physiologischen und pathophysiologischen Prozessen zu. Da die Familie der Toll-like Rezeptoren unter den Pathogen-Erkennungsrezeptoren eine zentrale Rolle einnimmt, ist die Verteilung ihrer Rezeptoren von großem Interesse für die Beantwortung immunologischer Fragestellungen. Schwerpunkt dieser Arbeit war die Untersuchung der glomerulären Mesangialzellen und ihre immunologische Bedeutung bei der Glomerulonephritis.
Ergebnissen dieser Arbeit zufolge zeigen die primären Mesangialzellen eine distinkte Expression der Toll-like-Rezeptoren 2, 3, 4 und in geringerer Ausprägung der Toll-like Rezeptoren 1, 5, 6 und 11, während die Toll-like Rezeptoren 7 und 9 nicht nachgewiesen werden konnten. Dies steht im Einklang mit Expressionsanalysen anderer renaler nicht-Immunzellen, die ebenfalls TLR7 und TLR9 nicht exprimieren. Zu diesen intrinsischen renalen Zellen gehören neben den Mesangialzellen die Tubulusepithelzellen, Podozyten, glomeruläre Endothelzellen und intrarenale Fibroblasten.
Im Gegensatz dazu exprimieren (intrarenale) Antigen-präsentierende Zellen wie Dendritische Zellen und Makrophagen zusätzlich TLR7 und 9 (siehe Abbildung 4.1)[159]. Es scheint somit, dass die intrinsischen renalen Zellen bei der Erkennung von Einzelstrang-RNA aus Viren und CpG-DNA aus Viren und Bakterien keine wesentliche Bedeutung haben. Von den Toll-like Rezeptoren kann demnach nur Toll-like Rezeptor 3 Nukleinsäuren (dsRNA) erkennen und eine entsprechende Signalkaskade aktivieren. Mit der Endeckung der Toll-like Rezeptor-unabhängigen RNA-Helikasen wurden alternative Erkennungsmechanismen für Doppelstrang-RNA aufgedeckt [113].
In dieser Arbeit wird zum ersten Mal gezeigt, dass neben den Toll-like Rezeptoren als Pathogen-Erkennungsrezeptoren auch die RNA-Helikasen MDA-5 und RIG-I auf Mesangialzellen exprimiert werden. Somit existieren auch TLR-unabhängige Erkennungsmechanismen und Signalwege in glomerulären Mesangialzellen. Ob diese RIG-like Rezeptoren und auch die Nod-like Rezeptoren auf anderen intrinsischen Nierenzellen exprimiert sind, wurde bislang noch nicht untersucht.
Toll-like Rezeptor 3 ist somit nicht der einzige Rezeptor auf Mesangialzellen, welcher Doppelstrang-RNA erkennt. Daher müssen frühere Arbeiten zu TLR3 kritisch beurteilt werden, die zeigten, dass virale Doppelstrang-RNA TLR3/TRIF-abhängig humane und murine Mesangialzellen dazu veranlassen, Interleukin-6 und CCL2 *in vitro* und *in vivo* zu produzieren [150][148].
Kumar et al. untersuchten die Wirkung von Poly(I:C)-Injektionen in Wildtyp-, Trif-defizienten und Ips-1-defizienten Mäusen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die nach Poly(I:C)-Gabe erhöhte Antigen-spezifische Antikörperproduktion

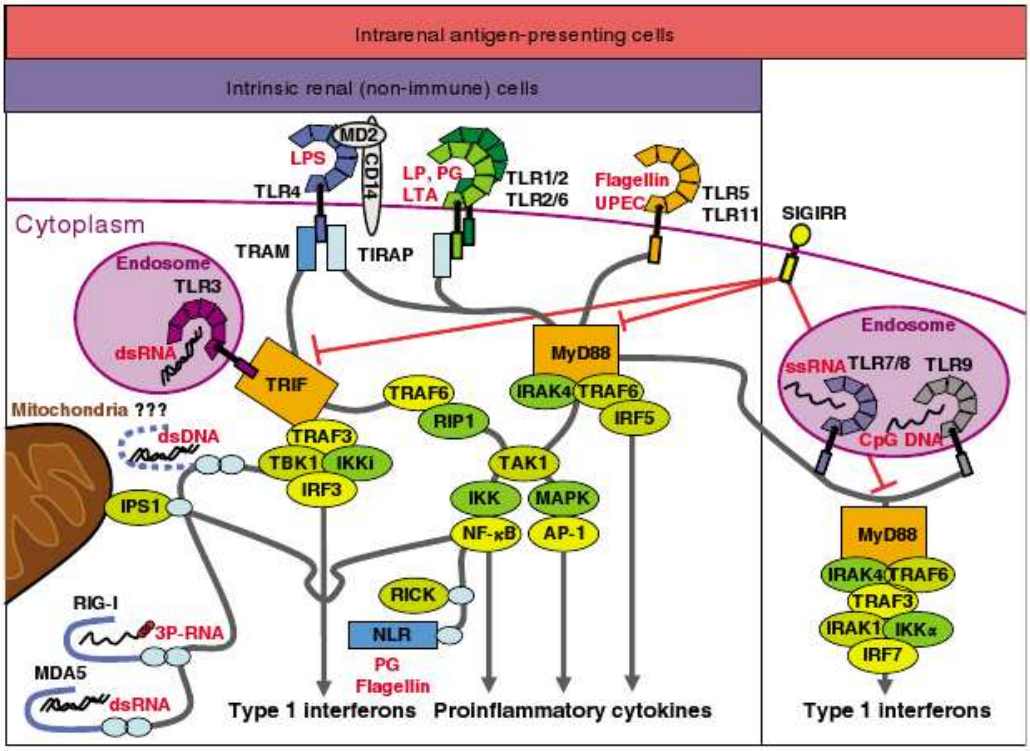

Abbildung 4.1: Expression der Pathogen-Erkennungsrezeptoren in der Niere: renale Immun- und nicht-Immunzellen verfügen über verschiedene Expressionsprofile [159]. Der Hauptunterschied besteht darin, dass (intrarenale) Immunzellen im Gegensatz zu den intrinsischen renalen Zellen Toll-like Rezeptor 7 und Toll-like Rezeptor 9 exprimieren.

vor allem in Ips-1-defizienten Mäusen vermindert war, während Trif-defiziente Mäuse unbeeinflusst blieben. Trif/Ips-1-Doppel-Knockout-Mäuse zeigten dagegen einen vollständigen Ausfall der Antikörperproduktion. Ebenso zeigte die Analyse der $CD8^+$-T-Zellen eine Reduktion sowohl in den Trif-defizienten als auch Ips-1-defizienten Mäusen, während in der Doppel-Knockout-Maus die $CD8^+$-T-Zell-Expansion vollständig aufgehoben war. Die Autoren folgerten, dass eine Kooperation von Toll-like Rezeptor 3 mit den TLR-unabhängigen zytoplasmatischen RNA-Helikase bei der Erkennung von Doppelstrang-RNA vorhanden zu sein scheint [160].
Interessanterweise wurden nur die dsRNA-Rezeptoren, d.h. Toll-like Rezeptor 3, MDA-5 und RIG-I durch Gabe von Interferon-γ und TNF-α in ihrer Expression hochreguliert, während Toll-like Rezeptor 2 und 4 unbeeinflusst blieben. Dies lässt darauf schliessen, dass renale Mesangialzellen durch systemische Entzüdnungsprozesse aktiviert werden können und durch Hochregulation der dsRNA-Rezeptoren sensitiver gegen virale Moleküle reagieren.
Die Stimulationexperimente mit primären Mesangialzellen mit Toll-like Rezeptor 2-Liganden Pam3Cys zeigten eine dem TLR-Expressionsprofil entsprechende IL-6-Antwort, die durch Vorstimulation mit Interferon-γ und TNF-α unbeeinflusst

blieb. In den Myd88-defizienten und Tlr2-defizienten Mesangialzellen konnte entsprechend der TLR-Signalkaskade keine IL-6-Ausschüttung ausglöst werden. Dagegen war die IL-6-Antwort in Mesangialzellen nach LPS-Stimulation in Trif-defizienten Mesangialzellen vermindert und blieb in Myd88-defizienten Zellen vollständig aus. Dies lässt sich durch unterschiedliche Signalwege von TLR4 erklären, die in Mesangialzellen nach LPS-Stimulation teilweise TRIF-abhängig und vollständig MyD88-abhängig zu sein scheinen.
Durch Stimulationsversuche mit Trif-defizienten Mesangialzellen konnte in dieser Arbeit erstmals eine sowohl TLR3/TRIF-abhängige als auch TLR3/TRIF-unabhängige Erkennung viraler Doppelstrang-RNA nachgewiesen werden. Studien mit Tlr3-defizienten Mäusen ergaben eine TLR3-abhängige Alteration der Zytokin- und Chemokin-Produktion nach Gabe von Poly(I:C) und nach Infektion mit West Nile Virus und Respiratory Syncytial Virus [79] [80] [161]. So konnte, wie auch schon in früheren Arbeiten beschrieben, die Stimulation mit Poly(I:C) eine IL-6-Ausschüttung in Mesangialzellen bewirken [150] [148].
Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass die externe Poly(I:C)-Stimulation auf einer TLR3/TRIF-abhängigen Aktivierung der Mesangialzellen beruht. Bei Komplexierung der Poly(I:C)-RNA mit kationischen Lipiden, welche eine zytosolische Stimulation bewirkt, konnte eine TLR3/TRIF-unabhängige Aktivierung der Mesangialzellen festgestellt werden. Trif-defiziente Mesangialzellen reagierten auf Stimulation komplexierter dsRNA gleichermaßen wie Wildtyp-Mesangialzellen. Dieses Phänomen lässt sich durch die Expression der zytosolischen RNA-Helikasen RIG-I und MDA-5 in Mesangialzellen erklären. Diese Rezeptoren erkennen TLR-unabhängig Doppelstrang-RNA verschiedener Viren und sind somit für die antivirale Immunantwort von Bedeutung.
So wurde in verschiedenen Arbeiten gezeigt, dass RIG-I bei der Abwehr von Paramyxoviren, Influenza-Viren, des *Vesicular Stomatitis*-Virus, Ebola-Virus und Epstein-Barr-Virus eine wesentliche Rolle spielt, während MDA-5 an der Immunreaktion nach Infektion mit Picornaviren, wie dem Enzephalo-Myokarditis-Virus oder dem Theiler-Virus beteiligt ist [162]. Einige Viren scheinen sowohl über RIG-I als auch MDA-5 eine Immunantwort zu initiieren. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass das Orthoreovirus und Flaviviren wie Dengue und West Nile Virus von beiden RNA-Helikasen erkannt werden [163].
Kato et al. zeigten, dass Poly(I:C) komplexiert mit kationischen Lipiden MDA-5-abhängig eine Ausschüttung von Typ I-Interferonen in Maus-Embryo-Fibroblasten (MEF) bewirkt [113]. Dagegen scheint das 5'-Triphosphat-Ende viraler Einzel- und Doppelstrang-RNA eine wesentliche Rolle bei der Aktivierung von RIG-I zu spielen [103]. Stimulation mit komplexierter 5'-Triphosphat-RNA (3P-RNA) führte in den Mesangialzellen TLR-unabhängig zu einer deutlichen Ausschüttung von IL-6.
Neben der IL-6-Ausschüttung wurde auch die Zellproliferation der Mesangialzellen nach Stimulation mit TLR-Liganden untersucht. Ergebnissen dieser Arbeit zufolge führte die Stimulation von TLR2 und TLR4 zu einer verstärkten Proliferation der Mesangialzellen. Bakterielle Infektionen können somit neben Wachstumfaktoren und

proinflammatorischen Zytokinen die Proliferation der Mesangialzellen im Mesangium beeinflussen und so zur Progression einer bestehenden Glomerulonephritis beitragen. Dagegen führte die Stimulation mit viraler Doppelstrang-RNA zu einer verminderten Zellaktivität. Dies lässt sich am wahrscheinlichsten durch Apoptose erklären. Auch in früheren Arbeiten mit humanen Mesangialzellen konnte gezeigt werden, dass Poly(I:C) Apoptose in Mesangialzellen induziert [150]. Diese Apoptose-induzierende Wirkung von Poly(I:C) konnte beispielsweise auch in β-Zellen des Pankreas beobachtet werden. Rasscheart et al. zeigten, dass Poly(I:C) synergistisch mit IFN-γ zu einer deutlich erhöhten Apoptoserate in β-Zellen führten [164]. Ebenso konnte durch systemische Poly(I:C)-Gabe eine Insulitis mit subsequenten Typ-1-Diabetes in BALB/c-Mäusen ausgelöst werden [165].
Somit könnte die Anwesenheit von Doppelstrang-RNA im Glomerulus zu lokalem Zelltod führen und auf diese Weise eine Immunreaktion auslösen.

4.2.2 Bedeutung endogener Liganden bei der Toll-like Rezeptor-abhängigen inflammatorischen Aktivierung glomerulärer Mesangialzellen

Ein seit langem kontrovers diskutiertes Thema der Immunologie beschäftigt sich mit der Frage, wie Zelltod unser Immunsystem zu einer Abwehrreaktion aktivieren kann. Die These, dass eine solche sterile Inflammation existiert, wurde erstmals von Polly Matzinger 1994 aufgestellt. Seither sind zahlreiche Publikationen zu diesem Thema erschienen. Die in dieser Arbeit gezeigten Daten liefern erstmalig Belege, dass apoptotisches und nekrotisches Zellmaterial in Mesangialzellen eine Immunantwort in Form einer IL-6-Produktion initiieren. Endogene Liganden werden überwiegend durch sterbende Zellen freigesetzt und können sowohl TLR-abhängig als auch TLR-unabhängig zu einer Immunantwort führen. In der vorliegenden Arbeit wurden die TLR-abhängigen Stimuli sterbender Zellen untersucht.

Effekt apoptotischer Zell-Stimulation in Mesangialzellen In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass apoptotische Zellen TLR2/MyD88-abhängig Mesangialzellen stimulieren, während Trif-defiziente Zellen eine verminderte, jedoch nicht-signifikante IL-6-Produktion aufwiesen. Erst die Extraktion der Gesamt-RNA aus apoptotischen Zellen konnte eine TLR3/TRIF-Abhängigkeit der IL-6-Ausschüttung in den Mesangialzellen nachweisen. Demnach scheint endogene RNA Mesangialzellen stimulieren und eine Immunreaktion im Glomerulus bewirken zu können. Dies steht im Einklang mit bisherigen Veröffentlichungen, in denen RNA aus totem Zellmaterial als endogener Ligand für TLR3 postuliert wurde.
So zeigte Kariko et al., dass *in vitro* -transkribierte mRNA TLR3-abhängig 293-Zellen stimuliert. Zudem konnte in dieser Arbeit auch eine Reifung und Zytokin-Ausschüttung von Dendritischen Zellen nach Stimulation mit nekrotischen Zellen nachgewiesen werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Nukleinsäuren der nekrotischen Zellsuspension für die Stimulation der Dendritischen Zellen

eine wesentliche Rolle spielen. So führte die Vorbehandlung der nekrotischen Zellsuspension mit der unspezifischen Nuklease Benzonase zu einer Verminderung der Zytokin-Produktion und DC-Reifung [125].
Brentano et al. wiesen eine TLR3-abhängige Aktivierung synovialer Fibroblasten durch RNA nekrotischer Zellen nach. Von Patienten mit Rheumatoider Arthritis wurden nekrotische Synovia-Zellen gewonnen und mit synovialen Fibroblasten koinkubiert. Die Stimulation durch Benzonase- und Hydroxychloroquin-vorbehandelter nekrotischer Zellen führte in den Fibroblasten jeweils zu einer verminderten Zytokinausschüttung im Vergleich zu nicht-behandelten nekrotischen Zellen. Daraus folgerten die Autoren, dass Nukleinsäuren aus nekrotischem Zellmaterial synoviale Fibroblasten von Patienten mit Rheumatoider Arthritis (RASF) stimulieren können. Hydroxychloroquin hemmt die endosomale Azidifikation, so dass endosomale Rezeptoren wie TLR3, 7, 8 und 9 nicht mehr aktiviert werden können. Da RASF (wie auch Mesangialzellen) TLR7, 8 und 9 nicht exprimieren, wurde mit der Chloroquin-Gabe nur TLR3 inhibiert und somit eine TLR3-abhängige Aktivierung der Fibroblasten durch nekrotisches Zellmaterial postuliert [126].
Ebenso konnte gezeigt werden, dass nekrotische neuronale Zellen eine Immunanwort in Schwann-Zellen via TLR2 und TLR3 hervorrufen [166].
In einer kürzlich erschienenen Veröffentlichung konnte gezeigt werden, dass TLR3-defiziente Makrophagen eine verminderte Zytokin- und Chemokin-Ausschüttung nach Stimulation mit nekrotischen Neutrophilen aufweisen. Ein Verdau der nekrotischen Zellsuspension mit RNase und Benzonase führte zu einer Verminderung der Zytokin-Produktion in den Wildtyp-Makrophagen. Zusätzlich konnte die Chemokin-Produktion in Wildtyp-Makrophagen nach Stimulation nekrotischer Neutrophiler durch TLR3-Antikörper signifikant reduziert werden [167].
Im Vergleich zu den TLR-Liganden induzierten apoptotische Thymozyten eine relativ geringe IL-6-Antwort in Mesangialzellen. Diese konnte auch nur durch eine (unphysiologisch) hohe Zahl apoptotischer Zellen erreicht werden. Es kann daher nicht differenziert werden, ob nun apoptotische oder sekundär nekrotische Zellen die Mesangialzellen aktivierten.
Zellen können durch unterschiedlichste Mechanismen sterben. Die 2 Haupttypen des Zelltodes sind dabei Nekrose und Apoptose. Nekrotischer Zelltod resultiert meist aus pathologischen Prozessen der Zellschädigung, wie beispielsweise nach Trauma, Ischämie oder durch toxische Substanzen. Die Nekrose ist dabei durch das Anschwellen der Zellen und anschließendem Verlust der Membranintegrität gekennzeichnet. Dagegen ist Apoptose ein geplanter Prozess, der normalerweise physiologisch vorkommt, wie zum Beispiel während Entwicklungsprozessen. Morphologisch sind apoptotische Zellen durch Zellschrumpfung gekennzeichnet und bewahren initial ihre Zellintegrität. Die Immunantwort auf diese zwei Formen des Zelltodes sind daher verschieden (siehe Abbildung 4.2) [168]. Nekrotischer Zelltod stimuliert eine Immunreaktion, während hingegen apoptotische Zellen in der Regel keine Immunantwort hervorrufen. Dies trifft zum Beispiel auf die Entwicklung der T-Zellen im Thymus zu. Zudem bewahren apoptotische Zellen ihre Membranintegrität

und setzen nicht wie nekrotische Zellen intrazelluläre Moleküle frei. Sie werden durch residente Makrophagen phagozytiert und somit effizient weggeräumt. Des Weiteren wurde gezeigt, dass apoptotische Zellen Makrophagen zu einer IL-10- und TGF-β-Ausschüttung stimulieren, was zu einer Unterdrückung der Immunreaktion führt [169].
Nach Polly Matzinger ist dieser Unterschied der Immunreaktion auf die zwei Formen des Zelltods dadurch begründet, dass nekrotischer Zelltod nur nach unphysiologischen, d.h. nach pathologischen Situationen auftritt und somit eine Gefahr für den Organismus bedeutet, während apoptotischer Zelltod meist physiologischer Natur ist und damit keine akute Bedrohung darstellt [122]. Eine schnelle Immunreaktion ist daher von Bedeutung, wenn sich nekrotischer Zelltod ereignet, um den Organismus in seiner Integrität zu bewahren. Unter bestimmten Umständen kann aber auch Apoptose zu einem inflammatorischen Prozess führen. So zeigten Faouzi et al., dass die systemische Gabe von FAS-Antikörpern zu einer FAS-induzierten Apoptose in der Leber und einer subsequenten starken Immunantwort führte. Diese Immunreaktion konnte durch Hemmung der Apoptose inhibiert werden [170].
Warum letztlich Apoptose in manchen Fällen zu einer Immunreaktion führt und in anderen Situationen nicht, bleibt ungeklärt. Ein wesentlicher Faktor scheint die Schnelligkeit und Effizienz der phagozytierenden Zellen zu sein, die apoptotische Zellen beseite räumen und so vor einer sekundären Nekrose bewahren [171]. Ist die Phagozytose nicht gewährleistet, werden potentielle intrazelluläre Immunstimuli freigesetzt. Dies könnte unter Umständen für den Organismus aber auch von Vorteil sein, wenn Apoptose beispielsweise bei pathologischen Prozessen wie (Virus-)Infektionen auftritt [172].

Nekrotische Zellkomponenten aktivieren Mesangialzellen via TLR2/MyD88

Glomerulonephritiden gehen häufig mit fokalen glomerulären Nekrosen einher. Glomeruläre Mesangialzellen treten somit in Kontakt mit nekrotischem Zellmaterial. Nekrotischer Zelltod ist durch den Verlust der Membranintegrität und damit durch die Freisetzung intrazellulärer Bestandteile charakterisiert. In verschiedenen Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass nekrotische Zellen das angeborene Immunsystem aktivieren, indem freigesetzte intrazelluläre Moleküle an *Pattern-Recognition*-Rezeptoren auf Dendritischen Zellen binden und diese daraufhin zu immunstimulatorischen Zellen reifen [121]. Die Mechanismen wurden in dieser Arbeit an glomerulären Mesangialzellen untersucht. *In vitro* wurden die Mesangialzellen mit nekrotischem Zellmaterial verschiedener Zellen stimuliert. Dies führte zu einer starken IL-6- und CXCL9/MIG-Freisetzung der Mesangialzellen. Für CXCL9/MIG wurde in einer kürzlich erschienenen Veröffentlichung gezeigt, dass es wesentlich an der Pathogenese einer Immunkomplex-Glomerulonephritis beteiligt ist [173].
Es wird davon ausgegangen, dass Nekrose mit einem Entzündungszustand in den Glomeruli vergesellschaftet ist und somit proinflammatorische Zytokine präsent sind. Ein Dosis-abhängiger synergistischer Effekt der IL-6-Ausschüttung konnte daher

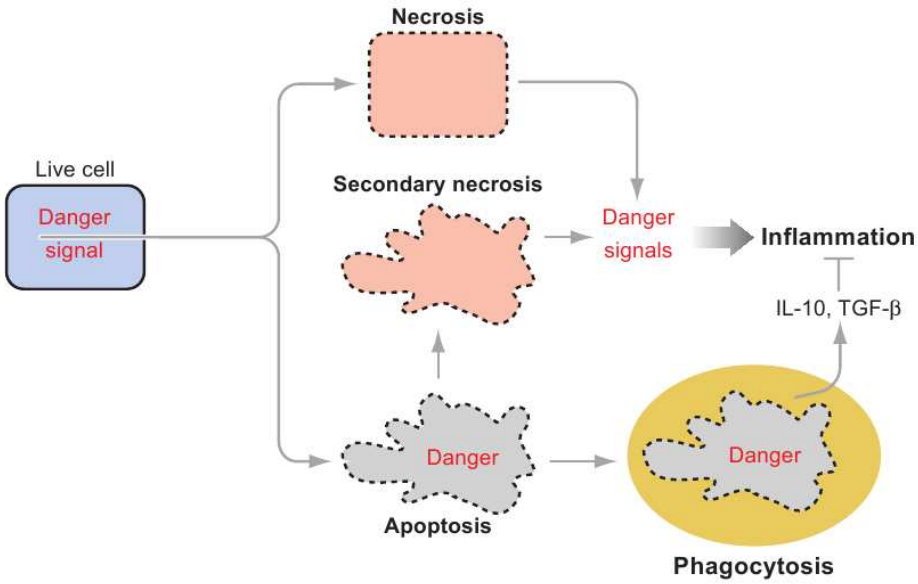

Abbildung 4.2: Mechanismus der sterilen Inflammation: Unterscheidung zwischen lebenden, nekrotischen und apoptotischen Zellen. Lebende Zellen beinhalten *Danger*-Signale, die erst durch Verlust der Membranintegrität freigesetzt werden und so eine Entzündungsreaktion auslösen können. Apoptotische Zellen bewahren dagegen ihre Zellintegrität und werden in der Regel durch Phagozytose abgeräumt. Intrazelluläre Bestandteile werden nicht freigesetzt und es kommt zu keiner Immunreaktion. Werden die apoptotischen Zellen jedoch nicht schnell genug phagozytiert, werden sie sekundär nekrotisch und verlieren ihre Membranintegrität. Dies führt durch Freisetzung endogener *Danger*-Moleküle zu einer Immunrantwort [168].

durch Vorstimulation mit proinflammatorischen Zytokinen nachgewiesen werden. Um die TLR-abhängigen Effekte in Mesangialzellen auf nekrotisches Zellmaterial zu untersuchen, wurden Tlr2-, Trif- und Myd88-defiziente Mesangialzellen mit Medium nekrotischer Fibroblasten stimuliert. Die *in vitro*-Experimente mit Trif-defizienten Mesangialzellen zeigten eine partielle Abhängigkeit in der IL-6-Freisetzung, während die CXCL9/MIG-Aussschüttung nicht unterschiedlich zu den Wildtypzellen war. Somit ist die Beteiligung des Adaptermoleküls TRIF an der Aktivierung von Mesangialzellen durch nekrotisches Zellmaterial nicht eindeutig geklärt.
Dagegen konnte ähnlich den Stimulationsversuchen mit apoptotischen Thymozyten eine absolute Abhängigkeit von TLR2 und MyD88 nachgewiesen werden. Die gezeigten Daten deuten darauf hin, dass freigesetzte Bestandteile nekrotischer Zellen glomeruläre Mesangialzellen über TLR2/MyD88-abhängige Signalwege zu einer IL-6- und MIG-Ausschüttung aktivieren, während die TRIF-abhängige Aktivierung in Mesangialzellen nur eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint.
So konnte bereits in einer früheren Studie gezeigt werden, dass die Stimulation mit nekrotischen Zellen zu einer NF-κB-Aktivierung via TLR2/MyD88 in Fibroblasten und Makrophagen führt [128].
Das TLR-Adapterprotein MyD88 wurde in verschiedenen primär nicht-infektiösen

Krankheitsmodellen als essentiell beschrieben. So sind Myd88-defiziente Mäuse vor größerem Gewebeschaden beispielsweise bei myokardialer Ischämie geschützt [174]. Zudem konnte *in vivo* in einem Modell des akuten Nierenversagens nachgewiesen werden, dass Tlr2-defiziente Mäuse nach Ischämie-Reperfusion deutlich weniger proinflammatorische Zytokine und Chemokine produzierten. Des Weiteren konnte ein wesentlich geringerer Gewebeschaden der Nieren im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren festgestellt werden [130]. Diese *in vivo*-Daten liefern wahrscheinlich die überzeugendsten Hinweise für die physiologische Relevanz endogener Liganden im Rahmen des akuten Gewebeuntergangs.
Die Anzahl der verschiedenen inflammatorischen Trigger aus sterbenden Zellen ist unbekannt. Eine Reihe potentieller stimulatorischer Moleküle wurde in den letzten Jahren identifiziert (siehe Einleitung: Endogene Liganden). HMGB1 (high mobility group box 1) beispielsweise ist ein nukleäres Protein und in allen Zellen enthalten. Es bindet an Chromatin und ist an der Regulation der Gen-Transkription beteiligt. Es wird passiv aus nekrotischen Zellen freigesetzt, bleibt jedoch während der Apoptose und auch nach sekundärer Nekrose apoptotischer Zellen im Nukleus.
In vitro Studien zeigten, dass HMGB1 aus nekrotischen Zellen Monozyten zur TNF-α-Produktion stimuliert [154]. In einer weiteren Studie wurden HMGB1-Antikörper in infarzierten Herzmuskel injiziert, was eine verbesserte Regeneration zur Folge hatte [175]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass HMGB1-Antikörper die Entzüdungsreaktion in der Leber nach Ischämie-Reperfusion verminderten [176].
Es ist weiterhin bekannt, dass HMGB1 über TLR2- und TLR4-abhängige Signalwege zu einer Freisetzung inflammatorischer Zytokine und Chemokine führen (siehe Einleitung). HMGB1 könnte somit als potentieller endogener Stimulus aus nekrotischen Zellen TLR2/MyD88-abhängig glomeruläre Mesangialzellen aktivieren. Ob nun HMGB1 allein eine proinflammatorische Aktivität aufweist, konnte bislang noch nicht nachgewiesen werden. Aufgereinigtes HMGB1-Protein allein konnte nur eine geringe Immunantwort auslösen [177]. Es wird daher vermutet, dass HMGB1 nur eine Vermittlerrolle einnimmt, indem es an andere intrazelluläre Moleküle, die aus nekrotischen Zellen freigesetzt wurden, bindet.
Die proinflammatorischen Moleküle aus sterbenden Zellen sind in der Regel keine biologisch aktiven Immunstimulanzien. Wie stimulieren solche normalerweise nicht-aktiven Substanzen plötzlich eine Immunreaktion? Eine Hypothese geht davon aus, dass bestimmte Rezeptoren Moleküle erkennen, die unter normalen Umständen in sich selbst verborgen sind [168]. Erst wenn diese *hidden-self*-Moleküle in den Extrazellulärraum durch Verlust der Membranintegrität durch nekrotischen Zelltod freigesetzt werden, stimulieren sie eine Immunantwort. Diese „sterile“ Immunantwort ist vergleichbar mit der Immunantwort auf extrazelluläre mikrobielle Pathogene. Tatsächlich ist es so, dass beide Immunreaktionen über Toll-like Rezeptoren vermittelt werden (siehe Abbildung 4.3). Chen et al. konnten 2007 zeigen, dass Tlr2/Tlr4-Doppelknockout-Mäuse eine reduzierte Immunantwort nach intraperitonealer Injektion nekrotischer Zellen aufweisen, während in defizienten Mäusen für Tlr2 und Tlr4 allein als auch für Tlr1, Tlr3, Tlr6, Tlr7, Tlr9 und Tlr11

keine Veränderung in der Immunantwort nachweisbar waren [178]. Dies deutet darauf hin, dass noch weitere Rezeptoren bei der Vermittlung „steriler“ Immunreaktionen beteiligt sind.
Die in dieser Arbeit gezeigten Daten liefern somit erstmalig Hinweise, dass freigesetzte intrazelluläre Moleküle aus nekrotischen Zellen potente Immunstimulanzien für Mesangialzellen darstellen und dies fast ausschließlich über TLR2 und MyD88 vermittelt wird. Dies unterstützt die These, dass Pathogen-Erkennungsrezeptoren wie TLR2 auch als so genannte *Danger*-Rezeptoren fungieren. Intraglomeruläre Läsionen könnten folglich eine lokale Entzündungsreaktion über diesen Mechanismus begünstigen.

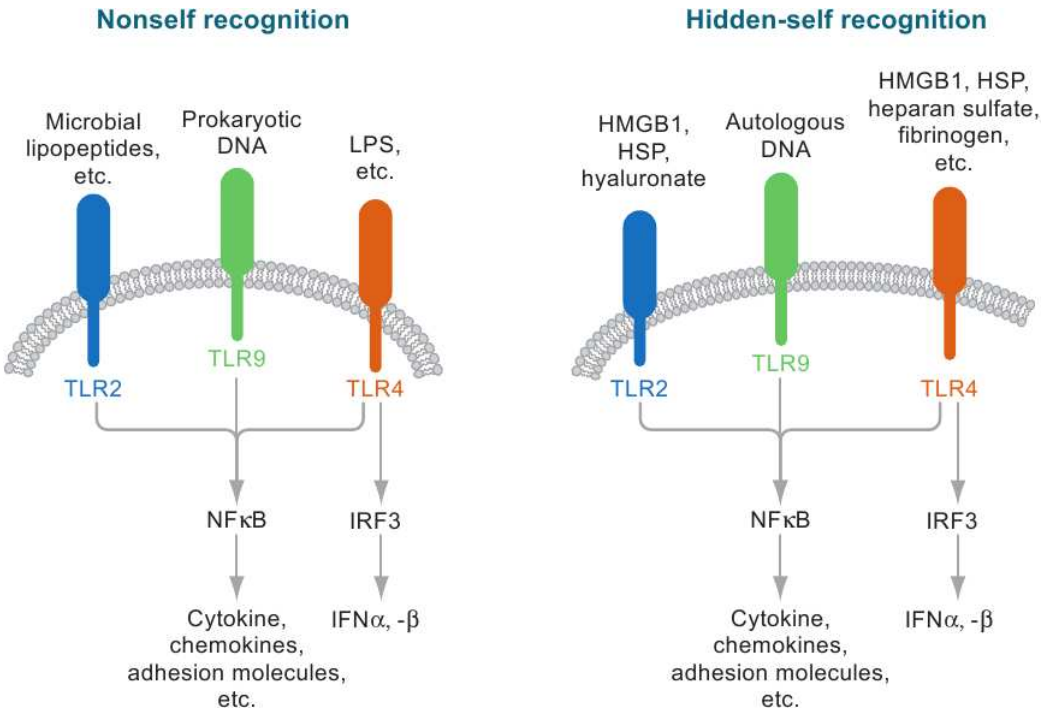

Abbildung 4.3: Pathogen- und *Hidden-self*-Erkennung: Toll-like Rezeptoren können sowohl durch Pathogene als auch durch intrazellulär versteckte eigene Moleküle eine Immunantwort auslösen. HMGB1 = *high mobility group box* 1, HSP = *heat shock protein*.

4.2.3 Bedeutung der Signaladaptermoleküle TRIF und MyD88 bei der Pathogenese der Immunkomplex-Glomerulonephritis

In dieser Arbeit wurde die Hypothese aufgestellt, dass endogene Liganden aus sterbenden Zellen über Rezeptoren des angeborenen Immunsystems eine funktionelle Relevanz bei der Immunkomplex-Glomerulonephritis haben. Wir gingen davon aus,

dass die Unterbrechung der Signalweiterleitung TLR-vermittelter Aktivierung einen verzögerten Krankheitsverlauf der Glomerulonephritis zur Folge habe. Um diese Annahme zu prüfen, wurde das Modell der nephrotoxischen Serumnephritis in Trif- und Myd88-Knockout-Mäusen induziert.

Funktionelle Bedeutung von TRIF bei der Immunkomplex-Glomerulonephritis
Den Ergebnissen zufolge entwickelten die Trif-defizienten Mäuse eine mit den Wildtyp-Mäusen vergleichbare Proteinurie im Verlauf der nephrotoxischen Serumnephritis. Auch die Serum-Parameter für Albumin, Cholesterin, Kreatinin und Harnstoff-N wiesen keine signifikanten Unterschiede zu den Wildtyp-Tieren auf. Dies bestätigte auch die FACS-Analyse der renalen Leukozyteninfiltration und die Histologie. In der Auswertung der Leukozyten- und Makrophageninfiltration nach Induktion des nephrotoxischen Serums konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Trif-Knockout und Wildtyp-Mäusen nachgewiesen werden. Ebenso ergab die Auswertung der histologischen Schnitte eine mit den Wildtyp-Tieren verlgeichbare Induktion der Immunkomplex-Glomerulonephritis. Die gezeigten Daten konnten somit keine funktionelle Relevanz des TLR-Adapterproteins TRIF bei der Immunkomplex-Glomerulonephritis nachweisen. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen *in vitro*. So konnte die Stimulation mit aufgereinigter Gesamt-RNA apoptotischer Thymozyten und Mesangialzellen zwar Trif-abhängig glomeruläre Mesangialzellen aktivieren, zeigte aber im Vergleich zu anderen TLR-Liganden nur einen schwachen Effekt.
Christensen et al. untersuchten im $MRL^{lpr/lpr}$-SLE-Modell die funktionelle Relevanz von TLR3 in der Pathogenese des Systemischen Lupus Erythematodes und der Lupusnephritis. In dieser Studie wurden dazu Tlr3-defiziente Mäuse mit $MRL^{lpr/lpr}$-Mäusen rückgekreuzt. Die Ergebnisse zeigten keine wesentlichen Veränderungen in der Autoantikörper-Prokution und der Progression der Lupusnephritis [179]. Diese Daten und die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse lassen somit vermuten, dass TLR3 und das Signaladapterprotein TRIF keine Bedeutung *in vivo* bei der Entwicklung einer Immunkomplex-Glomerulonephritis haben.
Dagegen zeigte die Arbeit von Patole et al., dass die Injektionn viraler Doppelstrang-RNA zu einer Aggravation der Lupusnephritis in $MRL^{lpr/lpr}$-Mäusen führte [148]. Dieses Phänomen kann einerseits durch die Interaktion von dsRNA mit TLR3 erklärt werden, andererseits wurden unlängst die RNA-Helikasen entdeckt, welche ebenfalls Doppelstrang-RNA erkennen und eine Immunantwort TLR-unabhängig vermitteln können. Weitere Studien sind somit notwendig, um die Rolle von TLR3 und der RNA-Helikasen bei der Pathogenese der Immunkomplex-Glomerulonephritis zu klären.
Dagegen konnte in einer kürzlich erschienenen Publikation von Cavassani et al. die *in vivo*-Relevanz von TLR3 als Sensor endogener Moleküle nachgewiesen werden [167]. In einem experimentellen Modell der septischen Peritonitis und in einem Darmischämie-Modell konnte jeweils eine TLR3-vermittelte Immunreaktion gezeigt

werden. In beiden Modellen waren die Mäuse keinen exogenen viralen Stimuli ausgesetzt. Daher folgerten die Autoren, dass die TLR3-abhängige Erkennung endogener Moleküle, die durch das Absterben von Zellen freigesetzt werden, in diesen Virus-unabhängigen Mausmodellen eine wesentliche Rolle spielt.

Funktionelle Bedeutung von MyD88 bei der Immunkomplex-Glomerulonephritis

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Myd88-Knockout-Mäuse vor der Ausbildung einer Immunkomplex-Glomerulonephritis geschützt waren. Sowohl klinisch als auch histologisch konnte keine Glomerulonephritis festgestellt werden. So konnte keine signifikante Proteinurie und Retention von Harnstoff in den Myd88-Knockout-Mäusen nachgewiesen werden. Ebenso zeigten Myd88-defiziente Tiere ein unauffälliges histologisches Bild, während die Wildtyp-Mäuse typische Veränderungen in der Histologie mit deutlicher Sklerosierung und Halbmondbildung der Glomeruli aufwiesen. Des Weiteren fand sich in der Immunhistochemie als auch in der FACS-Analyse der Nierenzellen kein Nachweis einer Infiltration von Makrophagen und T-Lymphoyzten.
Um die immunologischen Komponenten der Pathogenese weiter zu differenzieren, wurde zunächst die humorale Immunantwort der Mäuse untersucht. Im Serum aller Versuchstiere konnten Antikörper gegen die injizierten Kaninchen-Immunglobuline in vergleichbaren Mengen nachgewiesen werden. Folglich führte eine Deaktivierung von MyD88 nicht zu einer Verminderung der humoralen Immunantwort.
Der klinische Unterschied könnte somit in der zellulären Immunantwort begündet sein. Diesen Gedanken unterstützte eine signifikant und vergleichbar hohe IFN-γ-Sekretion der mit den Kanichen-IgG reaktivierten Splenozyten von Wildtyp- und Trif-defizienten Mäusen, die jedoch in Myd88-Knockout-Tieren fehlte. Zudem war eine deutliche Reaktivierung der zytotoxischen T-Zellen ebenfalls nur in den Wildtyp-Mäusen nachweisbar. Myd88-defiziente Mäuse zeigten dagegen keine Reaktivierung der zellulären Antwort.
Die klare Rolle der zellulären Immunantwort im Modell der nephrotoxischen Serumnephritis zeigte sich im fast vollständigen Ausbleiben der Proteinurie als Maß einer Nierenschädigung in T-Zell-defizienten Mäusen, während die Induktion der Erkrankung bei B-Zell-Defizienz weitgehend dem Wildtyp ähnelte [180]. Folglich wirkte der Schutz vor einer Glomerulonephritis in dem Modell der nephrotoxischen Serumnephritis bei den Myd88-defizienten Mäusen sehr wahrscheinlich über die zelluläre Immunantwort.
Schnare et al. konnten keinen Defekt in der Proliferation und Produktion von Interferon-γ und IL-4 Myd88-defizienter T-Zellen nachweisen. Bei der Analyse der Antigen-spezifischen Immunantwort konnte jedoch gezeigt werden, dass T-Zellen immunisierter Myd88–defizienter Mäuse kein IFN-γ nach Antigengabe produzierten. Es wird daher vermutet, dass das Antigen-spezifische *Priming* in Myd88-Knockout-Mäusen fehlerhaft ist. Die Immunisierungslösung enthielt neben Ovalbumin *Complete Freund's Adjuvant* (CFA). CFA enthält eine Mischung verschiedener Bestandteile von Mykobakterien, die von verschiedenen Toll-like

Rezeptoren wie TLR2 und TLR4 erkannt werden. Somit ist die fehlerhafte Aktivierung der adaptiven Immunantwort in Myd88-defizienten Mäusen durch die unzureichende Aktivierung von Toll-like Rezeptoren durch CFA begründet [181].
Diese Daten deuten folglich darauf hin, dass Myd88-defiziente Tiere resistent gegenüber der Induktion der nephrotoxischen Serumnephritis waren, da in diesem Modell CFA als Präimmunisierungslösung verwendet worden ist.
Dennoch konnte in einer Studie mit Myd88-Knockout-Mäusen, die in den $MRL^{lpr/lpr}$-Stamm rückgekreuzt worden sind, nachgewiesen werden, dass MyD88 eine wesentliche Rolle bei der Entwicklung der Lupusnephritis spielt. So zeigten Myd88-defiziente $MRL^{lpr/lpr}$-Mäuse eine verlängerte Überlebensrate und zusätzlich eine unauffällige Histologie der Nieren. Es konnten in den Nieren weder Leukozyteninfiltrate noch glomeruläre Läsionen festgestellt werden. Auch klinisch zeigten die Myd88-defizienten $MRL^{lpr/lpr}$-Mäuse im Vergleich zu den $MRL^{lpr/lpr}$-Mäusen keine Proteinurie und deutlich reduzierte Serumparameter. Folglich konnte in dieser Studie eindeutig belegt werden, dass MyD88 an der Pathogenese der Immunkomplex-Glomerulonephritis in einem SLE-Mausmodell wesentlich beteiligt ist [182].
Weitere Studien, beispielsweise mit Wildtyp/MyD88-chimeren Mäusen, sind somit notwendig, um die renale Beteiligung von MyD88 bei der experimentellen Immunkomplex-Glomerulonephritis aufzuklären.

Literaturverzeichnis

[1] Schober-Halstenberg H.-J. Frei, U. Nierenersatztherapie in Deutschland: QuaSi-Niere Jahresbericht 2006/2007. QuaSi-Niere GmbH, Berlin, Juni 2008.

[2] United States Renal Data System (USRDS). Atlas of Chronic Kidney Disease and End-Stage Renal Disease in the United States: Annual Data Report 2006. Minneapolis, USA, 2008.

[3] Deutsche Stiftung Organtransplantation (DSO), Frankfurt am Main, 2008.

[4] Agnes B. Fogo. Fundamentals of Renal Pathology. Springer, New York, 2008.

[5] C. Lefaucheur, B. Stengel, D. Nochy, P. Martel, G. S. Hill, C. Jacquot, J. Rossert, and G. N-P. R. O. G. R. E. S. S. Study Group. Membranous nephropathy and cancer: Epidemiologic evidence and determinants of high-risk cancer association. Kidney Int, 70(8):1510–1517, Oct 2006.

[6] S. R. Orth and E. Ritz. The nephrotic syndrome. N Engl J Med, 338(17):1202–1211, Apr 1998.

[7] A. Squarer, K. V. Lemley, S. Ambalavanan, B. Kristal, W. M. Deen, R. Sibley, L. Anderson, and B. D. Myers. Mechanisms of progressive glomerular injury in membranous nephropathy. J Am Soc Nephrol, 9(8):1389–1398, Aug 1998.

[8] Richard J Glassock. Diagnosis and natural course of membranous nephropathy. Semin Nephrol, 23(4):324–332, Jul 2003.

[9] Kelly D Smith and Charles E Alpers. Pathogenic mechanisms in membranoproliferative glomerulonephritis. Curr Opin Nephrol Hypertens, 14(4):396–403, Jul 2005.

[10] Franco Ferrario and Maria Pia Rastaldi. Histopathological atlas of renal diseases. membranoproliferative glomerulonephritis. J Nephrol, 17(4):483–486, 2004.

[11] Focal segmental glomerulosclerosis in children with idiopathic nephrotic syndrome. a report of the southwest pediatric nephrology study group. Kidney Int, 27(2):442–449, Feb 1985.

[12] Peter W Mathieson. Minimal change nephropathy and focal segmental glomerulosclerosis. Semin Immunopathol, 29(4):415–426, Nov 2007.

[13] Sharon P Andreoli. Racial and ethnic differences in the incidence and progression of focal segmental glomerulosclerosis in children. Adv Ren Replace Ther, 11(1):105–109, Jan 2004.

[14] D. E. Hricik, M. Chung-Park, and J. R. Sedor. Glomerulonephritis. N Engl J Med, 339(13):888–899, Sep 1998.

[15] W. G. Couser. Glomerulonephritis. Lancet, 353(9163):1509–1515, May 1999.

[16] J. H. Galla. Iga nephropathy. Kidney Int, 47(2):377–387, Feb 1995.

[17] David P D'Cruz, Munther A Khamashta, and Graham R V Hughes. Systemic lupus erythematosus. Lancet, 369(9561):587–596, Feb 2007.

[18] T. Hellmark, C. Johansson, and J. Wieslander. Characterization of anti-gbm antibodies involved in goodpasture's syndrome. Kidney Int, 46(3):823–829, Sep 1994.

[19] A. K. Short, V. L. Esnault, and C. M. Lockwood. Anti-neutrophil cytoplasm antibodies and anti-glomerular basement membrane antibodies: two coexisting distinct autoreactivities detectable in patients with rapidly progressive glomerulonephritis. Am J Kidney Dis, 26(3):439–445, Sep 1995.

[20] Zachary D Goldberger, Steven E Weinberger, Roberto F Nicosia, Sanjay Saint, and Bessie A Young. Clinical problem-solving. variations on a theme. N Engl J Med, 359(14):1502–1507, Oct 2008.

[21] Harrison's Principles of Internal Medicine, 16th Edition. McGraw-Hill, 2005.

[22] Carmen Gómez-Guerrero, Purificación Hernández-Vargas, Oscar López-Franco, Guadalupe Ortiz-Muñoz, and Jesús Egido. Mesangial cells and glomerular inflammation: from the pathogenesis to novel therapeutic approaches. Curr Drug Targets Inflamm Allergy, 4(3):341–351, Jun 2005.

[23] J. L. Ambrus and N. R. Sridhar. Immunologic aspects of renal disease. JAMA, 278(22):1938–1945, Dec 1997.

[24] M. R. Daha. Mechanisms of mesangial injury in glomerular diseases. J Nephrol, 13 Suppl 3:S89–S95, 2000.

[25] W. G. Couser. Pathogenesis of glomerular damage in glomerulonephritis. Nephrol Dial Transplant, 13 Suppl 1:10–15, 1998.

[26] D. Schlondorff. The glomerular mesangial cell: an expanding role for a specialized pericyte. FASEB J, 1(4):272–281, Oct 1987.

[27] P. Mené, M. S. Simonson, and M. J. Dunn. Physiology of the mesangial cell. Physiol Rev, 69(4):1347–1424, Oct 1989.

[28] M. Kashgarian and R. B. Sterzel. The pathobiology of the mesangium. Kidney Int, 41(3):524–529, Mar 1992.

[29] H. H. Radeke and K. Resch. The inflammatory function of renal glomerular mesangial cells and their interaction with the cellular immune system. Clin Investig, 70(9):825–842, Sep 1992.

[30] A. Papayianni. Cytokines, growth factors, and other inflammatory mediators in glomerulonephritis. Ren Fail, 18(5):725–740, Sep 1996.

[31] R. B. Sterzel, E. Schulze-Lohoff, and M. Marx. Cytokines and mesangial cells. Kidney Int Suppl, 39:S26–S31, Jan 1993.

[32] G. F. Schreiner. The mesangial phagocyte and its regulation of contractile cell biology. J Am Soc Nephrol, 2(10 Suppl):S74–S82, Apr 1992.

[33] S. Adler and H. R. Brady. Cell adhesion molecules and the glomerulopathies. Am J Med, 107(4):371–386, Oct 1999.

[34] S. Gauer, J. Yao, H. O. Schoecklmann, and R. B. Sterzel. Adhesion molecules in the glomerular mesangium. Kidney Int, 51(5):1447–1453, May 1997.

[35] J. A. Satriano, B. Banas, B. Luckow, P. Nelson, and D. O. Schlondorff. Regulation of rantes and icam-1 expression in murine mesangial cells. J Am Soc Nephrol, 8(4):596–603, Apr 1997.

[36] Uwe Haberstroh, Johanna Pocock, Carmen Gómez-Guerrero, Udo Helmchen, Alf Hamann, Jose C Gutierrez-Ramos, Rolf A K Stahl, and Friedrich Thaiss. Expression of the chemokines mcp-1/ccl2 and rantes/ccl5 is differentially regulated by infiltrating inflammatory cells. Kidney Int, 62(4):1264–1276, Oct 2002.

[37] A. Benigni and G. Remuzzi. Inflammation and glomerular injury. Springer Semin Immunopathol, 16(1):39–51, 1994.

[38] S. Segerer, P. J. Nelson, and D. Schlöndorff. Chemokines, chemokine receptors, and renal disease: from basic science to pathophysiologic and therapeutic studies. J Am Soc Nephrol, 11(1):152–176, Jan 2000.

[39] Hans-Joachim Anders, Volker Vielhauer, and Detlef Schlöndorff. Chemokines and chemokine receptors are involved in the resolution or progression of renal disease. Kidney Int, 63(2):401–415, Feb 2003.

[40] G. Wolf, S. Aberle, F. Thaiss, P. J. Nelson, A. M. Krensky, E. G. Neilson, and R. A. Stahl. Tnf alpha induces expression of the chemoattractant cytokine rantes in cultured mouse mesangial cells. Kidney Int, 44(4):795–804, Oct 1993.

[41] X. Wu, G. J. Dolecki, B. Sherry, J. Zagorski, and J. B. Lefkowith. Chemokines are expressed in a myeloid cell-dependent fashion and mediate distinct functions in immune complex glomerulonephritis in rat. J Immunol, 158(8):3917–3924, Apr 1997.

[42] M. Schwarz, H. H. Radeke, K. Resch, and P. Uciechowski. Lymphocyte-derived cytokines induce sequential expression of monocyte- and t cell-specific chemokines in human mesangial cells. Kidney Int, 52(6):1521–1531, Dec 1997.

[43] Yusuke Suzuki, Carmen Gómez-Guerrero, Isao Shirato, Oscar López-Franco, Purificación Hernández-Vargas, Guillermo Sanjuán, Marta Ruiz-Ortega, Takeshi Sugaya, Ko Okumura, Yasuhiko Tomino, Chisei Ra, and Jesús Egido. Susceptibility to t cell-mediated injury in immune complex disease is linked to local activation of renin-angiotensin system: the role of nf-at pathway. J Immunol, 169(8):4136–4146, Oct 2002.

[44] Bernhard Banas, Markus Wörnle, Thorsten Berger, Peter J Nelson, Clemens D Cohen, Matthias Kretzler, Jochen Pfirstinger, Matthias Mack, Martin Lipp, Hermann-Josef Gröne, and Detlef Schlöndorff. Roles of slc/ccl21 and ccr7 in human kidney for mesangial proliferation, migration, apoptosis, and tissue homeostasis. J Immunol, 168(9):4301–4307, May 2002.

[45] P. Romagnani, C. Beltrame, F. Annunziato, L. Lasagni, M. Luconi, G. Galli, L. Cosmi, E. Maggi, M. Salvadori, C. Pupilli, and M. Serio. Role for interactions between ip-10/mig and cxcr3 in proliferative glomerulonephritis. J Am Soc Nephrol, 10(12):2518–2526, Dec 1999.

[46] Y. Luo, C. Lloyd, J. C. Gutierrez-Ramos, and M. E. Dorf. Chemokine amplification in mesangial cells. J Immunol, 163(7):3985–3992, Oct 1999.

[47] C. S. Haas, H. O. Schöcklmann, S. Lang, M. Kralewski, and R. B. Sterzel. Regulatory mechanism in glomerular mesangial cell proliferation. J Nephrol, 12(6):405–415, 1999.

[48] H. O. Schöcklmann, S. Lang, and R. B. Sterzel. Regulation of mesangial cell proliferation. Kidney Int, 56(4):1199–1207, Oct 1999.

[49] J. Egido, M. Gómez-Chiarri, A. Ortíz, C. Bustos, J. Alonso, C. Gómez-Guerrero, D. Gómez-Garre, M. J. López-Armada, J. Plaza, and E. Gonzalez. Role of tumor necrosis factor-alpha in the pathogenesis of glomerular diseases. Kidney Int Suppl, 39:S59–S64, Jan 1993.

[50] D. L. Coleman and C. Ruef. Interleukin-6: an autocrine regulator of mesangial cell growth. Kidney Int, 41(3):604–606, Mar 1992.

[51] Y. Horii, M. Iwano, E. Hirata, M. Shiiki, Y. Fujii, K. Dohi, and H. Ishikawa. Role of interleukin-6 in the progression of mesangial proliferative glomerulonephritis. Kidney Int Suppl, 39:S71–S75, Jan 1993.

[52] F. Kayama, T. Yoshida, Y. Kodama, T. Matsui, J. M. Matheson, and M. I. Luster. Pro-inflammatory cytokines and interleukin 6 in the renal response to bacterial endotoxin. Cytokine, 9(9):688–695, Sep 1997.

[53] Carmen Gómez-Guerrero, Yusuke Suzuki, and Jesús Egido. The identification of iga receptors in human mesangial cells: in the search for ëldorado". Kidney Int, 62(2):715–717, Aug 2002.

[54] Ruth M Tarzi and H. Terence Cook. Role of fcgamma receptors in glomerulonephritis. Nephron Exp Nephrol, 95(1):e7–12, 2003.

[55] A. Santiago, T. Mori, J. Satriano, and D. Schlondorff. Regulation of fc receptors for igg on cultured rat mesangial cells. Kidney Int, 39(1):87–94, Jan 1991.

[56] M Masugi. Ueber das wesen der spezifischen veraenderungen der niere und der leber durch das nephrotoxin. 1933.

[57] W. W. Tang, S. Yin, A. J. Wittwer, and M. Qi. Chemokine gene expression in anti-glomerular basement membrane antibody glomerulonephritis. Am J Physiol, 269(3 Pt 2):F323–F330, Sep 1995.

[58] Victoria Cattell. Nitric oxide and glomerulonephritis. Kidney Int, 61(3):816–821, Mar 2002.

[59] Charles A Janeway and Ruslan Medzhitov. Innate immune recognition. Annu Rev Immunol, 20:197–216, 2002.

[60] Shizuo Akira and Kiyoshi Takeda. Functions of toll-like receptors: lessons from ko mice. C R Biol, 327(6):581–589, Jun 2004.

[61] Bruce Beutler. Inferences, questions and possibilities in toll-like receptor signalling. Nature, 430(6996):257–263, Jul 2004.

[62] K. V. Anderson, L. Bokla, and C. Nüsslein-Volhard. Establishment of dorsal-ventral polarity in the drosophila embryo: the induction of polarity by the toll gene product. Cell, 42(3):791–798, Oct 1985.

[63] K. V. Anderson, G. Jürgens, and C. Nüsslein-Volhard. Establishment of dorsal-ventral polarity in the drosophila embryo: genetic studies on the role of the toll gene product. Cell, 42(3):779–789, Oct 1985.

[64] C. Hashimoto, K. L. Hudson, and K. V. Anderson. The toll gene of drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. Cell, 52(2):269–279, Jan 1988.

[65] M. P. Belvin and K. V. Anderson. A conserved signaling pathway: the drosophila toll-dorsal pathway. Annu Rev Cell Dev Biol, 12:393–416, 1996.

[66] B. Lemaitre, E. Nicolas, L. Michaut, J. M. Reichhart, and J. A. Hoffmann. The dorsoventral regulatory gene cassette spätzle/toll/cactus controls the potent antifungal response in drosophila adults. Cell, 86(6):973–983, Sep 1996.

[67] R. Medzhitov, P. Preston-Hurlburt, and C. A. Janeway. A human homologue of the drosophila toll protein signals activation of adaptive immunity. Nature, 388(6640):394–397, Jul 1997.

[68] Mi Sun Jin and Jie-Oh Lee. Structures of the toll-like receptor family and its ligand complexes. Immunity, 29(2):182–191, Aug 2008.

[69] A. Bowie and L. A. O'Neill. The interleukin-1 receptor/toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. J Leukoc Biol, 67(4):508–514, Apr 2000.

[70] D. H. Wyllie, E. Kiss-Toth, A. Visintin, S. C. Smith, S. Boussouf, D. M. Segal, G. W. Duff, and S. K. Dower. Evidence for an accessory protein function for toll-like receptor 1 in anti-bacterial responses. J Immunol, 165(12):7125–7132, Dec 2000.

[71] Osamu Takeuchi, Shintaro Sato, Takao Horiuchi, Katsuaki Hoshino, Kiyoshi Takeda, Zhongyun Dong, Robert L Modlin, and Shizuo Akira. Cutting edge: role of toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. J Immunol, 169(1):10–14, Jul 2002.

[72] Lena Alexopoulou, Venetta Thomas, Markus Schnare, Yves Lobet, Juan Anguita, Robert T Schoen, Ruslan Medzhitov, Erol Fikrig, and Richard A Flavell. Hyporesponsiveness to vaccination with borrelia burgdorferi ospa in humans and in tlr1- and tlr2-deficient mice. Nat Med, 8(8):878–884, Aug 2002.

[73] M. A. Campos, I. C. Almeida, O. Takeuchi, S. Akira, E. P. Valente, D. O. Procópio, L. R. Travassos, J. A. Smith, D. T. Golenbock, and R. T. Gazzinelli. Activation of toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. J Immunol, 167(1):416–423, Jul 2001.

[74] A. M. Hajjar, D. S. O'Mahony, A. Ozinsky, D. M. Underhill, A. Aderem, S. J. Klebanoff, and C. B. Wilson. Cutting edge: functional interactions between toll-like receptor (tlr) 2 and tlr1 or tlr6 in response to phenol-soluble modulin. J Immunol, 166(1):15–19, Jan 2001.

[75] Kiyoshi Takeda, Osamu Takeuchi, and Shizuo Akira. Recognition of lipopeptides by toll-like receptors. J Endotoxin Res, 8(6):459–463, 2002.

[76] O. Takeuchi, K. Hoshino, T. Kawai, H. Sanjo, H. Takada, T. Ogawa, K. Takeda, and S. Akira. Differential roles of tlr2 and tlr4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. Immunity, 11(4):443–451, Oct 1999.

[77] O. Takeuchi, T. Kawai, P. F. Mühlradt, M. Morr, J. D. Radolf, A. Zychlinsky, K. Takeda, and S. Akira. Discrimination of bacterial lipoproteins by toll-like receptor 6. Int Immunol, 13(7):933–940, Jul 2001.

[78] S. Thoma-Uszynski, S. Stenger, O. Takeuchi, M. T. Ochoa, M. Engele, P. A. Sieling, P. F. Barnes, M. Rollinghoff, P. L. Bolcskei, M. Wagner, S. Akira, M. V. Norgard, J. T. Belisle, P. J. Godowski, B. R. Bloom, and R. L. Modlin. Induction of direct antimicrobial activity through mammalian toll-like receptors. Science, 291(5508):1544–1547, Feb 2001.

[79] L. Alexopoulou, A. C. Holt, R. Medzhitov, and R. A. Flavell. Recognition of double-stranded rna and activation of nf-kappab by toll-like receptor 3. Nature, 413(6857):732–738, Oct 2001.

[80] Tian Wang, Terrence Town, Lena Alexopoulou, John F Anderson, Erol Fikrig, and Richard A Flavell. Toll-like receptor 3 mediates west nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis. Nat Med, 10(12):1366–1373, Dec 2004.

[81] Kurt H Edelmann, Sarah Richardson-Burns, Lena Alexopoulou, Kenneth L Tyler, Richard A Flavell, and Michael B A Oldstone. Does toll-like receptor 3 play a biological role in virus infections? Virology, 322(2):231–238, May 2004.

[82] K. Hoshino, O. Takeuchi, T. Kawai, H. Sanjo, T. Ogawa, Y. Takeda, K. Takeda, and S. Akira. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (tlr4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for tlr4 as the lps gene product. J Immunol, 162(7):3749–3752, Apr 1999.

[83] J. da Silva Correia, K. Soldau, U. Christen, P. S. Tobias, and R. J. Ulevitch. Lipopolysaccharide is in close proximity to each of the proteins in its membrane receptor complex. transfer from cd14 to tlr4 and md-2. J Biol Chem, 276(24):21129–21135, Jun 2001.

[84] C. A. Byrd-Leifer, E. F. Block, K. Takeda, S. Akira, and A. Ding. The role of myd88 and tlr4 in the lps-mimetic activity of taxol. Eur J Immunol, 31(8):2448–2457, Aug 2001.

[85] E. A. Kurt-Jones, L. Popova, L. Kwinn, L. M. Haynes, L. P. Jones, R. A. Tripp, E. E. Walsh, M. W. Freeman, D. T. Golenbock, L. J. Anderson, and R. W. Finberg. Pattern recognition receptors tlr4 and cd14 mediate response to respiratory syncytial virus. Nat Immunol, 1(5):398–401, Nov 2000.

[86] John C Rassa, Jennifer L Meyers, Yuanming Zhang, Rama Kudaravalli, and Susan R Ross. Murine retroviruses activate b cells via interaction with toll-like receptor 4. Proc Natl Acad Sci U S A, 99(4):2281–2286, Feb 2002.

[87] F. Hayashi, K. D. Smith, A. Ozinsky, T. R. Hawn, E. C. Yi, D. R. Goodlett, J. K. Eng, S. Akira, D. M. Underhill, and A. Aderem. The innate immune

response to bacterial flagellin is mediated by toll-like receptor 5. Nature, 410(6832):1099–1103, Apr 2001.

[88] Thomas R Hawn, Annelies Verbon, Kamilla D Lettinga, Lue Ping Zhao, Shuying Sue Li, Richard J Laws, Shawn J Skerrett, Bruce Beutler, Lea Schroeder, Alex Nachman, Adrian Ozinsky, Kelly D Smith, and Alan Aderem. A common dominant tlr5 stop codon polymorphism abolishes flagellin signaling and is associated with susceptibility to legionnaires' disease. J Exp Med, 198(10):1563–1572, Nov 2003.

[89] Satoshi Uematsu, Myoung Ho Jang, Nicolas Chevrier, Zijin Guo, Yutaro Kumagai, Masahiro Yamamoto, Hiroki Kato, Nagako Sougawa, Hidenori Matsui, Hirotaka Kuwata, Hiroaki Hemmi, Cevayir Coban, Taro Kawai, Ken J Ishii, Osamu Takeuchi, Masayuki Miyasaka, Kiyoshi Takeda, and Shizuo Akira. Detection of pathogenic intestinal bacteria by toll-like receptor 5 on intestinal cd11c+ lamina propria cells. Nat Immunol, 7(8):868–874, Aug 2006.

[90] Erica Andersen-Nissen, Thomas R Hawn, Kelly D Smith, Alex Nachman, Aaron E Lampano, Satoshi Uematsu, Shizuo Akira, and Alan Aderem. Cutting edge: Tlr5-/- mice are more susceptible to escherichia coli urinary tract infection. J Immunol, 178(8):4717–4720, Apr 2007.

[91] A. Ozinsky, D. M. Underhill, J. D. Fontenot, A. M. Hajjar, K. D. Smith, C. B. Wilson, L. Schroeder, and A. Aderem. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. Proc Natl Acad Sci U S A, 97(25):13766–13771, Dec 2000.

[92] Hiroaki Hemmi, Tsuneyasu Kaisho, Osamu Takeuchi, Shintaro Sato, Hideki Sanjo, Katsuaki Hoshino, Takao Horiuchi, Hideyuki Tomizawa, Kiyoshi Takeda, and Shizuo Akira. Small anti-viral compounds activate immune cells via the tlr7 myd88-dependent signaling pathway. Nat Immunol, 3(2):196–200, Feb 2002.

[93] Sandra S Diebold, Tsuneyasu Kaisho, Hiroaki Hemmi, Shizuo Akira, and Caetano Reis e Sousa. Innate antiviral responses by means of tlr7-mediated recognition of single-stranded rna. Science, 303(5663):1529–1531, Mar 2004.

[94] Florian Heil, Hiroaki Hemmi, Hubertus Hochrein, Franziska Ampenberger, Carsten Kirschning, Shizuo Akira, Grayson Lipford, Hermann Wagner, and Stefan Bauer. Species-specific recognition of single-stranded rna via toll-like receptor 7 and 8. Science, 303(5663):1526–1529, Mar 2004.

[95] Jennifer M Lund, Lena Alexopoulou, Ayuko Sato, Margaret Karow, Niels C Adams, Nicholas W Gale, Akiko Iwasaki, and Richard A Flavell. Recognition of single-stranded rna viruses by toll-like receptor 7. Proc Natl Acad Sci U S A, 101(15):5598–5603, Apr 2004.

[96] H. Hemmi, O. Takeuchi, T. Kawai, T. Kaisho, S. Sato, H. Sanjo, M. Matsumoto, K. Hoshino, H. Wagner, K. Takeda, and S. Akira. A toll-like receptor recognizes bacterial dna. Nature, 408(6813):740–745, Dec 2000.

[97] A. Krug, A. Towarowski, S. Britsch, S. Rothenfusser, V. Hornung, R. Bals, T. Giese, H. Engelmann, S. Endres, A. M. Krieg, and G. Hartmann. Toll-like receptor expression reveals cpg dna as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with cd40 ligand to induce high amounts of il-12. Eur J Immunol, 31(10):3026–3037, Oct 2001.

[98] Dekai Zhang, Guolong Zhang, Matthew S Hayden, Matthew B Greenblatt, Crystal Bussey, Richard A Flavell, and Sankar Ghosh. A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. Science, 303(5663):1522–1526, Mar 2004.

[99] Felix Yarovinsky, Dekai Zhang, John F Andersen, Gerard L Bannenberg, Charles N Serhan, Matthew S Hayden, Sara Hieny, Fayyaz S Sutterwala, Richard A Flavell, Sankar Ghosh, and Alan Sher. Tlr11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. Science, 308(5728):1626–1629, Jun 2005.

[100] Hakim Echchannaoui, Karl Frei, Christian Schnell, Stephen L Leib, Werner Zimmerli, and Regine Landmann. Toll-like receptor 2-deficient mice are highly susceptible to streptococcus pneumoniae meningitis because of reduced bacterial clearing and enhanced inflammation. J Infect Dis, 186(6):798–806, Sep 2002.

[101] O. Takeuchi, K. Hoshino, and S. Akira. Cutting edge: Tlr2-deficient and myd88-deficient mice are highly susceptible to staphylococcus aureus infection. J Immunol, 165(10):5392–5396, Nov 2000.

[102] D. M. Underhill, A. Ozinsky, K. D. Smith, and A. Aderem. Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. Proc Natl Acad Sci U S A, 96(25):14459–14463, Dec 1999.

[103] Veit Hornung, Jana Ellegast, Sarah Kim, Krzysztof Brzózka, Andreas Jung, Hiroki Kato, Hendrik Poeck, Shizuo Akira, Karl-Klaus Conzelmann, Martin Schlee, Stefan Endres, and Gunther Hartmann. 5'-triphosphate rna is the ligand for rig-i. Science, 314(5801):994–997, Nov 2006.

[104] J. Andrejeva, K. S. Childs, D. F. Young, T. S. Carlos, N. Stock, S. Goodbourn, and R. E. Randall. The v proteins of paramyxoviruses bind the ifn-inducible rna helicase, mda-5, and inhibit its activation of the ifn-beta promoter. Proc Natl Acad Sci U S A, 101(49):17264–17269, Dec 2004.

[105] Mathias Chamaillard, Masahito Hashimoto, Yasuo Horie, Junya Masumoto, Su Qiu, Lisa Saab, Yasunori Ogura, Akiko Kawasaki, Koichi Fukase, Shoichi Kusumoto, Miguel A Valvano, Simon J Foster, Tak W Mak, Gabriel Nuñez,

and Naohiro Inohara. An essential role for nod1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. Nat Immunol, 4(7):702–707, Jul 2003.

[106] Stephen E Girardin, Ivo G Boneca, Jérôme Viala, Mathias Chamaillard, Agnès Labigne, Gilles Thomas, Dana J Philpott, and Philippe J Sansonetti. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (mdp) detection. J Biol Chem, 278(11):8869–8872, Mar 2003.

[107] Ari B Molofsky, Brenda G Byrne, Natalie N Whitfield, Cressida A Madigan, Etsu T Fuse, Kazuhiro Tateda, and Michele S Swanson. Cytosolic recognition of flagellin by mouse macrophages restricts legionella pneumophila infection. J Exp Med, 203(4):1093–1104, Apr 2006.

[108] Luigi Franchi, Amal Amer, Mathilde Body-Malapel, Thirumala-Devi Kanneganti, Nesrin Ozören, Rajesh Jagirdar, Naohiro Inohara, Peter Vandenabeele, John Bertin, Anthony Coyle, Ethan P Grant, and Gabriel Núñez. Cytosolic flagellin requires ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1beta in salmonella-infected macrophages. Nat Immunol, 7(6):576–582, Jun 2006.

[109] Thirumala-Devi Kanneganti, Nesrin Ozören, Mathilde Body-Malapel, Amal Amer, Jong-Hwan Park, Luigi Franchi, Joel Whitfield, Winfried Barchet, Marco Colonna, Peter Vandenabeele, John Bertin, Anthony Coyle, Ethan P Grant, Shizuo Akira, and Gabriel Núñez. Bacterial rna and small antiviral compounds activate caspase-1 through cryopyrin/nalp3. Nature, 440(7081):233–236, Mar 2006.

[110] Sanjeev Mariathasan, David S Weiss, Kim Newton, Jacqueline McBride, Karen O'Rourke, Meron Roose-Girma, Wyne P Lee, Yvette Weinrauch, Denise M Monack, and Vishva M Dixit. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and atp. Nature, 440(7081):228–232, Mar 2006.

[111] Fabio Martinon, Virginie Pétrilli, Annick Mayor, Aubry Tardivel, and Jürg Tschopp. Gout-associated uric acid crystals activate the nalp3 inflammasome. Nature, 440(7081):237–241, Mar 2006.

[112] Hiroki Kato, Shintaro Sato, Mitsutoshi Yoneyama, Masahiro Yamamoto, Satoshi Uematsu, Kosuke Matsui, Tohru Tsujimura, Kiyoshi Takeda, Takashi Fujita, Osamu Takeuchi, and Shizuo Akira. Cell type-specific involvement of rig-i in antiviral response. Immunity, 23(1):19–28, Jul 2005.

[113] Hiroki Kato, Osamu Takeuchi, Shintaro Sato, Mitsutoshi Yoneyama, Masahiro Yamamoto, Kosuke Matsui, Satoshi Uematsu, Andreas Jung, Taro Kawai, Ken J Ishii, Osamu Yamaguchi, Kinya Otsu, Tohru Tsujimura, Chang-Sung Koh, Caetano Reis e Sousa, Yoshiharu Matsuura, Takashi Fujita, and Shizuo Akira. Differential roles of mda5 and rig-i helicases in the recognition of rna viruses. Nature, 441(7089):101–105, May 2006.

[114] Andreas Pichlmair, Oliver Schulz, Choon Ping Tan, Tanja I Näslund, Peter Liljeström, Friedemann Weber, and Caetano Reis e Sousa. Rig-i-mediated antiviral responses to single-stranded rna bearing 5'-phosphates. Science, 314(5801):997–1001, Nov 2006.

[115] Tiffany Horng, Gregory M Barton, Richard A Flavell, and Ruslan Medzhitov. The adaptor molecule tirap provides signalling specificity for toll-like receptors. Nature, 420(6913):329–333, Nov 2002.

[116] Kenya Honda, Hideyuki Yanai, Tatsuaki Mizutani, Hideo Negishi, Naoya Shimada, Nobutaka Suzuki, Yusuke Ohba, Akinori Takaoka, Wen-Chen Yeh, and Tadatsugu Taniguchi. Role of a transductional-transcriptional processor complex involving myd88 and irf-7 in toll-like receptor signaling. Proc Natl Acad Sci U S A, 101(43):15416–15421, Oct 2004.

[117] T. Kawai, O. Adachi, T. Ogawa, K. Takeda, and S. Akira. Unresponsiveness of myd88-deficient mice to endotoxin. Immunity, 11(1):115–122, Jul 1999.

[118] Masahiro Yamamoto, Shintaro Sato, Hiroaki Hemmi, Katsuaki Hoshino, Tsuneyasu Kaisho, Hideki Sanjo, Osamu Takeuchi, Masanaka Sugiyama, Masaru Okabe, Kiyoshi Takeda, and Shizuo Akira. Role of adaptor trif in the myd88-independent toll-like receptor signaling pathway. Science, 301(5633):640–643, Aug 2003.

[119] Taro Kawai and Shizuo Akira. Tlr signaling. Semin Immunol, 19(1):24–32, Feb 2007.

[120] Taro Kawai, Ken Takahashi, Shintaro Sato, Cevayir Coban, Himanshu Kumar, Hiroki Kato, Ken J Ishii, Osamu Takeuchi, and Shizuo Akira. Ips-1, an adaptor triggering rig-i- and mda5-mediated type i interferon induction. Nat Immunol, 6(10):981–988, Oct 2005.

[121] Hajime Kono and Kenneth L Rock. How dying cells alert the immune system to danger. Nat Rev Immunol, 8(4):279–289, Apr 2008.

[122] P. Matzinger. Tolerance, danger, and the extended family. Annu Rev Immunol, 12:991–1045, 1994.

[123] S. Gallucci, M. Lolkema, and P. Matzinger. Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. Nat Med, 5(11):1249–1255, Nov 1999.

[124] Y. Shi, W. Zheng, and K. L. Rock. Cell injury releases endogenous adjuvants that stimulate cytotoxic t cell responses. Proc Natl Acad Sci U S A, 97(26):14590–14595, Dec 2000.

[125] Katalin Karikó, Houping Ni, John Capodici, Marc Lamphier, and Drew Weissman. mrna is an endogenous ligand for toll-like receptor 3. J Biol Chem, 279(13):12542–12550, Mar 2004.

[126] Fabia Brentano, Olivier Schorr, Renate E Gay, Steffen Gay, and Diego Kyburz. Rna released from necrotic synovial fluid cells activates rheumatoid arthritis synovial fibroblasts via toll-like receptor 3. Arthritis Rheum, 52(9):2656–2665, Sep 2005.

[127] Sean R Christensen, Jonathan Shupe, Kevin Nickerson, Michael Kashgarian, Richard A Flavell, and Mark J Shlomchik. Toll-like receptor 7 and tlr9 dictate autoantibody specificity and have opposing inflammatory and regulatory roles in a murine model of lupus. Immunity, 25(3):417–428, Sep 2006.

[128] M. Li, D. F. Carpio, Y. Zheng, P. Bruzzo, V. Singh, F. Ouaaz, R. M. Medzhitov, and A. A. Beg. An essential role of the nf-kappa b/toll-like receptor pathway in induction of inflammatory and tissue-repair gene expression by necrotic cells. J Immunol, 166(12):7128–7135, Jun 2001.

[129] Hun Sik Kim, Myoung Sook Han, Kun Wook Chung, Sunshin Kim, Eunshil Kim, Myoung Joo Kim, Eunkyeong Jang, Hyun Ah Lee, Jeehee Youn, Shizuo Akira, and Myung-Shik Lee. Toll-like receptor 2 senses beta-cell death and contributes to the initiation of autoimmune diabetes. Immunity, 27(2):321–333, Aug 2007.

[130] Jaklien C Leemans, Geurt Stokman, Nike Claessen, Kasper M Rouschop, Gwendoline J D Teske, Carsten J Kirschning, Shizuo Akira, Tom van der Poll, Jan J Weening, and Sandrine Florquin. Renal-associated tlr2 mediates ischemia/reperfusion injury in the kidney. J Clin Invest, 115(10):2894–2903, Oct 2005.

[131] Huiling Wu, Gang Chen, Kate R Wyburn, Jianlin Yin, Patrick Bertolino, Josette M Eris, Stephen I Alexander, Alexandra F Sharland, and Steven J Chadban. Tlr4 activation mediates kidney ischemia/reperfusion injury. J Clin Invest, 117(10):2847–2859, Oct 2007.

[132] Ramunas M Vabulas, Parviz Ahmad-Nejad, Sanghamitra Ghose, Carsten J Kirschning, Rolf D Issels, and Hermann Wagner. Hsp70 as endogenous stimulus of the toll/interleukin-1 receptor signal pathway. J Biol Chem, 277(17):15107–15112, Apr 2002.

[133] Jong Sung Park, Daiva Svetkauskaite, Qianbin He, Jae-Yeol Kim, Derek Strassheim, Akitoshi Ishizaka, and Edward Abraham. Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein. J Biol Chem, 279(9):7370–7377, Feb 2004.

[134] Kristen R Taylor, Janet M Trowbridge, Jennifer A Rudisill, Christian C Termeer, Jan C Simon, and Richard L Gallo. Hyaluronan fragments stimulate endothelial recognition of injury through tlr4. J Biol Chem, 279(17):17079–17084, Apr 2004.

[135] Kara A Scheibner, Michael A Lutz, Sada Boodoo, Matthew J Fenton, Jonathan D Powell, and Maureen R Horton. Hyaluronan fragments act as an

endogenous danger signal by engaging tlr2. J Immunol, 177(2):1272–1281, Jul 2006.

[136] Y. Okamura, M. Watari, E. S. Jerud, D. W. Young, S. T. Ishizaka, J. Rose, J. C. Chow, and J. F. Strauss. The extra domain a of fibronectin activates toll-like receptor 4. J Biol Chem, 276(13):10229–10233, Mar 2001.

[137] Geoffrey B Johnson, Gregory J Brunn, Yuzo Kodaira, and Jeffrey L Platt. Receptor-mediated monitoring of tissue well-being via detection of soluble heparan sulfate by toll-like receptor 4. J Immunol, 168(10):5233–5239, May 2002.

[138] S. T. Smiley, J. A. King, and W. W. Hancock. Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll-like receptor 4. J Immunol, 167(5):2887–2894, Sep 2001.

[139] Tanja Lövgren, Maija-Leena Eloranta, Ullvi Båve, Gunnar V Alm, and Lars Rönnblom. Induction of interferon-alpha production in plasmacytoid dendritic cells by immune complexes containing nucleic acid released by necrotic or late apoptotic cells and lupus igg. Arthritis Rheum, 50(6):1861–1872, Jun 2004.

[140] Christina M Lau, Courtney Broughton, Abigail S Tabor, Shizuo Akira, Richard A Flavell, Mark J Mamula, Sean R Christensen, Mark J Shlomchik, Gregory A Viglianti, Ian R Rifkin, and Ann Marshak-Rothstein. Rna-associated autoantigens activate b cells by combined b cell antigen receptor/toll-like receptor 7 engagement. J Exp Med, 202(9):1171–1177, Nov 2005.

[141] Elizabeth A Leadbetter, Ian R Rifkin, Andreas M Hohlbaum, Britte C Beaudette, Mark J Shlomchik, and Ann Marshak-Rothstein. Chromatin-igg complexes activate b cells by dual engagement of igm and toll-like receptors. Nature, 416(6881):603–607, Apr 2002.

[142] Melissa W Boulé, Courtney Broughton, Fabienne Mackay, Shizuo Akira, Ann Marshak-Rothstein, and Ian R Rifkin. Toll-like receptor 9-dependent and -independent dendritic cell activation by chromatin-immunoglobulin g complexes. J Exp Med, 199(12):1631–1640, Jun 2004.

[143] Terry K Means, Eicke Latz, Fumitaka Hayashi, Mandakolathur R Murali, Douglas T Golenbock, and Andrew D Luster. Human lupus autoantibody-dna complexes activate dcs through cooperation of cd32 and tlr9. J Clin Invest, 115(2):407–417, Feb 2005.

[144] Patrick N Cunningham, Ying Wang, Rongqing Guo, Gang He, and Richard J Quigg. Role of toll-like receptor 4 in endotoxin-induced acute renal failure. J Immunol, 172(4):2629–2635, Feb 2004.

[145] Naotake Tsuboi, Yasunobu Yoshikai, Seiichi Matsuo, Takeshi Kikuchi, Ken-Ichiro Iwami, Yoshiyuki Nagai, Osamu Takeuchi, Shizuo Akira, and Tetsuya Matsuguchi. Roles of toll-like receptors in c-c chemokine production by renal tubular epithelial cells. J Immunol, 169(4):2026–2033, Aug 2002.

[146] Heather J Brown, Steven H Sacks, and Michael G Robson. Toll-like receptor 2 agonists exacerbate accelerated nephrotoxic nephritis. J Am Soc Nephrol, 17(7):1931–1939, Jul 2006.

[147] Prashant S Patole, Sören Schubert, Kirsten Hildinger, Sascha Khandoga, Andrej Khandoga, Stephan Segerer, Anna Henger, Matthias Kretzler, Melanie Werner, Fritz Krombach, Detlef Schlöndorff, and Hans-Joachim Anders. Toll-like receptor-4: renal cells and bone marrow cells signal for neutrophil recruitment during pyelonephritis. Kidney Int, 68(6):2582–2587, Dec 2005.

[148] P. S. Patole, H. J. Grone, S. Segerer, R. Ciubar, E. Belemezova, A. Henger, M. Kretzler, D. Schlondorff, and H. J. Anders. Viral double-stranded RNA aggravates lupus nephritis through Toll-like receptor 3 on glomerular mesangial cells and antigen-presenting cells. J Am Soc Nephrol, 16(5):1326–38, 2005.

[149] Koichi Tabeta, Philippe Georgel, Edith Janssen, Xin Du, Kasper Hoebe, Karine Crozat, Suzanne Mudd, Louis Shamel, Sosathya Sovath, Jason Goode, Lena Alexopoulou, Richard A Flavell, and Bruce Beutler. Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. Proc Natl Acad Sci U S A, 101(10):3516–3521, Mar 2004.

[150] Markus Wörnle, Holger Schmid, Bernhard Banas, Monika Merkle, Anna Henger, Maximilian Roeder, Simone Blattner, Elisabeth Bock, Matthias Kretzler, Hermann-Josef Gröne, and Detlef Schlöndorff. Novel role of toll-like receptor 3 in hepatitis c-associated glomerulonephritis. Am J Pathol, 168(2):370–385, Feb 2006.

[151] C. Shih, L. C. Padhy, M. Murray, and R. A. Weinberg. Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts. Nature, 290(5803):261–264, Mar 1981.

[152] K. Hoebe, X. Du, P. Georgel, E. Janssen, K. Tabeta, S. O. Kim, J. Goode, P. Lin, N. Mann, S. Mudd, K. Crozat, S. Sovath, J. Han, and B. Beutler. Identification of lps2 as a key transducer of myd88-independent tir signalling. Nature, 424(6950):743–748, Aug 2003.

[153] O. Adachi, T. Kawai, K. Takeda, M. Matsumoto, H. Tsutsui, M. Sakagami, K. Nakanishi, and S. Akira. Targeted disruption of the myd88 gene results in loss of il-1- and il-18-mediated function. Immunity, 9(1):143–150, Jul 1998.

[154] Paola Scaffidi, Tom Misteli, and Marco E Bianchi. Release of chromatin protein hmgb1 by necrotic cells triggers inflammation. Nature, 418(6894):191–195, Jul 2002.

[155] P. Menè. Mesangial cell cultures. J Nephrol, 14(3):198–203, 2001.

[156] D. H. Lovett, S. L. Bursten, D. Gemsa, W. Bessler, K. Resch, and J. L. Ryan. Activation of glomerular mesangial cells by gram-negative bacterial cell wall components. Am J Pathol, 133(3):472–484, Dec 1988.

[157] L. Baud, J. P. Oudinet, M. Bens, L. Noe, M. N. Peraldi, E. Rondeau, J. Etienne, and R. Ardaillou. Production of tumor necrosis factor by rat mesangial cells in response to bacterial lipopolysaccharide. Kidney Int, 35(5):1111–1118, May 1989.

[158] Ann Marshak-Rothstein. Toll-like receptors in systemic autoimmune disease. Nat Rev Immunol, 6(11):823–835, Nov 2006.

[159] H-J. Anders. Innate pathogen recognition in the kidney: toll-like receptors, nod-like receptors, and rig-like helicases. Kidney Int, 72(9):1051–1056, Nov 2007.

[160] Himanshu Kumar, Shohei Koyama, Ken J Ishii, Taro Kawai, and Shizuo Akira. Cutting edge: cooperation of ips-1- and trif-dependent pathways in poly ic-enhanced antibody production and cytotoxic t cell responses. J Immunol, 180(2):683–687, Jan 2008.

[161] Brian D Rudd, Jetse J Smit, Richard A Flavell, Lena Alexopoulou, Matthew A Schaller, Achim Gruber, Aaron A Berlin, and Nicholas W Lukacs. Deletion of tlr3 alters the pulmonary immune environment and mucus production during respiratory syncytial virus infection. J Immunol, 176(3):1937–1942, Feb 2006.

[162] Osamu Takeuchi and Shizuo Akira. Mda5/rig-i and virus recognition. Curr Opin Immunol, 20(1):17–22, Feb 2008.

[163] Yueh-Ming Loo, Jamie Fornek, Nanette Crochet, Gagan Bajwa, Olivia Perwitasari, Luis Martinez-Sobrido, Shizuo Akira, Michelle A Gill, Adolfo García-Sastre, Michael G Katze, and Michael Gale. Distinct rig-i and mda5 signaling by rna viruses in innate immunity. J Virol, 82(1):335–345, Jan 2008.

[164] Joanne Rasschaert, Laurence Ladrière, Maryse Urbain, Zeynep Dogusan, Bitty Katabua, Shintaro Sato, Shizuo Akira, Conny Gysemans, Chantal Mathieu, and Decio L Eizirik. Toll-like receptor 3 and stat-1 contribute to double-stranded rna+ interferon-gamma-induced apoptosis in primary pancreatic beta-cells. J Biol Chem, 280(40):33984–33991, Oct 2005.

[165] Hiroaki Moriyama, Li Wen, Norio Abiru, Edwin Liu, Liping Yu, Dongmei Miao, Roberto Gianani, F. Susan Wong, and George S Eisenbarth.

Induction and acceleration of insulitis/diabetes in mice with a viral mimic (polyinosinic-polycytidylic acid) and an insulin self-peptide. Proc Natl Acad Sci U S A, 99(8):5539–5544, Apr 2002.

[166] Hyunkyoung Lee, Eun-Kyeong Jo, Se-Young Choi, Seog Bae Oh, Kyungpyo Park, Joong Soo Kim, and Sung Joong Lee. Necrotic neuronal cells induce inflammatory schwann cell activation via tlr2 and tlr3: implication in wallerian degeneration. Biochem Biophys Res Commun, 350(3):742–747, Nov 2006.

[167] Karen A Cavassani, Makoto Ishii, Haitao Wen, Matthew A Schaller, Pamela M Lincoln, Nicholas W Lukacs, Cory M Hogaboam, and Steven L Kunkel. Tlr3 is an endogenous sensor of tissue necrosis during acute inflammatory events. J Exp Med, 205(11):2609–2621, Oct 2008.

[168] Kenneth L Rock and Hajime Kono. The inflammatory response to cell death. Annu Rev Pathol, 3:99–126, 2008.

[169] Elaine Y Chung, Sun Jung Kim, and Xiao Jing Ma. Regulation of cytokine production during phagocytosis of apoptotic cells. Cell Res, 16(2):154–161, Feb 2006.

[170] S. Faouzi, B. E. Burckhardt, J. C. Hanson, C. B. Campe, L. W. Schrum, R. A. Rippe, and J. J. Maher. Anti-fas induces hepatic chemokines and promotes inflammation by an nf-kappa b-independent, caspase-3-dependent pathway. J Biol Chem, 276(52):49077–49082, Dec 2001.

[171] G. Majno and I. Joris. Apoptosis, oncosis, and necrosis. an overview of cell death. Am J Pathol, 146(1):3–15, Jan 1995.

[172] I. Fujimoto, J. Pan, T. Takizawa, and Y. Nakanishi. Virus clearance through apoptosis-dependent phagocytosis of influenza a virus-infected cells by macrophages. J Virol, 74(7):3399–3403, Apr 2000.

[173] Julia Menke, Geraldine C Zeller, Eriya Kikawada, Terry K Means, Xiao R Huang, Han Y Lan, Bao Lu, Joshua Farber, Andrew D Luster, and Vicki R Kelley. Cxcl9, but not cxcl10, promotes cxcr3-dependent immune-mediated kidney disease. J Am Soc Nephrol, 19(6):1177–1189, Jun 2008.

[174] Fang Hua, Tuanzhu Ha, Jing Ma, Xiang Gao, Jim Kelley, David L Williams, I. William Browder, Race L Kao, and Chuanfu Li. Blocking the myd88-dependent pathway protects the myocardium from ischemia/reperfusion injury in rat hearts. Biochem Biophys Res Commun, 338(2):1118–1125, Dec 2005.

[175] Federica Limana, Antonia Germani, Antonella Zacheo, Jan Kajstura, Anna Di Carlo, Giovanna Borsellino, Omar Leoni, Roberta Palumbo, Luca Battistini, Raffaella Rastaldo, Susanne Müller, Giulio Pompilio, Piero Anversa, Marco E

Bianchi, and Maurizio C Capogrossi. Exogenous high-mobility group box 1 protein induces myocardial regeneration after infarction via enhanced cardiac c-kit+ cell proliferation and differentiation. Circ Res, 97(8):e73–e83, Oct 2005.

[176] Allan Tsung, Rohit Sahai, Hiroyuki Tanaka, Atsunori Nakao, Mitchell P Fink, Michael T Lotze, Huan Yang, Jianhua Li, Kevin J Tracey, David A Geller, and Timothy R Billiar. The nuclear factor hmgb1 mediates hepatic injury after murine liver ischemia-reperfusion. J Exp Med, 201(7):1135–1143, Apr 2005.

[177] Ari Rouhiainen, Sarka Tumova, Leena Valmu, Nisse Kalkkinen, and Heikki Rauvala. Pivotal advance: analysis of proinflammatory activity of highly purified eukaryotic recombinant hmgb1 (amphoterin). J Leukoc Biol, 81(1):49–58, Jan 2007.

[178] Chun-Jen Chen, Hajime Kono, Douglas Golenbock, George Reed, Shizuo Akira, and Kenneth L Rock. Identification of a key pathway required for the sterile inflammatory response triggered by dying cells. Nat Med, 13(7):851–856, Jul 2007.

[179] Sean R Christensen, Michael Kashgarian, Lena Alexopoulou, Richard A Flavell, Shizuo Akira, and Mark J Shlomchik. Toll-like receptor 9 controls anti-dna autoantibody production in murine lupus. J Exp Med, 202(2):321–331, Jul 2005.

[180] A. R. Rosenkranz, S. Knight, S. Sethi, S. I. Alexander, R. S. Cotran, and T. N. Mayadas. Regulatory interactions of alphabeta and gammadelta t cells in glomerulonephritis. Kidney Int, 58(3):1055–1066, Sep 2000.

[181] M. Schnare, G. M. Barton, A. C. Holt, K. Takeda, S. Akira, and R. Medzhitov. Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. Nat Immunol, 2(10):947–950, Oct 2001.

[182] Atsushi Sadanaga, Hitoshi Nakashima, Mitsuteru Akahoshi, Kohsuke Masutani, Katsuhisa Miyake, Takashi Igawa, Naonobu Sugiyama, Hiroaki Niiro, and Mine Harada. Protection against autoimmune nephritis in myd88-deficient mrl/lpr mice. Arthritis Rheum, 56(5):1618–1628, May 2007.

Abkürzungsverzeichnis

APES	Ammoniumpersulfat
APC	Antigen-präsentierende Zelle
BSA	Bovines Serum Albumin
CD	Cluster of differentiation
cDNA	complementary-Desoxyribonukleinsäure
CpG	Cytosin-(phosphat)-Guanin-Dinukleotid
DAMP	Danger/Damage Associated Molecular Pattern
DC	Dendritische Zelle
DEPC	Diethyl-Pyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dsRNA	Doublestranded RNA
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EGF	Epidermal Growth Factor
FACS	Fluorescence-activated cell sorter
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isocyanat
GBM	Glomeruläre Basalmembran
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GN	Glomerulonephritis
HMGB	High Mobility Group Box
ICAM	Inter-Cellular Adhesion Molecule
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-1R	Interleukin-1-Rezeptor
IK	Immunkomplex
iNOS	induzierbare NO Synthase
IPS	Interferon-β-promotor-stimulator
IRAK	IL-1R-assoziierte Kinase
IRF	IFN Regulatory Factor
ITS	Insulin, Transferrin, Selenium
LBP	LPS binding protein
LPS	Lipopolysaccharid

MD-2	Myeloid Differentiation Protein 2
MDA	Melanoma Differentiation Associated Protein
MIG	Monokine Induced by Interferon-γ
MIP	Macrophage Inflammatory Protein
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting
MPGN	Membranoproliferative Glomerulonephritis
MyD88	Myeloid Differentiation Protein 88
NF	Nuclear Factor
NLR	NOD-like Rezeptor
NSN	Nephrotoxische Serumnephritis
NOD	Nucleotide-Binding Oligomerization Domain
OD	Optische Dichte
PAMP	Pathogen Associated Molecular Pattern
PAS	Periodic-acid Schiff
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCR	Polimerase Chain Reaction
PE	Phycoerythrin
PI	Propidium-Jodid
p(I:C)	Polyriboinosin-Polyribocytidyl-Säure
pMC	Primäre Mesangialzellen
PRR	Pathogen Recognition Receptor/ Pathogen-Erkennungsrezeptor
PS	Penicillin/Streptomycin
RIG	Retinoic Acid Inducible Protein
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Reverse Transcriptase
SLE	Systemischer Lupus Erythematodes
SMA	Smooth Muscle Actin
ssRNA	single stranded RNA
TIR	Toll/IL1-R domäne
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TRIF	TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN-β
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule

Danksagung

Ganz herzlich danken möchte ich Herrn PD Dr. Hans-Joachim Anders, der mir den Einstieg in die Grundlagenforschung und die Möglichkeit zur Durchführung dieser Arbeit gegeben hat. Insbesondere möchte ich mich für die exzellente Betreuung und die Schaffung idealer Arbeitsbedingungen bedanken.
Herrn PD Dr. Volker Vielhauer danke ich für seine freundliche Unterstützung und Zusammenarbeit bei den Tierexperimenten.
Bei Herrn Prof. Stefan Endres bedanke ich mich für die Aufnahme in das DFG-Granduiertenkolleg 1202 und die finanzielle Unterstützung.
Meinen Mitdoktoranden Herrn Rahul Pawar, Herrn Onkar Kulkarni und Herrn Ramanjaneyulu Allam möchte ich außerordentlich für die labortechnische Anleitung, die motivierenden Diskussionen und die gemeinsam erlebte Zeit danken. Auch gilt mein besonderer Dank den technischen Mitarbeiterinnen Frau Stephanie Pfeiffer und Frau Ewa Radomska für die herzliche Zusammenarbeit und ihre tatkräftige Unterstützung.
Herrn Dan Draganovici danke ich für die Anfertigung der histologischen Schnitte.
Allen anderen hier nicht namentlich genannten Mitarbeitern der Klinischen Biochemie sei an dieser Stelle für die kollegiale Arbeitsatmosphäre und Hilfsbereitschaft gedankt.
Meinen Eltern und meinem Bruder danke ich von ganzem Herzen für ihre Anteilnahme und ihre Unterstützung.

Veröffentlichungen

Posterpräsentationen

1. Patole PS, Pawar RD, **Lichtnekert J**, Lech M, Kulakarni OP, Ramanjaneyulu A, Segerer S, Anders HJ. Coactivation of Toll-like receptor-3 and -7 in immune complex glomerulonephritis. American Society of Nephrology (ASN) Renal Week 2006, San Diego, California

2. **Lichtnekert J**, Vielhauer V, Neumann I, Kulkarni OP, Anders HJ. Funktionelle Rolle von MyD88, nicht jedoch Trif bei der Immunkomplex- Glomerulonephritis Eingeladener Vortrag, Kongress für Nephrologie 2007, München

3. Vielhauer V, **Lichtnekert J**, Neumann I, Kulkarni OP, Anders HJ. Functional role of MyD88 in immune complex glomerulonephritis. American Society of Nephrology (ASN) Renal Week 2007, San Francisco, California

Veröffentlichungen in internationalen Fachzeitschriften

1. Patole PS, Pawar RD, **Lichtnekert J**, Lech M, Kulakarni OP, Ramanjaneyulu A, Segerer S, Anders HJ. Coactivation of Toll-like receptor-3 and -7 in immune complex glomerulonephritis. Journal of Autoimmunity, 29(1):52-9, Aug 2007.

2. **Lichtnekert J**, Vielhauer V, Zecher D, Kulkarni OP, Clauss S, Hornung V, Mayadas T, Beutler B, Akira S, Anders HJ. Trif is not required for immune complex glomerulonephritis: dying cells activate mesangial cells via Tlr2/Myd88 rather than Tlr3/Trif. Am J Physiol Renal Physiol., 296(4):F867-74, Apr 2009.

3. Allam R, **Lichtnekert J**, Moll A, Taubitz A, Vielhauer V, Anders HJ. Viral RNA and DNA sense common antiviral responses including type I interferons in mesangial cells. J Am Soc Nephrol 2009, *in press.*

4. Flür K, Allam R, Zecher D, **Lichtnekert J**, Cohen D, Schmid H, Beutler B, Anders HJ. Viral RNA induces type I interferon-dependent cytokine release and cell death in mesangial cells via melanoma-differentiation-associated gene-5. Implications for viral infection-associated glomerulonephritis. *In revision* (American Journal of Pathology).

Lebenslauf

Julia Lichtnekert
geboren am 13.03.1981 in München

Schulische Ausbildung

09/1987 – 09/1991	Grundschule in München
09/1991 – 06/2000	Pestalozzi-Gymnasium, München Allgemeine Hochschulreife: Juni 2000

Studium

03/2001 – 06/2008	Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München (LMU) Ärztliche Vorprüfung: März 2003 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung: Juni 2008

Promotion

05/2005 – 02/2007	Experimentelle Doktorarbeit in der Abteilung Klinische Biochemie Arbeitsgruppe PD Dr. med. H.-J. Anders Medizinische Poliklinik-Innenstadt, Klinikum der Universität München
01/2006 – 12/2006	DFG-Forschungs-Stipendium des Graduiertenkollegs 1202 „Oligonukleotide in Zellbiologie and Therapie“, LMU Leiter: Prof. S. Endres

Beruf

seit 09/2008	Wissenschaftliche Mitarbeiterin/ Assistenzärztin in der Medizinischen Poliklinik-Innenstadt, Klinikum der Universität München