

**Aus der Medizinischen Poliklinik – Innenstadt
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Komm. Direktor: Prof. Dr. Martin Reincke**

**Molekulare Mechanismen der viral-getriggerten Glomerulonephritis:
Effekte der Toll-like Rezeptor-abhängigen und -unabhängigen
Erkennung viraler RNA in glomerulären Mesangialzellen.**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Humanmedizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität

zu München

vorgelegt von

Katharina Theresia Flür

aus Mutlangen

2010

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität,
München

1.Berichterstatter: Prof. Dr. Hans-Joachim Anders

2.Berichterstatter: Prof. Dr. Gunnar Schotta

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Walter Samtleben

Prof. Dr. Karl-Klaus Conzelmann

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 29.04.2010

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	4
1.1	Chronisches Nierenversagen.....	4
1.2	Glomerulonephritis	6
1.2.1	Proliferative Glomerulonephritiden	8
1.2.2	Nichtproliferative Glomerulonephritiden	10
1.3	Virusassoziierte Glomerulonephritis	12
1.4	Mesangialzellen	14
1.5	Immunsystem.....	16
1.5.1	Die angeborene Immunantwort.....	16
1.5.2	Die erworbene Immunantwort	20
1.6	Erkennung viraler RNA	20
1.6.1	Toll-like Rezeptoren	20
1.6.2	RIG-like Helikasen	22
1.6.3	Immuneffekte nach Erkennung viraler RNA	23
1.7	Interferone und ihre Rezeptoren	24
1.7.1	Typ I-Interferone.....	25
1.7.2	Typ II-Interferone	26
1.7.3	Signalnetzwerk der Interferoninduktion	26
1.7.4	Kontinuierliche Interferonproduktion.....	29
1.8	Ziel der Untersuchungen und Hypothese.....	30
2	Material und Methoden.....	32
2.1	Zellisolation	33
2.2	Zellkultur	35
2.3	ELISA	37
2.4	RNA-Gewinnung und Umschreiben in cDNA	41
2.5	<i>Real time</i> RT-PCR (TaqMan)	44
2.6	Proliferationsassay	46
2.7	Western Blot	47
2.8	Zellfärbung	51
2.9	Durchflusszytometrie.....	52
2.10	Tierexperimentelle Methoden.....	54
2.10.1	Tierhaltung.....	54
2.10.2	Herstellung der <i>Trif</i> -mutanten Mäuse	54
2.10.3	Genotypisierung der Mäuse	55

2.10.4	Serumnephritis-Studie.....	57
2.11	Experimente mit menschlichem Biopsiematerial	62
2.12	Statistische Auswertung.....	62
3	Ergebnisse.....	64
3.1	Immunzytochemische Charakterisierung der Mesangialzellen	64
3.2	Toll-like Rezeptor-Expression auf Mesangialzellen.....	64
3.3	Mesangialzellen exprimieren die zytosolischen viralen RNA Rezeptoren Mda5, Rig-I und deren mitochondrialen Adaptor Ips-1	65
3.4	Virale RNA induziert die Produktion von Interleukin-6 in glomerulären Mesangialzellen... ..	68
3.5	Mesangialzellen produzieren Tlr-3/Trif-unabhängig große Mengen Interleukin-6 und Typ I-Interferone, wenn sie mit viraler RNA, die mit kationischen Lipiden komplexiert wurde, stimuliert wurden	69
3.6	Interferon- α und - β veranlassen primäre Mesangialzellen zur Interleukin-6-Produktion	71
3.7	Die virale Doppelstrang-RNA-induzierte Aktivierung von Mesangialzellen beinhaltet eine Typ I-Interferon autokrin-parakrine Aktivierung	75
3.8	Virale RNA, die mit kationischen Lipiden komplexiert ist, reduziert in Mesangialzellen die Proliferation	78
3.9	Virale RNA führt in Mesangialzellen zum Zelltod.....	80
3.10	Komplexe aus viraler RNA und kationischen Lipiden induzieren eine diffuse glomeruläre Nekrose und Mesangiolyse in Mäusen, die an nephrotoxischer Serumnephritis leiden.....	82
3.11	Die mit chronischer Hepatitis C-assoziierte Glomerulonephritis ist assoziiert mit einer gesteigerten glomerulären Interferon- α -Expression beim Menschen	86
4	Diskussion	88
4.1	Bedeutung der angeborenen RNA-Rezeptoren.....	88
4.2	Effekte der RNA-Erkennung in Mesangialzellen.....	91
4.3	Reaktion der Mesangialzellen auf Interferone	93
4.4	Existenz einer autokrinen Aktivierung in Mesangialzellen	95
4.5	Klinische Bedeutung für die Glomerulonephritis	97
5	Zusammenfassung	100
6	Literaturangaben.....	104
	Abkürzungsverzeichnis	113
	Danksagung	116

Vorbemerkungen

Die vorliegende Arbeit wurde von November 2006 bis März 2008 in den Forschungslabors der Medizinischen Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität in München durchgeführt.

Betreut wurde die Arbeit durch Herrn Professor Dr. med. Hans-Joachim Anders.

Rechtliche Grundlage der Tierversuche

Während der im Rahmen dieser Studie durchgeführten Eingriffe an Versuchstieren wurde darauf geachtet, das Leiden der Versuchstiere auf ein Minimum zu reduzieren. Die mit dieser Arbeit verbundenen Tierversuche waren durch die Regierung von Oberbayern geprüft und genehmigt worden.

Förderung des Projektes

Diese Arbeit wurde im Rahmen des Graduiertenkollegs 1202: „Oligonukleotide in Zellbiologie und Therapie“ der Deutschen Forschungsgemeinschaft absolviert und durch dieses gefördert.

Aus dieser Arbeit ging folgende Originalarbeit hervor

Flür K et al.: 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. *Am J Pathol.* 175:2014-22, Nov. 2009

Kapitel 1:

Einleitung

1 Einleitung

1.1 Chronisches Nierenversagen

Die Prävalenz des chronischen Nierenversagens hat in den letzten 10 Jahren ständig zugenommen (Abbildung 1). So lag die Zahl der Dialysepatienten in Deutschland Ende 2005 bei über 63 000 [1]. Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion weisen gegenüber dem Rest der Bevölkerung eine zehnfach höhere Morbidität und Mortalität an Herz-Kreislauf- und Infektionskrankheiten auf (Abbildung 2) [2]. Somit entsteht ein gesellschaftliches Problem mit gewaltigen Dimensionen verbunden einerseits mit psychosozialer Belastung und enormer Abnahme der Lebensqualität für Patienten und deren Familien andererseits aber auch mit erheblichen Kosten. Die jährlichen Ausgaben für die Nierenersatztherapie eines dialysepflichtigen Patienten liegen bei ca. 45 000 Euro. Kostengünstiger ist die Nierentransplantation mit 18 000 Euro jährlich [3]. Die Wartezeit auf eine Transplantatniere beträgt derzeit jedoch im Durchschnitt 5-7 Jahre [4]. In Deutschland warten ca. 9 000 Dialysepatienten auf eine Nierentransplantation, im Jahr 2006 wurden 2 800 Patienten transplantiert, das heißt, es warten dreimal so viele Patienten auf eine neue Niere wie Organe vermittelt werden können (Abbildung 3) [4]. Dies führt unter anderem dazu, dass pro Jahr 4-5 % der Patienten auf der Warteliste versterben und somit jeder 4. Patient seine Nierentransplantation gar nicht mehr erleben kann [3].

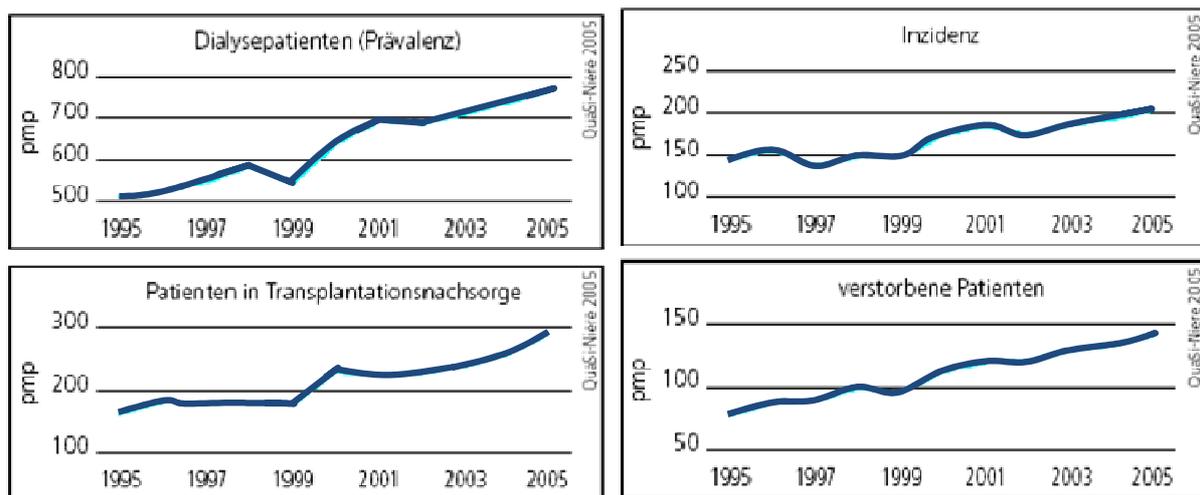


Abbildung 1: Jahresvergleich: Chronische Nierenersatztherapie 1995-2005 pro Million Einwohner (pmp). Prävalenz sowie Inzidenz der Dialysepatienten in Deutschland nehmen ständig zu [1].

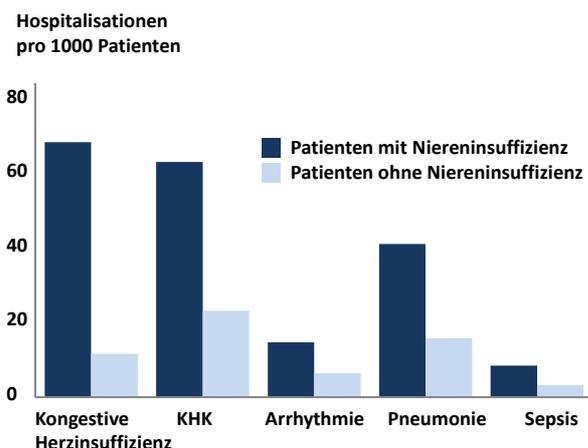


Abbildung 2: Morbidität infolge kardiovaskulärer und infektiöser Erkrankungen. Bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz ist die Zahl der Hospitalisationen infolge Herz-Kreislaufenerkrankungen oder Infektionen signifikant höher als bei Patienten mit normaler Nierenfunktion [2].

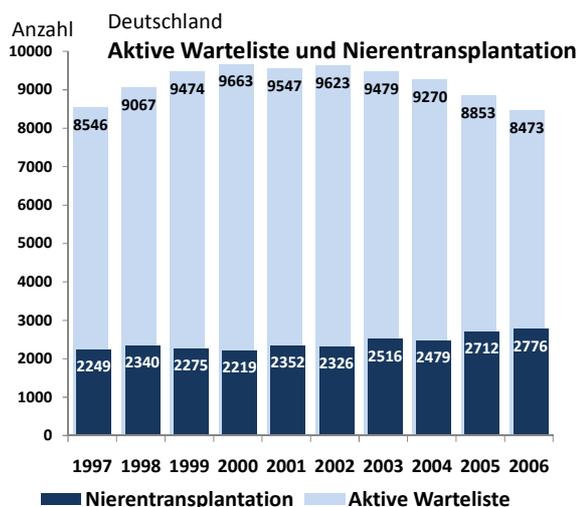


Abbildung 3: Aktive Warteliste und Nierentransplantationen von 1997 bis 2006. Die Zahl der Patienten, die auf eine Niere warten, ist etwa dreimal so hoch wie die Zahl der transplantierten Organe [4].

Als Ursache für das terminale Nierenversagen wurde in Deutschland 2005 bei 23 % der Patienten eine diabetische Nephropathie und bei ebenfalls 23 % eine Glomerulonephritis diagnostiziert. Diese Verteilung ändert sich etwas, wenn die Anzahl der Dialysepatienten zugrunde gelegt wird. Hier steht der Diabetes mellitus mit 28 % an erster Stelle. An zweiter Stelle folgt jedoch schon die Glomerulonephritis mit 19 % (Abbildung 4) [1]. Betrachtet man die Indikationen, die im Jahr 2006 für eine Nierentransplantation in Deutschland gestellt wurden, so zeigt sich, dass die Glomerulonephritis mit 30 % den Großteil der Indikationen darstellte. An zweiter Stelle standen andere Ursachen mit 25 % und an dritter Stelle die diabetische Nephropathie mit 13 % (Tabelle 1) [4].

Die gezeigten Daten machen die Notwendigkeit der Entwicklung geeigneter Therapiemöglichkeiten zur Erhaltung der Nierenfunktion deutlich. Dabei ist zu beachten, dass chronische Nierenerkrankungen, ungeachtet der Ätiologie, einen ähnlichen Verlauf aufweisen. Der Verlust der Nierenfunktion schreitet in der Regel so langsam fort, dass eine vermeintlich geringfügige Verlangsamung der Progredienz zu einer beträchtlichen Änderung der Langzeitprognose führt [5].

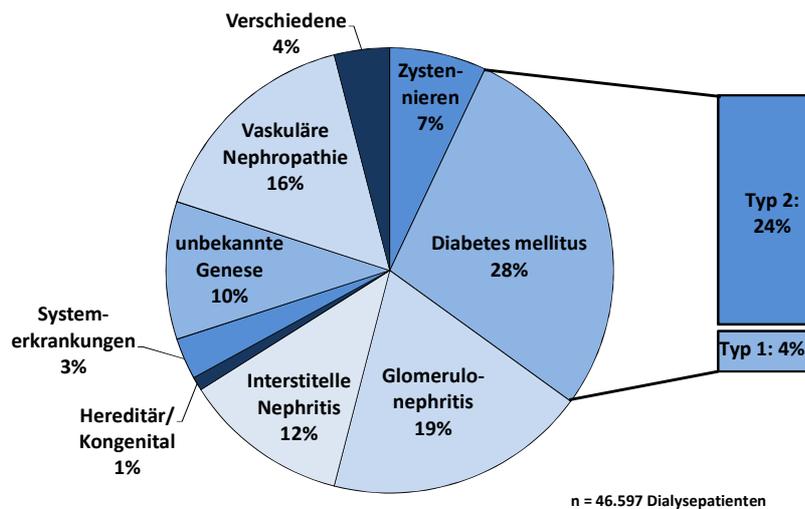


Abbildung 4: Diagnoseverteilung aller bei QUASI-Niere erfassten lebenden Dialysepatienten in Nierenersatztherapie 2005. Ursächlich für 28 % des dialysepflichtigen chronischen Nierenversagens ist der Diabetes mellitus gefolgt von Glomerulonephritiden mit 19 % [1].

Tabelle 1: Indikationen für eine Nierentransplantation in Deutschland 2006 [4]

Glomerulonephritis	761	} 2824
Andere	710	
Diabetische Nephropathie	369	
Zystennieren	385	
Interstitielle Nephritis	173	
Vaskuläre Erkrankungen	172	
Immunologische Systemerkrankungen	143	
Kongenitale Veränderungen	25	
Hereditäre Nierenerkrankung	57	
HUS	22	
Amyloid- und Plasmozytomnieren	7	

1.2 Glomerulonephritis

Als Glomerulonephritiden bezeichnet man eine Gruppe von Erkrankungen, die durch eine Entzündung des Filtrierapparates der Niere, den Glomeruli, gekennzeichnet sind. Dabei sind immer beide Nieren betroffen. Man unterscheidet primäre von sekundären Glomerulonephritiden. Eine primäre Glomerulonephritis (GN) ist eine Erkrankung, die sich primär und ausschließlich an den Glomeruli abspielt, eine sekundäre Glomerulonephritis tritt als renale Beteiligung bei verschiedenen Systemerkrankungen (z.B. Kollagenosen und Vaskulitiden), Infektionen, Tumoren oder medikamentenbedingt auf [6]. Glomerulonephritiden können anhand verschiedener Klassifikationen (klinischer Verlauf, Histologie, Pathogenese) eingeteilt werden (Abbildung 5).

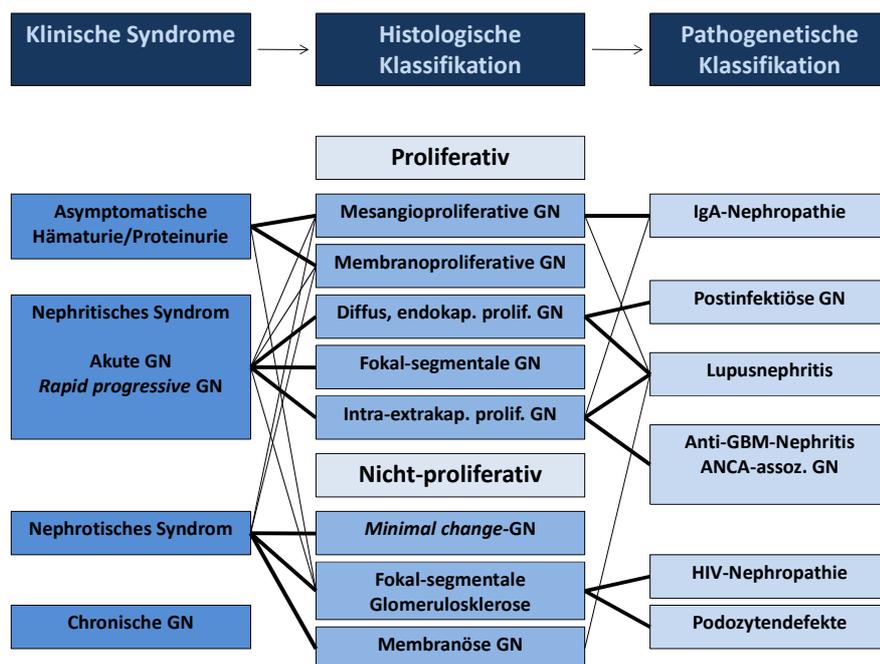


Abbildung 5: Formen der Glomerulonephritis. Die Glomerulonephritiden können anhand ihrer klinischen Symptome, anhand histologischer Veränderungen oder nach ihrer Pathogenese eingeteilt werden.

Nach ihrem klinischen Verlauf unterscheidet man akute von chronischen Glomerulonephritiden. Akute Glomerulonephritiden sind gekennzeichnet durch einen plötzlichen Krankheitsbeginn mit Hämaturie, Proteinurie, Ödemen und evtl. einem Kreatininanstieg. Prinzipiell kann jede Glomerulonephritis in einen chronischen Verlauf übergehen. Oft bleibt dabei die eigentliche Entzündung unerkannt, es kommt über Jahre zum progredienten Entzündungsprozess der Glomeruli mit nachfolgender Glomerulosklerose [7]. Während der Beginn der einzelnen Glomerulonephritiden sehr verschieden sein kann, führt die Antwort auf entzündliche und fibrotische Ereignisse meist zu einer gemeinsamen Endstrecke von progressivem Nierenschaden. Eine Sonderform der akuten Glomerulonephritis stellt die *rapid progressive* Glomerulonephritis dar. Diese seltene Glomerulonephritis ist ein nephrologischer Notfall. Unbehandelt kann es innerhalb weniger Monate zur terminalen Niereninsuffizienz kommen. Darüber hinaus können Glomerulonephritiden klinisch unterschieden werden und zwar solche, die mit nephrotischem Syndrom einhergehen von solchen, die mit nephritischem Syndrom oder einer asymptotischen Hämaturie einhergehen. Das nephrotische Syndrom ist gekennzeichnet durch eine große Proteinurie (>3,5 g/24 h), eine Hypoproteinämie, Ödeme und eine Hyperlipidämie. Beim nephritischen Syndrom kommt es zu Makrohämaturie, leichter Proteinurie, arterieller Hypertonie, Ödemen und Oligurie.

Histologisch lassen sich die Glomerulonephritiden in zwei Gruppen einteilen: proliferativ und nichtproliferativ. Zu den proliferativen Glomerulonephritiden zählen die mesangioproliferative Glomerulonephritis, die membranoproliferative Glomerulonephritis, die diffus endokapillär

proliferative Glomerulonephritis, die fokalsegmentale Glomerulonephritis sowie die intraextrakapilläre proliferative Glomerulonephritis. Nichtproliferative Glomerulonephritiden sind die *minimal change*-Glomerulonephritis, die fokalsegmentale Glomerulosklerose und die membranöse Glomerulonephritis.

Anhand ihrer Pathogenese lassen sich folgende Glomerulonephritiden unterscheiden: die IgA-Nephropathie, die postinfektiöse Glomerulonephritis, die Lupusnephritis, die Antibasalmembran-Nephritis, die HIV-Nephropathie sowie andere virusinfektionsassoziierte Glomerulonephritis, Glomerulonephritis als Mitbeteiligung bei Vaskulitiden oder Glomerulonephritis durch Podozytendefekte. Diese Erkrankungen führen entweder durch Bildung von Immunkomplexen oder Antibasalmembran-Antikörper oder direkt zur glomerulären Schädigung. Bei der Immunkomplex-Glomerulonephritis sind es Immunkomplexe, bestehend aus einem Antigen und dem zugehörigen Antikörper, die sich beim Durchströmen der Nieren im Glomerulus ablagern. Sie führen lokal zur Aktivierung der Komplementkaskade mit nachfolgender entzündlicher Reaktion im Glomerulus. Zu den Immunkomplex-Glomerulonephritiden zählen die Lupusnephritis, die postinfektiöse Glomerulonephritis und die IgA-Nephropathie. Bei der Antibasalmembran-Antikörper-Glomerulonephritis dagegen bildet das Immunsystem Autoantikörper gegen die glomeruläre Basalmembran, die Anlagerung dieser Antikörper an die Basalmembran löst eine Entzündungsreaktion mit Zerstörung der Membran aus [8]. Diese Erkrankung befällt häufig Nieren und Lungen gleichzeitig (*Goodpasture-Syndrom*) [9].

Im Folgenden werden die verschiedenen Glomerulonephritiden anhand ihrer histologischen Klassifikation näher erläutert.

1.2.1 Proliferative Glomerulonephritiden

Mesangioproliferative Glomerulonephritis

Die klassische mesangioproliferative Glomerulonephritis ist die IgA-Nephropathie. Sie ist mit ca. 25 % die weltweit häufigste Form aller Glomerulonephritiden; betroffen sind überwiegend Männer zwischen 20 und 40 Jahren. Eine weitere Ursache der mesangioproliferativen Glomerulonephritis ist die Lupusnephritis. Histologisch zeigen sich vergrößerte Glomeruli mit einer Vermehrung der Mesangialzellen sowie einer Verbreiterung der mesangialen Matrix. Immunhistologisch finden sich granuläre Ablagerungen von Immunglobulinen und Komplement im Mesangium und später in den Basalmembranen [8]. Bei der IgA-Nephropathie finden sich in der Immunfluoreszenz mesangiale IgA-Ablagerungen [10]. Ätiologie und Pathogenese der IgA-Nephropathie sind unklar. Vermutet wird eine vermehrte Bildung von durch Fehlglykosierung strukturell verändertem IgA in den peripheren lymphatischen Geweben der Schleimhäute infolge lokaler Infekte. IgA-Immunkomplexe im

Mesangium führen durch Komplementaktivierung zur oben genannten Mesangialzellproliferation und mesangialer Matrixvermehrung. Im Serum finden sich oft erhöhte IgA-Spiegel, zirkulierende IgA-Immunkomplexe und ein erhöhter Anteil polymerer IgA-Moleküle, die bei manchen Patienten die Aktivität eines Rheumafaktors besitzen [11]. Es ist nicht klar, ob Fc-Rezeptoren, welche Immunglobuline binden können und die an der Oberfläche von Mesangialzellen exprimiert sind, bei der Entstehung dieser Erkrankung eine Rolle spielen [8]. Klinisch treten bei der mesangioproliferativen Glomerulonephritis häufig eine isolierte Proteinurie und/oder eine Mikrohämaturie auf, seltener besteht ein nephrotisches Syndrom. Die Diagnose wird oftmals als Zufallsbefund erhoben. Im Urinsediment finden sich Akanthozyten oder Erythrozytenzylinder. Sie kann jahrelang stationär bleiben, andererseits aber auch bei anhaltender oder wiederholter immunologischer Aktivität fortschreiten. Hierdurch kommt es zu glomerulären Sklerosen sowie zu einer sekundären interstitiellen Fibrose und Tubulusatrophie. Das Endstadium ist eine glomerulonephritische Schrumpfniere mit chronischem Nierenversagen. Eine Indikation zur Therapie mit Kortikosteroiden und Cyclophosphamid liegt bei Patienten mit nephrotischem Syndrom und rasch progredienter Glomerulonephritis vor. Bei 25 % der Patienten ist die Prognose gut, bei 50 % kommt es im Verlauf von 10 bis 20 Jahren zur Progression der Erkrankung, 25 % gehen mit einem raschen Verlust der Nierenfunktion einher [7]. Die molekularen Mechanismen dieser infektgetriggerten Aktivität der IgA-Nephritis sind unklar und Gegenstand der vorgelegten Promotionsarbeit. Bei der IgA-Nephropathie kann es ein bis drei Tage nach einem Infekt der oberen Luftwege zu Flankenschmerzen und zur typischen Makrohämaturie kommen. Die Flankenschmerzen sind als Kapselschmerz bei Nierenschwellung zu erklären.

Membranoproliferative (mesangiokapilläre) Glomerulonephritis

Bei dieser Glomerulonephritis liegen sowohl mesangiale Proliferationen als auch eine Basalmembranverbreiterung vor. Es fällt eine Kapillarwandverdichtung in den Glomeruli auf, die teils von mesangialer Interposition, teils von abgelagerten Immunkomplexen herrührt. Sie kann in zwei Subtypen unterteilt werden. Die Typ 1-MPGN wird durch zirkulierende komplementaktivierende Immunkomplexe verursacht. Sie ist fast immer mit Infektionskrankheiten assoziiert insbesondere mit der chronischen Hepatitis B und C. Des Weiteren tritt sie bei Sichelzellanämie und Kryoglobulinämie auf. Immunhistologisch finden sich subendotheliale grob-granuläre Ablagerungen von Immunglobulinen und C3 subendothelial und mesangial. Beim Typ 2 fehlen in der Regel zirkulierende Immunkomplexe; nachweisbar ist aber ein sog. C3-nephritischer Faktor; im Blut besteht ein Mangel an Komplement. Immunhistologisch sind dichte intramembranöse Depots (*dense deposits*) in der Basalmembran von Glomeruli und Tubuli nachweisbar [8]. Insgesamt ist diese Glomerulonephritisform eher selten. Üblicherweise wird sie durch ein nephrotisches Syndrom

auffällig, 16-30 % jedoch auch durch eine akute Nephritis [10]. Die symptomatische Therapie steht im Vordergrund. Die Prognose ist ungünstig; auch nach Nierentransplantation tritt die Glomerulonephritis bei 50 % der Patienten wieder auf.

Endokapilläre Glomerulonephritis

Das am besten bekannte Beispiel für die endokapilläre Glomerulonephritis ist die Poststreptokokken-Glomerulonephritis [10]. Hierbei handelt es sich um eine sekundär bedingte Immunkomplexerkrankung, die häufig zwei bis drei Wochen nach einer Infektion mit Streptokokken der Gruppe A auftritt (Pharyngitis, Furunkel). Es kommt zur Ablagerung von zirkulierenden Immunkomplexen und Komplementfaktoren an der Außenseite der Basalmembran. Die Implantation von Streptokokken-Antigen in die Basalmembran wird diskutiert. Histologisch sind die Glomeruli auffällig vergrößert; sie weisen eine globale Schwellung und Vermehrung der Endothel- und Mesangiumzellen auf. Die glomerulären Kapillarlichtungen sind eingengt und enthalten neutrophile Granulozyten. Durch die abgelagerten Immunkomplexe wird ein akuter Entzündungsprozess in Gang gesetzt, der zu Mikrohämaturie, nichtselektiver Proteinurie, Ödemen und Hypertonie führt (akutes nephritisches Syndrom). Allgemeinsymptome mit Fieber, Abgeschlagenheit, Leistungsverlust und Gliederschmerzen treten auf. Die Nierenfunktion kann je nach Verlauf und Schwere des Krankheitsbildes nicht, vorübergehend oder zunehmend eingeschränkt sein. Bei vorausgegangener Streptokokkeninfektion und gezielter Antibiotikatherapie heilt die Glomerulonephritis nach Tagen oder Wochen ohne oder mit Residuen aus [7]. Während die Poststreptokokken-Glomerulonephritis seltener geworden ist, nehmen Glomerulonephritiden nach Infektionen mit Staphylokokken und gramnegativen Erregern vor allem bei älteren Menschen und Immunsupprimierten zu. Des Weiteren können Meningokokken, Pneumokokken und Viren ebenfalls eine postinfektiöse Glomerulonephritis auslösen.

1.2.2 Nichtproliferative Glomerulonephritiden

Minimal change-Glomerulonephritis

Die *minimal change*-Glomerulonephritis ist die häufigste Ursache des nephrotischen Syndroms im Kindes- und Jugendalter. Die Ätiologie der Minimalläsion ist unklar; vermutet wird ein von T-Zellen produzierter, zirkulierender Faktor, der die glomeruläre Permeabilität beeinflusst. Histologisch findet sich ein Verlust der Podozyten an der glomerulären Basalmembran. Die Erkrankung beginnt plötzlich mit einem nephrotischen Syndrom und geht stets ohne Niereninsuffizienz einher. Diese Glomerulonephritis spricht zumeist gut auf eine Kortikoidtherapie an [7].

Fokal-segmental sklerosierende Glomerulonephritis (Fokal-segmentale Glomerulosklerose)

Hierbei handelt es sich um eine fokale Glomerulonephritis, die mit segmentalen Hyalinosen und Sklerosen der Glomeruli einhergeht und eine ausgedehnte Verschmelzung der Fußfortsätze aufweist (durchgehende glomeruläre Podozytenkrankheit). Immunhistologisch finden sich neben der Sklerose diffuse segmentale und mesangiale Ablagerungen von IgG, IgM und C3-Komplement. Bei etwa 5 % der Erwachsenen mit Nierenerkrankungen im Endstadium findet sich eine fokal-segmentale Glomerulosklerose [12]. Die Ätiologie ist unklar, es gibt eine primäre idiopathische Form, eine sekundäre Form bei immunologischen Erkrankungen, Neoplasien und Infektionen (z.B. HIV) und eine hereditäre Form. Bei der hereditären Form führen Mutationen des ACTN4-Gens, welches für das α -Aktinin-4 codiert, zur Entstehung einer autosomal-dominant vererbten Form der fokal-segmentalen Glomerulosklerose [13]. Des Weiteren können Genmutationen im NPHS2-Gen zur Entstehung eines autosomal-rezessiv vererbten steroidresistenten nephrotischen Syndroms führen [12]. Die Klinik der fokal-segmentalen Glomerulosklerose beinhaltet die Proteinurie und das nephrotische Syndrom; es kommt regelmäßig zum fortschreitenden Verlust der Nierenfunktion. Eine gesicherte Therapie gibt es nicht; eine Therapie mit Kortikosteroiden führt zum Verschwinden des nephrotischen Syndroms [7].

Membranöse Glomerulonephritis

Charakteristisch für diese Glomerulonephritis sind Immunkomplexablagerungen oder *in situ* Immunkomplexformationen in der glomerulären Basalmembran. Die Ursache für eine primäre Erkrankung ist nicht bekannt. Als Sekundärerkrankung tritt sie bei soliden Tumorerkrankungen, Infektionen, immunologisch bedingten Systemerkrankungen (Lupus erythematodes), bei Drogeneinnahme und unter Therapie mit bestimmten Arzneimitteln auf. Die subepithelialen Ablagerungen zirkulierender oder *in situ* gebildeter Immunkomplexe führen durch Neusynthese von Basalmembranmaterial zu einer Basalmembranverbreiterung ohne auffällige Zellproliferation. Die membranöse Glomerulonephritis verläuft in vier Stadien. Im Frühstadium kommt es zu subepithelialen Immundepots. Die weiteren Stadien sind durch zunehmende Neubildung von Basalmembransubstanzen zunächst zwischen den Immundepots, später auch an der Außenseite mit Umhüllung der Depots und deutlicher Verbreiterung der Basalmembran gekennzeichnet. Bei Auflösung der Immundepots entsteht schließlich eine kettenartige Gliederung der Basalmembran; in einigen Fällen kann es zur Ausheilung mit Ausbildung einer normalen Basalmembran kommen. Immunhistologisch besteht ein klassisches granuläres subepitheliales Ablagerungsmuster von IgG und C3 an der Außenseite der glomerulären Basalmembran. Klinisch zeigt sich diese Glomerulonephritis durch ein nephrotisches Syndrom oder durch eine isolierte Proteinurie. Die Prognose ist abhängig von der Ätiologie der Erkrankung. Bei idiopathischer Glomerulonephritis ist sie hinsichtlich der Heilung

schlecht; bei der sekundären Form kann es durch Therapie der Grunderkrankung zu einer deutlichen Verbesserung der Nierenfunktion kommen [8].

1.3 Virusassoziierte Glomerulonephritis

Chronische virale Infektionen, z.B. Hepatitis C, können eine *de novo* Immunkomplex-Glomerulonephritis auslösen. Häufiger jedoch führen akute virale Infektionen zur Verschlechterung vorbestehender glomerulärer Erkrankungen wie der IgA-Nephropathie. Tabelle 2 zeigt verschiedene Mechanismen der virusassoziierten Glomerulonephritisentstehung wie sie vor 15 Jahren gesehen wurden (= traditionelles Konzept) [14]. Inzwischen ist ein völlig neues Verständnis der Entstehung eines Gewebeschadens entstanden, das die Pathogenerkennung mit nachfolgender Aktivierung der Immunität beinhaltet. Dabei ist zu beachten, dass bei der akuten Glomerulonephritis die direkte virale Infektion des Glomerulus zu proliferativen Veränderungen und zur Ausschüttung von Zytokinen führt [15]. Bei chronischen Formen hingegen führt die persistierende virale Entzündung zur kontinuierlichen Antigenstimulation mit nachfolgender Antikörperproduktion und Immunkomplexbildung [16]. Diese lagern sich entweder mesangial oder perimembranös ab.

In Tabelle 3 sind die viralen Infektionen aufgeführt, die zur Entstehung bzw. Verschlechterung glomerulärer Erkrankungen beitragen können [14]. Es wird derzeit diskutiert, ob andere Viren wie solche, die Gelbfieber, Mumps, Masern, Varizellen und Herpes auslösen, ebenfalls eine Rolle bei der Entstehung der Glomerulonephritis spielen [16]. Virale Infektionen aktivieren die systemische antivirale Immunität über verschiedene Mediatoren (siehe Kapitel 1.5). Dies führt durch verstärkte Autoantikörperproduktion, Immunkomplexbildung oder systemische Interferonfreisetzung [17] zur Sklerose und zum Aufblühen der Glomerulonephritiden.

Tabelle 2: Mechanismen der virusassoziierten Glomerulonephritis [14]

1. Zirkulierende Immunkomplexe

- Aus viralem Antigen und antiviralem Antikörper [15]
- Aus endogenem Antigen, das durch virale Verletzung und Autoantikörper verändert wurde [18]

2. *In situ* immunvermittelte Mechanismen, bei denen virale Antigene an glomeruläre Strukturen gebunden wurden [19, 20]

3. Expression von viralen Proteinen oder anormalen körpereigenen Proteinen, die

- Durch Apoptose, Nekrose oder Zelldysfunktion den Zelltod auslösen [21]
- Die Matrixsynthese erhöhen und/oder die Matrixdegeneration vermindern
- Zur Ausschüttung von Zytokinen, Chemokinen, Adhäsionsmolekülen oder Wachstumsfaktoren führen [22]

4. Direkter zytopathogenetischer Effekt auf glomeruläre Zellen mit unbestimmtem Mechanismus [23]

Tabelle 3: Virale Infektionen, die Nierenerkrankungen hervorrufen/verschlechtern können [14]

Hepatitis B-Virus (HBV)	membranöse Nephropathie, mesangiokapilläre GN, IgA-Nephritis
Hepatitis C-Virus (HCV)	Kryoglobulinämie, mesangiokapilläre GN
Humanes Immundefizit-Virus (HIV)	HIV-Nephropathie
Parvovirus B 19 (PV 19)	fokal-segmentale Glomerulosklerose
Cytomegalie-Virus (CMV)	Allograft-Nephropathie?
Epstein-Barr-Virus (EBV)	Lupusnephritis?
Polyoma-Virus BK (BKV)	BK (Allograft)-Nephropathie
Hantavirus	akutes Nierenversagen
Coronavirus	akutes Nierenversagen

Es wird geschätzt, dass derzeit weltweit 350-400 Millionen Menschen mit Hepatitis B infiziert sind. In Endemiegebieten erfolgt die Übertragung meist vertikal, d.h. von der infizierten Mutter zum Kind [16]. Die berichtete Prävalenz der HBV-assoziierten Nephropathie korreliert mit der geographischen Verteilung der Hepatitis B-Prävalenz [24]. Die drei Hauptformen der mit Hepatitis B-assoziierten Glomerulonephritis sind die membranöse Glomerulonephritis, die mesangiokapilläre Glomerulonephritis und die IgA-Nephropathie [25]. Die HBV-assoziierte membranöse Nephropathie manifestiert sich etwas unterschiedlich in Kindern und Erwachsenen. Kinder leiden häufig unter einem nephrotischen Syndrom mit Hämaturie und normaler bis leicht eingeschränkter Nierenfunktion [26]. Bei Erwachsenen findet sich häufig eine Proteinurie oder eine nephrotisches Syndrom. Die Nierenfunktion kann stark eingeschränkt sein [24]. Im Gegensatz zu Kindern ist die Erkrankung bei Erwachsenen typischerweise fortschreitend, so entwickelten beispielsweise in Hong Kong 29 % der Patienten mit membranöser Nephropathie ein fortschreitendes Nierenversagen [27]. Bisher wurde noch kein ideales Therapiekonzept für die Hepatitis B-assoziierten Glomerulonephritiden gefunden. Versucht wird der Einsatz von Lamivudin, pegyliertem Interferon und Kortikosteroiden [28]. Die aktive Hepatitis B-Impfung ist der beste Schutz [29].

Die WHO nimmt an, dass es momentan 170-200 Millionen Hepatitis C-Infizierte weltweit gibt. Die häufigste renale Manifestation der Hepatitis C-Infektion ist die mesangiokapilläre Glomerulonephritis Typ I, meist im Zusammenhang mit der gemischten Kryoglobulinämie [30]. Zwei Gründe werden für die extrahepatische Manifestation der Hepatitis C angenommen. Erstens ist das Hepatitis C-Virus dafür bekannt, die Immunelimination zu umgehen und dadurch zu chronischer Infektion und zur Akkumulation von Immunkomplexen zu führen. Zweitens stimuliert es die Produktion von monoklonalen Rheumafaktoren, was eine gemischte Kryoglobulinämie verursacht [16]. Zwischen 35 und 90 % der Hepatitis C-Infizierten leiden unter gemischter Kryoglobulinämie [31, 32]. Typischerweise treten die mit Hepatitis C-assoziierten Nierenerkrankungen um die fünfte oder sechste Lebensdekade auf. Etwa ein Viertel der Patienten stellt sich mit einem akuten nephritischen Syndrom

vor. Über 80 % der Patienten leiden unter therapierefraktärer Hypertonie [16]. Der Verlauf der Erkrankung kann stark variieren. Laut einer italienischen Studie werden 15 % der Patienten mit Hepatitis C-assoziierten Nierenerkrankungen dialysepflichtig [33]. Die Therapie besteht einerseits aus der Entfernung der Immunkomplexe durch Plasmapherese und der Unterdrückung der Immunkomplexneubildung durch Steroide. Andererseits durch die Verhinderung der viralen Replikation durch Interferon und Ribavirin.

Die mit HIV-assoziierten Glomerulonephritiden lassen sich in vier Gruppen einteilen. Die erste Gruppe ist die klassische HIV-assoziierte Nephropathie (HIVAN) mit dem histologischen Bild der fokal-segmentalen Glomerulosklerose [34]. Die zweite Gruppe ist eine diffuse proliferativ-mesangiokapilläre oder lupusähnliche Glomerulonephritis mit mesangialen Immunablagerungen [35]. Die dritte Gruppe ist heterogen mit glomerulären Läsionen, deren pathogenetische Mechanismen noch nicht geklärt sind. Zur letzten Gruppe zählt das HIV-assoziierte thrombotisch hämolytisch-urämische Syndrom [16]. Von der HIV-assoziierten Nephropathie sind bis zu 10 % der HIV-Infizierten betroffen. Die Patienten stellen sich mit einer schweren Proteinurie, einem nephrotischen Syndrom und stark erhöhten Kreatininwerten vor. Histologisch zeigt die fokale Sklerose eine kollabierende Form, die Kapillarschlingen in den Glomeruli scheinen geschlossen und zeigen Epithelzellproliferationen in der Bowman-Kapsel. Außerdem finden sich große, zystische Tubuli. Die intensive antiretrovirale Therapie verzögert die Progression [36]. Die schwere Proteinurie wird meist mit ACE-Hemmern oder Angiotensin-2-Rezeptorblockern behandelt [28].

1.4 Mesangialzellen

Die Niere besteht aus Nierenrinde und Nierenmark. Die Rinde enthält die Glomeruli sowie die proximalen und distalen Tubuli. Das Mark umfasst die Pyramiden mit je 8-10 Papillen pro Niere, die in die Nierenkelche der ableitenden Harnwege hineinragen. Die morphologisch-funktionelle Einheit der Niere ist das Nephron. Es besteht aus dem Nierenkörperchen (Bowman-Kapsel, Glomerulus und Mesangium) (Abbildung 6 und 7 [37]) mit zugehörigem Tubulus- und Sammelrohrsystem. Diese werden von interstitiellem Bindegewebe umhüllt, in dem die Blutgefäße verlaufen. Die Filtrationsmembran der Glomeruli ist folgendermaßen aufgebaut: das Endothel ist gefenstert und lässt so einen direkten Kontakt des Plasmas mit der Basalmembran zu, die Basalmembran bildet die strukturelle Matrix an der sich Endothel und Podozyten anhaften, das außen gelegene Epithel (Podozyten) besitzt zahlreiche Fußfortsätze, die mit der Basalmembran Kontakt haben [8].

Der Raum zwischen den Kapillaren des Glomerulus wird vom Mesangium eingenommen, einem schmalen Bindegewebsraum, in dem die Mesangialzellen (Abbildung 6) in die sehr faserarme, extrazelluläre Matrix eingebettet sind [38]. Das Mesangium hilft den Kapillarwänden des Glomerulus dem recht hohen intrakapillären Druck stand zu halten [37]. Mesangialzellen besitzen nicht nur eine

anatomisch zentrale Position im renalen Glomerulus sondern auch eine Funktionelle. Sie bieten strukturelle Unterstützung für die Kapillarschlingen, reagieren in ihrer Eigenschaft als glatte Muskelzellen auf vasokonstriktische (z.B. Angiotensin II, Vasopressin, Norepinephrin und Histamin) und vasorelaxierende (erhöhte Erzeugung von cAMP und cGMP) Faktoren, was zur lokalen Beeinflussung der glomerulären Filtration führt, und erzeugen vasoaktive Substanzen, wie Renin, Prostaglandin und den Plättchenaktivierungsfaktor. Außerdem sind sie am Auf- und Abbau der Basalmembran und anderer Biomatrixkomponenten beteiligt. Mesangialzellen sind auch zur Endozytose von Makromolekülen einschließlich Immunkomplexen fähig; diese wird durch Bindung an einen spezifischen Rezeptor ausgelöst, was zur Bildung des Plättchenaktivierungsfaktors führt. Des Weiteren sind Mesangialzellen zur Synthese von Zytokinen, wie Interleukin-1 und dem *platelet-derived growth factor* fähig und reagieren auf diese in einer autokrinen Weise. Das bedeutet, dass die Mesangialzellen nicht nur die glomeruläre Filtration kontrollieren können sondern auch bei der Immunantwort auf lokale, glomeruläre Verletzungen beteiligt sein können [39].

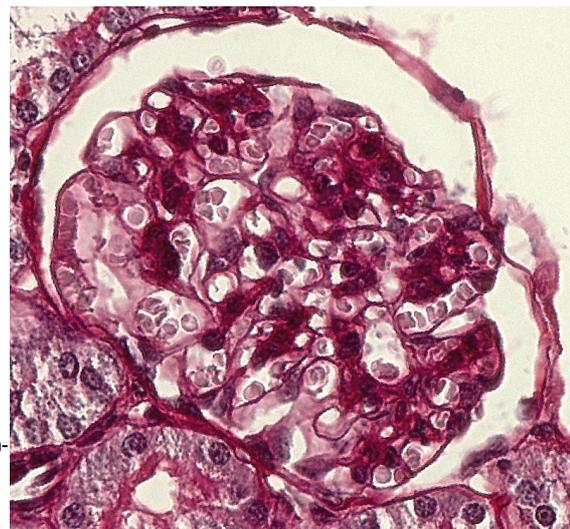
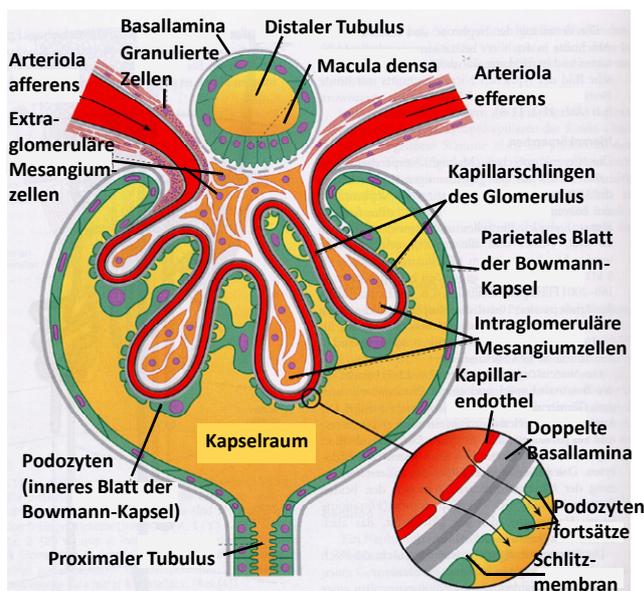


Abbildung 6: Schematische Darstellung eines Nierenkörperchens. Rechts unten: strukturelle Komponenten der Blut-Harn-Schranke [37].

Abbildung 7: PAS-gefärbtes Nierenkörperchen. Dargestellt ist ein Nierenkörperchen mit Glomerulus, Bowman-Kapsel und Kapselraum. Unten sind angeschnittene proximale Tubuli zu sehen. (Vergrößerung 400-fach)

1.5 Immunsystem

Aufgabe des Immunsystems ist es, die Integrität eines Individuums zu bewahren, indem ein Schutz gegen exogene und endogene Angriffe vermittelt wird. Dazu muss das Immunsystem „Eigen“ von „Fremd“ unterscheiden und Pathogene effektiv beseitigen können. Eine Immunantwort kann über das angeborene (unspezifische) und das erworbene (spezifische) Immunsystem erfolgen, wobei der Interaktion beider Systeme eine große Rolle zukommt.

Wichtige Effektoren des angeborenen Immunsystems sind Makrophagen, neutrophile Granulozyten, dendritische Zellen und natürliche Killerzellen. Diese sorgen für die erste Abwehr von Krankheitserregern und sollen die Entstehung eines Infektionsherdes verhindern. Sie sind auch die Grundlage für die Auslösung der spezifischen Immunantwort.

Die spezifische Immunantwort zeichnet sich durch die Spezifität der Pathogenerkennung und das immunologische Gedächtnis aus, das einen verstärkten Schutz gegen eine erneute Infektion gewährleistet. Hierbei spielen Lymphozyten die zentrale Rolle. B-Lymphozyten produzieren Antikörper, die extrazelluläre Pathogene binden, T-Lymphozyten unterstützen andere Zellen (T-Helferzellen) oder töten infizierte Zellen ab (zytotoxische T-Zellen).

Neben den genannten Zellen sind das Komplementsystem, Zytokine, Akute-Phase-Proteine und Antikörper für die Immunantwort von großer Bedeutung [40].

1.5.1 Die angeborene Immunantwort

Das angeborene Immunsystem bildet die erste Station in der Abwehr von Krankheitserregern. Dieser Abwehrmechanismus ist in allen Mehrzellorganismen vorhanden. Zunächst verhindern die Körperepithelien das Eindringen von Erregern dadurch, dass sie eine chemische, mechanische und mikrobielle Barriere darstellen. Falls dieser Abwehrmechanismus versagt, versuchen Phagozyten und das Komplement die Infektion zu stoppen. Die sofortige erfolgreiche Phagozytose ist die Hauptaufgabe der neutrophilen Granulozyten (Abbildung 8) [40].

Makrophagen haben zusätzlich zur Phagozytose noch die Aufgabe der Signalweiterleitung und damit der Induktion weiterer Reaktionen. Hierfür ist der Toll-like Rezeptorsignalweg von Bedeutung. Über diesen werden sie aktiviert, Chemokine und Zytokine freisetzen; dadurch kommt es zum klassischen Bild der Entzündungsreaktion, d.h. zur Erweiterung lokaler Blutgefäße (Rötung und Erhitzung), zur Extravasation von Leukozyten, insbesondere Granulozyten, und zur erhöhten Durchlässigkeit der Gefäßwand, wodurch sich Flüssigkeit und Plasmaproteine wie Komplement am Infektionsherd anreichern können (Schwellung und Schmerz). Durch diese akute Entzündung wird neben einer möglichen Beseitigung des Erregers auch die Ausbreitung des Pathogens verhindert (Abbildung 9) [40].

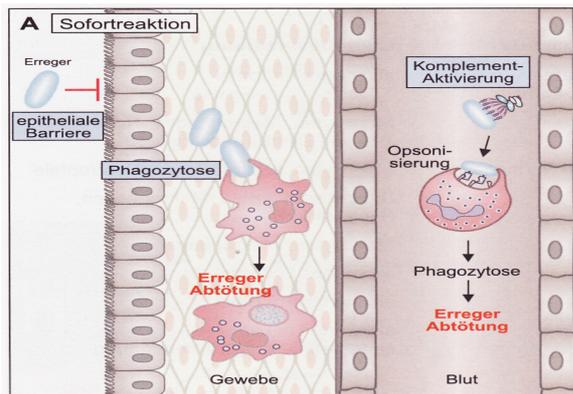


Abbildung 8: Angeborene Effektormechanismen: Sofortreaktion. Epithelien stellen die erste physikalische und chemische Abwehrmaßnahme dar. Dringt der Erreger ins Blut vor, kommt es durch die Aktivierung von Komplement zur Opsonierung und Phagozytose durch Granulozyten und ggf. zur Abtötung des Pathogens. Dringt der Erreger ins Gewebe ein, kommt es zur Aufnahme durch ortsständige Makrophagen, die durch Phagozytose aktiviert werden und mikrobizide Faktoren produzieren, was ggf. zur Vernichtung des Pathogens führt. Gelingt die Beseitigung nicht in der Sofortreaktion, werden weitere Effektormechanismen induziert [40].

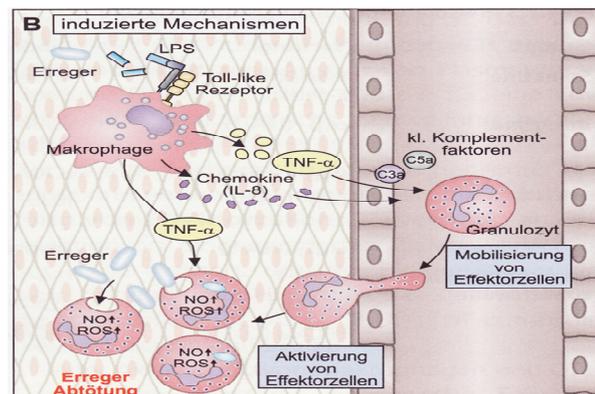


Abbildung 9: Angeborene induzierte Effektormechanismen: Aktivierte Toll-like Rezeptoren auf phagozytierenden Makrophagen bewirken die Ausschüttung von Zytokinen, insbesondere TNF- α und Chemokinen, was zur Endothelaktivierung und Mobilisierung von weiteren Effektorzellen in das infizierte Gewebe führt. Kleine Komplementfaktoren sind hier ebenfalls beteiligt. Makrophagen-Zytokine stimulieren dann wiederum Effektorzellen, um mit den Erregern auf unterschiedlichste Art fertig zu werden. Insbesondere TNF- α spielt hier eine wesentliche Rolle [40].

Das angeborene Immunsystem besitzt im Gegensatz zum erworbenen Immunsystem keine Spezifität, kann aber Eigen von Fremd unterscheiden. Um Krankheitserreger zu erkennen und die Immunantwort zu aktivieren, sind Rezeptoren nötig. Diese Rezeptoren, die generell Pathogene erkennen, bezeichnet man als Mustererkennungsmoleküle (*pattern recognition receptors*, PRR). Sie erkennen und binden sich regelmäßig wiederholende Strukturmuster von Mikroorganismen. Die Strukturen, die gebunden werden, werden Musterstrukturen (*pathogen associated molecular pattern*, PAMP) genannt. Diese Strukturen befinden sich idealerweise nur auf Mikroben und nicht auf Wirtszellen. Die Musterstrukturen unterscheiden sich innerhalb einer Klasse von Krankheitserregern nicht, so dass unterschiedliche Erreger durch eine limitierte Menge an Rezeptoren erkannt werden. Noch nicht ganz geklärt ist die Frage, über welchen Mechanismus das angeborene Immunsystem zwischen Musterstrukturen der physiologischen Mikroflora und Musterstrukturen pathogener Erreger unterscheiden kann. Diskutiert wird der Einfluss der Kompartimentierung und antiinflammatorischer Zytokine [40].

Mustererkennungsmoleküle können lösliche Rezeptoren, Zelloberflächenrezeptoren und intrazelluläre PRRs sein, um Mikroorganismen in allen intra- und extrazellulären Kompartimenten erkennen zu können. Abbildung 10 zeigt Beispiele für Mustererkennungsstrukturen der angeborenen und erworbenen Immunantwort.

Besondere Bedeutung im Verständnis der angeborenen Immunantwort kommt der Identifikation von drei Pathogenerkennungsfamilien zu: den Toll-like Rezeptoren, den RIG-like Rezeptoren und den NOD-like Rezeptoren. Es ist wahrscheinlich, dass das Zusammenspiel dieser drei Familien die Koordination der angeborenen Immunantwort entweder über synergistische oder über kooperative Wege sicher stellt und somit in der ersten Phase der Infektionsabwehr ein wirkungsvoller Abwehrmechanismus gewährleistet wird [41] (siehe Kapitel 1.6).

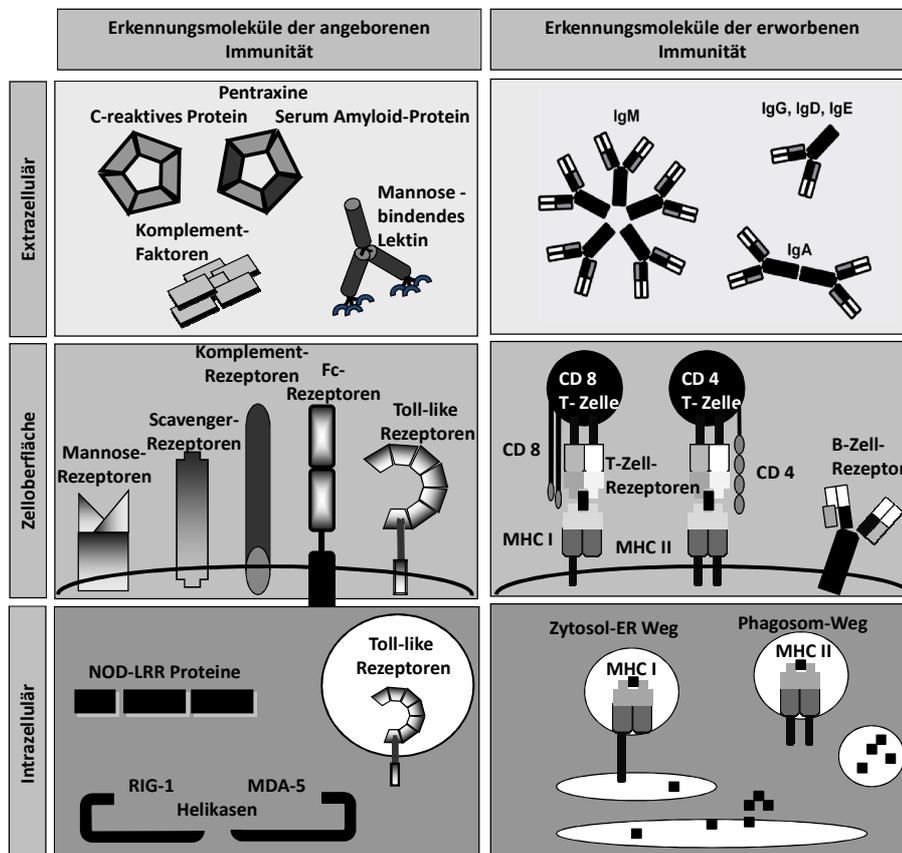


Abbildung 10: Mustererkennungsstrukturen der angeborenen und erworbenen Immunität. Es gibt intra- und extrazelluläre Erkennungsmoleküle sowie Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Zu den Rezeptoren der angeborenen Immunität gehören unter anderem Komplementfaktoren, Toll-like Rezeptoren, NOD-like Rezeptoren und RIG-ähnliche Helikasen. Zum erworbenen Immunsystem gehören Immunglobuline, T- und B-Zellen und MHC (major histocompatibility complexes).

Häufig werden eindringende Pathogene von Antikörpern (Abbildung 11) gebunden. Dabei entstehen Immunkomplexe, bestehend aus einem Antikörper (Immunglobulin) und einem Antigen. Es ist schon seit Längerem bekannt, dass diese Antigen-Antikörper-Komplexe über den Fc-Rezeptor von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten erkannt werden, was diese Zellen dazu veranlasst, die Komplexe zu phagozytieren. Ob die virale RNA dieser Immunkomplexe auch direkt über *pattern recognition receptors* erkannt werden kann, ist bislang unklar (Abbildung 12).

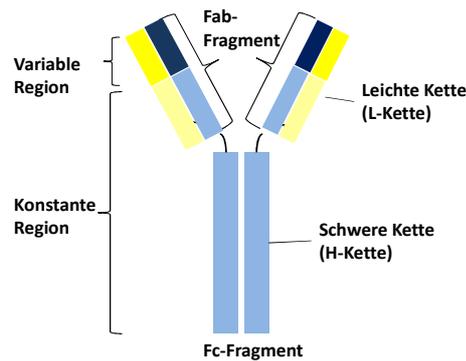


Abbildung 11: Aufbau eines Antikörpers. Antikörper sind γ -förmige Glykoproteine bestehend aus zwei identischen schweren und zwei identischen leichten Ketten. Innerhalb der Ketten kann man variable und konstante Regionen unterscheiden. Die variablen Domänen liegen am N-terminalen, die konstanten Domänen am C-terminalen Ende des Moleküls [42]. Das Fab (fragment antigen binding)-Fragment ist ein proteolytisches Fragment eines Immunglobulinmoleküls, das aus einer kompletten leichten Kette, gepaart mit einem Fragment der schweren Kette, das die variable und die erste konstante Region enthält, besteht. Das Fab-Fragment kann ein Antigen binden, aber nicht mit Fc-Rezeptoren interagieren oder Komplement binden. Fc (fragment crystallizable)-Fragmente bestehen aus den über Disulfidbrücken verbundenen carboxyterminalen Regionen der beiden schweren Ketten. Fc-Regionen medieren Effektorfunktionen von löslichen Antikörpern wie Komplementaktivierung oder Bindung an Fc-Rezeptoren von Makrophagen [40].

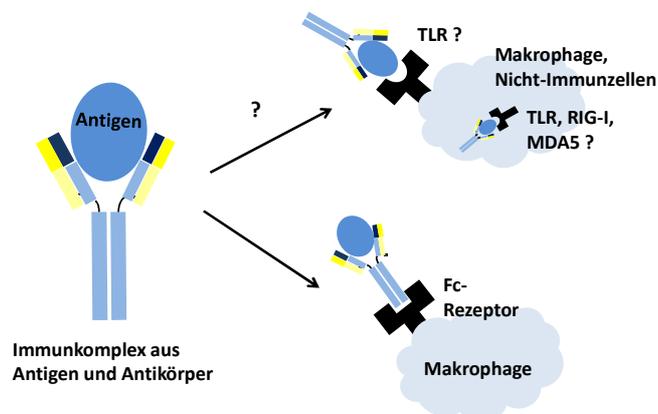


Abbildung 12: Immunkomplexerkennung über Fc-Rezeptoren und PRRs. Das Fc-Fragment des Antikörpers von Immunkomplexen kann von Makrophagen über den Fc-Rezeptor auf dessen Zelloberfläche erkannt werden. Ob auch der Antigenteil der Immunkomplexe über *pattern recognition receptors* auf der Zelloberfläche oder intrazellulär erkannt werden kann, ist bislang unklar.

1.5.2 Die erworbene Immunantwort

Das erworbene Immunsystem greift immer dann ein, wenn die Eliminierung des Erregers durch das angeborene Immunsystem nicht erfolgreich war. Eine erworbene Immunantwort zeichnet sich durch Antigenspezifität aus, das heißt sie ist die Reaktion auf ein spezifisches Antigen und muss daher eine enorme Diversität in den Erkennungsstrukturen aufweisen. Durch von B-Lymphozyten produzierte Antikörper werden Krankheitserreger im Extrazellulärraum bekämpft (humorale Antwort), durch T-Zellen intrazelluläre Erreger. Je nachdem, in welchen Zellkompartimenten sich die Pathogene aufhalten, werden die abgebauten Antigene mit Hilfe der MHC-Moleküle an die Oberfläche der infizierten Wirtszelle gebracht. Der Typ von MHC/Peptid-Komplex bestimmt die Wechselwirkungen der Wirtszelle mit den verschiedenen T-Effektorzellen. Zytotoxische T-Zellen (CD8 positiv) erkennen MHC I-Komplexe und töten die infizierte Zelle ab. T-Helferzellen (CD4 positiv) sind auf MHC II-Komplexe spezialisiert und aktivieren den gebundenen Makrophagen bzw. die B-Zelle. T-Zellen sind sowohl für die zelluläre als auch für die humorale adaptive Immunantwort von Bedeutung. Die erworbene Immunantwort kann aber nicht nur Krankheitserreger beseitigen, sie erzeugt gleichzeitig durch klonale Selektion eine Population von ausdifferenzierten Gedächtniszellen. Dies ermöglicht bei einer erneuten Infektion eine schnellere und wirksamere Effektorreaktion [40].

Da die erworbene Immunantwort für die vorliegende Arbeit nicht weiter von Bedeutung ist, wird auf eine nähere Beschreibung verzichtet.

1.6 Erkennung viraler RNA

1.6.1 Toll-like Rezeptoren

Toll-like Rezeptoren (TLR) haben ihren Namen von ihrer Ähnlichkeit mit den Toll-Proteinen von *Drosophila melanogaster*. In der Fruchtfliege wurde das erste Mitglied dieser Familie, Toll genannt, identifiziert [43]. Toll ist verantwortlich für die dorsoventrale Entwicklung der Fruchtfliege und spielt eine wichtige Rolle in der Pilzabwehr der erwachsenen Fliege [44]. Homolog zu Toll gibt es in Vertebraten die Toll-like Rezeptoren. Bisher wurden 13 TLRs identifiziert, 10 im Menschen (TLR 1-10) und 12 murine (TLR 1-9 und 11-13), von denen einige homolog sind [45, 46]. Die Toll-like Rezeptoren 3, 7, 8 und 9 befinden sich endosomal, der Rest ist an der Zelloberfläche lokalisiert. Sie sind essentielle Pathogenerkennungsrezeptoren der angeborenen Immunantwort und vermitteln hier Signale, die u.a. zu einer Entzündungsreaktion führen. Sie unterscheiden sich durch ihre Ligandenspezifität und durch die Notwendigkeit bestimmter akzessorischer Proteine. Ihre Aktivierung durch spezifische Liganden führt zur Induktion von Genen, deren Produkte (Zytokine, Chemokine,

Adhäsionsmoleküle, NO-Synthase) essentiell für die angeborene und die erworbene Immunantwort sind. Tabelle 4 zeigt die bisher bekannten Toll-like Rezeptoren und ihre Antigene [47].

Toll-like Rezeptoren sind Typ I-Transmembranproteine, die gekennzeichnet sind durch einen extrazellulären leucinreichen Bereich (*leucin-rich repeats*, LRR) und einen intrazellulären oder zytoplasmatischen Bereich, der homolog zum Interleukin-1-Rezeptor (Toll/II-1-receptor, TIR) ist [48, 49]. Nach Erkennung ihrer Liganden dimerisieren die TLRs und beginnen eine Signalkaskade, die zur Aktivierung der proinflammatorischen Antwort führt [48]. Die Ligandenbindung induziert zwei Signalwege, einen MyD88-abhängigen und einen MyD88-unabhängigen. Beide Wege führen zur Produktion proinflammatorischer Zytokine und Interferone [49]. Diese zwei Antworten sind über den selektiven Gebrauch der Adaptormoleküle, die durch die TIR-Domäne der TLRs nach Ligandenerkennung und Bindung rekrutiert werden, ausgelöst.

Bisher wurden vier Adaptormoleküle identifiziert: MyD88, TIR-assoziiertes Protein (TIRAP), *TIR domain-containing adaptor protein inducing IFN- β* (TRIF) und *TRIF related adaptor molecules* (TRAM) [50-54]. MyD88 und TIRAP sind verantwortlich für die Induktion der proinflammatorischen Gene, TRIF und TRAM für die Induktion der Interferone [46]. Abbildung 13 zeigt die Toll-like Rezeptoren und ihre Signalkaskade mit Adaptorproteinen [47].

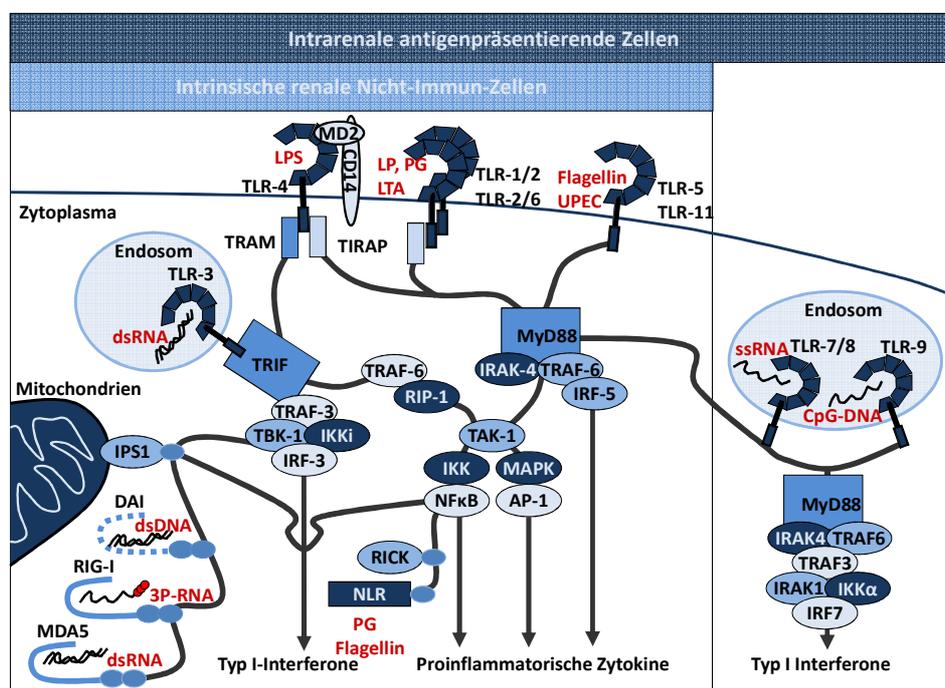


Abbildung 13: Toll-like Rezeptoren, Nod-like Rezeptoren, RIG-like Helikasen und ihre Adaptormoleküle. Dargestellt sind die verschiedenen Erkennungswege viraler RNA. Zum einen die einzelnen Toll-like Rezeptoren mit ihren Adaptormolekülen TRIF, TRAM, TIRAP und MyD88, zum anderen die RIG-like Helikasen RIG-I und MDA5 mit ihrem mitochondrialen Adaptorprotein IPS-1 und die NOD-like Rezeptoren mit RICK. Über diese Signalkaskaden führt die Erkennung viraler RNA zur Produktion proinflammatorischer Zytokine und Typ I-Interferone [47].

Tabelle 4: Pathogenassoziierte Moleküle und ihre Toll-like Rezeptoren [47]

Pathogen	Molekulares Muster	Toll-like Rezeptor
Bakterienwand		
Alle Bakterien	Peptidoglykan	TLR-2
Gram- Bakterien	Lipopolysaccharide	TLR-4
Gram+ Bakterien	Triacyl-Lipopeptide	TLR-1/TLR-2
	Lipoteichonsäure	TLR-2 –TLR-6
	Diacyl-Lipopeptide	TLR-2 –TLR-6
	Porine	TLR-2
	Mykobakterien	Lipoarabinomannan
	Triacyl-Lipopeptide	TLR-1/TLR-2
Mikrobielle oder virale Nukleinsäure		
DNA	CpG-DNA	TLR-9
	dsDNA	-
RNA	dsRNA	TLR-3
	ssRNA	TLR-7, TLR-8
	3P-RNA	
Andere Pathogenbestandteile		
Flagella	Flagellin	TLR-5
Uropathogener E. coli	?	mTLR-11
Virale Hüllproteine	RSV-Hüllprotein	TLR-4
	Masern-Virus-Hämagglutinin	TLR-2
	CMV, HSV1-Proteine	TLR-2
Pilzzellwand	Candida-Phospholipomannan	TLR-2
	Candida Mannan	TLR-4
	Sacharomyces Zymosan	TLR-2/TLR-6

1.6.2 RIG-like Helikasen

Im Gegensatz zu den Toll-like Rezeptoren, die hauptsächlich auf dendritischen Zellen exprimiert sind, kommen die RIG-like Rezeptoren auf vielen Zelltypen vor und schützen alle virusinfizierten Zellen [41, 55]. Sie zählen wie die Toll-like Rezeptoren zu den Mustererkennungsmolekülen der angeborenen Immunantwort. In die Gruppe der RIG-like Rezeptoren gehören das *Retinoic acid-inducible gene 1* (RIG-I), das *melanoma differentiation-associated gene 5* (MDA5) und das *laboratory of genetics and physiology 2* (LGP2) [56]. Die RIG-like Rezeptoren befinden sich intrazellulär, erkennen virale Doppelstrang-RNA und werden durch Interferon- α/β -Aktivierung hochreguliert [41]. Nach Aktivierung erfolgt eine Signalkaskade über die CARD-Domäne zu dem CARD-enhaltenden Adaptorprotein IPS-1 (*Interferon- β promoter stimulator 1*), auch bekannt als MAVS, VISA oder Cardif, was in der Aktivierung von IRF-3 (*Interferon regulating factor*) und NF- κ B resultiert und zur Produktion antiviraler Proteine führt [57]. In Abbildung 14 ist die durch virale RNA ausgelöste Aktivierung von RIG-I dargestellt [58].

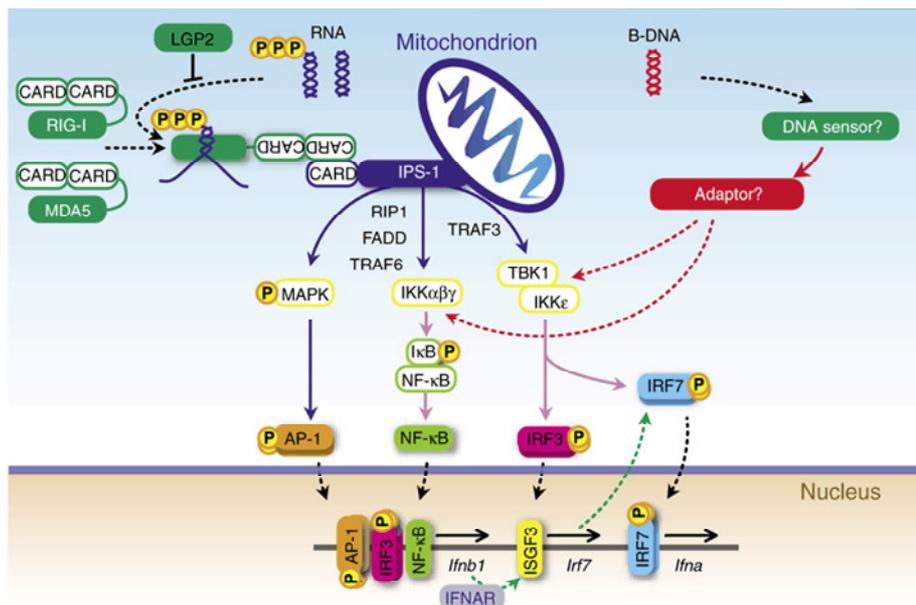


Abbildung 14: Aktivierung von RIG-I und MDA5 durch virale RNA. RNA wird intrazellulär über RIG-I und MDA5 erkannt. Die Aktivierung dieser zwei RNA-Helikasen führt zu Konformationsänderungen, die CARD-abhängige Interaktionen zwischen RIG-I/MDA5 und deren mitochondrialem Adaptor IPS-1 ermöglichen. Die nachfolgende Signalkaskade führt über IRF-3, AP-1 und NF-κB zur Transkription von Interferonen [58].

1.6.3 Immuneffekte nach Erkennung viraler RNA

Nachdem das angeborene Immunsystem virale RNA über Toll-like Rezeptoren und RIG-like Helikasen erkannt hat, sezernieren die aktivierten Makrophagen Zytokine. Zytokine sind Proteine, die eine Rolle als Mediatoren der Immunantwort sowie im Entzündungsgeschehen spielen. Es gibt fünf Hauptgruppen von Zytokinen: Interferone (siehe Kapitel 1.7), Interleukine (von Leukozyten produzierte Zytokine; dienen der Kommunikation von Leukozyten und anderen Immunzellen), Chemokine (chemotaktische Zytokine, veranlassen Zellen mit entsprechenden Rezeptoren zur Migration), Tumornekrosefaktoren (von Makrophagen und T-Zellen produziertes Zytokin, das die Aktivität verschiedener Immunzellen regelt; kann Zelltod, Zellproliferation, Zelldifferenzierung und die Ausschüttung anderer Zytokine anregen) und koloniestimulierende Faktoren (Wachstumsfaktoren der roten und weißen Blutkörperchen). Die freigesetzten Zytokine initiieren die Entzündungsreaktion mit den Kardinalsymptomen *Rubor*, *Dolor*, *Calor* und *Tumor*. Dies lockt weitere Zellen, wie neutrophile Granulozyten und Monozyten, an. Die Monozyten differenzieren dann sehr schnell zu Makrophagen. Makrophagen, die Erreger aufgenommen haben, können diese den T-Zellen des erworbenen Immunsystems präsentieren. Spezialisierte antigenpräsentierende Zellen sind jedoch dendritische Zellen. Die eingewanderten Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems versuchen dann gemeinsam die Erreger zu bekämpfen [59].

Eine Möglichkeit mit virusbefallenen Zellen umzugehen, ist der programmierte Zelltod (Apoptose). Dieser wird von Immunzellen aus der Umgebung induziert. Im Gegensatz zur Nekrose, wird die Apoptose von den infizierten Zellen aktiv durchgeführt. Bei der Apoptose kommt es zum Schrumpfen der Zellen, bei der Nekrose schwellen die Zellen an; es werden Zellorganellen freigesetzt, die dann von Makrophagen beseitigt werden. Die Apoptose tritt auch bei Lymphozyten selbst ein, wenn diese nicht mehr gebraucht werden.

1.7 Interferone und ihre Rezeptoren

1957 entdeckten Isaacs und Lindenmann eine Substanz, die Zellen vor viralen Infektionen schützt. Sie nannten sie Interferon [60]. Interferone (IFN) repräsentieren Proteine mit antiviraler Aktivität, die von Zellen als Antwort auf verschiedene Stimuli sezerniert werden [61-63]. Typ I- und Typ II-Interferone waren die ersten entdeckten Zytokine, sie lieferten eine fundamentale Basis um die Funktionen, Wege und Strukturen anderer Zytokine und ihrer Rezeptoren zu verstehen und wurden als erste therapeutisch eingesetzt [63-66]. Es gibt zwei Arten von Interferonen, Typ I und Typ II, und interferonähnliche Zytokine. Typ I-Interferone bestehen aus sieben Klassen: IFN- α , IFN- β , IFN- ϵ , IFN- κ , IFN- ω , IFN- δ , IFN- τ . Zu den Typ II-Interferonen zählt nur IFN- γ und zu den interferonähnlichen Zytokinen zählen Limitin, Interleukin-28A, Interleukin-28B und Interleukin-29 [67]. Abbildung 15 zeigt die Strukturformeln von Interferon-alpha, -beta und -gamma [67]. Es gibt mehrere Isotypen von Interferon-alpha, jedoch nur einen von Interferon-beta.

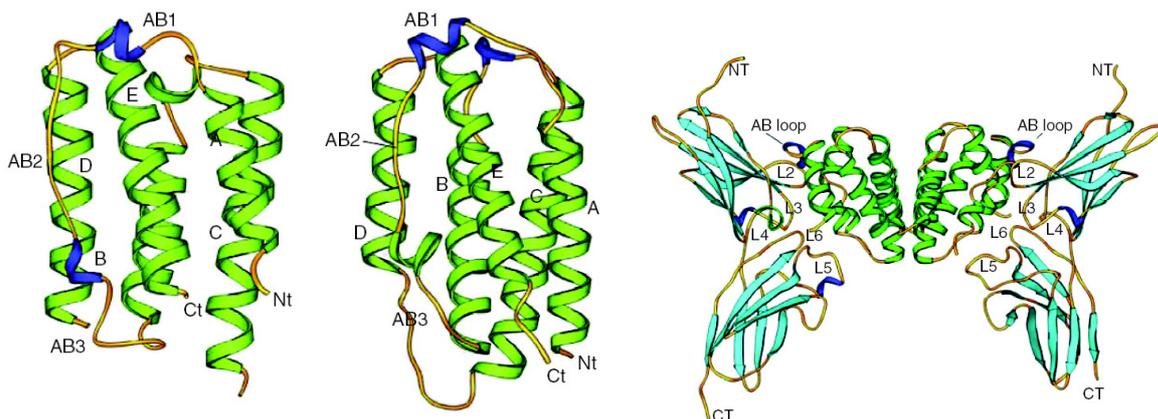


Abbildung 15: Struktur von IFN- α 2b, IFN- β und IFN- γ . Die Alpha-Helices sind grün dargestellt, die loops gelb, die 3^{10} Helices dunkelblau und die β -Stränge hellblau [67].

1.7.1 Typ I-Interferone

Die Expression von Typ I-Interferonen wird als ein Hauptbestandteil der angeborenen antiviralen Immunantwort als direkte Antwort auf eine Virusinfektion ausgelöst. Eindringende Viren werden von infizierten Nicht-Immunzellen sowie von Immunzellen, wie Makrophagen und dendritischen Zellen, erkannt. Hierbei spielen Mustererkennungsstrukturen, wie Toll-like Rezeptoren [68], RIG-I und MDA5 [69, 70], eine wichtige Rolle (Abbildung 18). Interferone sind aber auch bei der erworbenen Immunantwort von Bedeutung. Über die Bildung von Typ I-Interferonen und proinflammatorischen Zytokinen kommt es zur schnellen antiviralen Antwort. Die gebildeten Typ I-Interferone induzieren die Apoptose in virusinfizierten Zellen und aktivieren natürliche Killerzellen und T-Zellen. Typ I-Interferone spielen jedoch nicht nur eine Rolle in der angeborenen antiviralen Immunität sondern aktivieren auch das erworbene Immunsystem [71]. Zusätzlich zu den antiviralen Aufgaben haben sie auch eine Funktion bei der direkten bzw. indirekten Tumorsuppression [72]. Im Menschen sind plasmazytische dendritische Zellen die hauptsächliche Quelle von Interferon- α , während Interferon- β von vielen Zellen, einschließlich Fibroblasten, produziert wird. Typ II-Interferone sind das Produkt aktivierter T-Zellen und natürlicher Killerzellen nach Erkennung virusinfizierter Zellen [73]. Beide Interferon-Typen induzieren in den Zielzellen einen antiviralen Status, wodurch die Virusreplikation beeinträchtigt wird. Die Interferone geben ihr Signal über den Jak-Stat-Signaltransduktionsweg weiter [74]. Der Rezeptor für Typ I-Interferone besteht aus zwei Ketten, IFN- α R1 und IFN- α R2c. Der Ligand Interferon-alpha ist ein Monomer, das an den Zwei-Ketten-Komplex bindet [75]. Nach Eintritt von Interferon-alpha in den Komplex, bindet Stat-2 an IFN- α R2c und rekrutiert Stat-1. Stat-1 und Stat-2 werden phosphoryliert, gelöst und in Verbindung mit p48 in den Zellkern transloziert, wo sie zur Bildung antiviraler Gene führen (Abbildung 16) [67].

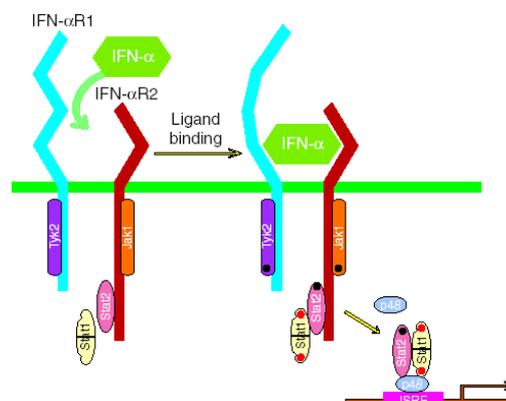


Abbildung 16: Darstellung des Typ I-Interferon Rezeptorkomplexes. Interferon-alpha wird vom Rezeptor gebunden, es kommt zur Strukturänderung des Rezeptors, was dazu führt, dass Stat-2 an den Rezeptor bindet (schwarzer Punkt) und Stat-1 rekrutiert. Das phosphorylierte Stat-1 und Stat-2 (rote Punkte) gelangt in den Zellkern und veranlasst die Bildung von Proteinen [67].

1.7.2 Typ II-Interferone

Interferon- γ verwendet die Rezeptorketten IFN- γ R1 und IFN- γ R2 [76]. Der Ligand IFN- γ ist ein Dimer, das an beide IFN- γ R1-Ketten, nicht aber direkt an die IFN- γ R2-Ketten bindet. Nach Bindung phosphorylieren die Jak-Kinasen sich zunächst gegenseitig; anschließend phosphorylieren die aktivierten Jak-Kinasen das Tyrosin 457 jeder IFN- γ R1-Kette, was zur Rekrutierung von Stat-1 α führt. Stat-1 α bindet an das phosphorylierte Tyrosin 457 jeder IFN- γ R1-Kette, bewegt die Rezeptorketten auseinander [77] und wird von der Jak-Kinase phosphoryliert. Das phosphorylierte Stat-1 α Protein löst sich von der IFN- γ R1-Kette, bildet einen Transkriptionsfaktor, der in den Zellkern gebracht wird, um dort die Interferon- γ -regulierenden Gene zu aktivieren (Abbildung 17) [67].

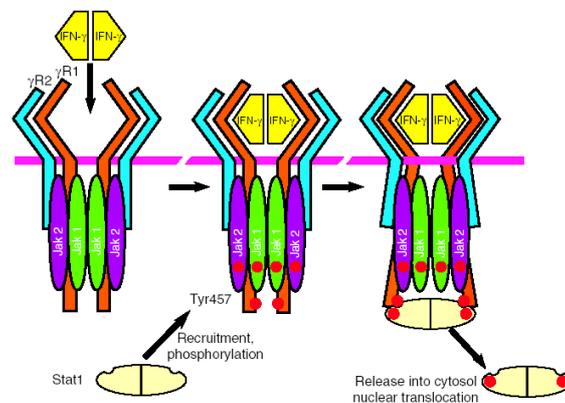


Abbildung 17: Darstellung des Typ II-Interferon Rezeptor-Komplexes. Die Bindung von Interferon-gamma an den Rezeptor führt zur Phosphorylierung (rote Punkte) der Jak-Kinasen, was zur Rekrutierung von Stat-1 führt. Das phosphorylierte Stat-1 wird in den Zellkern gebracht [67].

1.7.3 Signalnetzwerk der Interferoninduktion

Abbildung 18 fasst das Signalnetzwerk der Interferon Typ I-Induktion während viraler Infektionen zusammen [78]. Zunächst werden bestimmte Virusbestandteile, z.B. des Influenza-Virus, des Zytomegalie-Virus (CMV), des HI-Virus, des Herpes-Virus (HSV), des Sendai-Virus (SeV), des vesikulären Stomatitis-Virus (VSV), des Newcastle-Virus (NDV) oder des Maus-Mammatumovirus (MMTV) entweder vom extrazellulären bzw. endosomalen Toll-like Rezeptorsystem oder vom zytosolischen RIG-I/MDA5-System erkannt. Anschließend wird das Signal über die Adaptormoleküle TRIF, TRAM, TIRAP oder MyD88 bzw., bei Stimulation über die RIG-ähnlichen Helikasen, über das mitochondriale Adaptormolekül IPS-1 weitergeleitet. Dies führt über IRF-Kinasen, wie TBK1 (*TANK-binding kinase 1*) und IKK ϵ /*i* (*I κ B kinase ϵ /*i**), zur Phosphorylierung und Aktivierung der interferonregulierenden Faktoren (IRF)-3 und -7. Das aktivierte IRF-3 und -7 translozieren in den Zellkern und binden dort an die positiv regulierenden Domänen (PRD) III und I des IFN- β -Promoters

oder an die PRD-ähnlichen Elemente (PRD-LE) des IFN- α -Promoters, was zur Aktivierung der Gentranskription und somit der Bildung von Interferon- α und Interferon- β führt (Abbildung 18-1). Die gebildeten Interferone binden daraufhin an den Interferonrezeptor der Zielzelle; es kommt zur Signalweiterleitung über den Jak-Stat-Signaltransduktionsweg und anschließend einerseits zur Produktion anderer antiviraler Gene und andererseits über IRF-3 und -7 zur weiteren Produktion von Interferon- α und Interferon- β , welche in einem positiven *Feedback*-Mechanismus (rote Pfeile) wieder an den Interferonrezeptor dieser Zelle binden. Dadurch kommt es über die Proteine ISRE (*interferon-stimulated response element*) und ISGF3 (*interferon-stimulated gene factor 3*) zur weiteren Bildung von Typ I-Interferonen und anderer antiviraler Gene. Somit wird die Immunantwort deutlich verstärkt (Abbildung 18-2) [78].

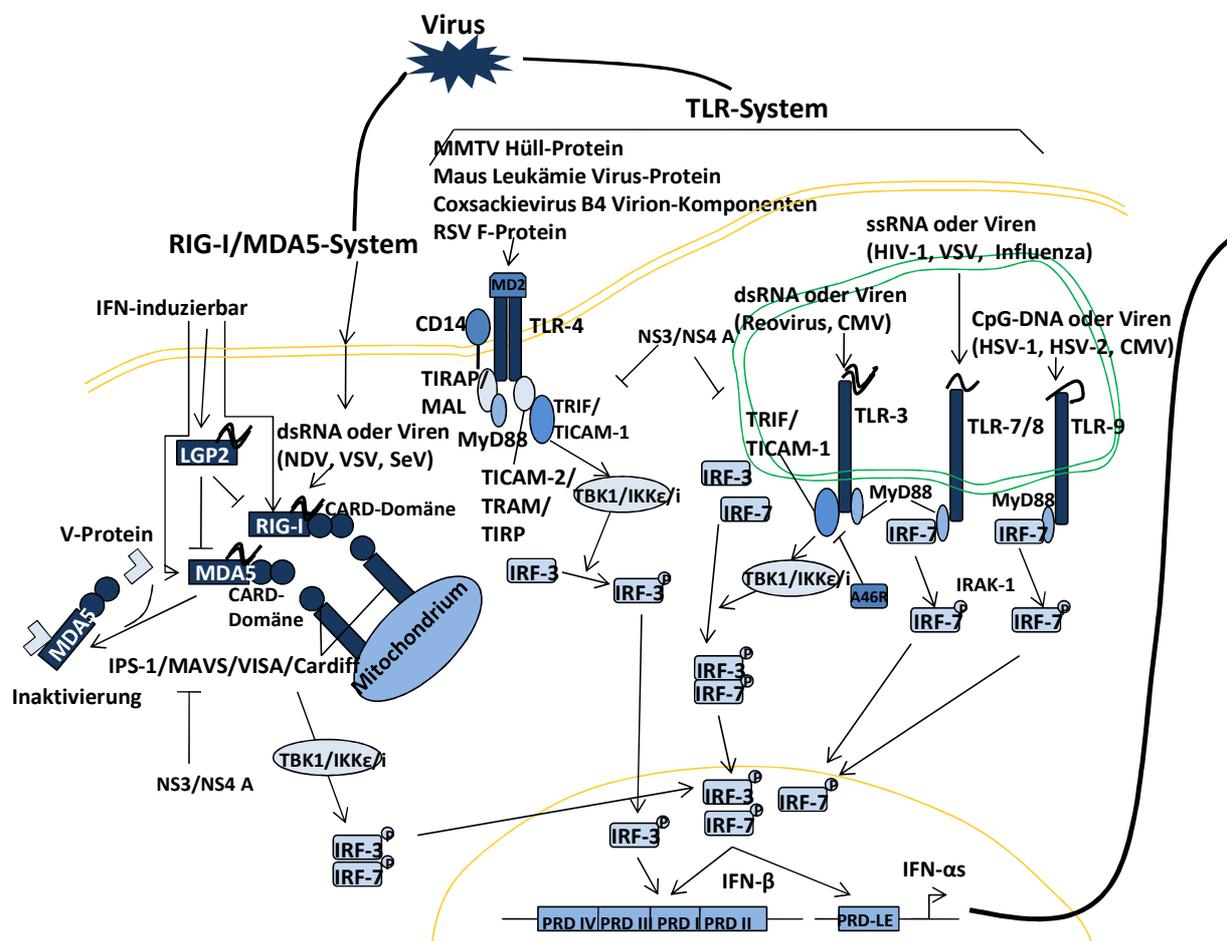


Abbildung 18-1: Viruserkennung über das RIG-I/MDA5 bzw. TLR-System und nachfolgende Interferonproduktion in dendritischen Zellen. Die Erkennung eines Virus läuft zum einen über das TLR-System, zum anderen über die RIG-like Helikasen RIG-I und MDA5. Nach Viruserkennung wird eine Signalkaskade über Adaptormoleküle in Gang gesetzt, was zur Phosphorylierung und Aktivierung interferonregulierender Faktoren führt. Diese gelangen in den Zellkern und veranlassen dort die Bildung von Interferonen [78].

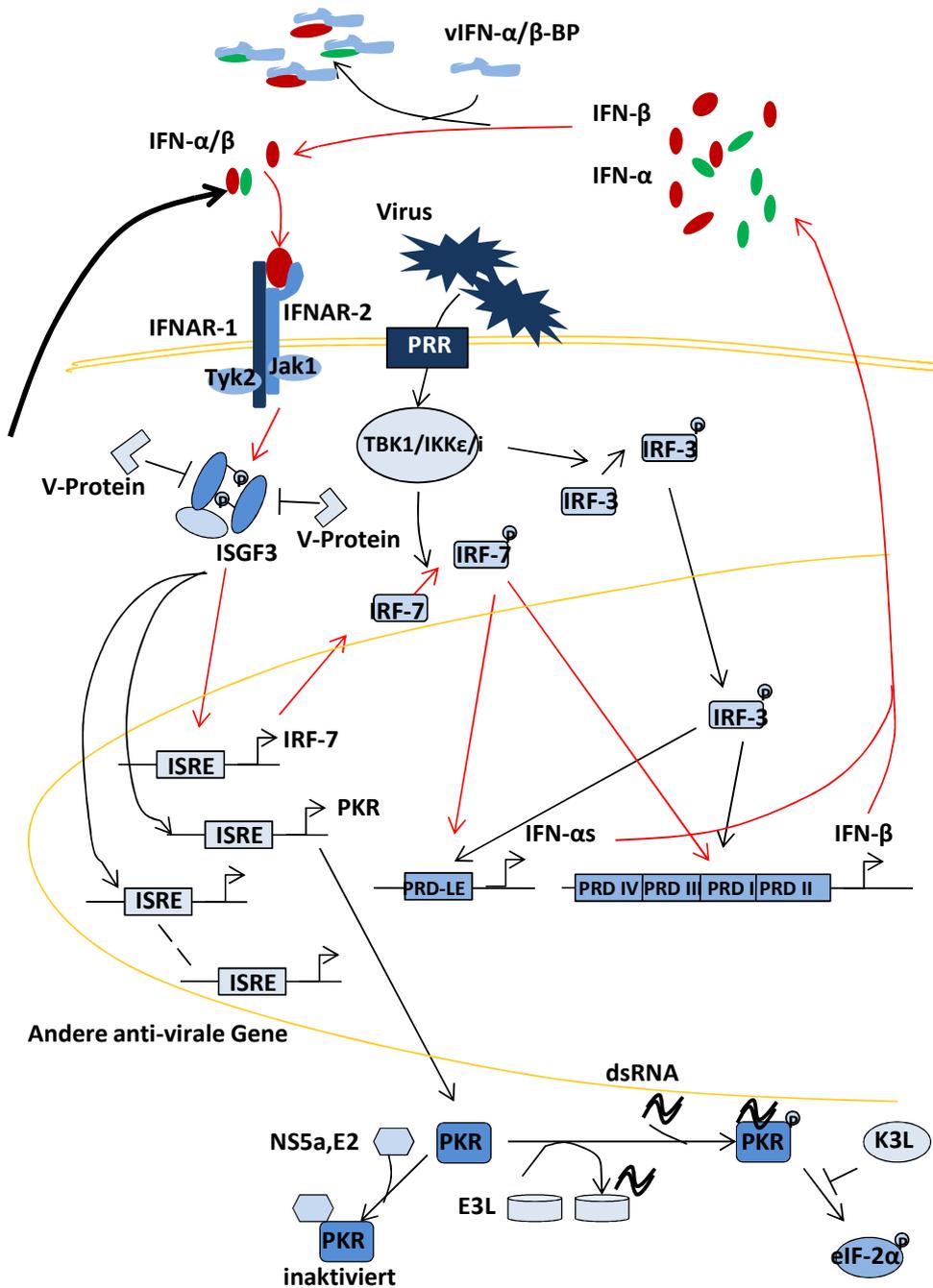


Abbildung 18-2: Reaktion der Zielzelle auf die gebildeten Interferone. Die gebildeten Interferone binden an Interferonrezeptoren der Zielzellen, was zur Bildung weiterer Interferone und anderer antiviraler Proteine führt [78].

NS3/S4A-Protease: schneidet TRIF und IPS-1

V-Protein: inhibiert MDA5 und Stat

A46R-Protein: inhibiert verschiedene TIR-Adaptoren

NS5A, E2: verhindert die Aktivierung von PKR und eIF-2α

E3L: bindet RNA und verhindert die Aktivierung von PKR und eIF-2α

K3L: mimt eIF-2α und inhibiert seine Funktion

vIFN-α/β-BP (B16R): bindet und inhibiert Typ I-Interferone; PKR: Protein-Kinase R

Die hier dargestellten antiviralen Mechanismen der Interferonproduktion und der Reaktion auf Interferonstimulation sind bislang nur an dendritischen Zellen charakterisiert. Ob diese Mechanismen auch in Nicht-Immunezellen, wie Mesangialzellen, vorhanden sind, ist derzeit ungeklärt. Ebenso ungeklärt ist, ob es in Nicht-Immunezellen den oben beschriebenen positiven *Feedback*-Mechanismus, der zur Verstärkung der Immunantwort führt, gibt.

1.7.4 Kontinuierliche Interferonproduktion

Wie oben bereits erwähnt, werden Interferon-alpha und -beta in großen Mengen vor allem nach viraler Infektion gebildet. Es gibt jedoch auch Anzeichen für die kontinuierliche geringe Expression dieser Interferone in Fibroblasten, Splenozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen in Abwesenheit von Viren oder anderer Interferoninduzierern [79, 80]. Es gibt Beweise dafür, dass dieses, durch kontinuierlich exprimierte Interferone ausgelöste, schwache Signaling wichtig dafür ist, dass die Zellen effektiv auf Stimulation durch IFN- γ , Interleukin-6 oder Viren reagieren können [81, 82]. In Abbildung 19 ist das Modell dieser autokrinen Aktivierung dargestellt [78].

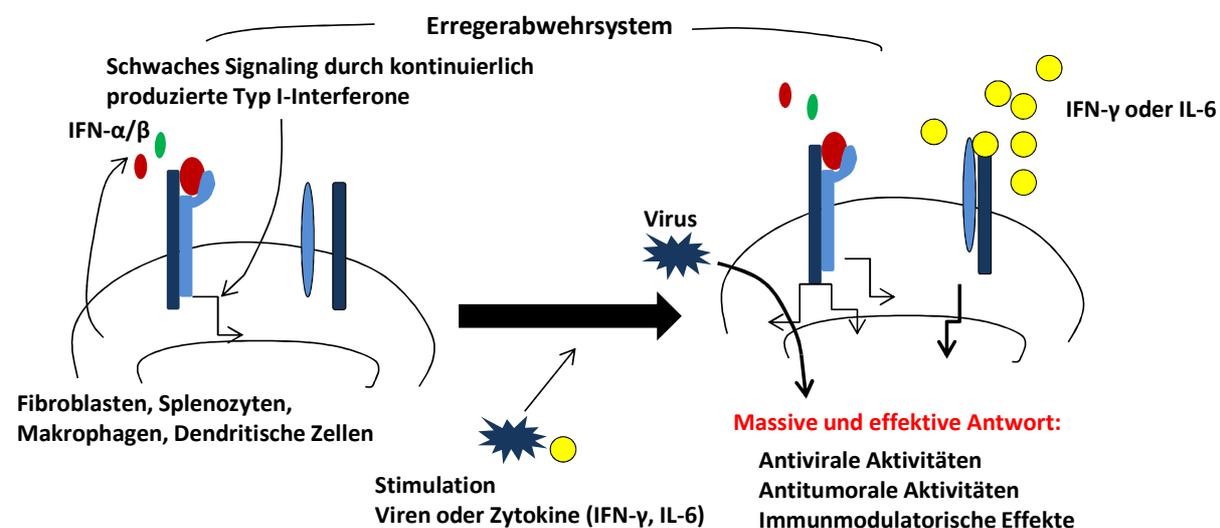


Abbildung 19: Hypothetisches Modell der durch ständiges schwaches IFN- $\alpha\beta$ -Signaling ausgelösten verstärkten Immunantwort. Dieses Modell zeigt, dass bestimmte (alle?) Zellen kontinuierlich eine geringe Menge IFN produzieren und es dadurch bei viraler Infektion oder bei Stimulation durch Zytokine zu einer effizienteren Immunantwort kommt [78].

1.8 Ziel der Untersuchungen und Hypothese

Die hier vorgelegte Untersuchung befasst sich mit den molekularen Mechanismen der durch Viren getriggerten Glomerulonephritiden. Es ist bereits bekannt, dass akute Infektionen zur Verschlechterung einer vorbestehenden Glomerulonephritis führen können. Dies ist zum Beispiel bei der Lupusnephritis, der IgA-Nephropathie oder der renalen Vaskulitis der Fall (mesangioproliferative Glomerulonephritiden). Chronische virale Infektionen (z.B. Hepatitis C) können sogar eine *de novo* Glomerulonephritis auslösen. Hierbei handelt es sich um eine Immunkomplex-Glomerulonephritis, die durch die Bildung von Immunkomplexen aus eindringendem Antigen und daraufhin gebildetem Antikörper entsteht. Die Immunkomplexe werden über den Fc-Teil des Antikörpers erkannt. Ob die viralen Komponenten dieser Komplexe auch direkt erkannt werden und von welchen Zellen ist unbekannt. Neben der Bildung von Immunkomplexen spielt die Produktion von Interferonen eine wichtige Rolle bei der Entstehung von virusassoziierten Glomerulonephritiden. Die Aktivierung der systemischen antiviralen Immunität führt zur systemischen Interferonfreisetzung.

Es wird angenommen, dass die meisten Zellen Typ I-Interferone produzieren können, wenn sie viral infiziert werden. So kann beispielsweise die TLR-3-vermittelte Erkennung viraler dsRNA in den Inselzellen des Pankreas über lokale IFN- α -Produktion eine autoimmune Inselzellzerstörung auslösen [83]. Dahingegen ist unklar, ob lokal produzierte Typ I-Interferone zur Entstehung von virusassoziierten Glomerulonephritiden beitragen können. Wurde Mäusen virale dsRNA injiziert, gelangte diese zu den glomerulären Mesangialzellen [84]. Mesangialzellen besitzen als einzigen nukleinsäurespezifischen Toll-like Rezeptor den TLR-3 und produzieren auf Stimulation durch virale dsRNA hin Interleukin-6 und CCL2 [84, 85]. Ob dieser Effekt über den endosomalen TLR-3 oder über zytosolische dsRNA-Rezeptoren abläuft und ob Mesangialzellen überhaupt Interferone produzieren können, ist allerdings noch unklar.

Unsere Hypothese ist, dass Mesangialzellen virale RNA sowohl TLR-abhängig als auch TLR-unabhängig erkennen können und dass die virale RNA daraufhin ein angeborenes antivirales Antwortprogramm, einschließlich der Produktion von Typ I-Interferonen, in glomerulären Mesangialzellen aktiviert.

Kapitel 2: Material und Methoden

2 Material und Methoden

Verwendete Geräte und Materialien

2 100 Bioanalysator	Agilent Technologies, Waldbronn, D
BioRad Semi-Dry Blotting System	BioRad, München, Deutschland
ELISA-Reader Tecan, GENios Plus	Tecan, Crailsheim, Deutschland
ELISA-Washer	ELx50, BioTek, Bad Friedrichshall, D
Entwickler Curix 60	AGFA, Köln, Deutschland
FacsCalibur™	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Gel-Kammer (für PCR)	PeqLab Biotechnologie, Erlangen, D
Lichtmikroskop Leitz Diavert	Leica Microsystems, Solms, Deutschland
Lichtmikroskop Leitz DMRBE	Leica Microsystems, Solms, Deutschland
Mini-PROTEAN® II Electrophoresis Cell	BioRad, München, Deutschland
pH meter WTW	WTW GmbH, Weilheim, Deutschland
Photometer Ultrospec 1000	Amersham, Freiburg, Deutschland
RNA 6000 LabChip	Agilent Technologies, Waldbronn, D
Schneidgerät	Jung CM 3000, Leica, Solms, D
Shandon Citadel™ 2000 Tissue Protector	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, D
Spektrophotometer Beckman DU® 530	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Steril Card Hood Class II, Typ A/B3	The Baker Company, Sanford, Maine, US
Sonicator	Branson, Danbury, CT, USA
TaqMan ABI prism™ 7700 sequence detector	PE Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vortex Genie 2™	Bender&Hobein AG, Bruchsal, D
Waage Mettler PJ 3000	Mettler Toledo, Gießen, Deutschland
Wasserbad HI 1210	Leica Microsystems, Solms, Deutschland
Zellinkubator Type B5060 EC-CO ₂	Heraeus Sepatech, Osterode, Deutschland
Zentrifuge Heraeus, Minifuge T	VWR International, Darmstadt, D
Zentrifuge Heraeus, Sepatech Biofuge A	Heraeus Sepatech, Osterode, Deutschland
UNO-II-Cycler (Thermocycler)	Biometra, Göttingen, Deutschland
UV-Licht	Bachofer Laborgeräte, Reutlingen, D
24-well-Platten	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
6-well-Platten	Costar Corning, Schiphol-Rijk, Holland
Analysesiebe aus Stahl (Ø 50 mm, 45-105 µm)	Linker Industrie-Technik, Kassel, D

Einbettkassetten	neoLab Migge, Heidelberg, Deutschland
Einmal-Küvetten 1,5 ml Plastibrand®	Brand, Gießen, Deutschland
Eppendorfgefäße 1,5 ml	TPP, Trasadingen, Schweiz
Falcons 15 ml und 50 ml	BD, Heidelberg, Deutschland
Immobilon PVDF Transfermembran	Millipore, Schwalbach/Ts., Deutschland
Kodak BioMax XAR Film	Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Kryobox Cryo 1 °C Freezing cont	Nalgene™, Rochester, NY, USA
Kryovials	Alpha Laboratories, Eastleigh, UK
Multikanalpipette Eppendorf Research	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Nadeln BD Microlance 26 G x ½	BD, Heidelberg, Deutschland
Nunc-Immuno™ 96 Microwell™ Plates	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Perfusorspritze	Fresenius Kabi, Bad Homburg, D
Pipettenspitzen 1-1 000 µl Typ Gilson®	Peske, Aindling-Arnhofen, Deutschland
Pipettenspitzen epT.I.P.S. Standard	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipetten Pipetman®P	Gilson, Middleton, WI, USA
Pipettierhilfe Pipetus®-classic	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, D
Plastikfilter 70 µm	BD, Heidelberg, Deutschland
Preseparationsfilter	Milteny Biotec, Bergisch-Gladbach, D
Serologische Pipetten 5, 10, 25 ml	Falcon®/BD, Heidelberg, Deutschland
Skalpelle No. 20	Feather Safety Razor Co., Japan
Spritzen BD Plastipak 1000 µl, 5 ml	BD, Heidelberg, Deutschland
Whatman-Papier	Millipore, Schwalbach/Ts., Deutschland
Zellkulturschalen 10 cm	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellschaber 24 cm	TPP, Trasadingen, Schweiz

2.1 Zellisolation

di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Collagenase Type IV 210	Worthington Biochemical, Lakewood, NY
Fötales bovines Serum (FCS)	Biochrom KG, Berlin, Deutschland
Insulin-Transferrin-Sodium Selenite (ITS)	Roche-Diagnostics, Mannheim, D
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (PS) (100x)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
RPMI 1640-Medium	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

10 x PBS: 80,0 g NaCl; 11,6 g Na₂HPO₄; 2,0 g KH₂PO₄; 2,0 g KCl gelöst in 1 l doppelt deionisiertem Wasser, pH 7

Die Nierenentnahme erfolgte bei sechs bis acht Wochen alten Wildtyp- bzw. *Trif*-mutanten C57BL/6 Mäusen (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) oder *Ifn*-alpha/beta-Rezeptor-defizienten 129Sv/Ev Mäusen (B&K Universal Group Limited, North Humberside HU11 4QE, Großbritannien), nachdem diese durch zervikale Dislokation getötet worden waren (siehe auch 2.10). Es wurden jeweils vier bis sechs Mäusen unter sterilen Bedingungen die Nieren entnommen. Die Nieren wurden in einer Petrischale mit etwas kaltem RPMI gesammelt. Anschließend wurden Kapsel und Mark entfernt und die Rinden mit zwei Skalpellenspitzen so lange in kleine Stücke zerschnitten, bis eine Paste entstand. Diese wurde mit kaltem, autoklaviertem PBS in einer 50-ml-Perfusorspritze auf das erste Sieb (150 µm) eines aus fünf Stahlsieben bestehenden Turmes gespült. Die Nierenpaste wurde anschließend mit dem Stempel einer 5-ml-Spritze durch das erste Sieb gedrückt und zwischendurch immer wieder mit Druck mit PBS durchgespült. Nach etwa fünf Spülvorgängen wurde die Unterseite des 150-µm-Siebes auf das 106-µm-Sieb gespült. Hier wurde ebenso verfahren und die Paste auf das nächste Sieb (63 µm) gespült. Auf diesem Sieb wurde nur noch fünf Mal mit Druck durchgespült und die Unterseite wieder auf das darunter liegende Sieb (50 µm) abgespült. Durch dieses Sieb wurde ebenfalls mit PBS gespült. Dann wurde eine neue Perfusorspritze mit 50 ml kaltem RPMI und 10 % FCS gefüllt und das 50-µm-Sieb von unten in ein 50-ml-Röhrchen abgespült. Dieses wurde in die auf 4 °C gekühlte Zentrifuge gestellt und ein zweites Röhrchen ebenfalls auf diese Weise gefüllt. Durch das letzte Sieb (45 µm) wurde ebenfalls fünfmal mit PBS gespült und das, was sich auf diesem befand, wiederum zweimal in ein Röhrchen gespült. Dann wurden die Röhrchen 7 Minuten lang bei 4 °C mit 4 300 rpm/Minute zentrifugiert.

In der Zellkultur wurde der Überstand abgesaugt, mit 1 ml RPMI-Medium resuspendiert und auf ca. 10 ml aufgefüllt. Daraufhin wurde diese Lösung durch einen 70-µm-Plastikfilter in ein neues Röhrchen gespült. Dieser Inhalt wurde durch einen 30-µm-Preseparationsfilter gespült. Alle Glomeruli bleiben in diesem Filter hängen. Der Filter wurde umgedreht und der Inhalt mit ca. 20 ml RPMI in ein neues Röhrchen gespült. Zu diesem wurde 20 ml Collagenase IV-Lösung (1 mg/ml) gegeben und das Ganze 20 Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Dadurch kommt es zur Andauung der Glomeruli. Nach der Inkubationszeit wurde nochmals 7 Minuten bei 4 300 Umdrehungen/Minute und 4 °C zentrifugiert. Anschließend der Überstand abgesaugt und mit 1-2 ml RPMI resuspendiert. Zuletzt wurde das Ganze mit RPMI (+ 20 % FCS, 1 % PS und ITS) auf 60 ml aufgefüllt und auf fünf 6-well-Platten verteilt (je 2 ml pro well). Die Platten kamen für 5-6 Tage in den Inkubator (37 °C, 5 % CO₂), dann erfolgte der erste Mediumwechsel; dazu wurde das Medium sehr vorsichtig abgesaugt und zwei Milliliter frisches Medium dazu gegeben. Von nun an erfolgte alle zwei bis drei Tage ein Mediumwechsel. Nach etwa 10 Tagen begann das erste Auswachsen von Zellen aus den Glomeruli

(und aus den Tubulifragmenten, die bei der Isolation hängen blieben) (Abbildung 20). Nach etwa 16-20 Tagen, wenn die Zellen konfluent waren, konnte die erste Passage der Zellen (siehe 2.2) auf eine bzw. zwei 10 cm-Platten erfolgen. Auch jetzt erfolgte ein Mediumwechsel alle zwei bis drei Tage. Unter dem Mikroskop wurden die Stellen, an denen andere Zellen wuchsen, markiert und anschließend diese Bereiche unter dem Abzug abgekratzt bzw. abgesaugt. Waren die Zellen konfluent, konnten sie im Verhältnis 1: 2 (in späteren Passagen 1: 4) weiter passagiert werden. Ab der fünften Passage konnten die Zellen eingefroren werden (siehe 2.2). Außerdem erfolgte ein *Immunostaining* zur Typisierung der Zellen (siehe 2.8). Mesangialzellen sind Zytokeratin negativ und *smooth muscle actin* positiv. Dementsprechend wurden alle weiteren Versuche nur mit Zytokeratin-negativen und *smooth muscle actin*-positiven Zellklonen durchgeführt. Ab der sechsten Passage konnte das Medium auf RPMI mit 10 % FCS und 1 % PS reduziert werden.

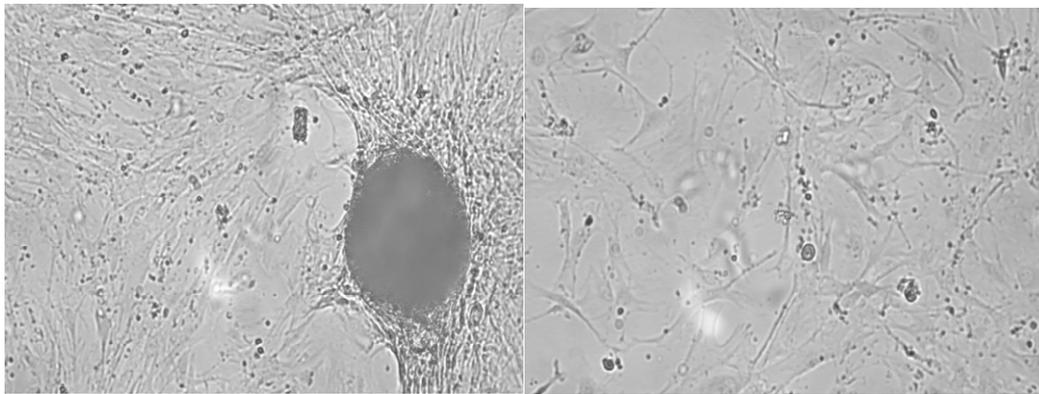


Abbildung 20: Mesangialzellen in Kultur. Zu sehen sind primäre murine Mesangialzellen in Zellkulturmedium. Links ist ein Glomerulus mit auswachsenden Zellen gezeigt, rechts mehrere spindelförmige, teils konfluierende Zellen. Vergrößerung 20 x

2.2 Zellkultur

Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Dulbecco's PBS (1x)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
EDTA (Versen)	Biochrom KG, Berlin, Deutschland
Fötales bovines Serum (FBS Superior)	Biochrom KG, Berlin, Deutschland
Insulin-Transferrin-Sodium Selenite (ITS)	Roche Diagnostics, Mannheim, D
Penicillin/Streptomycin (PS) (100x)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
RPMI 1640-Medium	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblau	Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland

Zellkultivierung und Zellpassage

Die primären Mesangialzellen wurden unter Standardbedingungen (bei 37 °C im Inkubator mit 5 % CO₂) in RPMI 1640-Medium unter Zusatz von 10 % FCS und 1 % PS (100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin) in Petrischalen mit 10 cm Durchmesser kultiviert. Die Zelllinie wurde in DMEM unter Zusatz von 5 % und 1 % PS kultiviert.

Waren die Zellen zu 100 % konfluent, wurden sie mit PBS gewaschen und mit PBS und 1,5 mM EDTA für fünf bis zehn Minuten im Wärmeschrank inkubiert; dabei lösten sie sich von der Petrischale ab. Anschließend wurde Medium mit FCS hinzu gegeben, die Zellsuspension in ein Röhrchen pipettiert und bei 1 300 Umdrehungen/Minute für 3 Minuten zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt, die Zellen mit Medium resuspendiert und im Verhältnis 1: 2 oder 1: 4 auf neue Petrischalen passagiert, bzw. für Stimulationsversuche auf 6-, 12- oder 24-well-Platten verteilt.

Einfrieren und Auftauen der Zellen

Die Zellen wurden wie bei der Zellpassage mit PBS gewaschen und mit PBS plus 1,5 mM EDTA von der Platte abgelöst und zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde das Pellet mit 2 ml FCS + 10 % DMSO resuspendiert. Je ein Milliliter der Suspension wurde in ein Einfriergefäß gegeben und in einer Kryobox für 48 Stunden bei –80° C gefroren. Anschließend im Flüssigstickstoff aufbewahrt.

Zum Auftauen wurden die Einfriergefäße aus dem Flüssigstickstoff zunächst 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen, dann mit 1 ml RPMI + 20 % FCS + PS und ITS resuspendiert, auf eine 10 cm-Zellkulturschale gegeben und mit 12 ml Medium aufgefüllt. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel. Nach einigen Tagen konnte das Medium auf RPMI + 10 % FCS + PS reduziert werden.

Zellzählung

Um die Zellen zu zählen, wurde das Pellet nach Zentrifugation mit 1 ml Medium resuspendiert, dann 50 µl davon mit 50 µl PBS gemischt. Hieraus wurden wieder 50 µl entnommen und zu 50 µl Trypanblau gegeben. Diese Mischung wurde in eine Zählkammer pipettiert und die hellen (lebenden) Zellen von zehn Großquadraten meanderförmig ausgezählt. Anschließend wurde die Zellzahl pro Milliliter mit folgender Formel berechnet: (Gezählte Zellen/Anzahl der ausgezählten Großquadrate) * Verdünnung * 10⁴ = Zellzahl/ml

Stimulationsexperimente

Lipofectamine™ 2000	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Mouse Interferon- β	PBL Biomedical, Piscataway, NJ, USA
Opti-MEM®I	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Poly I:C	Invivogen, Toulouse, Frankreich
Polymyxin B	Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Rat Monoclonal Antibody against Mouse Ifn- α	PBL, Piscataway, NJ, USA
Rat Monoclonal Antibody against Mouse Ifn- β	PBL, Piscataway, NJ, USA
Recombinant Murine Interferon- α	AbD Serotec, Martinsried, Deutschland
Recombinant Murine Interferon- γ	PeptoTech INC., London, UK
Tumor Necrosis Factor alpha (Tnf- α)	ImmunoTools GmbH, Friesoythe, D
Ultra Pure E. coli LPS	Invivogen, Toulouse, Frankreich

Die Stimulationen an den primären Mesangialzellen wurden in RPMI mit 5 % FCS durchgeführt, die an der Zelllinie in DMEM mit 2,5 % FCS. Bei allen Versuchen waren die Zellen zu 70-80 % konfluent und hatten, wenn angegeben, 24 Stunden gehungert (RPMI bzw. DMEM mit 1 % Penicillin/Streptomycin, ohne FCS).

Die primären Mesangialzellen wurden von Passage 6 bis 20 verwendet. Um den Überstand für ELISAs zu gewinnen wurden 24-well-Platten mit 0,5 ml Medium verwendet, um RNA für die *real time* RT-PCR zu bekommen, 6-well-Platten mit 2 ml Medium. Vor der Stimulation wurden die Zellen eine halbe Stunde mit Polymyxin B inkubiert, um LPS-Kontamination zu vermeiden. Wurde poly I:C mit Lipofectamin transfektiert, wurde dafür zunächst die gewünschte Menge poly I:C in 25 μ l Opti-MEM gegeben und gemischt; in einem anderen Eppendorfgesäß wurde die 1,5-fache Menge Lipofectamin ebenfalls in 25 μ l Opti-MEM gemischt. Dann wurde der Inhalt des zweiten Eppendorfgesäßes zum Ersten gegeben, alles gemischt und für 20 Minuten inkubiert.

2.3 ELISA

Unter einem ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) versteht man ein immunologisches Nachweisverfahren, das auf einer enzymatischen Farbreaktion beruht. Mittels ELISA können Proteine, Viren, Hormone, Toxine oder Pestizide nachgewiesen werden. Dazu werden zur Probe spezifische, an Enzyme gekoppelte Antikörper gegeben, die an das nachzuweisende Antigen binden. Nach Zugabe eines enzymatischen Substrates kommt es zu einem sichtbaren Signal, das mit der Menge des Antigens zunimmt (Abbildung 21). Alle ELISA's wurden laut Herstellerprotokoll durchgeführt.

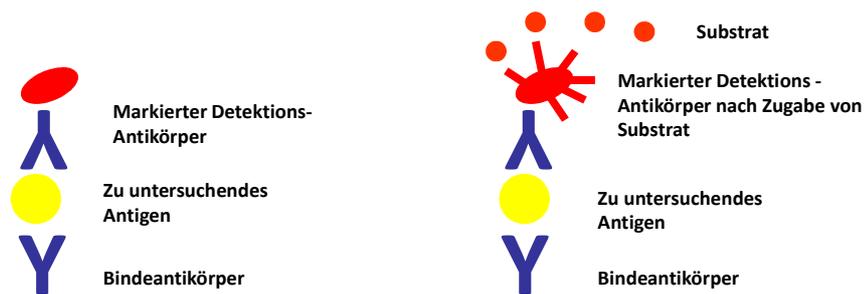


Abbildung 21: Aufbau eines Sandwich-ELISAs. Das zu untersuchende Antigen bindet an den Bindeantikörper. Ein dazu gegebener markierter Detektions-Antikörper bindet ebenfalls an das Antigen. Nach Substratzugabe kommt es zu einem sichtbaren Signal.

II-6-ELISA

II-6-ELISA-Kit BD OptEIA

BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland

Enthält: *Bindeantikörper*: Anti-Maus II-6; *Standard*: rekombinantes Maus II-6; *Arbeits-Detektor-Reagenz*: biotinierter Detektions-Antikörper Anti-Maus II-6 in Probenverdünner 1: 500 gelöst, dazu das Enzymreagenz (mit *Horseradish-Peroxidase* markiertes Streptavidin) im Verhältnis 1: 250

di-Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Fötales bovines Serum (FBS Superior)	Biochrom KG, Berlin, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumcarbonat (Na_2CO_3)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tween 20	Fluka, Sigma Aldrich, Deisenhofen, D

Substratlösung: Tetramethylbenzidin und Hydrogen-Peroxid im Verhältnis 1: 1 (BD PharmingTM TMB-Substrate, Heidelberg, Deutschland); Stopplösung (2 N H_2SO_4)

10 x PBS: 80,0 g NaCl; 11,6 g Na_2HPO_4 ; 2,0 g KH_2PO_4 ; 2,0 g KCl gelöst in 1 l doppelt deionisiertem Wasser, pH 7

Beschichtungspuffer: 8,4 g NaHCO_3 , 3,56 g Na_2CO_3 gelöst in 1 l doppelt deionisiertem Wasser, pH 9,5

Waschpuffer: PBS + 0,05 % FCS

Probenverdünner: PBS mit 10 % FCS

Zunächst wurde eine 96-well-Platte mit 100 µl/well in Beschichtungspuffer gelöstem Bindeantikörper (Verhältnis 1: 250) beschichtet, verschlossen und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit 30 µl/well Waschpuffer gewaschen und die Platte mit 200 µl/well Probenverdünner (*assay diluent*) geblockt. Nach 1 Stunde Inkubation wurde nochmals dreimal gewaschen und anschließend je 100 µl der Proben, des Standards (Verdünnungsreihe von 1 000 pg/ml bis 7,8 pg/ml) und des Probenverdünners als Leerwert aufgetragen, die Platte verschlossen und 2 Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation folgte ein fünfmaliges Waschen, im Anschluss daran wurden 100 µl Arbeits-Detektor-Reagenz aufgetragen und die Platte wieder für eine Stunde inkubiert. Danach wurde sieben Mal gewaschen, mit je einer Minute Einwirkzeit zwischen den Waschschritten, anschließend 100 µl Substratlösung in jedes well gegeben und die Platte ohne Deckel für 30 Minuten im Dunkeln inkubiert. Zum Schluss wurde die Reaktion mit 50 µl Stopplösung gestoppt und innerhalb von 15 Minuten die Absorption bei 450 nm mittels ELISA-Lesegerät gemessen. Als Referenzwert galt die Absorption bei 620 nm. Mit Hilfe der Standardkurve wurde aus der Absorption der Proteingehalt in pg/ml berechnet.

Interferon- α -ELISA

Ifn- α -ELISA-Kit

PBL Biomedical Laboratories, Piscataway, NJ, USA

Enthält: *Waschlösung*; *Standard*: Maus Interferon-alpha; *Verdünnungspuffer*; *Antikörper-Lösung*: Antikörper-Konzentrat 1: 1000 verdünnt in Verdünnungspuffer; *HRP-Konjugat-Lösung*: HRP-Konjugat-Konzentrat verdünnt in HRP-Konjugat-Verdünner; *TMB-Substratlösung*; *Stopplösung*

Zu Beginn wurden je 100 µl der Proben, des Standards (Verdünnungsreihe von 500 pg/ml bis 12,5 pg/ml) und des Verdünnungspuffers als Leerwert auf die vorbeschichtete 96-well-Platte gegeben (die obere und untere Reihe der Platte wurde dabei ausgelassen, da hier die Leerwerte höher sind) und für eine Stunde verschlossen inkubiert. Anschließend wurde einmal mit Waschpuffer gewaschen und 100 µl/well der Antikörper-Lösung aufgetragen. Die Platte wurde für 24 Stunden verschlossen im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation wurde dreimal gewaschen und 100 µl der HRP-Konjugat-Lösung in jede Vertiefung gegeben. Nach einer Stunde Inkubation wurde viermal gewaschen und 100 µl TMB-Substratlösung dazu gegeben. Nach 15 Minuten wurde die Reaktion mit 100 µl Stopplösung beendet, die Absorption bei 450 nm gemessen und mittels Standardkurve die Interferonkonzentration berechnet.

Interferon- β -ELISA

Ifn- β -ELISA-Kit

PBL Biomedical Laboratories, Piscataway, NJ, USA

Enthält: *Waschlösung*; *Standard*: Maus Interferon-beta; *Probenverdünner*; *Antikörper-Lösung*: Antikörperkonzentrat lotspezifisch verdünnt in Konzentrat-Verdünner; *HRP-Konjugat-Lösung*: HRP-Konjugat-Konzentrat lotspezifisch verdünnt in Konzentrat-Verdünner; *TMB-Substratlösung*; *Stopplösung*

Zuerst wurden je 100 μ l der Proben, des Standards (Verdünnungsreihe von 1 000 bis 15,6 pg/ml) und des Probenverdünners als Leerwert auf die vorbeschichtete Platte aufgetragen und verschlossen für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde dreimal mit Waschpuffer gewaschen und 100 μ l des zweiten Antikörpers (Antikörperlösung) aufgegeben. Nach einer Stunde Inkubation wurde wiederum dreimal gewaschen und im Anschluss die HRP-Konjugat-Lösung aufgetragen. Nach erneuter einstündiger Inkubation folgte dreimaliges Waschen und das Auftragen von 100 μ l TMB-Substratlösung je well. Diese wurde 15 Minuten inkubiert und dann mit Stopplösung die Farbreaktion gestoppt und innerhalb von 5 Minuten die Absorption bei 450 nm mittels ELISA-Lesegerät bestimmt.

Interferon- γ -ELISA

Ifn- γ -ELISA-Kit

BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland

Enthält: *Bindeantikörper*: Anti-Maus Ifn- γ ; *Standard*: Rekombinantes Maus Ifn- γ ; *Arbeits-Detektor-Reagenz*: biotiniertes Detektions-Antikörper Anti-Maus Ifn- γ im Verhältnis 1: 250 in Probenverdünner gelöst, dazu das Enzymereagenz (mit *Horseradish-Peroxidase* markiertes Streptavidin) im Verhältnis 1: 250 gegeben

di-Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Fötale bovines Serum (FBS Superior)	Biochrom KG, Berlin, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumcarbonat (Na_2CO_3)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tween 20	Fluka, Sigma Aldrich, Deisenhofen, D

Substratlösung: Tetramethylbenzidin und Hydrogen-Peroxid im Verhältnis 1: 1 (BD PharmingTM TMB-Substrate, Heidelberg, Deutschland); Stopplösung (2 N H_2SO_4)

<i>10 x PBS:</i>	80,0 g NaCl; 11,6 g Na ₂ HPO ₄ ; 2,0 g KH ₂ PO ₄ ; 2,0 g KCl gelöst in 1 l doppelt deionisiertem Wasser, pH 7
<i>Beschichtungspuffer:</i>	8,4 g NaHCO ₃ , 3,56 g Na ₂ CO ₃ gelöst in 1 l Wasser, pH 9,5
<i>Waschpuffer:</i>	PBS + 0,05 % FCS
<i>Probenverdünner:</i>	PBS mit 10 % FCS

Zunächst wurde eine 96-well-Platte mit 100 µl/well in Beschichtungspuffer gelöstem Bindeantikörper (Verhältnis 1: 250) beschichtet, verschlossen und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde fünfmal mit 300 µl/well Waschpuffer gewaschen und die Platte mit 200 µl Probenverdünner geblockt. Nach 1 Stunde Inkubation wurde nochmals fünfmal gewaschen und anschließend je 100 µl der Proben, des Standards (Verdünnungsreihe von 1 000 pg/ml bis 7,8 pg/ml) und des Probenverdünners als Leerwert aufgetragen, die Platte verschlossen und 2 Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation folgte ein fünfmaliges Waschen, im Anschluss daran wurden 100 µl des Arbeits-Detektor-Reagenz aufgetragen und die Platte wieder für eine Stunde inkubiert. Danach wurde zehnmal gewaschen, mit je einer Minute Einwirkzeit zwischen den Waschschrinen, anschließend wurden 100 µl Substratlösung in jedes well gegeben und die Platte ohne Deckel für 30 Minuten im Dunkeln inkubiert. Zum Schluss wurde mit 50 µl Stopplösung die Reaktion gestoppt und innerhalb von 15 Minuten die Absorption bei 450 nm mittels ELISA-Lesegerät gemessen. Als Referenzwert galt die Absorption bei 620 nm.

2.4 RNA-Gewinnung und Umschreiben in cDNA

0,1M DTT	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
15 µg/ml Linear Acrylamide	Ambion, Darmstadt, Deutschland
25nM dNTPS	dNTP-Set, GE Healthcare, München
40 U/µl rNasin	Promega, Mannheim, Deutschland
5*First Strand Buffer	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Agarosepulver	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Diethyl-Pyrocyanat (DEPC)	Fluka, Sigma Aldrich, Deisenhofen, D
DNase Set (enthält DNase, RDD-Puffer und RNase freies Wasser)	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Hexanucleotide	Roche, Mannheim, Deutschland
Mops	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumacetat (CH ₃ COONa)	Merck, Darmstadt, Deutschland

RNA Sample Loading Buffer	Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
RNeasy Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Superscript II	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

10 x MOPS-Puffer: 20,93 g 200 mM Mops, 3,4g 50 mM Na-Acetat, 10 ml 0,5 M EDTA, gelöst in 500 ml Wasser, pH 7

Agarose-Gel: 0,75 g Agarose-Pulver + 50 ml Mops-Puffer

Zur RNA-Gewinnung wurde das RNeasy-Kit von Qiagen verwendet. Es wurde an einem RNase-freien Arbeitsplatz auf Eis gearbeitet. Alle Eppendorfröhrchen wurden vorher mit DEPC behandelt.

Zellyse

Der RLT-Lyse-Puffer wurde im Verhältnis 100: 1 mit β -Mercaptoethanol gemischt. Das Medium wurde von den Platten abgesaugt und einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 350 μ l des Puffer-Gemisches hinzugegeben und mit einem Zellschaber die Vertiefungen kräftig abgekratzt. Mit einer Pipette wurde die Flüssigkeit einige Male aufgesaugt und wieder in die Vertiefungen zurückgespült, um die Zellen zum Platzen zu bringen. Dann wurde die Lösung in ein DEPC-behandeltes Eppendorfröhrchen gegeben und bei -20 °C eingefroren.

RNA-Isolation

Die Proben wurden auf Eis aufgetaut und im Verhältnis 1: 1 mit 70 % nicht vergälltem Alkohol gemischt. Die Mischung wurde anschließend auf die Filtriersäulen gegeben und eine halbe Minute bei 10 000 Umdrehungen/Minute zentrifugiert. Dabei blieb die RNA auf der Membran hängen. Die Flüssigkeit im unteren Gefäß wurde abgossen. Jetzt wurden 350 μ l RW1-Puffer (wäscht Ethanol und Reststoffe aus) darauf gegeben und bei 10 000 Umdrehungen/Minute 30 Sekunden zentrifugiert. Währenddessen wurde das DNase-Puffer-Gemisch hergestellt. Dazu wurde zunächst das DNase-Pulver mit 550 μ l RNase-freiem Wasser aufgelöst, anschließend je Probe 10 μ l der DNase mit 70 μ l RDD-Puffer gemischt. Nachdem der Überstand abgossen war, wurden 80 μ l DNase-Puffer-Gemisch mittig auf die Säulen gegeben und 20 Minuten inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde nochmals mit 350 μ l RW1-Puffer gewaschen und wie oben zentrifugiert, anschließend die Säulen in neue Gefäße umgesetzt, 500 μ l RPE-Puffer dazu gegeben und nochmals zentrifugiert. Nachdem der Überstand abgossen war, wurden erneut 500 μ l RPE-Puffer dazu gegeben und dieses Mal zwei Minuten bei 10 000 Umdrehungen/Minute zentrifugiert, anschließend der Überstand abgossen. Dann wurden die Säulen zwei Minuten bei 13 000 Umdrehungen/Minute trocken zentrifugiert.

Schließlich wurden die Säulen in Eppendorfgefäße umgesetzt und 30 µl RNase-freies Wasser mittig aufgegeben und zwei Minuten bei 10 000 Umdrehungen/Minute zentrifugiert. Das Wasser löst die RNA von der Membran. Diese befindet sich nach Zentrifugation im Eppendorfgefäß und kann bei -80° C aufbewahrt werden.

Messen der optischen Dichte

Im Anschluss an die RNA-Isolation wurde die optische Dichte gemessen, um den RNA-Gehalt zu bestimmen. Dazu wurden die Proben zunächst 1: 50 mit RNase-freiem Wasser verdünnt (2 µl Probe + 98 µl Wasser). Anschließend die 100 µl Probe in die Küvette gegeben und die Werte für 260 nm, 280 nm und das Verhältnis abgelesen. Die Werte sind verwertbar bei einem Verhältnis zwischen 1,7 und 2,2. Darunter liegt eine Proteinkontamination vor, darüber eine DNA-Kontamination.

Gel-Elektrophorese

Die Gel-Elektrophorese wurde gemacht, um die Reinheit der isolierten RNA zu bestimmen. Dazu wurden 2 µl der Probe mit 5 µl RNA-Ladepuffer gemischt und zehn Minuten bei 37 °C im Thermomixer gemischt.

Danach wurde das Ganze auf das Agarose-Gel aufgetragen und bei 130 V 20 Minuten laufen gelassen. Anschließend wurden in der Dunkelkammer die Banden gemessen. Bei deutlichen Banden liegt keine Kontamination vor.

Berechnung der RNA-Konzentration

Um die RNA in cDNA umzuschreiben sind 2 µg RNA nötig. Die Konzentration der RNA, die gewonnen wurde, lässt sich mit der Formel: $c \text{ (}\mu\text{g/ml)} = \text{Extinktion bei 260 nm} * \text{Verdünnungsfaktor} * 1 \text{ optische Dichte (für RNA 40 } \mu\text{g/ml)}$ berechnen. Daraus lässt sich mittels Dreisatz bestimmen, in wie viel µl der gewonnenen Lösung 2 µg RNA sind.

Umschreiben der mRNA in cDNA

Die Menge der Proben, in der 2 µg RNA sind, wurden in ein neues Eppendorfgefäß pipettiert und mit Wasser auf 30 µl aufgefüllt. Das Ganze zweimal (einmal für cDNA+ und einmal für cDNA-). Für den Mastermix wurden je Probe 9 µl 5*Puffer, 1 µl 25mM dNTPS, 2 µl 0,1M DTT, 1 µl 40 U/µl rNasin, 0,5 µl 15 µg/ml *linear Acrylamide* und 0,5 µl *Hexanucleotide* verwendet. Zusätzlich für die cDNA+ 1 µl reverse Transkriptase (Superscript) und für die cDNA- 1 µl RNase freies Wasser. Anschließend

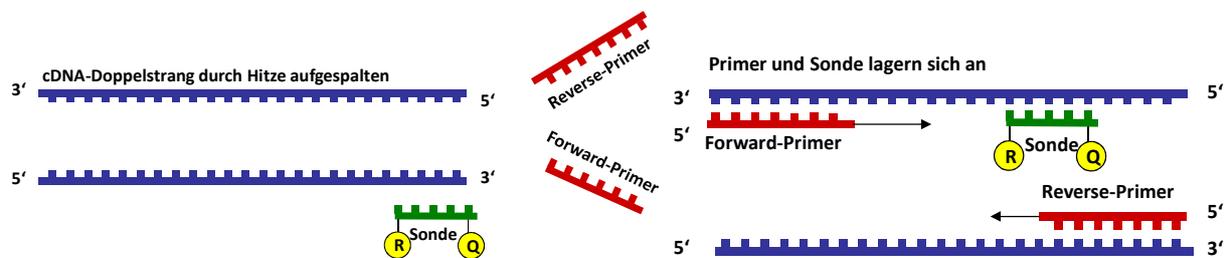
wurden 15 µl Mastermix zu jeder Probe gegeben und die Proben im Thermomixer bei 42 °C eine Stunde gemischt. Die cDNA wurde bei -20° C aufbewahrt.

2.5 Real time RT-PCR (TaqMan)

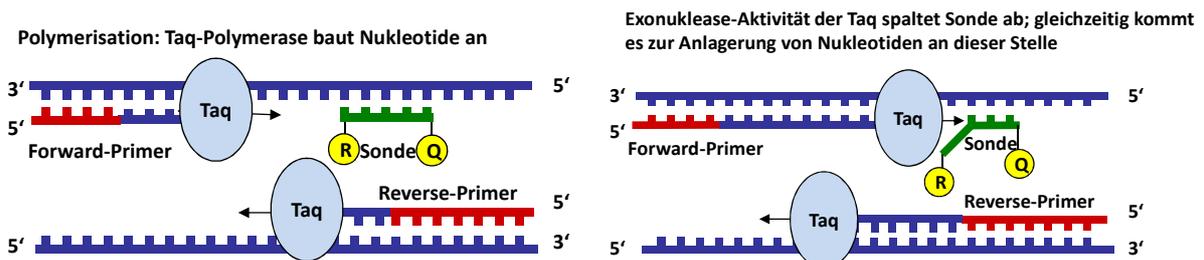
Die *real time* RT-PCR ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die gleichzeitig eine Quantifizierung während eines PCR-Zyklus zulässt. Für die Quantifizierung wird zu den Proben zusätzlich zum *Forward*- und *Reverse*-Primer eine Sonde gegeben, die an ihrem 5' Ende einen *Quencher* (TAMRA), am 3' Ende einen Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (VIC, FAM oder TET) enthält.



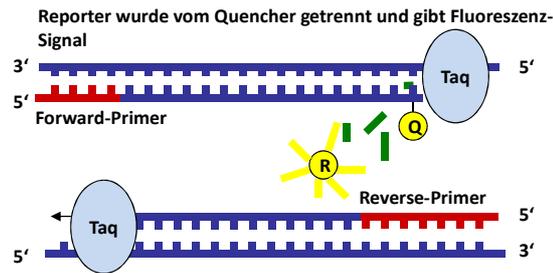
Durch Erhitzen wird der Doppelstrang zunächst aufgespalten und Primer und Sonde lagern sich am komplementären Strang an.



Wenn die TaqPolymerase, die gleichzeitig Exonukleaseaktivität besitzt, am Strang entlang wandert und die einzelnen Nukleotide verbindet, spaltet sie auch die Sonde ab.



Dadurch entfernen sich *Quencher* und Reporter voneinander, der *Quencher* kann die Fluoreszenz des Reporters nicht mehr unterdrücken (*quenching*) und eine steigende Reporterfluoreszenz kann gemessen werden.



Die gemessene Fluoreszenz am Ende jeden Zykluses entspricht dabei der Menge des amplifizierten Produkts. Entscheidend hierbei ist der *Threshold-Zyklus*, das ist derjenige Zyklus, bei dem sich die gemessene Fluoreszenz zum ersten Mal deutlich vom Hintergrundrauschen unterscheidet. Je mehr cDNA (in Folge von viel mRNA) für eine bestimmte Sequenz vorhanden ist, desto früher steigt die Fluoreszenz an. Am Ende wird die Anzahl der Zyklen, die nötig sind, um eine signifikante Fluoreszenz zu messen, bestimmt. Je weniger Zyklen nötig sind, desto mehr mRNA ist vorhanden.

18S rRNA (pre-developed TaqMan Assay Reagents)	Applied Biosystems, Darmstadt, D
EDTA	Merck, Darmstadt, Deutschland
GAPDH (pre-developed TaqMan Assay Reagents)	Applied Biosystems, Darmstadt, D
TaqMan PCR-Master-Mix	Roche, Mannheim, Deutschland
(enthält AmpliTaq Gold [®] DNA Polymerase, AmpErase [®] UNG, dNTPs mit dUTP, passive Referenz, Puffer)	
Tris (Trihydroxymethylaminomethan)-HCl	Merck, Darmstadt, Deutschland

TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA

Verwendete Primer (murin)

Il-6 AssayID Mm00446190_m1 FAM5'-AAATGAGAAAAGAGTTGTGCAATGG-3'
 Mx-1 AssayID Mm00487796_m1 FAM 5'-TGTACTGCTAAGTCCAAAATTAAG-3'
 Ifn-β AssayID Mm00439546_s1 FAM 5'-TCCACGCTGCGTTCCTGCTGTGTGCTT-3'
 Ifn-γ AssayID Mm00801778_m1 FAM 5'-CTATTTTAACTCAAGTGGCATAGAT -3'
 Ips-1/Visa AssayIDMm00523168_m1 FAM 5'-AGTGACCAGGATCGACTGCGGGCTT-3'
 Mda5 AssayID Mm00459183_m1 FAM 5'-GACACCAGAGAAAATCCATTTAAAG-3'
 Rig-I AssayID Mm00554529_m1 FAM 5'-CCAAACCAGAGGCCGAGGAAGAGGCA-3'
 Tlr-3 Accession Number AF355152 FAM 5'-CACTTAAAGAGTTCTCCC-3'
 Tlr-7 Accession Number AY035889 FAM 5'-CCAAGAAAATGATTTTAATAAC -3'
 Ifn-Rezeptor 1 Assay ID Mm00439544_m1

Verwendete Primer (human)

IFN-α FAM 5'-CAG ACA TGA CTT TGG ATT TCC CCA GG-3'

Zunächst wurden die cDNAplus- und die cDNAminus-Proben im Verhältnis 1:10 mit TE-Puffer gemischt (5 µl Probe + 45 µl TE-Puffer). Dann wurde der Mix für das Ziel-Gen hergestellt. Dazu wurden je Probe 10 µl Taq-Mix, 1 µl des jeweiligen Primers (enthält *Forward*- und *Reverse*-Primer sowie die Sonde), und 7 µl Wasser gemischt. Anschließend wurden 18 µl davon in ein Eppendorfgefäß gegeben und 2,2 µl der cDNA RT+ hinzugefügt. Als *Housekeeper* (Referenz-Gen) wurde 18S rRNA verwendet. Dazu wurden je Probe 10 µl Taq-Mix, 1 µl 18s rRNA und 7 µl Wasser gemischt und je 20 µl davon plus 2,2 µl der cDNA RT+ in ein Eppendorfgefäß gegeben und gemischt. Anschließend wurde in jede Vertiefung der 96-well-Platte 20 µl des Ziel-Gen-Mixes und des *Housekeepers* jeweils in Duplikaten aufgetragen. Für die cDNA RT- wurde zunächst 20 µl des rRNA-Mixes auf die Platte gegeben, anschließend 2,2 µl der cDNA RTminus-Probe dazu gefügt (in Unikaten). Dann wurde die Platte mit Folie gut verschlossen und in den TaqMan Abi Prism gegeben. Dort lief die *real time* RT-PCR für 1 Stunde 48 Minuten ab. Dabei erfolgte die erste Inkubation für 2 Minuten bei 50 °C, anschließend für 10 Minuten bei 95 °C. Danach wurde die DNA während 40 Zyklen, die jeweils 15 Sekunden bei 95 °C und 1 Minute bei 60 °C beinhalteten, vervielfältigt. Für die Auswertung wurde zunächst die cDNA RT- betrachtet. Waren diese Werte mehr als 5 verschieden von der cDNA RT+, lag keine DNA-Kontamination vor und die Werte konnten verwendet werden. Danach wurde für jede Probe der *Housekeeper* von dem Wert des Ziel-Gens abgezogen. Wurde dieser Wert noch mit 2^x berechnet, kam man auf das Ergebnis.

2.6 Proliferationsassay

CellTiter 96[®] AQ_{ueous} One Solution Cell Proliferation Assay

Promega, Mannheim, D

Der Proliferationsassay dient dazu, die Zellproliferation auf bestimmte Stimuli hin zu bestimmen. Zunächst wurde die dafür am besten geeignete Zellzahl bestimmt. Hierfür wurden die Zellen gezählt (siehe 2.2), anschließend Zellkonzentrationen von 200 000 Zellen/ml bis 3 125 Zellen/ml auf je 8 wells einer 96-well-Platte in RPMI + 1 % FCS gegeben; zusätzlich in 8 wells nur Medium als Leerwert. Nach 48 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel. Nach weiteren 44 Stunden wurden je well 20 µl der *One Stop Solution* hinzugegeben und nach 3 Stunden die Absorption bei 492 nm gemessen. Die Zellzahl, die sich im aufsteigenden Teil der Kurve befand, wurde für weitere Versuche verwendet. Für die Messung der eigentlichen Proliferation wurden je 30 000 Zellen/ml auf eine 96-well-Platte mit RPMI + 1 % FCS + 1 % PS verteilt. Nach 24 Stunden wurde das Medium gewechselt und die Liganden dazu gegeben. Nach 44 Stunden im Inkubator wurden je well 20 µl *One Stop Solution* hinzugegeben und nach 2 Stunden die Absorption bei 492 nm mittels ELISA-Lesegerät bestimmt und im Diagramm aufgetragen.

2.7 Western Blot

Western Blot bedeutet die Übertragung (das Blotten) von Proteinen von einem Gel auf eine Trägermembran. Der Name geht auf den Erfinder der Blotting-Technik, Edwin Southern, zurück, der 1975 den Southern Blot, das Blotten von DNA, erstmals beschrieben hat.

Zunächst werden hierfür die Proteine mittels Elektrophorese auf einem Gel aufgespalten (Abbildung 22). Anschließend erfolgt das Blotten dieser Proteine vom SDS-Gel auf eine Membran. Dazu werden die Proteine, die sich auf dem Gel aufgespalten haben, auf eine Transfermembran übertragen (Abbildung 23). Auf der Membran können die gesuchten Proteine mittels spezifischer Antikörper markiert und anschließend durch Autoradiographie auf Röntgenfilme nachgewiesen werden (Abbildung 24).

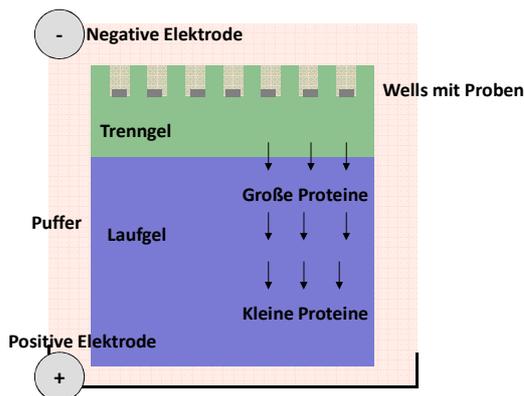


Abbildung 22: Aufbau einer Elektrophoresekammer. Im oberen Teil befindet sich das Trenngel, im Unteren das Laufgel. In die Vertiefungen des Trenngels werden die Proteinproben aufgetragen. Die gesamte Kammer ist mit einer Pufferlösung gefüllt. Wird Strom dazu gegeben, beginnen die Proteine von der Kathode in Richtung der Anode zu laufen. Dabei sind kleine Proteine schneller als Große und erreichen somit das Ende zuerst. Wird der Strom gestoppt, hat man Banden mit verschiedenen großen Proteinen.

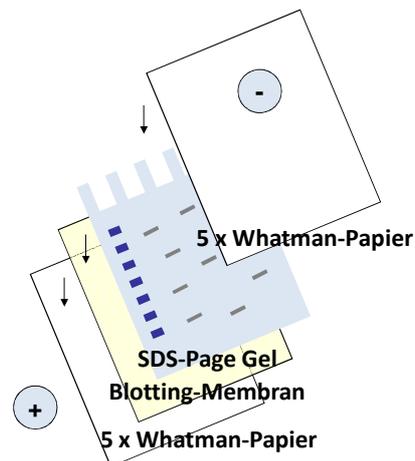


Abbildung 23: Schema des Sandwichaufbaus beim Blotten. Unten befinden sich 5 Lagen in Puffer getränktes Whatman-Papier, dann folgt die aktivierte Blotting-Membran und das Gel mit den Proteinen. Zum Schluss nochmals 5 Schichten feuchtes Whatman-Papier. Wird das Blotting-Gerät gestartet, läuft der Strom von der Kathode (oben) zur Anode (unten). Dadurch werden die Proteine vom Gel auf die Blotting-Membran übertragen.

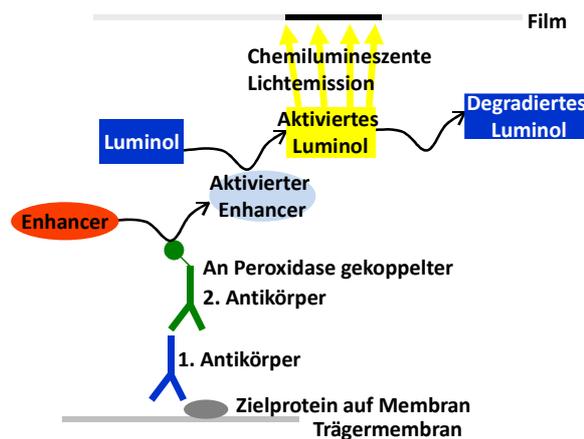


Abbildung 24: Nachweis der zu untersuchenden Proteine. Der spezifische 1. Antikörper bindet an das Zielprotein auf der Membran. Ein an Peroxidase gekoppelter 2. Antikörper bindet an den 1. Antikörper. Durch Zugabe der Chemilumineszenz wird zunächst der Enhancer aktiviert, dieser aktiviert Luminol, was zur Belichtung des Röntgenfilmes führt. Nach Entwicklung des Films zeigen sich die entsprechenden Banden auf dem Film

10 % Ammoniumpersulfat (APS)	BioRad, München, Deutschland
10 % SDS	BioRad, München, Deutschland
2-Buthanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
30 % Acrylamide (Rotiphorese Gel 30)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
β -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bio-Rad Protein Assay	BioRad, München, Deutschland
Blockierlösung Western Blocking Reagent	Roche, Mannheim, Deutschland
Bovines Serum-Albumin (BSA)	Roche, Mannheim, Deutschland
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, Deutschland
Desoxycholicacid	Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
ECL (Chemilumineszenz)	NEN™, Life Science Prod., Boston, USA
ECL Rabbit-IgG HRP-linked	GE Healthcare, München, Deutschland
EDTA	Merck, Darmstadt, Deutschland
Eisessig	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glycin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycerol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
HCL	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
NaCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
Polyclonal Antibody to Cardif (Ips1)	Alexis, San Diego, Ca, USA
Polyclonal Antibody to Helicard (Mda5)	Alexis, San Diego, Ca, USA
Ponceau S	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Proteasen-Inhibitor-Cocktail Complete	Roche, Mannheim, Deutschland
Rig-I Antibody	ProSci Inc., Poway, CA, USA
Standard peqGOLD Protein-Marker II	Peqlab, Erlangen, Deutschland
TEMED	BioRad, München, Deutschland
Tris	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Fluka, Sigma Aldrich, Deisenhofen, D
Tween 20	Fluka, Sigma Aldrich, Deisenhofen, D

RIPA-Lysepuffer: 4 ml Triton X-100, 4 g Desoxycholicacid, 2 ml SDS 20 %, 12 ml 5 M NaCl, 20 ml 1 M Tris, 8 ml 0,5 M EDTA auf 400 ml Wasser auffüllen

2 Trenngele (10 %): 7,9 ml Millipore-Wasser; 6,7 ml 30 % Acrylamidemix; 5 ml 1,5 M Tris-HCl pH 8,8 (36,3 g Tris in 150 ml Wasser, mit HCl auf pH 8,8; mit Wasser auf 200 ml auffüllen); 0,2 ml 10 % SDS; 0,2 ml 10 % APS; 0,008 ml TEMED

2 Sammelgele: 5,6 ml Millipore-Wasser; 1,7 ml 30 % Acrylamidemix; 2,5 ml 0,5 M Tris-HCl pH 6,8 (12,1 g Tris in 150 ml Wasser, mit HCl auf pH 6,8; auf 200 ml mit Wasser auffüllen); 0,1 ml 10 % SDS; 0,1 ml 10 % APS; 0,01 ml Temed

2 x Probenpuffer: 2,5 ml 1,25 M Tris-HCl, pH 6,8; 5,8 ml Glycerol (87 %); 1 g SDS; 2,5 ml β -Mercaptoethanol; 5 mg Bromphenolblau; 40 ml Millipore-Wasser

10 x Elektrophoresepuffer: 144 g Glycin; 30 g Tris; 30 g SDS in 1 l Wasser

Transferpuffer: 17,46 g Tris; 8,79 g Glycin; 11,25 ml SDS 10 %; 600 ml Methanol; mit Millipore-Wasser auf 3 Liter auffüllen

TBS: 24,22 g 200 mM Tris; 80 g 1,37 M NaCl; 1 l Millipore-Wasser; pH 7,6

TBS-T: TBS + 0,05 % Tween 20

Ponceau S-Färbelösung: 5 g Ponceau S, 10 ml Eisessig, 990 ml Millipore-Wasser

Gel gießen

Zunächst wurde die Gelkammer zusammengesetzt, dann das Trenngel wie angegeben hergestellt. Kurz vor dem Gießen wurde TEMED hinzugegeben. Das Trenngel wurde bis ca. 2 cm unterhalb des Randes in die Kammern gegossen, etwas 2-Butanol darüber gegeben, damit das Gel plan abschließt und das Ganze 20 Minuten erstarren gelassen. War das Gel fest, wurde das Butanol abgegossen, gut nachgespült und getrocknet. Danach wurde das Sammelgel hergestellt und wieder kurz vor Verwendung TEMED hinzugegeben. Schließlich wurde das Sammelgel in die Gelkammer auf das Trenngel gegossen, die Kämme hinein gesteckt und ebenfalls erstarren gelassen.

Proteingewinnung

Um die Proteine zu isolieren, wurde zunächst zu 1 ml RIPA-Puffer 40 µl Proteasen-Inhibitor-Cocktail gegeben. Anschließend das Medium von der 10 cm Zellkulturplatte abgesaugt, zweimal mit PBS gewaschen und gut abgesaugt. Dann wurden je Platte 120 µl RIPA-Puffer auf der Platte verteilt und mit dem Zellschaber die Zellen abgekratzt und in ein Eppendorfgefäß pipettiert, dieses 10 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend 10 Minuten bei 15 000 Umdrehungen/Minute zentrifugiert. Der Überstand, in dem sich die Proteine befanden, wurde in ein neues Eppendorfgefäß gegeben.

Proteinmessung und Laden der Proteine

Für die Proteinmessung wurden zunächst 180 µl des Bio-Rad Protein Assay Reagenz A mit 20 µl des Bio-Rad Protein Assay Reagenz S zusammen pipettiert. Anschließend wurde eine Standardreihe mit Konzentrationen zwischen 0,5 mg/ml und 6 mg/ml aus RIPA und BSA hergestellt. Schließlich wurden je 5 µl des Standards, der Proben und des Leerwertes (RIPA-Puffer) in dreifacher Ausführung auf eine 96-well-Platte gegeben und in jedes dieser wells zusätzlich 25 µl des Protein Assay Gemisches. Zum Schluss wurden 200 µl des Bio-Rad Protein Assay B hinzugefügt. Nach 15-minütiger Inkubationszeit wurde mittels ELISA-Lesegerät die Absorption bei 620 nm gemessen und mit Hilfe der Standardkurve die Proteinkonzentration berechnet. Die gewünschte Proteinmenge (30 mg) wurde in ein neues Eppendorfgefäß gegeben, mit der halben Menge des zweifachen Ladepuffers vermischt und anschließend eine halbe Stunde bei 65 °C im Thermomixer gekocht.

SDS-Page

Zunächst wurde das Gel in die Elektrophoresekammer eingesetzt, mit Elektrophoresepuffer gefüllt und die Kämme entfernt. Nachdem die Taschen mit Puffer gut gespült worden waren, um Gelreste zu entfernen, wurde in die erste Tasche jedes Gels 5 µl des Standards (Protein-Marker II) gegeben. In die anderen Taschen kamen die Proben. Die Elektrophorese wurde bei 100 V einlaufen gelassen, bis die Trennlinie erreicht war und lief schließlich bei 130 V so lange weiter, bis die Proben den unteren Rand erreicht hatten. Dann wurde der Puffer abgegossen und das Gel auf der kleinen Glasplatte zum Äquilibrieren in den Transferpuffer gelegt.

Blotting

Die Transfermembran wurde zum Aktivieren kurz in Methanol gelegt und anschließend in den Transferpuffer. Die Whatman-Papiere wurden in Stapeln zu je fünf Stück ebenfalls kurz in den Transferpuffer gelegt. Zum Sandwichaufbau auf dem Blottinggerät wurde zunächst ein Stapel

Whatman-Papier aufgelegt, dann die Transfermembran, darauf das Gel und zum Schluss ein weiterer Stapel Whatman-Papiere. Das Gerät lief für ca. eine Stunde bei 25 V. Nach dem Blotten wurde die Membran für etwa 5 Minuten auf dem Taumler in Ponceau-Färbelösung gegeben, um den Standard sichtbar zu machen. Danach wurde sie kurz in Wasser gewaschen, getrocknet und die Banden des Standards markiert, anschließend eine Stunde mit Blockierlösung auf dem Taumler geblockt und mit TBS dreimal und mit TBS-T einmal gewaschen. Dann wurde der erste Antikörper in TBS verdünnt in ein 50-ml-Röhrchen gegeben, dazu die Membran. Das Ganze wurde über Nacht auf dem Taumler inkubiert. Im Anschluss wurde wieder dreimal mit TBS und einmal mit TBS-T gewaschen und die Membran dann für eine Stunde zu dem zweiten, 1: 10000 in Milchpulver verdünnten, Antikörper gegeben. Nach der Inkubation erfolgte erneutes Waschen und im Anschluss die Entwicklung.

Entwicklung

Für die Entwicklung wurden je Membran zwei Milliliter der Lösungen 1 und 2 der Chemilumineszenz getrennt abgefüllt und in der Dunkelkammer zusammen gegeben. Der Blot wurde eine Minute im Dunkeln in der Lösung inkubiert, auf Whatman-Papier leicht abgetrocknet, in Frischhaltefolie eingepackt und eine Minute auf den Filmstreifen gelegt. Nach Entwicklung des Filmstreifens wurde entschieden, ob der Blot länger oder kürzer auf dem Filmstreifen inkubiert werden muss.

2.8 Zellfärbung

Bovines Serum-Albumin (BSA)	Roche, Mannheim, Deutschland
Dulbecco's PBS (1x)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
Fischgelatine	Merck, Darmstadt, Deutschland
Fötales bovines Serum (FBS Superior)	Biochrom KG, Berlin, Deutschland
Goat Anti-Mouse FITC-Conjugated	ImmunoTools, Friesoythe, Deutschland
Monoclonal Mouse Anti-Human Smooth Muscle Actin	Dako, Hamburg, Deutschland
Mounting Medium with Dapi	Vector, Burlingame, CA, USA
Mouse Anti-Cytokeratin 18	Chemicon, Temecula, CA, USA
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Sucrose	Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Triton X-100	Fluka, Sigma Aldrich, Deisenhofen, D

PFA-Fixierpuffer: 2 % PFA, 4 % Sucrose in 1 x PBS

0,3 % Triton: 150 µl Triton in 50 ml PBS

Blockierlösung: 2 % FCS, 2 % BSA, 0,2 % Fischgelatine in PBS

Für die Zellfärbung wurden zunächst kleine Plättchen in die Vertiefungen einer 12-well-Platte gegeben. Auf diese wurde dann vorsichtig die Zellsuspension mit Medium gegeben und die Zellen wurden so lange im Brutschrank wachsen gelassen, bis sie ca. 80 % konfluent waren. Dann fand die Zellfixierung statt. Zunächst wurde dafür das Medium abgesaugt und etwa ein Milliliter PFA in jedes well gegeben. Nach fünfminütiger Inkubationszeit wurde das PFA entfernt, dreimal mit PBS gewaschen und für 10 Minuten Tritonpuffer aufgetragen. Dieser wurde ebenfalls entfernt und wieder dreimal mit PBS gewaschen. Schließlich wurden die fixierten Zellen mit PBS bedeckt und in der 12-well-Platte bei 4 °C aufbewahrt, bis die eigentliche Zellfärbung stattfinden konnte. Die Plättchen wurden dann auf Parafilm in eine dunkle, feuchte Kammer gelegt, mit 150 µl Blockierlösung geblockt und für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Blockierlösung abpipettiert und 100 µl des verdünnten ersten Antikörpers auf die Plättchen gegeben. Nach einstündiger Inkubation wurde der Antikörper entfernt, dreimal für je drei Minuten mit PBS gewaschen und 100 µl des verdünnten zweiten Antikörpers für 45 Minuten dazu gegeben. Nach Entfernen des zweiten Antikörpers wurde dreimal für je drei Minuten mit PBS und dreimal mit Wasser gewaschen, das Wasser abpipettiert und das Plättchen vorsichtig getrocknet. Auf einen Objektträger wurde ein Tropfen Einbettmedium gegeben und die Plättchen mit den Zellen nach unten auf das Einbettmedium gelegt. Anschließend erfolgte die Mikroskopie.

2.9 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (FACS, *fluorescence-activated cell sorting*) ermöglicht das Zählen und die Analyse von physikalischen und molekularen Eigenschaften von Partikeln (Zellen, Kunststoffkügelchen usw.) in einem Flüssigkeitsstrom. Eine Hauptanwendung besteht darin, mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoff-markierten Proben (Antikörper, Rezeptoren, Streptavidin, usw.) bestimmte Eigenschaften von Zellen oder Zellpopulationen auf Einzelzellebene zu dokumentieren. Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion, die mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern durchgeführt wird. Zur Analyse werden die Zellen einer Einzelzellsuspension durch hydrodynamische Fokussierung wie an einer Perlenkette an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet (Abbildung 25). Bei exakter Anregung der Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes durch den monochromatischen Laserstrahl werden diese auf ein höheres Energieniveau gehoben. Nach dem Laserpuls fallen die Elektronen unter Abgabe von Energie (in Form von Photonen) auf ihr Ursprungsniveau zurück. Die emittierte Photonenkonzentration, die durch einen Photodetektor registriert wird, verhält sich proportional zur Menge an gebundenen Antikörpern/Zelle. Zusätzlich werden durch die Lichtbeugung und -streuung Informationen über die Zellgröße und die Binnenstruktur (Granularität des Zytoplasmas, Größe des Zellkerns usw.) der Zellen gewonnen (Abbildung 25) [86].

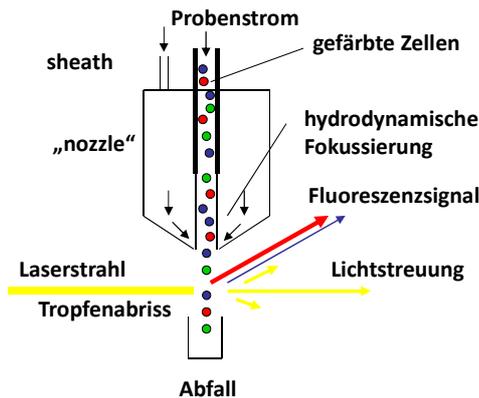


Abbildung 25: Aufbau eines FACS-Gerätes. Die fluoreszenzmarkierten Zellen werden mittels hydrodynamischer Fokussierung an einem gebündelten Laserstrahl vorbeigeleitet. Durch den Laserstrahl werden die Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes auf ein höheres Energieniveau gehoben. Nach dem Laserpuls fallen die Elektronen unter Abgabe von Energie (in Form von Photonen) auf ihr Ursprungsniveau zurück und werden anhand ihrer Färbung sortiert. Die emittierte Photonenkonzentration verhält sich proportional zur Menge an gebundenen Antikörpern/Zelle [86].

Wir führten die Durchflusszytometrie durch, um die Anzahl toter Zellen zu bestimmen. Dazu verwendeten wir die Färbung mit Annexin und Propidium Jodid. Das Antikoagulans Annexin V ist in der Lage Ca^{++} -abhängig das Zellmembran-Phospholipid Phosphatidylserin hochaffin zu binden. Diese Eigenschaft macht man sich bei der durchflusszytometrischen Bestimmung des Zelltodes zu Nutze. In vitalen Zellen ist Phosphatidylserin an der zytosolischen Seite der Plasmamembran lokalisiert. Die Aufrechterhaltung dieser asymmetrischen Verteilung erfordert Energie in Form von ATP. Im Rahmen des Zelltodes kommt es zu einer Translokation des Phosphatidylserins an die Außenseite der Plasmamembran. Dies geschieht bereits in der Frühphase des Zelltodes, während der die Zellmembran noch intakt ist. Mit einer Doppelfärbung der Zellen mit Annexin V und Propidium Jodid (PI), das nur beschädigte Zellmembranen passieren kann und sich im Zellkern an DNS bindet, ergibt sich die Möglichkeit, verschiedene Phasen des Zelltodprozesses abzubilden. In einer frühen Phase, in der die Zellen lediglich Phosphatidylserin an ihrer Oberfläche zeigen, jedoch noch eine intakte Plasmamembran besitzen, strahlen die Zellen auf Grund der Bindung von Annexin V (und dem daran gekoppelten Fluoreszein) im FITC-charakteristischen Spektrum. Im Laufe des weiteren Zelltodprozesses wird die Zellmembran auch für PI durchlässig. Somit strahlen die Zellen bei Anregung durch Licht der Wellenlänge $\lambda = 488 \text{ nm}$ zusätzlich in einem Bereich zwischen 562 nm und 588 nm . Diese charakteristische Kinetik kann mit Hilfe der FACS-Analyse nachvollzogen werden.

Ac-IETD-CHO Caspase-Inhibitor

Biomol, Hamburg, Deutschland

Annexin V Binding-Buffer

BD, Heidelberg, Deutschland

Annexin V-FITC

BD, Heidelberg, Deutschland

Dulbecco's PBS (1x)

PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D

Maus-Serum Black6	Eigene Gewinnung
Propidium Jodid Staining-Solution	BD, Heidelberg, Deutschland
Ratten-Serum	Eigene Gewinnung

Zunächst wurden die Zellen nach 18-stündiger Stimulation vorsichtig im Medium von den Platten abgeschabt und anschließend in ein Röhrchen pipettiert. Nach 3-minütiger Zentrifugation bei 12 000 Umdrehungen/Minute wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet mit jeweils 120 µl PBS resuspendiert. In Eppendorfgefäße wurden jeweils 5 µl Mäuse- und Ratten-Serum sowie 100 µl der Zellsuspension gegeben und 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit je 5 µl Annexin und 5 µl Propidium Jodid gefärbt und für 30 Minuten im Dunkeln auf Eis inkubiert. Die Mediumkontrolle wurde zusätzlich entweder nur mit Annexin oder nur mit Propidium Jodid gefärbt. Nach der Inkubation erfolgte die Zentrifugation mit 2 000 Umdrehungen/Minute für 2 Minuten, dann wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert und das Pellet mit 200 µl PBS resuspendiert. Dieser Schritt wurde wiederholt und anschließend wurde nochmals zentrifugiert, abpipettiert und mit 400 µl Bindepuffer resuspendiert. Diese Suspension wurde in FACS-Röhrchen gegeben und auf Eis im Dunkeln aufbewahrt bis die Durchflusszytometrie statt fand. Die FACS-Analyse wurde mittels eines FACScalibur-Gerätes und der CellQuest Software von BD Pharming durchgeführt.

2.10 Tierexperimentelle Methoden

2.10.1 Tierhaltung

Für die Serumnephritis-Studie wurden männliche C57BL/6 Mäuse (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland) verwendet. Für die Isolation der Mesangialzellen Wildtyp bzw. *Trif*-mutante C57BL/6 Mäuse (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) oder *Ifn*-alpha/beta-Rezeptor-defiziente 129Sv/Ev Mäuse (B&K Universal Group Limited, North Humberside HU11 4QE, Großbritannien). Je maximal 5 Tiere wurden in autoklavierten Macrolone Typ III-Käfigen mit Filterdeckel bei einem 12-stündigen Hell-Dunkel-Rhythmus und freiem Zugang zu Wasser und Futter gehalten. Das Futter und Wasser sowie Stroh und Watte wurden durch Autoklavieren sterilisiert.

Alle experimentellen Verfahren wurden nach den Vorschriften des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt und waren durch die Regierung von Oberbayern genehmigt.

2.10.2 Herstellung der *Trif*-mutanten Mäuse

Die *Trif*-mutanten Mäuse (mit C57BL/6-Hintergrund) wurden in den Laboratorien von Bruce Beutler (La Jolla, San Diego, USA) mittels Keimbahnmutationen hergestellt. Zunächst wurden hierfür

zufällige Keimbahnmutationen mit dem alkylierenden Agens N-Ethyl-N-Nitrosurea (ENU) induziert. Die entstandene Mutation wurde LPS 2 genannt. Anschließend wurden ca. 2 500 Tiere der F 1-Generation (heterozygot) und ca. 4 500 Tiere der F 3-Generation (homozygot) auf neue Immunphänotypen untersucht. Dazu wurden Peritoneal-Makrophagen gewonnen, mit verschiedenen Tlr-Liganden stimuliert und die Immunantwort (Tnf-Produktion, Interleukinproduktion, Zytotoxizität) untersucht. Unter diesen Tieren war eine Maus mit starker Resistenz gegen Lipid A und LPS. Diese wurde durch Inzucht weiter gezüchtet, um einen homozygoten Mutantenbestand zu erzeugen. Um die Identität der Mutationen aufzudecken, wurden eine Genkartierung und eine Sequenzierung durchgeführt. LPS 2 wurde durch Kreuzen Homozygoter mit C3H/HeN-Mäusen und Rückkreuzung der Nachkommen mit Mäusen des Mutantenbestandes meiotisch kartiert. Unter Zuhilfenahme von 59 Mikrosatellitenmarkern konnte LPS 2 zunächst auf eine Region des Chromosoms 17 begrenzt werden und schließlich, nach 1 567 Meiosen, auf einen von den Mikrosatellitenmarkern D17Mit87 und D17Mit20 begrenzten Bezirk. In diesem Bezirk wurden 11 zusätzliche Mikrosatelliten-Längenpolymorphismen identifiziert. Es wurden außerdem sieben *cross overs* zwischen D17Mit87 und D17Mit20 beobachtet. Die Länge dieser gerade beschriebenen kritischen Region betrug 216 Kilobasen. Sie wurde in 63 überlappenden 4-kb-Fragmenten mit Hilfe einer Vorlage aus LPS 2-Homozygoten und normalen Black6-Mäusen vervielfacht und in ihrer Gesamtheit mit 865 Primern sequenziert. Es zeigte sich, dass in dieser gesamten kritischen Region des LPS 2-Stammes nur eine einzige Mutation vorhanden war. Dieser Bereich kodiert für das Protein Trif. In *Trif*-Homozygoten (*Triflps2/lps2*) ist das Trif-Protein durch eine Basenpaardeletion verändert, die dazu führt, dass 24 Aminosäuren vom C-Ende des Proteins entfernt und durch eine Sequenz aus 11 Aminosäuren ersetzt werden [87].

Die *Trif*-Homozygoten wurden rückgekreuzt, so dass die Mesangialzellen schließlich aus Tieren der Generation F 10 gewonnen werden konnten (siehe 2.1).

2.10.3 Genotypisierung der Mäuse

10 x HotStar PCR-Puffer	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
25 mM dNTP-Mix	GE Healthcare, Little Chalfont, UK
Agarosepulver	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Borsäure	Fluka, Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, Deutschland
EDTA	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Gelatine	Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Glycerin	Roth, Karlsruhe, Deutschland

KCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
HotStar Polymerase	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Isopropanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
MgCl ₂	Merck, Darmstadt, Deutschland
NP40	Fluka, Sigma, Deisenhofen, D
Proteinase K	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tris	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tween 20	Fluka, Sigma, Deisenhofen, D
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland

<i>Agarose-Gel:</i>	2 g Agarose in 100 ml 1 x TBE plus 4 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml); aufkochen
<i>10 x Ladepuffer:</i>	25 ml 50 % Glycerin, 0,125 g 0,25 % Bromphenolblau, 0,125 g 0,25 % Xylencyanol, 10 ml 100mM EDTA, 15 ml Wasser
<i>10 x TBE-Puffer:</i>	108 g Tris, 55 g Borsäure, 5,84 g EDTA, auf 1 l Wasser auffüllen
<i>PBND-Puffer:</i>	2,5 ml 2M KCl, 1 ml 1M Tris-HCl, 0,25 ml 1M MgCl ₂ , 10 ml 0,1 % Gelatine, 0,45 ml 100 % NP40, 0,45 ml 100 % Tween 20; auf 100 ml Wasser auffüllen

Da die *Triflps2/lps2*-Mäuse keine *knock out*-Tiere sind, sondern durch eine *frameshift*-Mutation entstanden sind (ein G fehlt), müssen sie via Sequenzierung genotypisiert werden. Sowohl als Sequenzierungs- als auch Typisierungsprimer wurden folgende Primer verwendet: *Forward*-Primer: 5' ACAGTCCCAATCCTTTCCATCAGC 3', *Reverse*-Primer: 5' AGGATTCAGATTGGAGTCCCA CAGTC 3'.

Um die DNA zu amplifizieren wurde zunächst eine PCR durchgeführt. Dafür wurden kleine Stückchen der Schwanzspitzen mit 200 µl PBND-Puffer und 1 µl Proteinase K für 4 h bei 56 °C angedaut, abzentrifugiert und der Überstand (mit der DNA) für die nachfolgende PCR verwendet. Für die PCR wurden dann folgende Reagenzien verwendet: 1 µl DNA, 2,5 µl PCR-Puffer, 2 µl dNTPs, 1 µl des oben genannten *Forward*-Primers (10 pM) und 1 µl des *Reverse*-Primers (10 pM) sowie 0,5 µl Polymerase und 16,5 µl Wasser. Die PCR lief im Thermocycler ab. Zunächst fand ein 5-minütiger Inkubationsschritt bei 94 °C statt, dann begann der eigentlich Zyklus mit 30 Sekunden bei 94 °C, 90 Sekunden bei 61 °C und 90 Sekunden Inkubation bei 72 °C. Dieser Zyklus wurde 35-mal wiederholt und das Programm endete mit einer 10-minütigen Inkubation bei 72 °C.

Anschließend wurde eine Elektrophorese durchgeführt, um die Proben aufzutrennen. Hierfür wurden diese zunächst mit einem Sechstel des 10-fachen DNA-Ladepuffers gemischt und auf das Agarosegel aufgetragen, das sich in TBE-Puffer befand. Es wurde Strom angelegt und die Fragmente anhand ihrer

Größe aufgetrennt. Unter UV-Licht konnten die Banden durch das Ethidiumbromid sichtbar gemacht werden. Die entstandene Bande wurde unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten. Mit Hilfe des Gel-Extraktions-Kit wurde aus der Bande die DNA isoliert. Hierfür wurde die Bande zunächst so klein wie möglich ausgeschnitten und gewogen. Dann wurde die dreifache Menge des Gelgewichts an Puffer QG (Löslichmach-Puffer) hinzugegeben. Nach 10 Minuten Inkubation bei 50 °C wurde die einfache Menge Isopropanol zu den Proben gegeben. Die Probe wurde in eine Säule gegeben und für eine Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und es wurden 0,5 ml des QG-Puffers auf die Säule gegeben und wiederum für 1 Minute zentrifugiert. Anschließend wurden 0,75 ml des PE-Puffers (Waschpuffer) auf die Säule gegeben und zentrifugiert. Schließlich wurde die Säule bei 13 000 rpm für eine Minute trocken zentrifugiert, die Säulen in neue Eppendorfgefäße umgesetzt und die DNA mit 50 µl EB-Puffer (Auswaschpuffer) durch Zentrifugation von der Säule in das Gefäß gebracht. Anschließend konnte die DNA zur Sequenzierung zu Medigenomix (Martinsried) geschickt werden. Bei der Sequenzierung zeigte sich, dass in den mutierten Mäusen ein G in der *Trif*-Region fehlte.

2.10.4 Serumnephritis-Studie

Freund's Adjuvans (Complete)	Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Dotap	Roche-Diagnostics, Mannheim, D
Hepes	Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
NaCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
Poly I:C	Invivogen, Toulouse, Frankreich
Rabbit IgG	Jackson Immuno., West Grove, Pa, USA
Nephrotoxisches Serum VV-NTS III	Eigene Herstellung

HBS (HEPES-buffered saline): 20 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,4; 876 mg NaCl in 90 ml Wasser
+ 2 ml 1 M HEPES, auf 100 ml auffüllen

Studiendesign

Bei dieser Studie ging es darum, die Auswirkungen der poly I:C-RNA-Applikation im Modell der nephrotoxischen Serumnephritis zu untersuchen.

Bei der nephrotoxischen Serumnephritis handelt es sich um das Modell einer Immunkomplex-Glomerulonephritis, die durch Anti-GBM (glomeruläre Basalmembran)-Antikörper induziert wird. In diesem Modell führt die Injektion einer subnephritischen Dosis Anti-GBM-Antikörper zu glomerulärem Schaden und zwar dadurch, dass die injizierten Antikörper an die Basalmembran binden und eine Immunantwort auslösen. Diese frühe Reaktion ist gefolgt von einer dosisabhängigen

Proteinurie. Nach fünf bis sieben Tagen entwickelt sich die zweite Phase. In dieser binden autologe Antikörper an heterologe Immunglobuline, die bereits an der Basalmembran abgelagert sind. Es kommt zur nachfolgenden Aktivierung von Komplement, der Ablagerung von Fibrin, der Akkumulation polymorphkerniger Granulozyten und der Nekrose glomerulärer Kapillaren [88].

Im Alter von 8 Wochen wurden die Mäuse in vier Gruppen eingeteilt:

- Gruppe 1 (n = 5): HBS-Kontrollgruppe; diese Tiere bekamen 3-mal pro Woche 200 µl des Vehikels HBS intraperitoneal injiziert.
- Gruppe 2 (n = 4): Dotap-Kontrollgruppe; diese Tiere bekamen 3-mal pro Woche je 50 µl Dotap in 150 µl HBS intraperitoneal injiziert.
- Gruppe 3 (n = 5): poly I:C-Gruppe; diesen Tieren wurden 3-mal pro Woche je 50 µl poly I:C-RNA in 150 µl HBS injiziert.
- Gruppe 4 (n = 5): poly I:C + Dotap-Gruppe; Zunächst wurden je Tier in ein Eppendorfgefäß 50 µl poly I:C-RNA zu 50 µl HBS gegeben und in ein anderes Eppendorfgefäß 50 µl Dotap ebenfalls zu 50 µl HBS. Dann wurde der Inhalt des ersten Gefäßes zum Zweiten gegeben und vorsichtig vermischt. Das Ganze wurde für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend intraperitoneal injiziert. Dies erfolgte ebenfalls 3-mal pro Woche.

Alle Injektionslösungen wurden unter sterilen Bedingungen zubereitet und unter dem Abzug injiziert. Zu Beginn wurde in C57BL/6 Wildtyp-Mäusen die oben beschriebene nephrotoxische Serumnephritis induziert. Hierfür fand an Tag -3 die Vorimmunisierung statt. Dazu wurden 2 ml Rabbit IgG (0,2 mg/ml) mit 2 ml Complete Freund's Adjuvans gemischt und mittels *Sonicater* eine dicke Emulsion zubereitet. Jeweils 100 µl dieser Emulsion wurden subkutan in beide Flanken der Mäuse injiziert. An Tag 0 wurden allen Mäusen 50 µl des nephrotoxischen Serums VV-NTS III in die Schwanzvene injiziert. Dieses wurde durch Immunisierung von Hasen mit einer Suspension aus der glomerulären Basalmembran von Mäusenieren hergestellt [88, 89].

Die poly I:C-RNA-Injektionen erfolgten anschließend an Tag 0, 2, 4, 7 und 9 intraperitoneal. Eine Urinabnahme erfolgte an Tag 0, 7 und 10. Die Blut- und Gewebsentnahme an Tag 10.

Blutentnahme

EDTA (Versen)

Biochrom KG, Berlin, Deutschland

Die Blutentnahme vor der Tötung erfolgte in Allgemeinnarkose. Das Vollblut wurde in ein Eppendorfgefäß mit 20 µl EDTA gegeben. Davon wurde das Serum durch Zentrifugieren mit 8 000 Umdrehungen/Minute für 5 Minuten gewonnen und bei -20 °C gelagert.

Nierenentnahme

Formaldehydlösung 37 %	Merck, Darmstadt, Deutschland
RNA-later	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland

Nach 10 Tagen wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet und die Nieren nach medianer Laparotomie entnommen. Die Nieren wurden nacheinander dargestellt, mobilisiert und vom Gefäßstumpf abgesetzt. Der mittlere Teil wurde zur histologischen Untersuchung abgeschnitten und für 24 Stunden in 10%ige Formalinlösung eingelegt. Die Nierenpole wurden zur RNA-Isolation in 500 µl RNAlater bei -20 °C aufbewahrt und zur Anfertigung von Gefrierschnitten in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

Albumin-ELISA

Mouse Albumin-ELISA Quantification Kit	Behyl Laboratories, Montgomery, TX, US
--	--

Enthält: *Bindeantikörper*: Goat Anti-Mouse Albumin-Affinity Purified; *Kalibrator*: Mäuse-Referenz-Serum; *HRP-Detektions-Antikörper*: Goat Anti-Mouse Albumin-HRP-Conjugate

Bovines Serum-Albumin (BSA)	Roche, Mannheim, Deutschland
Fötales bovines Serum (FBS Superior)	Biochrom KG, Berlin, Deutschland
NaCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumbicarbonat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tris	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tween 20	Fluka, Sigma Aldrich, Deisenhofen, D

Substratlösung: Tetramethylbenzidin und Hydrogen Peroxid im Verhältnis 1: 1 (BD Pharming™ TMB Substrate, Heidelberg, Deutschland); Stopplösung (2 N H₂SO₄)

Beschichtungspuffer: 5,3 g Natriumcarbonat; 4,2 g Natriumbicarbonat; 1000 ml deionisiertes Wasser; auf pH 9,6 einstellen

Puffergrundsubstanz: 6,057 g Tris; 8,1816 g NaCl; 1000 ml deionisiertes Wasser; auf pH 8,0 einstellen

Blockierlösung: 200 ml Puffergrundsubstanz; 2 ml BSA (2 g Feststoff); auf pH einstellen

Probenverdünner: 100 ml Blockierlösung; 50 µl Tween 20

Waschlösung: 800 ml Puffergrundsubstanz; 400 µl Tween 20; auf pH 8 einstellen

Am Vortag wurde die Platte mit 100 µl in Beschichtungspuffer 1: 10 verdünntem Bindeantikörper beschichtet und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Dann wurde die Platte mit 300 µl Waschlösung dreimal gewaschen und mit 100 µl/well Blockierlösung geblockt. Nach 60 Minuten wurde wiederum dreimal gewaschen. Anschließend wurden je 100 µl des Kalibrators (Verdünnungsreihe von 7,8 ng/ml bis 500 ng/ml), der in Probenverdünner 10^3 - 10^6 verdünnten Proben bzw. des Probenverdünners als Leerwert aufgetragen und für 60 Minuten inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen wurde der HRP-Detektions-Antikörper 1: 50 000 in Probenverdünner verdünnt und 100 µl in jedes well gegeben. Die Platte wurde wiederum für 60 Minuten inkubiert und fünfmal gewaschen. Anschließend wurden 100 µl der Substratlösung aufgetragen und solange inkubiert, bis der am stärksten verdünnte Standard eine leichte Blaufärbung annahm (10 bis 30 Minuten). Dann wurde die Reaktion mit Stopplösung gestoppt und die Absorption bei 450 nm mittels ELISA-Lesegerät gemessen. Mit Hilfe der Standardkurve konnte der Albumingehalt in ng/ml bestimmt werden. Dieser musste dann noch in die gewünschte Einheit mg/dl unter Berücksichtigung der Verdünnung umgerechnet werden.

Wir führten den Albumin-ELISA durch, um die Albuminmenge im Urin der jeweiligen Mäusegruppen zu quantifizieren und darüber Schlüsse der glomerulären Schädigung ziehen zu können. Da die einmalig bestimmte Albuminmenge im Urin abhängig von der Konzentrierung des Urins ist, wird die Proteinurie unter Zuhilfenahme des Albumin-Kreatinin-Quotienten bestimmt.

Kreatininmessung

Creatinin FS

DiaSys, Holzheim, Deutschland

Enthält: *Reagenz 1* (Natriumhydroxid 0,16 mol/l), *Reagenz 2* (Pikrinsäure 4,0 mmol/l), *Standard* (2 mg/dl)

Kreatinin ist ein Abfallprodukt, das von den Nieren hauptsächlich durch glomeruläre Filtration und, zu einem geringen Teil, durch tubuläre Sekretion ausgeschieden wird. Die Konzentration von Kreatinin im Plasma von Gesunden ist annähernd konstant. Daher deuten erhöhte Kreatininwerte im Plasma auf eine verringerte Ausscheidung, d.h. auf eine eingeschränkte sekretorische Nierenfunktion hin.

Die Kreatininmessung im Urin wird hier mittels kinetischen Tests nach der Jaffé-Methode durchgeführt. Diese beruht auf dem Prinzip, dass Kreatinin in alkalischer Lösung mit Pikrinsäure einen orangeroten Farbkomplex bildet, dessen Extinktionsdifferenz zu festgelegten Zeiten proportional zur Kreatininkonzentration ist (Datenblatt).

Zunächst wurde der Urin 1: 10 mit destilliertem Wasser verdünnt, das Plasma wurde nicht verdünnt; außerdem wurden vier Teile des Reagenz 1 mit einem Teil des Reagenz 2 gemischt. Dies ergab das Gebrauchsreagenz. Für die Messung wurden zunächst 50 µl der verdünnten Proben bzw. des

Standards bzw. destillierten Wassers (als Reagenzienleerwert) in eine Küvette gegeben. Dazu wurden dann 1000 µl des Gebrauchsreagenz hinzugefügt, vermischt, in das Photometer gestellt und die Extinktion E 1 nach einer Minute abgelesen. Nach weiteren zwei Minuten wurde die Extinktion E 2 abgelesen.

Die Kreatininkonzentration im Urin bzw. Plasma berechnet sich daraus wie folgt:

$$\Delta E = [(E2-E1) \text{ Probe oder Standard}] - [(E2-E1) \text{ Reagenzienleerwert}]$$

$$\text{Kreatinin [mg/dl]} = \Delta E \text{ Probe} / \Delta E \text{ Standard} \times \text{Konzentration Standard [mg/dl]} \quad (\times 10 \text{ bei Urin})$$

Histologische Auswertung

Ammoniumpersulfat (APES)	Bio-Rad, München, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Formaldehydlösung 37 %	Merck, Darmstadt, Deutschland
Mounting Medium Vecta Mount	Vector, Burlingame, CA, USA
PAS	Bio-Optica, Mailand, Italien
Xylol	Merck, Darmstadt, Deutschland

Vorbereitung der Paraffinschnitte:

Das entnommene Gewebe wurde in 10%igem Formalin für 24 Stunden 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 °C aufbewahrt.

Als erster Schritt bei jeder Färbung wurden die Schnitte in Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe (100 %, 96 %, 70 %, 50 %) entparaffiniert und in wässrige Lösung gebracht.

PAS-Färbung:

Schnitte mit 2 µm Dicke wurden mittels PAS (*periodic acid Schiff*)-Reagenz nach Angaben des Herstellers gefärbt. Hierfür wurden zunächst 10 Tropfen des Reagenz A (PAS-Lösung) für 10 Minuten auf die Schnitte gegeben, anschließend mit destilliertem Wasser gewaschen und 10 Tropfen des Reagenz B (Schiff-Reagenz Hotchkiss McManus) für 20 Minuten aufgetragen, wiederum gewaschen und 10 Tropfen Reagenz C (Kalium-Methabisulfit-Lösung) für 2 Minuten darauf gegeben. Dieses wurde nur abtropfen gelassen und 10 Tropfen Reagenz D (Fixierlösung) hinzugegeben. Nach 2 Minuten wurde dieses abgespült und 10 Tropfen Reagenz E (Mayer's Hemalum) für 3 Minuten darauf getropft. Zum Schluss wurde für 5 Minuten unter laufendem Wasser gewaschen, mit Ethanol dehydriert und mit Xylol und Einbettmedium aufgehellt.

Histopathologische Indizes (Fokaler Nekrose-Score):

Der fokale glomeruläre Nekrose-Score wurde in 15 kortikalen glomerulären Abschnitten semiquantitativ bestimmt und mit jeweils 0-4 Punkten bewertet. Dabei bedeutet: 0 = keine Läsionen, 1 = < 25 % Sklerose, 2 = 25-49 % Sklerose, 3 = 50-74 % Sklerose, 4 = 75-100 % Sklerose. Die Mesangiolyse wurde in Prozent der betroffenen Glomeruli (n = 15) quantifiziert. Es wurde jeweils bei einer Vergrößerung von 100 und 400 mikroskopiert.

2.11 Experimente mit menschlichem Biopsiematerial

Für diese Versuche wurden menschliche Nierenbiopsien der europäischen Nieren-cDNA-Bank Kroener-Fresenius-Biopsiebank (ERCB-KFB) verwendet. Dies ist eine europaweite cDNA-Bank, die mit Einverständnis der Patienten und nach Richtlinien der lokalen Ethikkommission cDNA von Nierenbiopsien zu Forschungszwecken enthält. Die Nierenbiopsien wurden hierfür von Hand unter einem Stereomikroskop mit Hilfe von zwei Dissektions-Nadelhaltern in PBS mikrodissoziiert. Aus diesen mikrodissoziierten Stücken wurde RNA mittels Silikongel-Säulen isoliert und in 30 µl RNase freiem Wasser verdünnt. 2 µl dieser Lösung wurden mit Hilfe des RNA 6000 LabChip auf einem 2 100 Bioanalytiker untersucht. Dieses System trennt Gesamt-RNA elektrophoretisch durch ein mikro-fluides System. Die hohe Qualität der RNA wurde durch umschriebene Ribosomen-Peaks im Elektrophorese-*Read out* bestätigt, wobei es keine zusätzlichen Signale unter den ribosomalen Banden und keinen *Shift* zu kürzeren Fragmenten gab. [90]. Anschließend erfolgten das Umschreiben der RNA in cDNA und die RT-PCR wie oben beschrieben (siehe 2.5). In diesem Versuch wurden glomeruläre und tubulointestinale Kompartimente von Hepatitis C-negativen (n = 7) sowie Hepatitis C-positiven Patienten (n = 8) mit membranoproliferativer Glomerulonephritis analysiert. Biopsien von Lebendspendern ohne histopathologische Veränderungen dienten als Negativkontrolle (n = 12).

2.12 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm *standard error of the mean* (SEM) dargestellt. Die Gruppen wurden mittels Student's t-test verglichen. Der Vergleich mehrerer Gruppen erfolgte mittels ANOVA-Test mit *post hoc* Bonferronikorrektur. Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen. Die Fehlerindikatoren repräsentieren den *standard error of the mean* (SEM).

Kapitel 3:

Ergebnisse

3 Ergebnisse

3.1 Immunzytochemische Charakterisierung der Mesangialzellen

Da bei der Isolation der Nierenglomeruli aus den Mäusenieren auch andere Zellen aus den Glomeruli bzw. Tubulifragmenten auswachsen können, wurden die Zellen nach der fünften Passage durch immunhistochemische Färbung charakterisiert. Mesangialzellen besitzen im Gegensatz zu Fibroblasten, Podozyten, Endothel- und Epithelzellen nur *smooth muscle actin* (SMA) und kein Zytokeratin. Tubuluszellen hingegen besitzen nur Zytokeratin und kein *smooth muscle actin*.

Bei dieser Charakterisierung zeigte sich nach Färbung mit *smooth muscle actin* ein grünes Signal, während es nicht zu einem Signal nach Färbung mit Zytokeratin kam. Dies spricht dafür, dass es sich bei den isolierten Zellen tatsächlich um Mesangialzellen handelte.

3.2 Toll-like Rezeptor-Expression auf Mesangialzellen

Der endosomale Toll-like Rezeptor (Tlr)-3 erkennt virale Doppelstrang-RNA, während der Toll-like Rezeptor-7 virale Einzelstrang-RNA bindet [91]. Um festzustellen, ob diese Toll-like Rezeptoren auch in Mesangialzellen exprimiert sind, wurden primäre Mesangialzellen nach einer 24-stündigen Hungerzeit für 3 Stunden mit poly I:C-RNA, einem Liganden für Tlr-3, stimuliert und anschließend die *real time* RT-PCR für Tlr-3 und Tlr-7 durchgeführt (Abbildung 26). Es zeigte sich, dass der TLR-3 basal exprimiert und nach Stimulation hochreguliert wird; der Tlr-7 wird, wie erwartet, durch die Doppelstrang-RNA nicht hochreguliert, ist aber basal ebenfalls nicht vorhanden.

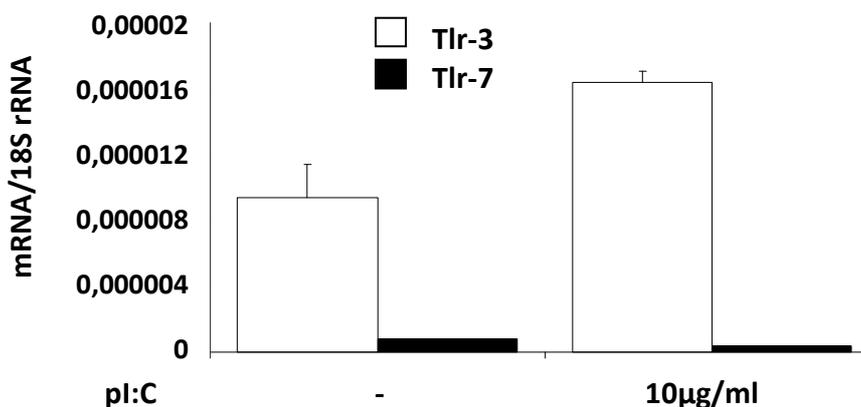


Abbildung 26: Mesangialzellen exprimieren basal den Tlr-3, nicht aber den Tlr-7. Die primären murinen Mesangialzellen hungerten für 24 Stunden, dann erfolgte die Stimulation mit 10 µg/ml poly I:C (synthetische Doppelstrang-RNA, pl:C.) Nach dreistündiger Inkubation wurde die *real time* RT-PCR für Tlr-3 und -7 durchgeführt.

Im nächsten Versuch wurden die Zellen mit Imiquimod, einem Liganden für den Tlr-7, stimuliert und der Interleukin-6-Gehalt mittels ELISA bestimmt (Abbildung 27). Hierbei zeigte sich, dass die Zellen nicht auf die Stimulation mit Imiquimod reagierten und die Interleukinproduktion ausblieb, was darauf schließen lässt, dass der Tlr-7 in Mesangialzellen nicht vorhanden ist. Um die Reaktion der Mesangialzellen auf virale RNA zu zeigen, verwendeten wir deshalb für unsere weiteren Versuche ausschließlich die synthetische Doppelstrang-RNA poly I:C als Liganden.

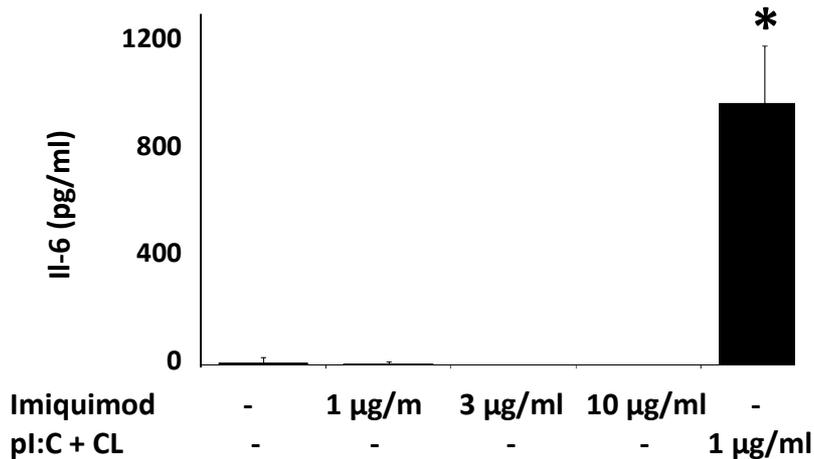


Abbildung 27: Mesangialzellen reagieren nicht auf Stimulation mit Tlr-7-Liganden. Primäre Mesangialzellen wurden mit steigenden Dosen Imiquimod stimuliert und für 24 Stunden inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung des Interleukin-6-Gehaltes mittels ELISA. Als Positivkontrolle dienten mit poly I:C-RNA und Lipofectamin stimulierte Zellen. * $p < 0.05$ vs. Medium

3.3 Mesangialzellen exprimieren die zytosolischen viralen RNA Rezeptoren Mda5, Rig-I und deren mitochondrialen Adaptor Ips-1

Neben der Erkennung über die endosomalen Toll-like Rezeptoren kann virale Doppelstrang-RNA auch Toll-like Rezeptor-3-unabhängig über zytosolische RNA-Erkennungsrezeptoren erkannt werden [91-93]. Mda5 und Rig-I sind als solche zytosolischen Rezeptoren in dendritischen Zellen beschrieben [92, 93]. Ebenso ihr mitochondriales Adaptormolekül Ips-1. In Mesangialzellen wurde die Expression solcher zytosolischer Rezeptoren bislang noch nicht untersucht. Wir prüften zunächst auf RNA-Ebene, ob diese Rezeptoren in Mesangialzellen ebenfalls vorhanden sind. Hierfür stimulierten wir primäre Mesangialzellen mit poly I:C-RNA und poly I:C-RNA komplexiert mit kationischen Lipiden. Die kationischen Lipide führen dazu, dass die RNA ins Zytosol gelangt und dort über zytosolische Rezeptoren erkannt werden kann. Im Anschluss wurde der mRNA-Gehalt an Mda5, Rig-I und Ips-1 mittels *real time* RT-PCR bestimmt (Abbildung 28).

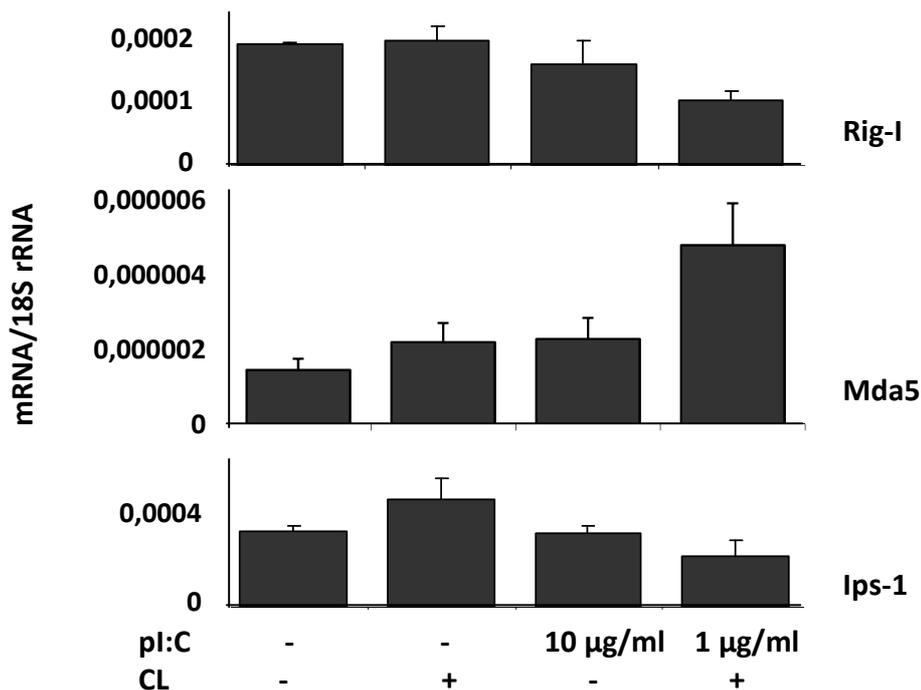


Abbildung 28: Mesangialzellen exprimieren *Rig-I*, *Mda5* und *Ips-1*. Nach einer 24-stündigen Hungerzeit wurden die Zellen für 3 Stunden mit 10 µg/ml poly I:C-RNA bzw. 1 µg/ml poly I:C-RNA, die mit Lipofectamin komplexiert wurde, stimuliert. Als Negativkontrolle dienten Medium und Lipofectamin alleine. Anschließend wurden die Zellen geerntet, die RNA isoliert und der Gehalt an *Rig-I*, *Mda5* und *Ips-1* bestimmt.

Es zeigte sich, dass die beiden zytosolischen RNA-Rezeptoren, sowie ihr Adaptormolekül in basalem Zustand vorhanden sind und dass *Mda5* nach Stimulation mit viraler RNA hoch reguliert wurde. Dahingegen ging die Expression von *Rig-I* und *Ips-1* unter den gleichen Bedingungen eher zurück.

Um die Ergebnisse auf Proteinebene zu bestätigen, führten wir einen Western Blot für diese Faktoren durch. Dazu wurden die Zellen zunächst mit Zytokinen ($Tnf-\alpha$ und $Ifn-\gamma$) für 24 Stunden vorstimuliert und im Anschluss daran mit poly I:C-RNA, die mit kationischen Lipiden komplexiert war, für die angegebenen Zeiten stimuliert. Auch hier zeigte sich, dass alle Faktoren in basalem Zustand vorhanden sind und dass *Mda5* im Gegensatz zu *Rig-I* und *Ips-1* nach Stimulation hoch reguliert wurde (Abbildung 29). Diese Ergebnisse zeigen, dass Mesangialzellen sowohl die zytosolischen Rezeptoren *Rig-I* und *Mda5* als auch deren mitochondriales Adaptormolekül *Ips-1* exprimieren und dass proinflammatorische Zytokine, wie $Tnf-\alpha$ und $Ifn-\gamma$ die Expression von *Mda5* und *Rig-I* induzieren. Dies könnte daraufhin deuten, dass die Erkennung viraler RNA in inflammatorischem Milieu verstärkt ist.

Um die virale RNA ins Zytosol zu bringen und die zytosolischen Rezeptoren zu aktivieren, verwendeten wir in den weiteren Versuchen die synthetische Doppelstrang-RNA poly I:C, komplexiert mit dem kationischen Lipid Lipofectamin.

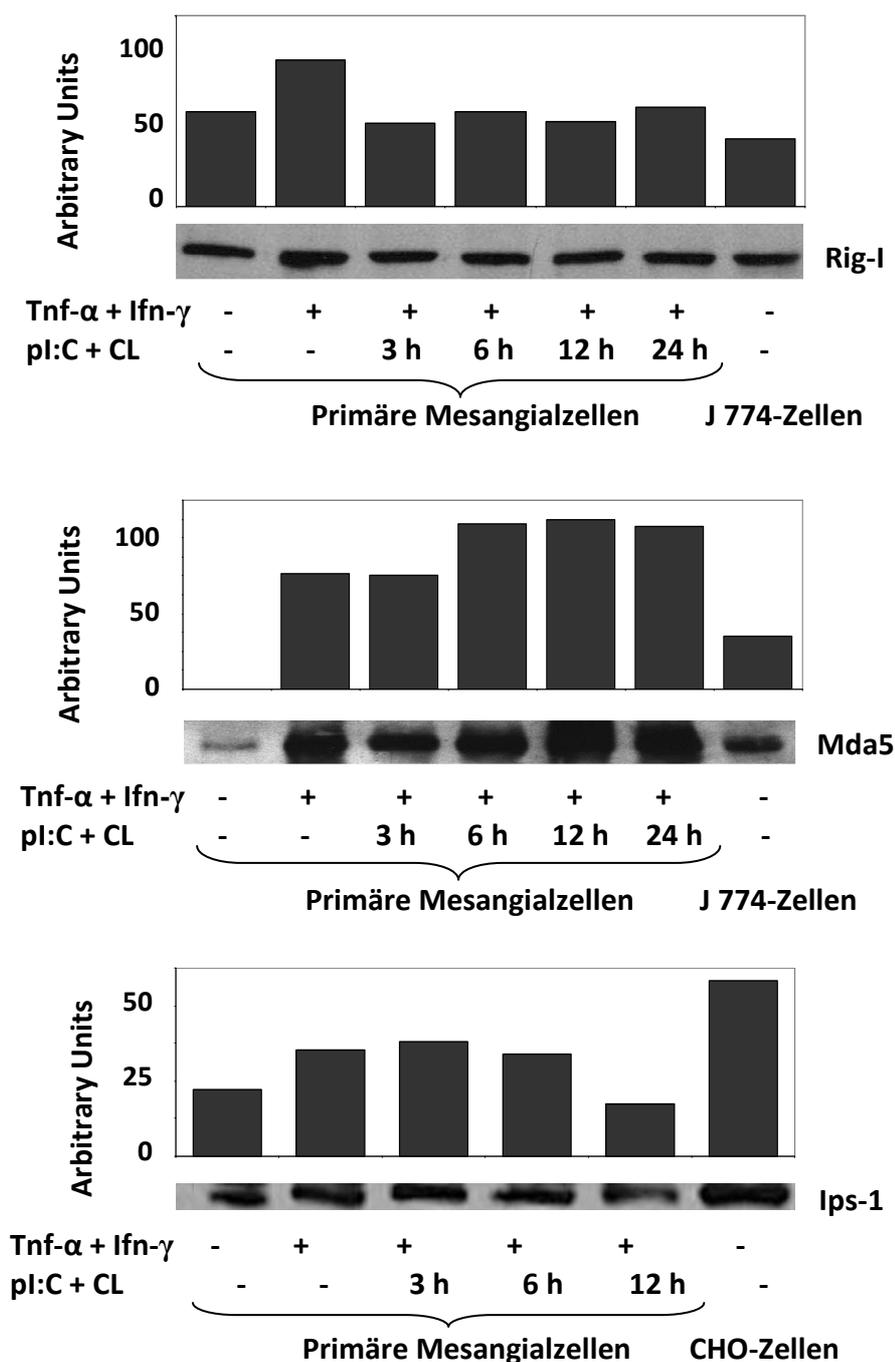


Abbildung 29: Mesangialzellen exprimieren Rig-I, Mda5 und deren mitochondrialen Adaptor Ips-1. Primäre murine Mesangialzellen wurden mit Zytokinen (Tnf- α 500U/ml und Ifn- γ 200U/ml) für 6 Stunden vorstimuliert. Anschließend erfolgte die Stimulation mit 1 μ g/ml poly I:C (pI:C, synthetische Doppelstrang-RNA), komplexiert mit kationischen Lipiden (CL, Lipofectamine[®]). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Proteine geerntet und der Western Blot mit Rig-I (2 μ g/ml Rabbit Anti-Rig-I Polyclonal-Antibody, Unconjugated), Mda5 (1: 1000; PAB to Helicard) und Ips-1 (1: 2000; PAB to Cardiff)-Antikörpern durchgeführt. Als Kontrolle dienten J774-Makrophagen bzw. CHO-Zellen. Die Quantifizierung der Bandenintensität erfolgte digital mittels Adobe Photoshop[®]-Software. Die Daten repräsentieren den Prozentanteil des positiven Signals in den betreffenden identisch großen Regionen bei einer Grenze von 30 % für alle Banden.

3.4 Virale RNA induziert die Produktion von Interleukin-6 in glomerulären Mesangialzellen

Etablierte murine und humane Mesangialzell-Zelllinien exprimieren den Toll-like Rezeptor-3 und produzieren Interleukin-6 nach Stimulation mit poly I:C-RNA, einer synthetischen viralen Doppelstrang-RNA [84, 85]. Um diese Beobachtung in primären murinen Mesangialzellen zu bestätigen, isolierten wir, wie im Methodenteil beschrieben, glomeruläre Mesangialzellen aus den Nieren von C57BL/6-Mäusen und stimulierten diese anschließend mit steigenden Dosen poly I:C-RNA. Im daraufhin durchgeführten ELISA zeigte sich, dass die Stimulation mit verschiedenen Dosen poly I:C-RNA, wie erwartet, dosisabhängig zur Interleukin-6-Produktion in diesen Zellen führt (Abbildung 30).

Um diese Beobachtung auf mRNA-Ebene zu überprüfen, stimulierten wir die Zellen wiederum mit steigenden Dosen poly I:C-RNA und führten anschließend zu drei verschiedenen Zeitpunkten eine *real time* RT-PCR für Interleukin-6 durch. Hierbei zeigte sich, dass die Interleukin-6-mRNA-Expression in diesen Zellen zeit- und dosisabhängig verläuft und ihr Maximum nach einer dreistündigen Inkubation und bei einer Dosis von 3 µg/ml poly I:C-RNA (Abbildung 31). Wir haben bereits gezeigt, dass primäre murine Mesangialzellen den Toll-like Rezeptor-3 exprimieren (Abbildung 26). In diesen Versuchen konnten wir jetzt zeigen, dass diese primären Zellen, ebenso wie die Mesangialzell-Zelllinien, virale RNA über den Toll-like Rezeptor-3 erkennen und daraufhin zur Interleukin-6-Produktion fähig sind. Die Interleukinproduktion zeigt eine zeit- und dosisabhängige Verlaufskurve.

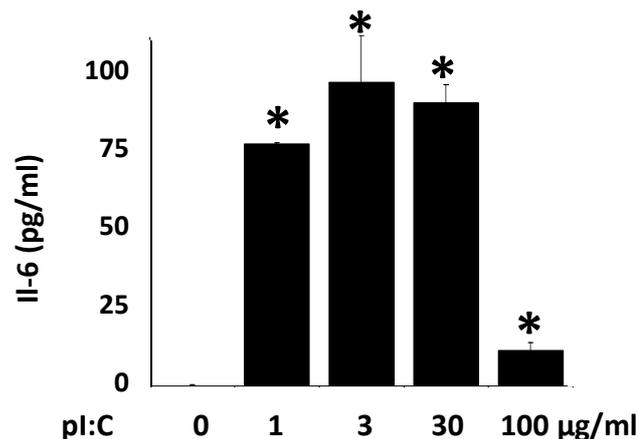


Abbildung 30: Mesangialzellen produzieren Interleukin-6 nach Exposition auf poly I:C-RNA. Die Mesangialzellen wurden nach einer 24-stündigen Hungerzeit mit steigenden Dosen poly I:C-RNA für 24 Stunden stimuliert. Anschließend wurde der Interleukin-6-Gehalt mittels ELISA bestimmt. Die Daten sind Mittelwerte \pm SEM von zwei unabhängigen Experimenten, die in Duplikaten analysiert wurden. * $p < 0.05$ vs. Medium.

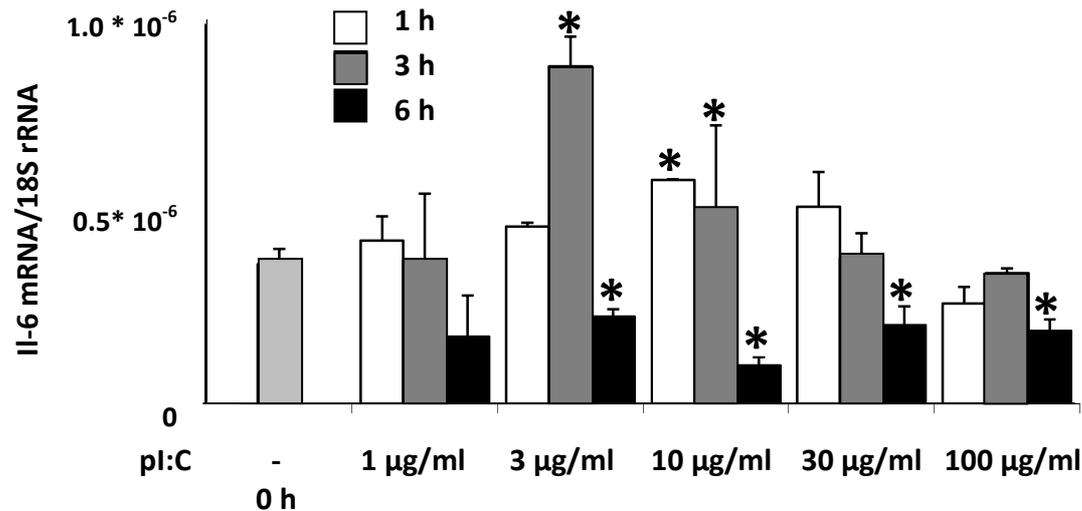


Abbildung 31: Das Maximum der Interleukin-6-mRNA-Expression ist nach drei Stunden und bei einer poly I:C-RNA-Dosis von 3 µg/ml erreicht. Nachdem die primären murinen Mesangialzellen 24 Stunden gehungert hatten, wurden sie für eine, drei bzw. sechs Stunden mit steigenden Dosen poly I:C-RNA (in µg/ml) stimuliert. Im Anschluss daran wurde die Interleukin-6-mRNA-Expression mittels real time RT-PCR gemessen. Die Werte sind als Verhältnis von Il-6-mRNA zu 18S rRNA dargestellt. * $p < 0.05$ vs. Medium

3.5 Mesangialzellen produzieren Tlr-3/Trif-unabhängig große Mengen Interleukin-6 und Typ I-Interferone, wenn sie mit viraler RNA, die mit kationischen Lipiden komplexiert wurde, stimuliert wurden

Die Erkennung viraler RNA in dendritischen Zellen kann sowohl über einen Tlr-3/Trif-abhängigen als auch über einen Tlr-3/Trif-unabhängigen Weg erfolgen [91-94]. Um die Beteiligung des Tlr-3-abhängigen Weges bei der RNA-Erkennung in Mesangialzellen zu zeigen, verglichen wir die poly I:C-RNA-induzierte Interleukin-6-Antwort in Wildtyp- und *Trif*-mutanten murinen Mesangialzellen. Da *Trif* ein Adaptormolekül auf dem Weg des Signalings über den Toll-like Rezeptor-3 ist, kann das Signaling in den *Trif*-mutanten Zellen als Tlr-3-unabhängig angesehen werden.

Das Fehlen von *Trif* reduziert die Il-6-Produktion, verhinderte sie aber nicht vollständig (Abbildung 32-1). Das lässt darauf schließen, dass poly I:C-RNA auch nicht Tlr-3/Trif-abhängige Wege in Mesangialzellen aktiviert. In dendritischen Zellen wurde bereits gezeigt, dass der Tlr-3/Trif-unabhängige Signalweg besonders aktiviert wurde, wenn die virale RNA mit kationischen Lipiden komplexiert wurde [92]. Es wird davon ausgegangen, dass die Komplexierung der RNA mit kationischen Lipiden dazu führt, dass die RNA ins intrazelluläre Zytosol gelangt und über Rezeptoren dort erkannt werden kann. Wir fanden, dass Komplexe aus kationischen Lipiden mit sehr geringen Mengen poly I:C-RNA Mesangialzellen *Trif*-unabhängig zur Produktion großer Mengen Il-6 veranlassen (Abbildung 32-1). Bei sehr hohen Mengen poly I:C-RNA ging die Il-6-Produktion zurück. Da die RNA durch Komplexierung ins Zytosol gelangte und es *Trif*-unabhängig zur Il-6-Produktion

kam, nehmen wir an, dass dies ein Effekt war, der über die zytosolischen Rezeptoren Mda5 und Rig-I vermittelt wurde.

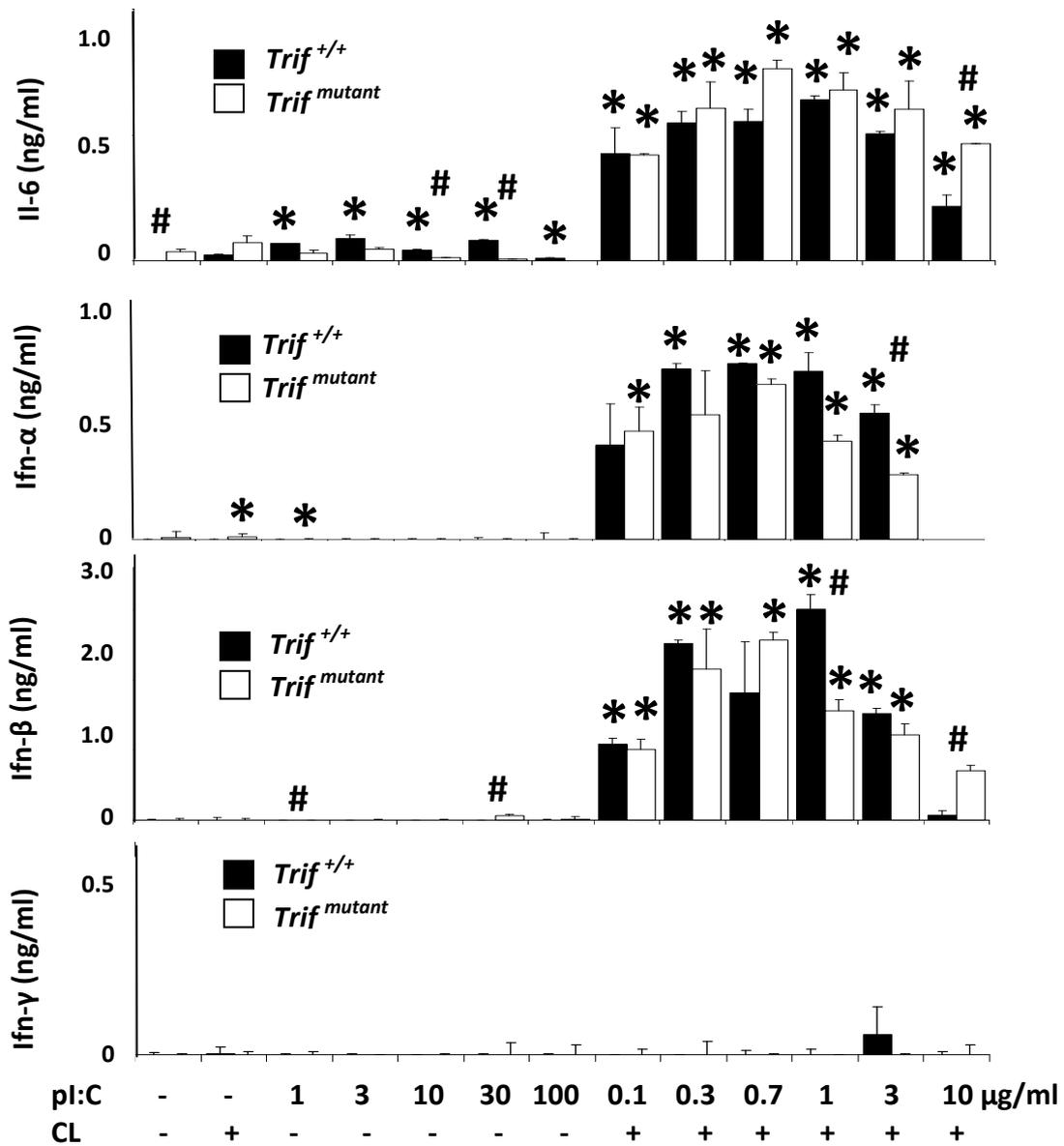


Abbildung 32-1 bis 32-4: Virale, mit kationischen Lipiden komplexierte, Doppelstrang-RNA veranlasst Mesangialzellen *Trif*-unabhängig zur Produktion großer Mengen Interleukin-6 und Typ I-Interferone. Murine Wildtyp und *Trif*-defiziente Mesangialzellen wurden nach einer 24-stündigen Hungerzeit mit der synthetischen Doppelstrang-RNA poly I:C (pI:C) in beschriebenen Konzentrationen stimuliert. Diese war, wenn angegeben, mit kationischen Lipiden (Lipofectamine[®]) komplexiert. Nach 24 Stunden Inkubation wurden die Interferon-ELISAs und der Il-6-ELISA laut Herstellerprotokoll durchgeführt. Die Daten stellen den Mittelwert ± SEM dar. * *p* < 0,05 vs. Medium (*t*-test), # *p* < 0,05 vs. Wildtyp (*t*-test).

Veranlasst die Trif-unabhängige Erkennung viraler RNA auch die Produktion von Interferonen in Mesangialzellen? Um diese Frage zu beantworten, bestimmten wir den Interferon- α -, Interferon- β - und Interferon- γ -Gehalt im Mesangialzellüberstand. Es zeigte sich, dass Komplexe aus poly I:C-RNA und kationischen Lipiden Trif-unabhängig zur Produktion hoher Mengen an Interferon- α und - β , nicht jedoch - γ führen. Die alleinige Stimulation mit poly I:C-RNA führte hingegen nicht zur Interferonproduktion (Abbildung 32-2 bis 32-4).

Diese Daten zeigen, dass Mesangialzellen Trif-unabhängig große Mengen Interleukin-6 und Typ I-Interferone produzieren können, wenn sie viraler RNA, die mit kationischen Lipiden komplexiert ist, ausgeliefert sind. Ist die virale RNA hingegen nicht mit kationischen Lipiden komplexiert, kommt es nicht zur Interferonproduktion. Die Interleukin-6-Produktion ist in diesem Fall in *Trif*-mutanten Zellen reduziert, was bedeuten könnte, dass diese RNA-Erkennung zum Teil über den Toll-like Rezeptor-Weg abläuft, aber nicht gänzlich von diesem abhängt (Abbildung 32).

3.6 Interferon- α und - β veranlassen primäre Mesangialzellen zur Interleukin-6-Produktion

Im letzten Versuch haben wir gezeigt, dass Mesangialzellen Interferone produzieren können (Abbildung 32). Um heraus zu finden, ob Mesangialzellen auch auf Stimulation mit Interferonen reagieren, wurden die primären murinen Mesangialzellen nach einer 24-stündigen Hungerzeit mit verschiedenen Dosen Interferon- α , - β und - γ stimuliert. 24 Stunden nach Stimulation wurde die Proteinkonzentration mittels Interleukin-6-ELISA bestimmt. Es zeigte sich, dass es auf Stimulation mit Typ I-Interferon dosisabhängig zur Interleukin-6-Produktion kommt, nicht jedoch nach Stimulation mit Interferon- γ (Abbildung 33).

Wir überprüften diese Ergebnisse auch auf mRNA-Ebene mittels *real time* RT-PCR. Hierbei zeigte sich jedoch, dass es nicht nur nach Stimulation mit Interferon-alpha und -beta, sondern auch nach Stimulation mit Interferon-gamma zur Interleukin-6-Produktion kommt, wenn auch in geringerem Maße (Abbildung 34).

Virale RNA kann Mesangialzellen zur Interleukinproduktion veranlassen (Abbildung 30). Was geschieht nun mit der Interleukinproduktion in durch Interferone vermitteltem entzündlichem Milieu? Verstärkt die Interferonfreisetzung die durch virale RNA ausgelöste Aktivierung von Mesangialzellen? Um diese Frage zu beantworten, wurden die Mesangialzellen mit je 1000 U/ml Interferon- α , - β und - γ für 24 Stunden vorstimuliert. Anschließend erfolgte die Stimulation mit poly I:C-RNA und nach weiteren 24 Stunden wurde der Interleukin-6-ELISA durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Interleukin-6-Produktion nach Vorstimulation mit Typ I-Interferonen stark anstieg, nicht jedoch nach Stimulation mit Interferon- γ (Abbildung 35).

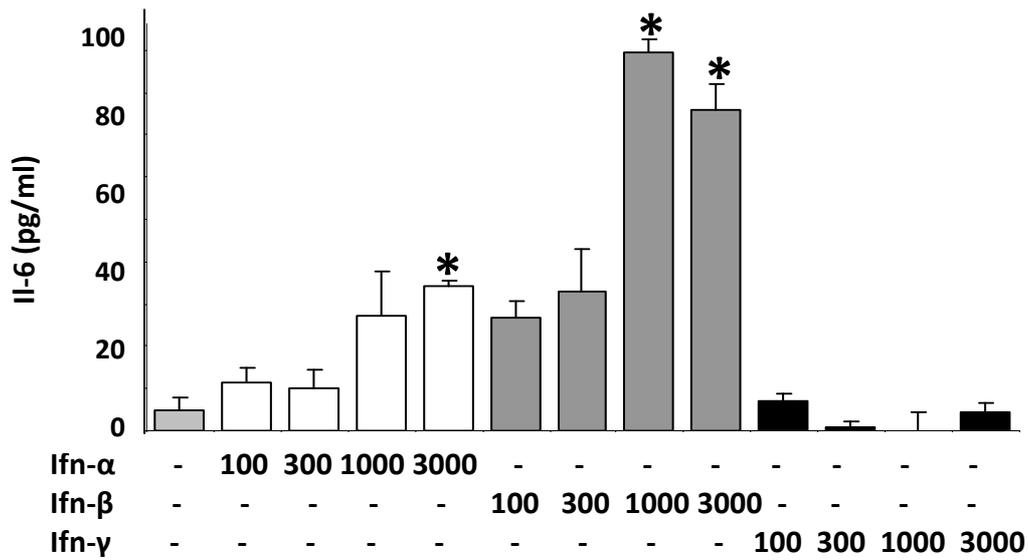


Abbildung 33: Interferon- α und - β induzieren die Interleukin-6-Produktion in primären Mesangialzellen. Die murinen primären Wildtyp-Mesangialzellen wurden in RPMI 1640-Medium mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin kultiviert. Nach einer 24-stündigen Hungerzeit erfolgte die Stimulation mit Interferon- α , - β oder - γ in den angegebenen Konzentrationen (in U/ml). 24 Stunden nach Stimulation wurde die Proteinkonzentration mittels IL-6-ELISA bestimmt. Dieser wurde laut Herstellerprotokoll durchgeführt. Die Daten zeigen den Mittelwert \pm SEM aus zwei unabhängigen Experimenten. * $p < 0.05$ vs. Medium

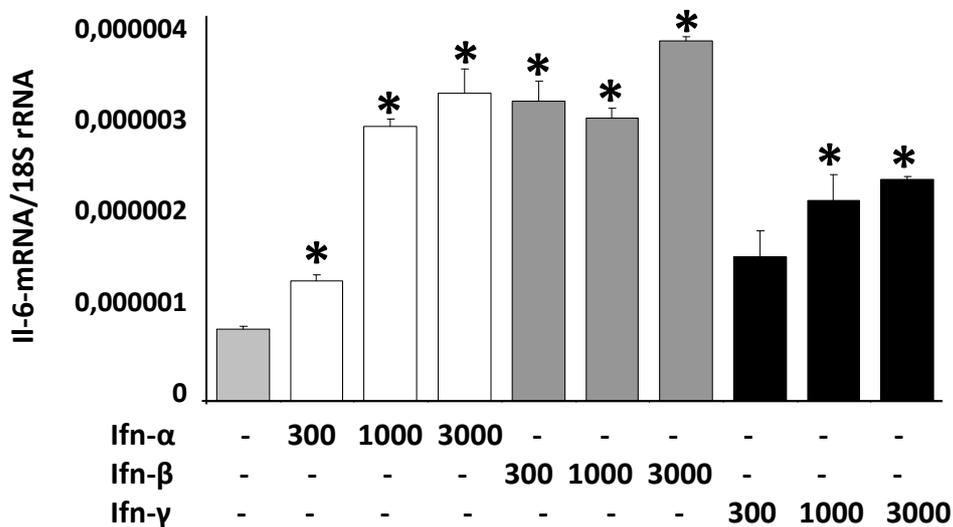


Abbildung 34: Interferon- α , - β und (in geringerem Maße) - γ induzieren die Interleukin-6-Produktion in primären Mesangialzellen. Die murinen primären Wildtyp-Mesangialzellen wurden in RPMI 1640-Medium mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin kultiviert. Nach einer 24-stündigen Hungerzeit erfolgte die Stimulation mit Interferon- α , - β oder - γ in den angegebenen Konzentrationen (in U/ml). 3 Stunden nach Stimulation wurde die RNA-Konzentration mittels real time RT-PCR bestimmt. Die Daten zeigen den Mittelwert \pm SEM aus zwei unabhängigen Experimenten. * $p < 0.05$ vs. Medium

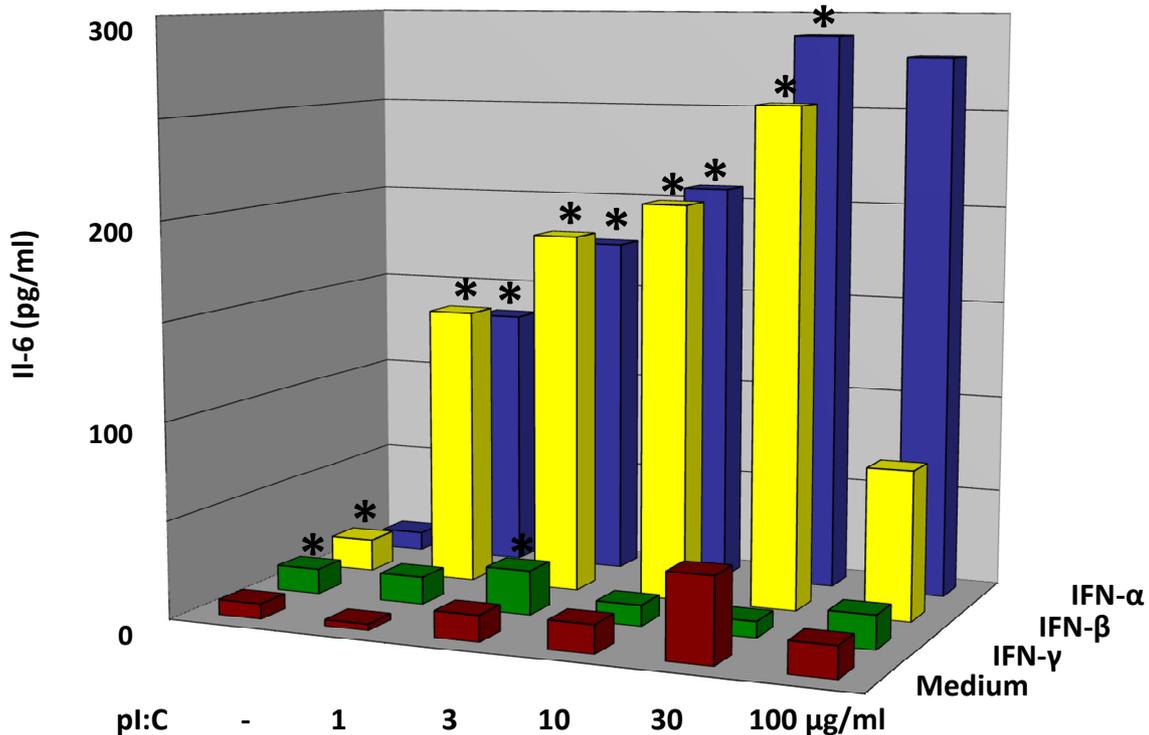


Abbildung 35: Vorstimulation mit Typ I-Interferonen erhöht die Il-6 Antwort auf Stimulation mit viraler Doppelstrang-RNA. Die murinen primären Mesangialzellen wurden mit 1000 U/ml Interferon- α , - β oder - γ für 24 Stunden vorstimuliert. Anschließend wurden sie mit synthetischer Doppelstrang-RNA (poly I:C, pl:C) in den angegebenen Konzentrationen stimuliert. Nach weiteren 24 Stunden wurde der Il-6-Gehalt im Überstand mittels ELISA bestimmt. * $p < 0.05$ vs. Medium

Wie hier zu sehen ist, führt die Vorstimulation mit Typ I-Interferonen zur deutlich verstärkten Interleukinproduktion im Gegensatz zu den nicht stimulierten Zellen oder den mit Interferon-gamma vorstimulierten Zellen. Dies deutet darauf hin, dass es in dem durch die Interferone simuliertem inflammatorischem Milieu zur verstärkten antiviralen Aktivität nach einer Virusinfektion kommt. Warum führen jedoch nur Typ I-Interferone, nicht Typ II-Interferone zur Doppelstrang-RNA-vermittelten Aktivierung der Mesangialzellen und warum kommt es überhaupt zur verstärkten Interleukinproduktion nach Interferonvorstimulation? Dies kann möglicherweise durch eine Induktion der RNA-Erkennungsmaschinerie auf die Typ-I-Interferonstimulation hin verursacht sein. Daher überprüfen wir im nächsten Versuch, wie die Stimulation mit Interferon-beta die Expression verschiedener RNA-Rezeptoren beeinflusst. Abbildung 36 zeigt, dass die Interferon- β -Stimulation die mRNA-Expression sowohl des endosomalen Toll-like Rezeptors-3, als auch der zytosolischen Rezeptoren Rig-I und Mda5 in primären Mesangialzellen massiv induzierte. Im Gegensatz dazu wurde das Signalmolekül Ips-1 durch Interferon- β eher herunter reguliert (Abbildung 36). Die Ursache dessen ist bisher nicht geklärt.

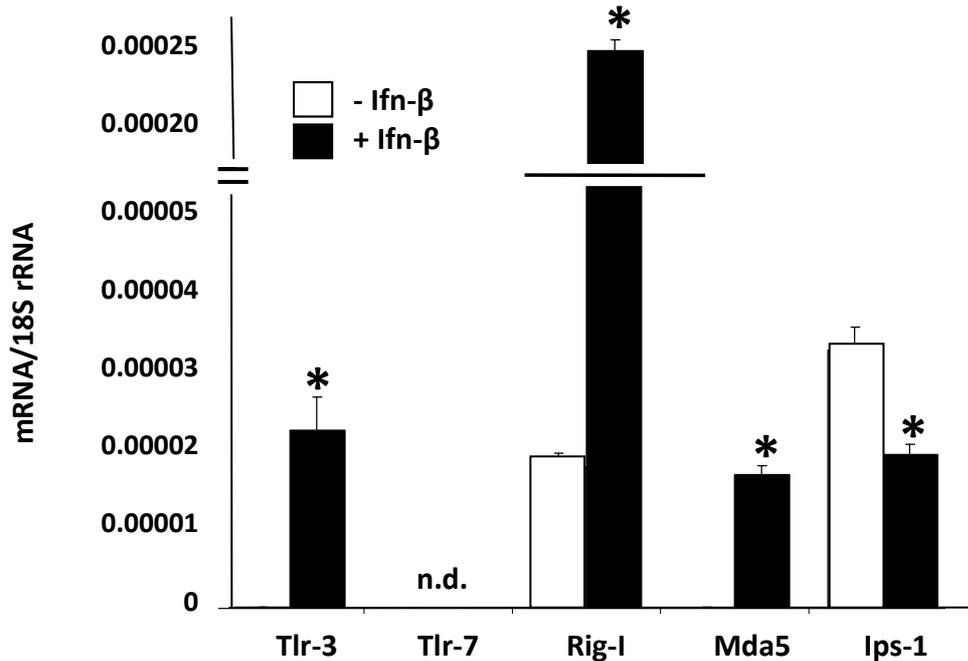


Abbildung 36: Vorstimulation mit Interferon-β führt zu verstärkter Expressierung der RNA-Erkennungsmaschinerie. Primäre Mesangialzellen wurden in An- oder Abwesenheit von 2000 U/ml Ifn-β kultiviert. Nach 3 Stunden wurde die mRNA geerntet und eine real time RT-PCR für die angegebenen RNA-Erkennungsmoleküle durchgeführt. Die Daten stellen das Verhältnis der spezifischen RNA zu 18S rRNA dar. N.d. = not detected., * $p < 0.05$ vs. Medium

Die Tatsache, dass durch Interferonvorstimulation und nachfolgende poly I:C-RNA-Stimulation die Interleukin-6-Produktion anstieg (Abbildung 35), kann auf die Hochregulation des Toll-like Rezeptors-3 durch die Interferone zurückzuführen sein (Abbildung 36). Da durch die Interferon-beta-Vorstimulation die gesamte RNA-Erkennungsmaschinerie hochreguliert wird (Abbildung 36) - also auch die zytosolischen Rezeptoren Rig-I und Mda5 - überlegten wir, dass die Interleukinproduktion auch steigen müsste, wenn die RNA-Erkennung über diese Rezeptoren abläuft. Um dies zu überprüfen, stimulierten wir die Mesangialzellen für 24 Stunden mit Interferon-alpha und -beta (1000 U/ml) und anschließend für weitere 24 Stunden mit poly I:C-RNA kombiniert mit dem kationischen Lipid Lipofectamin. Anschließend wurde der Interleukin-6-Gehalt mittels ELISA bestimmt. Dabei zeigte sich, dass die Interleukinproduktion in den mit poly I:C und kationischen Lipiden stimulierten Zellen - wie erwartet und wie bereits in Abbildung 32 zu sehen war - deutlich höher lag, als in den nur mit poly I:C-RNA stimulierten Zellen aus Abbildung 35. Überraschenderweise stieg die Interleukinproduktion in den mit Interferonen vorstimulierten Zellen jedoch nicht an, sie war im Gegenteil sogar deutlich reduziert. Worauf das zurückzuführen ist, ist bislang unklar (Abbildung 37). Da der Verlauf auch dosisabhängig ist, ist es eher unwahrscheinlich, dass es durch eine Überstimulation zum Zelltod kam.

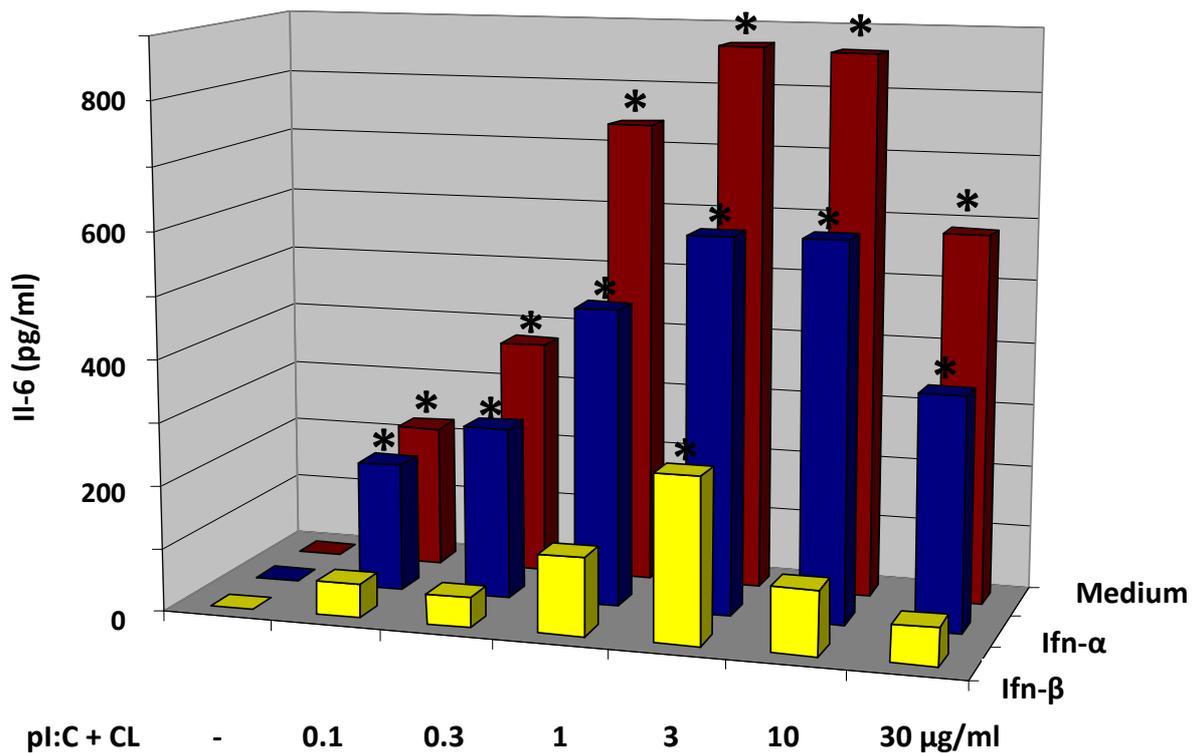


Abbildung 37: Vorstimulation mit Typ I-Interferonen erhöht die IL-6-Antwort auf Stimulation mit viraler, mit kationischen Lipiden komplexierter, Doppelstrang-RNA nicht. Die murinen primären Mesangialzellen wurden mit 1000 U/ml Interferon- α , - β oder - γ für 24 Stunden vorstimuliert. Anschließend wurden sie mit synthetischer Doppelstrang-RNA (poly I:C, pl:C), komplexiert mit kationischen Lipiden (CL), in den angegebenen Konzentrationen stimuliert. Nach weiteren 24 Stunden wurde der IL-6-Gehalt im Überstand mittels ELISA bestimmt. Die Daten zeigen den Mittelwert aus zwei unabhängigen Experimenten \pm SEM.

3.7 Die virale Doppelstrang-RNA-induzierte Aktivierung von Mesangialzellen beinhaltet eine Typ I-Interferon autokrin-parakrine Aktivierung

In dendritischen Zellen führt die Erkennung viraler RNA zur Freisetzung von Typ I-Interferonen, was unter anderem dazu führt, dass das TLR-Signaling über einen autokrin-parakrinen Erkennungsmechanismus der Typ I-Interferone verstärkt wird [95]. Eine wesentliche Rolle spielen hierbei der Typ I-Interferon-Rezeptor und die Stat-1-Phosphorylierung. Unsere bisherigen Ergebnisse, dass Mesangialzellen große Mengen Typ I-Interferone nach Tlr-unabhängiger Erkennung von viraler Doppelstrang-RNA produzieren und auch auf die Stimulation mit Interferonen reagieren, ließen die Frage aufkommen, ob es in Mesangialzellen ebenfalls eine solche autokrin-parakrine Aktivierung gibt. Zunächst stellte sich die Frage, ob Mesangialzellen den Typ I-Interferon-Rezeptor exprimieren, um über diesen Interferone erkennen zu können. Dies konnten wir mittels *real time* RT-PCR an unstimulierten und stimulierten Zellen zeigen (Abbildung 38).

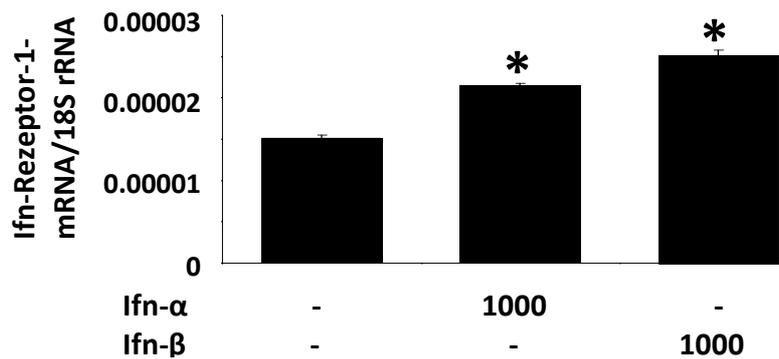


Abbildung 38: Mesangialzellen exprimieren den Interferonrezeptor. Primäre Mesangialzellen wurde für 3 Stunden mit 1000 U/ml Interferon- α bzw. - β stimuliert und im Anschluss die real time RT-PCR für den Interferonrezeptor-1 durchgeführt. Die Werte sind als Verhältnis zu 18S rRNA dargestellt.

Um zu zeigen, dass die Typ I-Interferone, die von Mesangialzellen selbst produziert werden, die in 3.6 beschriebene Induktion der RNA-Maschinerie auslösen können (Abbildung 36) und somit eine autokrin-parakrine Aktivierung in Mesangialzellen ebenfalls vorhanden ist, stimulierten wir primäre murine Mesangialzellen mit Komplexen aus poly I:C-RNA und kationischen Lipiden in Anwesenheit oder Abwesenheit von steigenden Dosen an Antikörpern, die die Funktion von Interferon- α und - β neutralisieren. Durch das Blockieren beider Typ I-Interferone mit einer entsprechend hohen Dosis blockierender Antikörper wurde die durch RNA und kationische Lipide induzierte Interleukin-6-Produktion beinahe vollständig unterdrückt (Abbildung 39). Diese Daten zeigen, dass die durch virale Doppelstrang-RNA ausgelöste Aktivierung der Mesangialzellen von einer Typ I-Interferon autokrin-parakrinen Aktivierung abhängig ist, die die RNA-Erkennung mittels der Induktion von Rig-I und Mda5 vermittelt.

Anstelle der blockierenden Antikörper verwendeten wir im nächsten Versuch Mesangialzellen aus Typ I-Interferon-Rezeptor(*Ifnar*)-defizienten Mäusen und stimulierten diese ebenfalls mit der synthetischen Doppelstrang-RNA poly I:C, gegebenenfalls komplexiert mit kationischen Lipiden. Anschließend wurde der Interleukin-6-ELISA durchgeführt (Abbildung 40) und die Proteinmenge an produziertem Interleukin-6 bestimmt. Wurden die Werte der Wildtyp- und der Interferonrezeptor-defizienten Zellen als Verhältnis zum Mediumleerwert dargestellt, zeigte sich hierbei ebenfalls, dass die Interleukinproduktion in den Interferonrezeptor-defizienten Zellen deutlich geringer ist, als in den Wildtypzellen. Dies bestätigt die Ergebnisse des vorherigen Versuches und verstärkt die Annahme, dass in Mesangialzellen eine autokrin-parakrine Aktivierung vorhanden ist, für die die lokal produzierten Interferone von Bedeutung sind und die zu einer verstärkten antiviralen Aktivität bei einer Entzündungsreaktion führen.

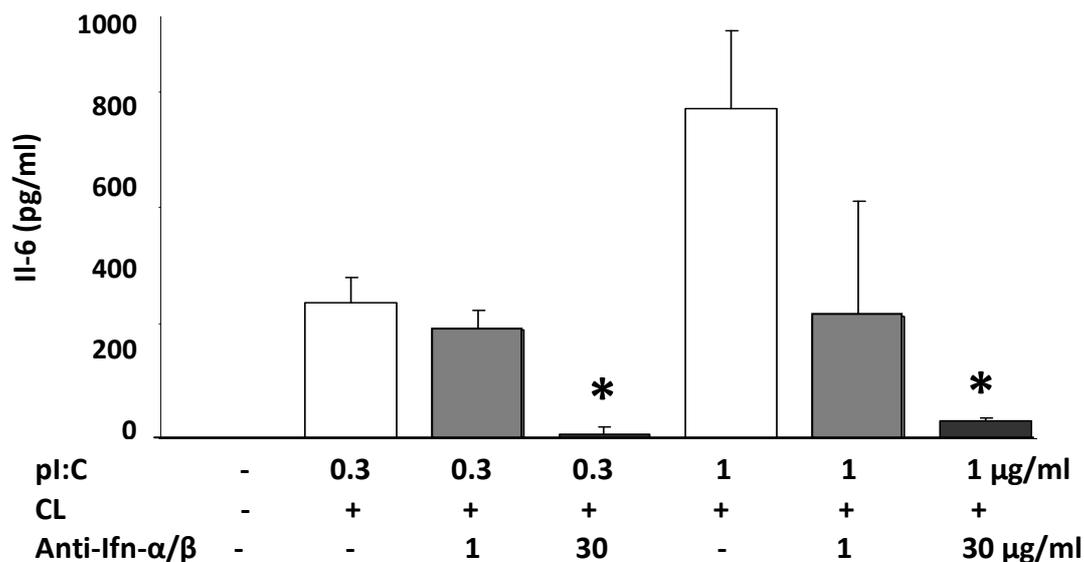


Abbildung 39: Das Blockieren von *Ifn-α* und *-β* reduziert die *Il-6*-Produktion nach Stimulation mit viraler Doppelstrang-RNA. Vor Stimulation wurden verschiedene Konzentrationen eines blockierenden Antikörpers (Rabbit Polyclonal Antibody against Mouse Interferon-alpha, against Mouse Interferon-beta) zu den murinen primären Mesangialzellen gegeben. 24 Stunden nach Stimulation mit steigenden Dosen poly I:C (synthetische Doppelstrang-RNA, pI:C), komplexiert mit kationischen Lipiden (CL, Lipofectamine®), wurde der *Il-6*-Gehalt im Überstand mittels ELISA bestimmt. Die Daten zeigen Mittelwerte \pm SEM. * $p < 0.05$ vs. Gruppe ohne Antikörper (t-test).

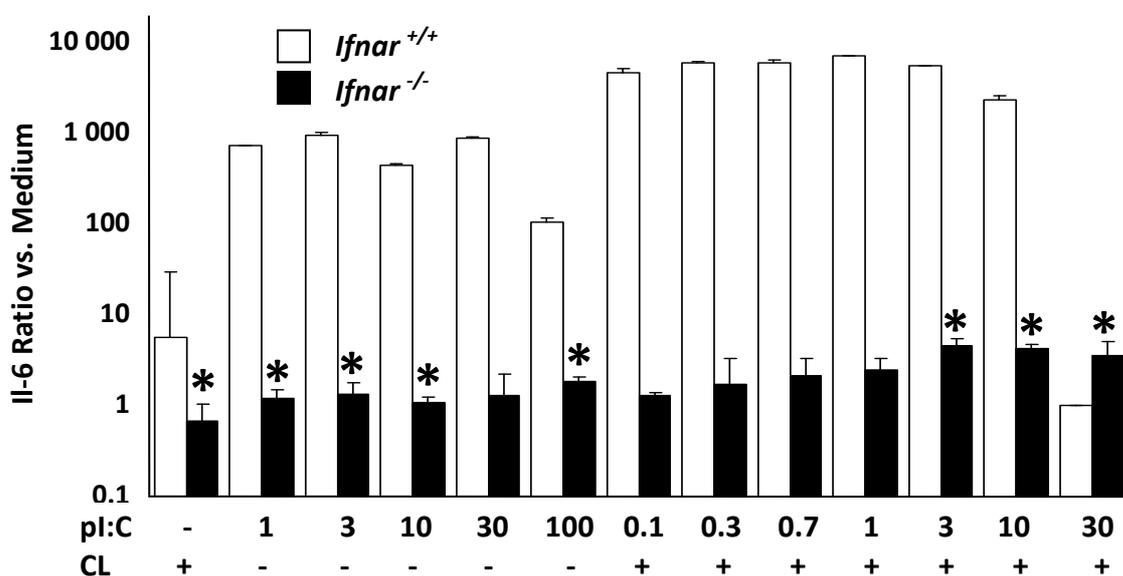


Abbildung 40: Die Interleukinproduktion ist in Interferonrezeptor-defizienten Mesangialzellen geringer als in Wildtypzellen. Murine Wildtyp- und Interferonrezeptor-k.o.-Mesangialzellen wurden nach einer 24-stündigen Hungerzeit mit der synthetischen Doppelstrang-RNA poly I:C (pI:C) in beschriebenen Konzentrationen (in µg/ml) stimuliert. Diese war, wenn angegeben, mit kationischen Lipiden (CL, Lipofectamine®) komplexiert. Nach 24 Stunden Inkubation wurde der *Il-6*-ELISA laut Herstellerprotokoll durchgeführt. Die Daten stellen den Mittelwert \pm SEM in logarithmischer Skalierung und als Verhältnis zum Medium dar. * $p < 0.05$ vs. *Ifnar*^{+/+}

Um zu überprüfen, ob Interferon-alpha und -beta auch die Produktion von Typ I-Interferonen veranlassen können, stimulierten wir die Mesangialzellen nach einer 24-stündigen Hungerszeit für drei Stunden mit Interferon-alpha bzw. -beta und führten anschließend eine *real time* RT-PCR für Mx 1 (anstelle von Interferon-alpha) und Interferon-beta durch. Hierbei zeigte sich, dass beide Interferone zur Produktion von Mx 1, nicht jedoch zur Produktion von Interferon-beta führen (Abbildung 41).

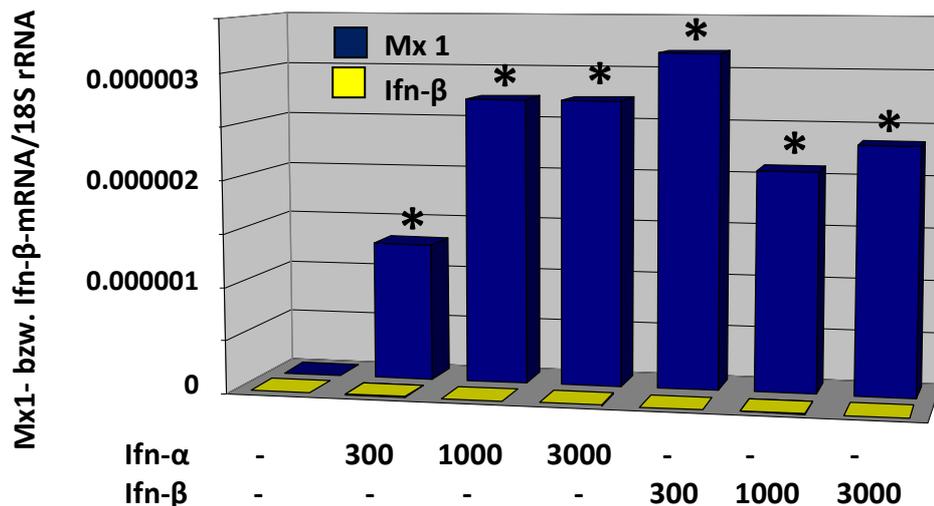


Abbildung 41: Sowohl Interferon-alpha als auch -beta induzieren die Produktion von Interferon-alpha. Die murinen primären Wildtyp-Mesangialzellen wurden in RPMI 1640-Medium mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin kultiviert. Nach einer 24-stündigen Hungerszeit erfolgte die Stimulation mit Interferon- α oder - β in den angegebenen Konzentrationen (in U/ml). 3 Stunden nach Stimulation wurde die RNA-Konzentration an Mx1 bzw. Ifn- β mittels *real time* RT-PCR bestimmt. * $p < 0.05$ vs. Medium

3.8 Virale RNA, die mit kationischen Lipiden komplexiert ist, reduziert in Mesangialzellen die Proliferation

Bisher konnte gezeigt werden, dass virale RNA in Mesangialzellen zur Produktion proinflammatorischer Zytokine sowie Typ I-Interferone führt. Virusinfektionen sind jedoch häufig auch ein Signal für apoptotischen Zelltod; dieser soll zur Kontrolle der viralen Replikation und der Verhinderung der Ausbreitung der Virusinfektion dienen. Unsere bisherigen Erkenntnisse, dass höhere Dosen poly I:C-RNA zu sinkender Interleukin-6- und Interferonproduktion führen, lassen annehmen, dass es sich hierbei um einen antiproliferativen oder proapoptotischen Effekt handelt. Tatsächlich zeigte sich in unserem Proliferationsassay, dass die Zahl der proliferierenden Mesangialzellen nach Stimulation mit steigenden Dosen poly I:C-RNA zurückging. Dieser Effekt war wesentlich stärker, wenn poly I:C mit kationischen Lipiden komplexiert wurde (Abbildung 42).

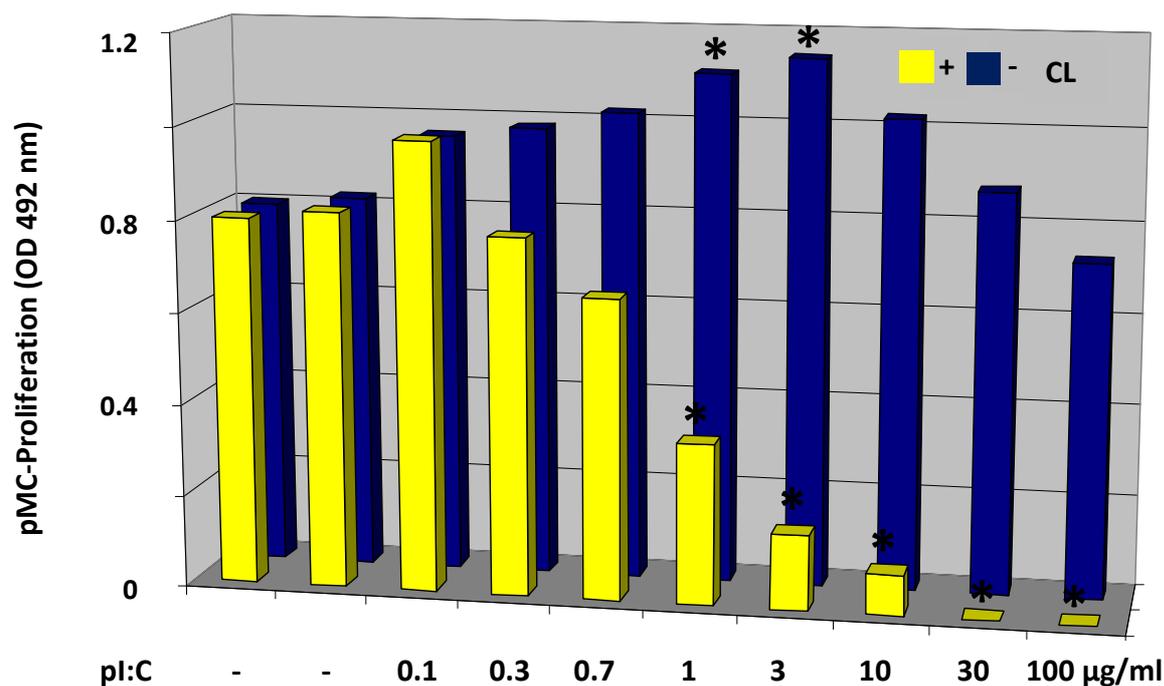


Abbildung 42: Die zytosolische RNA-Erkennung führt zu reduzierter Proliferation. Nachdem 30 000 murine primäre Mesangialzellen/ml 48 Stunden lang in einer 96-well-Platte mit RPMI 1640-Medium + 1 % FCS + 1 % Penicillin/Streptomycin gewachsen waren, erfolgte die Stimulation mit der synthetischen Doppelstrang-RNA poly I:C (pl:C) in genannten Konzentrationen. Wenn angegeben, war diese mit kationischen Lipiden (CL, Lipofectamine®) komplexiert. Nach weiteren 48 Stunden wurde der CellTiter 96® AqueousOne Solution Cell Proliferation Assay hinzu gegeben und nach 3 Stunden die optische Dichte bei 492 nm gemessen. * $p < 0.05$ vs. Medium

Abbildung 42 zeigt, dass die Stimulation mit ausreichend hohen Dosen viraler RNA nicht mehr zu einer Zunahme der Proliferation führt, wie es bei niedrigeren Dosen RNA der Fall ist, sondern dass dadurch in den Mesangialzellen ein Mechanismus ausgelöst wird, der die Proliferation der Zellen verlangsamt bzw. aufhält. Wenn die RNA mit Hilfe kationischer Lipide direkt ins Zytosol gebracht wird, ist dieser Proliferationsrückgang noch stärker. Ob für diesen starken Rückgang der Proliferation auch Interferone eine Rolle spielen, ist bislang unklar. Um dies zu untersuchen, stimulierten wir im nächsten Versuch Wildtypzellen und Interferon-alpha-Rezeptor-defiziente Mesangialzellen mit viraler RNA, komplexiert mit kationischen Lipiden und verglichen anschließend die Proliferation der Wildtypzellen im Gegensatz zu den *knock out*-Zellen. Wurde die Proliferation der unstimulierten Wildtypzellen und der unstimulierten *Ifnar*-defizienten Zellen auf 100 % gesetzt, so zeigte sich, dass der Proliferationsrückgang nach Stimulation bei den *knock out*-Zellen wesentlich langsamer erfolgte als bei den Wildtypzellen (Abbildung 43). Dies lässt annehmen, dass die autokrine Interferonaktivierung, der wir in den vorherigen Versuchen schon eine Rolle für die Zytokinproduktion der Mesangialzellen zuschrieben, für die Zellproliferation ebenfalls von Bedeutung ist.

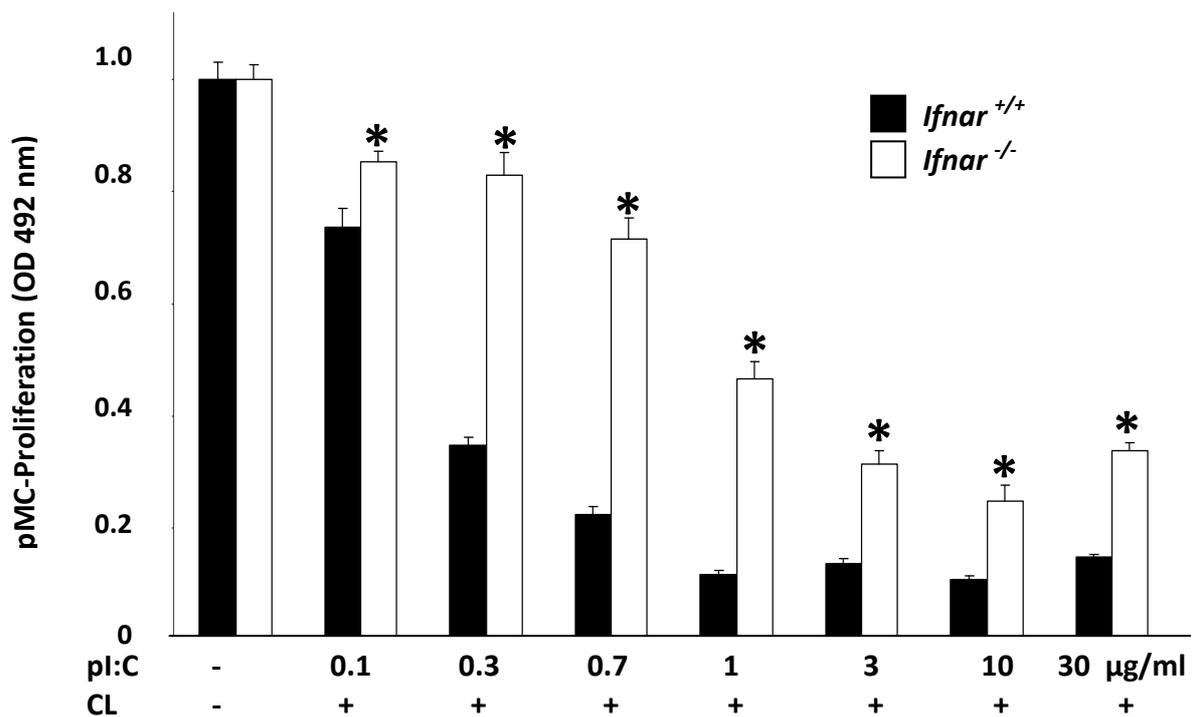


Abbildung 43: Der Rückgang der Zellproliferation ist in Typ I-Interferonrezeptor-defizienten Zellen wesentlich geringer als in Wildtypzellen. 30 000 murine primäre Wildtyp- bzw. Interferonrezeptor-defiziente Mesangialzellen/ml wurden 48 Stunden lang in einer 96-well-Platte mit RPMI 1640-Medium + 1 % FCS + 1 % Penicillin/Streptomycin wachsen gelassen. Dann erfolgte die Stimulation mit der synthetischen Doppelstrang-RNA poly I:C (pI:C), komplexiert mit kationischen Lipiden (CL, Lipofectamine®). Nach weiteren 48 Stunden wurde der CellTiter 96® AqueousOne Solution Cell Proliferation Assay hinzu gegeben und nach 3 Stunden die optische Dichte bei 492 nm gemessen. * $p < 0,05$ vs. Wildtyp.

3.9 Virale RNA führt in Mesangialzellen zum Zelltod

Wir nahmen an, dass der Rückgang der Proliferation, den wir in den letzten Versuchen zeigten, auf einen Zelltod zurückzuführen ist. Dies wollten wir in unserem nächsten Versuch klären. Hierfür stimulierten wir die Mesangialzellen mit hohen Dosen poly I:C-RNA, zum Teil komplexiert mit kationischen Lipiden, für 24 Stunden. Anschließend färbten wir die Zellen mit Annexin und Propidium Jodid und führten die Durchflusszytometrie durch. Annexin und Propidium Jodid sind, wie im Methodenteil ausführlich beschrieben, Marker für verschiedene Zeitpunkte im Zelltod-Prozess, die an bestimmte Zellbestandteile binden und mittels Durchflußzytometrie sichtbar gemacht werden können. Lebende Zellen färben sich somit nicht an, Zellen, die sich in einem frühen Stadium des Zelltodes befinden, färben sich nur mit Annexin an und Zellen, die bereits tot sind, sind nur mit Propidium Jodid anfärbbar. Bei Zellen, die sich sowohl mit Annexin als auch mit Propidium Jodid anfärben lassen, handelt es sich entweder um Zellen, die sich in einem späteren Stadium des Zelltodes befinden, oder um Zellen, die bereits abgestorben sind.

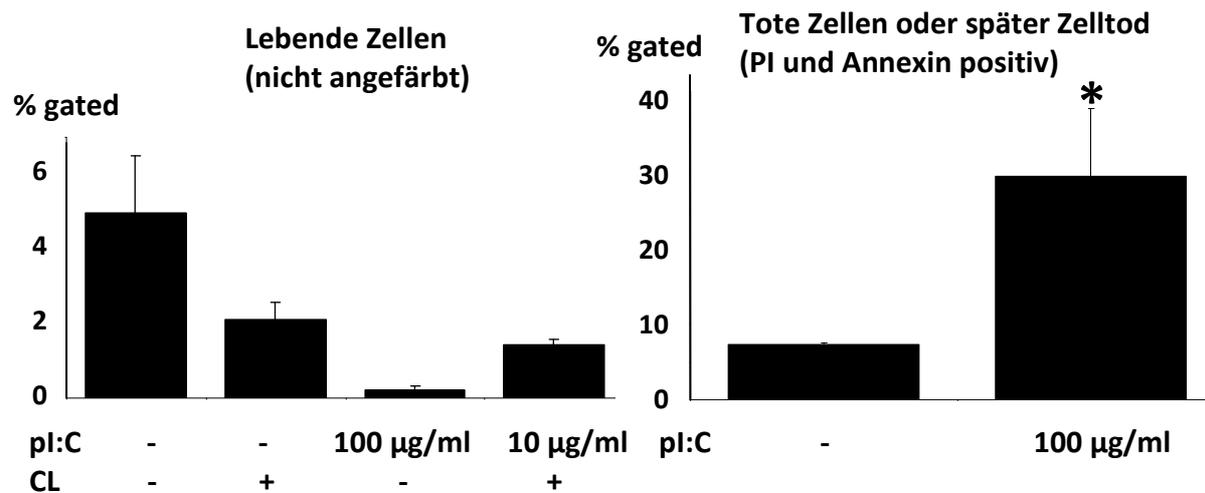


Abbildung 44: Virale RNA führt in Mesangialzellen zum Zelltod. Die murinen Mesangialzellen wurden, nach 24-stündiger Hungerzeit, in RPMI-Medium + 5 % FCS für 24 Stunden mit den angegebenen Dosen poly I:C-RNA, gegebenenfalls komplexiert mit Lipofectamin (CL), stimuliert. Anschließend wurden sie, wie im Methodenteil beschrieben, von den Platten entfernt, mit Annexin und Propidium Jodid gefärbt und die FACS-Analyse mittels der FACScalibur Maschine und der CellQuest software von BD Pharming durchgeführt. * $p < 0.05$ vs. Medium

Bei diesem Versuch zeigte sich, dass die Zahl der nicht anfärbbaren, lebenden Zellen in den stimulierten Gruppen niedriger und die Zahl der Propidium Jodid und Annexin gefärbten Zellen, also der Zellen, die einen solchen Schaden erlitten haben, dass ihre Plasmamembran durchlässig geworden ist, signifikant höher war (Abbildung 44).

Abbildung 44 lässt darauf schließen, dass die Stimulation mit virale RNA in den Mesangialzellen zum Zelltod führt. Ob dieser Zelltod durch Apoptose oder durch Nekrose verursacht ist, lässt sich hiermit jedoch noch nicht sagen. Deshalb wurde im nächsten Versuch vor Stimulation ein Caspase-8-Inhibitor zu den Zellen gegeben. Verschiedene Caspasen sind Bestandteile des Apoptoseweges. Wir erwarteten durch eine teilweise Blockade dieses Apoptoseweges die Zahl der toten Zellen reduzieren können. Tatsächlich war die Anzahl der toten Zellen nach poly I:C-Stimulation mit Caspase-Inhibitor im Vergleich zu der Gruppe ohne Caspase-Inhibitor signifikant niedriger. Die Caspase-Hemmung verhinderte den durch poly I:C-RNA und kationische Lipide ausgelösten Zelltod fast vollständig (Abbildung 45). Daraus zogen wir die Schlussfolgerung, dass es sich (zumindest bei einem Teil der gestorbenen Zellen) um Apoptose und nicht um Nekrose gehandelt hat. Dass es in Mesangialzellen nach Exposition mit viraler RNA, vor allem, wenn diese ins intrazelluläre Zytosol gelangt, zum apoptotischen Zelltod kommt, ist, neben der Interleukinproduktion und der Interferonproduktion, die wir in den vorherigen Versuchen untersuchten, Teil der angeborenen antiviralen Immunantwort dieser Zellen.

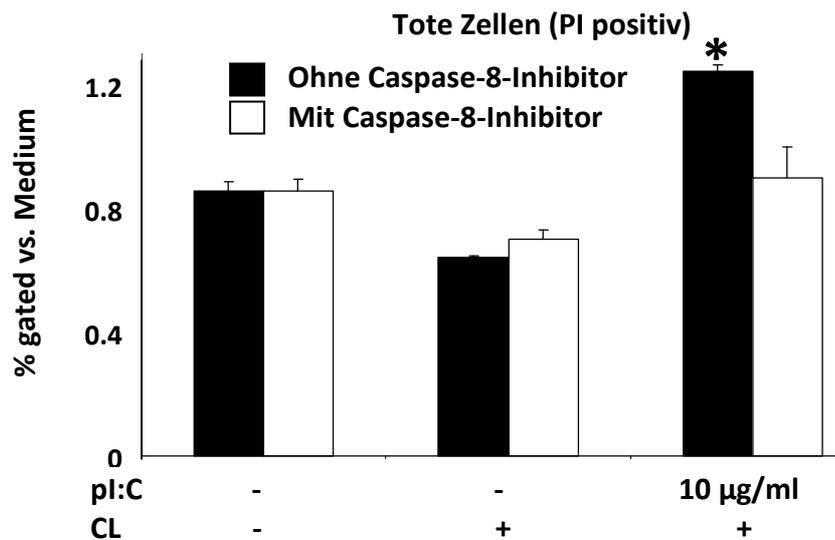


Abbildung 45: Der Zelltod in Mesangialzellen beruht, zumindest zum Teil, auf Apoptose. Zu den murinen Mesangialzellen wurde 6 Stunden vor Stimulation der Caspase-8-Inhibitor Ac-IETD-CHO (5 µg/ml) hinzugegeben. Anschließend erfolgte ein Mediumwechsel und die Zellen wurden in RPMI-Medium + 5 % FCS für 24 Stunden mit den angegebenen Dosen poly I:C, gegebenenfalls komplexiert mit Lipofectamin (CL), stimuliert. Danach wurden die Zellen mit Propidium Jodid (PI) angefärbt und die FACS-Analyse durchgeführt. Die Zellzahl der Mediumkontrolle wurde gleich 100 % gesetzt. Die Daten zeigen den Mittelwert aus zwei Experimenten \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. Medium und vs. „mit Caspase-8-Inhibitor“

3.10 Komplexe aus viraler RNA und kationischen Lipiden induzieren eine diffuse glomeruläre Nekrose und Mesangiolyse in Mäusen, die an nephrotoxischer Serumnephritis leiden

Unsere Arbeitsgruppe hat kürzlich gezeigt, dass die vorübergehende Exposition auf virale Doppelstrang-RNA die Immunkomplex-Glomerulonephritis in Mäusen verschlimmern kann [84]. Der hier entdeckte Mechanismus würde allerdings implizieren, dass virale RNA, die z.B. mit kationischen Lipiden komplexiert ist, eine vorbestehende Glomerulonephritis deutlich verstärken kann. Um diese Hypothese zu testen, injizierten wir C57BL/6 Mäusen, die an einer autologen nephrotoxischen Serumnephritis litten, entweder das Vehikel (HBS), kationische Lipide (Dotap), pI:C (Doppelstrang-RNA) oder pI:C komplexiert mit kationischen Lipiden. Die Dosis, die gewählt wurde um die nephrotoxische Serumnephritis zu induzieren, verursacht normalerweise nach 21 Tagen eine Immunkomplex-Glomerulonephritis mit massiver Albuminurie. Entsprechend unserer Hypothese zeigte sich in der Gruppe, die mit Komplexen aus pI:C-RNA und kationischen Lipiden behandelt wurde, bereits nach 10 Tagen eine signifikant höhere Proteinurie als in den Kontrollgruppen (Abbildung 46).

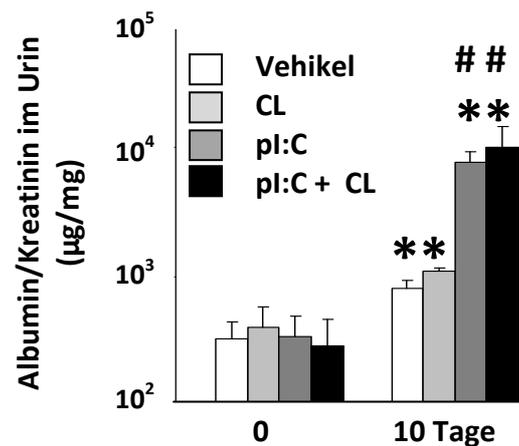


Abbildung 46: Der Albumin/Kreatinin-Quotient an Tag 10 ist in der pl:C und der pl:C + CL-Gruppe deutlich höher als in den Kontrollgruppen. Von allen Mäusegruppen wurde der an Tag 0 und Tag 10 gewonnene Urin mittels ELISA auf Albumin und mittels Farbassay auf Kreatinin quantitativ untersucht. Aus den gewonnenen Angaben (jeweils in µg/ml) wurde der Albumin/Kreatinin-Quotient berechnet und im Diagramm dargestellt. Dieser entspricht der Proteinurie. * $p < 0,05$ vs. Tag 0; # $p < 0,05$ vs. Vehikel

Bei Bestimmung des Kreatinins im Serum zeigte sich, dass dieses an Tag 10 in der pl:C- und der pl:C+CL-Gruppe signifikant höher war als in den Kontrollgruppen. Zwischen diesen beiden Gruppen bestand jedoch kein Unterschied (Abbildung 47).

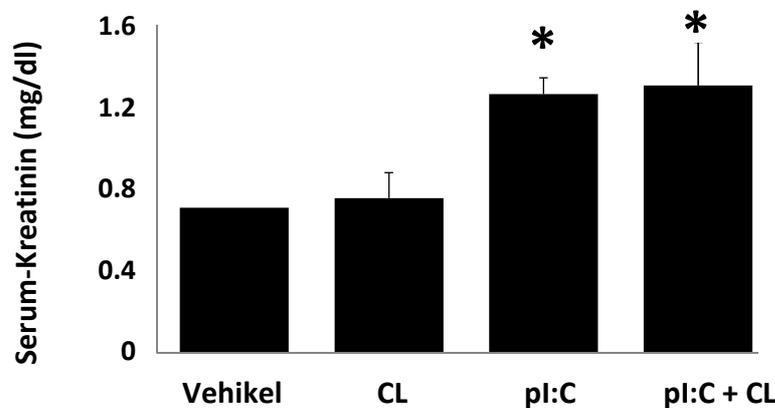


Abbildung 47: Das Serum-Kreatinin ist sowohl in der pl:C- als auch in der pl:C + CL-Gruppe signifikant höher als in den Kontrollgruppen. Das an Tag 10 gewonnene Serum von allen vier Gruppen wurde mittels Farbassay auf den Kreatiningehalt quantitativ getestet. * $p < 0,05$ vs. Vehikel.

Die entnommenen Nieren der Mäuse dieser vier Gruppen wurden mittels PAS angefärbt und mikroskopisch der fokale Nekrosescore bestimmt (Abbildung 48 und 50). Hierbei zeigte sich, dass die Nekrose bei den mit pl:C und kationischen Lipiden behandelten Tieren deutlich stärker ausgeprägt ist als in den Kontrollgruppen oder der pl:C-Gruppe.

Des Weiteren konnte in den PAS-gefärbten Nierenschnitten gezeigt werden, dass die Komplexe aus Doppelstrang-RNA (poly I:C) und kationischen Lipiden zu einer diffusen und schweren Mesangiolyse in den nephritischen C57BL/6-Mäusen geführt haben, was mit unseren Daten über den Zelltod in Mesangialzellen übereinstimmt (Abbildung 49 und 50).

Diese Daten unterstützen die Theorie, dass der bei den vorhergehenden *in vitro* Versuchen in primären Mesangialzellen entdeckte Mechanismus der antiviralen Immunantwort nach Stimulation mit viraler RNA, ebenfalls *in vivo* für die murine Glomerulonephritis zutrifft.

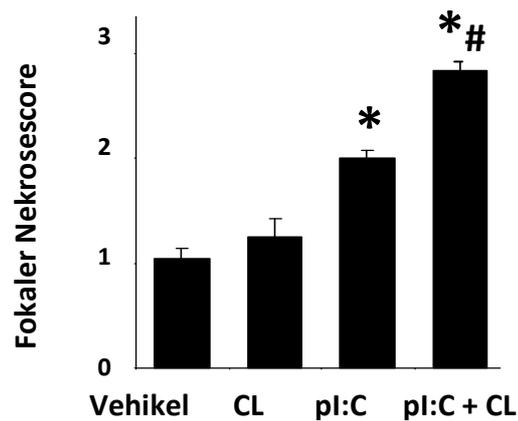


Abbildung 48: Die Gruppe, die mit pI:C und CL behandelt wurde, zeigt eine signifikant höhere Nekrose als diejenige, die nur mit pI:C behandelt wurde. Die fokale glomeruläre Nekrose je Gruppe wurde in PAS-gefärbten Nierenschnitten unter Zuhilfenahme eines semiquantitativen Scores von 0-3 in 15 Glomeruli je Abschnitt bestimmt. * $p < 0,05$ vs. Medium; # $p < 0,05$ pI:C + CL vs. pI:C

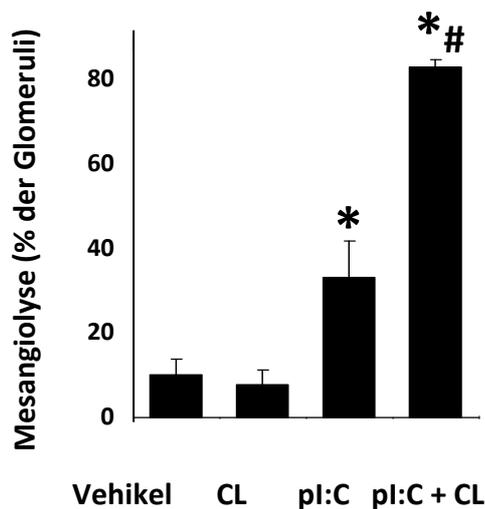


Abbildung 49: Die Gruppe, die mit pI:C und CL behandelt wurde, zeigt eine signifikant höhere Mesangiolyse als diejenige, die nur mit pI:C behandelt wurde. Der Prozentanteil der Glomeruli, die von Mesangiolyse betroffen waren, wurde in PAS-gefärbten Nierenschnitten in 15 Glomeruli je Abschnitt bestimmt. * $p < 0,05$ vs. Medium; # $p < 0,05$ pI:C + CL vs. pI:C

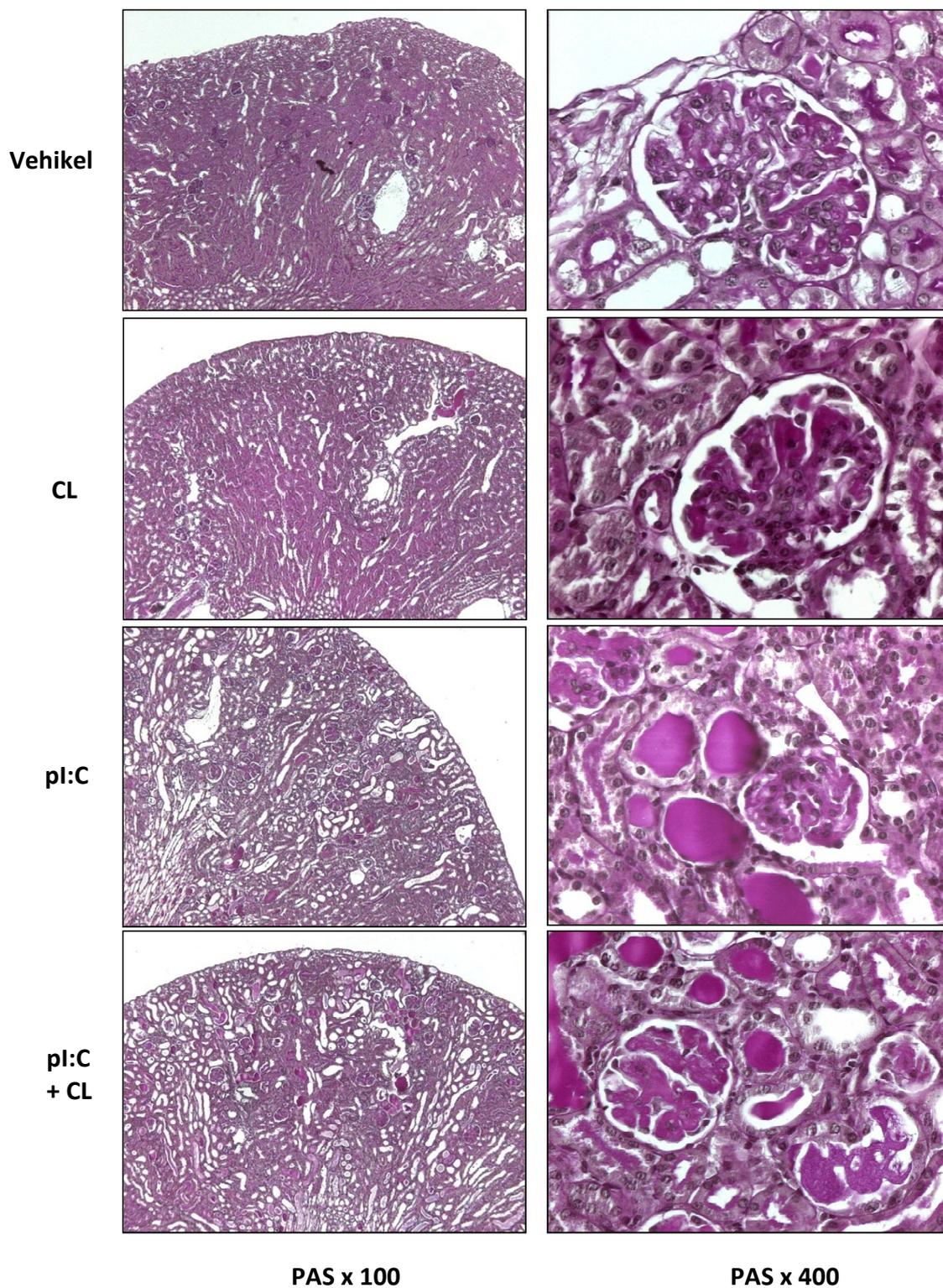


Abbildung 50: PAS-gefärbte Nierenschnitte. Nierenschnitte von Mäusen aller Gruppen wurden, wie im Methodenteil beschrieben, mit PAS (periodic acid Schiff) gefärbt. Die Bilder wurden bei einer Vergrößerung von 100 x und 400 x gemacht.

3.11 Die mit chronischer Hepatitis C-assoziierte Glomerulonephritis ist assoziiert mit einer gesteigerten glomerulären Interferon- α -Expression beim Menschen

Welche Bedeutung haben diese *in vitro* Beobachtungen für die menschliche Glomerulonephritis? Die chronische Hepatitis C-Infektion ist beispielsweise häufig mit der membranproliferativen Glomerulonephritis (MPGN) assoziiert. Diese Erkrankung ist durch eine glomeruläre Ablagerung von Immunkomplexen aus Hepatitis C-RNA charakterisiert. Dadurch werden die Mesangialzellen mit viraler dsRNA konfrontiert [96]. Wir untersuchten Nierenbiopsien aus der europäischen Nieren-cDNA-Bank Kroener-Fresenius-Biopsiebank von folgenden Patientenkohorten: 1. Lebende Nierenspende (ohne Schäden des Nierengewebes), 2. HCV-negative MPGN, 3. HCV-assoziierte MPGN [97]. Die Interferon- α -Expression dieser Proben wurde mittels *real time* RT-PCR in glomerulären und tubulointerstitiellen cDNA-Isolaten untersucht. Es zeigte sich, dass die Glomeruli der Hepatitis C-positiven Patienten signifikant mehr Interferon- α -mRNA exprimierten im Vergleich zu den Hepatitis C-negativen Patienten oder zu den lebenden Spendern. Im Gegensatz dazu war kein signifikanter Unterschied im tubulointerstitiellen Kompartiment bemerkbar (Abbildung 51). Diese Daten zeigen, dass menschliche Hepatitis C-induzierte Glomerulonephritis mit einer verstärkten glomerulären Interferon- α -Expression assoziiert ist.

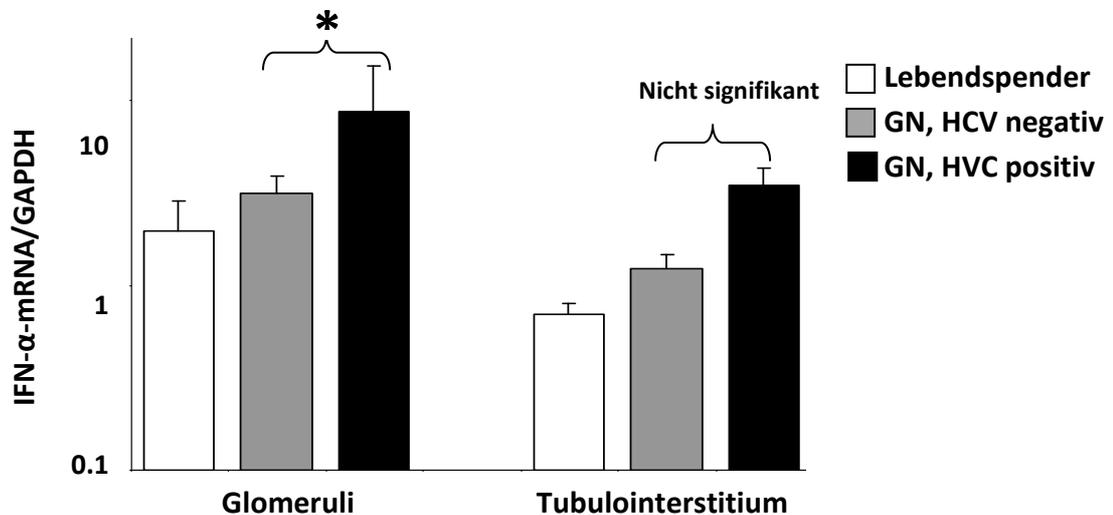


Abbildung 51: Interferon- α -Expression bei menschlicher MPGN. Glomeruläre und tubulointestinale cDNA-Isolate aus mikrodisszezierten menschlichen Nierenbiopsien wurden mittels *real time* RT-PCR auf ihren Interferon- α -Gehalt untersucht. * $p < 0.05$

Kapitel 4:

Diskussion

4 Diskussion

Neueste Entdeckungen im Feld der angeborenen Pathogenerkennung erlauben neue Hypothesen der molekularen Mechanismen virusassoziierter Glomerulonephritiden. Die Typ I-Interferonproduktion ist, neben der Produktion von Zytokinen und der Apoptose, ein zentrales Element der antiviralen Immunität [17]. Unsere Hypothese war, dass virale RNA die Produktion von Typ I-Interferonen in Mesangialzellen über angeborene RNA-Rezeptoren veranlasst. Unsere Daten unterstützen diese Hypothese und zeigen, dass die Tlr-unabhängige Erkennung viraler Doppelstrang-RNA die Produktion von Typ I-Interferonen wesentlich stärker triggern kann als die Tlr-3/Trif-abhängige Erkennung. Außerdem können wir zeigen, dass Mesangialzellen nicht nur Typ I-Interferone produzieren können sondern Interferone auch erkennen und mit der Produktion von Zytokinen, wie Interleukin-6, auf sie reagieren. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Erkennung von Interferonen zur Hochregulation der angeborenen RNA-Rezeptoren in Mesangialzellen führt. Des Weiteren zeigen diese Daten, dass die RNA-induzierte Aktivierung der Mesangialzellen einer Typ I-Interferon-abhängigen autokrin-parakrinen Aktivierung unterliegt. Unsere *in vivo* Daten können wir mit Hilfe von *in vitro* Versuchen bestärken.

4.1 Bedeutung der angeborenen RNA-Rezeptoren

Der glomeruläre Filtrationsprozess setzt Mesangialzellen vielen zirkulierenden Mikro- und Makromolekülen - einschließlich viralen Partikeln - während Infektionen des intravaskulären Kompartiments aus. RNA kann vom RNase-Verdau geschützt werden, wenn sie mit Proteinen, wie Immunglobulinen oder Nukleoproteinen, komplexiert ist [98-100]. Bei Glomerulonephritiden sind solche Immunkomplexe häufig in glomerulären Kapillaren oder dem Mesangium abgelagert, wo sie von glomerulären Mesangialzellen aufgenommen werden [101]. Arbeiten aus unserer Gruppe zeigten, dass virale Doppelstrang-RNA menschliche und murine Mesangialzellen dazu veranlassen, Interleukin-6 und CCL2 *in vitro* und *in vivo* zu produzieren, was wir dem Toll-like Rezeptor-3 zuschrieben. Dieser ist der einzige RNA-spezifische Toll-like Rezeptor, der von Mesangialzellen exprimiert wird [84, 85]. Virale Doppelstrang-RNA kann jedoch auch Tlr-3/Trif-unabhängig die Reifung dendritischer Zellen veranlassen [87]. Die neueste Entdeckung von Rig-I und Mda5 als zytosolische virale Doppelstrang-RNA-Rezeptoren [92] lässt Zweifel an der Bedeutung des Tlr-3-Signalings in Mesangialzellen nach Stimulation mit viraler Doppelstrang-RNA aufkommen. Im Gegensatz zu pDCs, in denen Toll-like Rezeptoren essentiell für die Zytokin- und Interferonproduktion sind [55], scheint virale Doppelstrang-RNA in Nicht-Immunzellen eher den zytosolischen Rig-I-Weg als den Toll like Rezeptor-3-Weg zu aktivieren [87]. Insbesondere lokale

Infektionen induzieren die Interferonproduktion über die Rig-like Helikasen und nicht über Toll-like Rezeptoren, wohingegen systemische Infektionen die Toll-like Rezeptoren der pDCs aktivieren [71]. Die Zusammenarbeit des Tlr-Systems und der Rig-like Helikasen bei der Viruserkennung wurde kürzlich von Takeuchi et al. beschrieben [102].

Für die Wichtigkeit einer Zusammenarbeit sprechen auch die Ergebnisse, die kürzlich von Kumar et al. veröffentlicht wurden [103]. Sie untersuchten die Auswirkungen der poly I:C-RNA-Injektionen in Wildtyp-, *Trif*-defiziente und *Ips-1*-defiziente Mäuse. Hierbei zeigte sich, dass die Typ I-Interferonproduktion in der Milz der *Trif*-defizienten Tiere nur mäßig reduziert war, bei den *Ips-1*-defizienten Tieren jedoch aufgehoben war. Sie bestimmten auch die Zytokinproduktion in kultivierten dendritischen Zellen. Dabei zeigte sich ebenfalls, dass die Interferon- β -Produktion in *Ips-1*-defizienten Zellen nach poly I:C-Stimulation aufgehoben war, während sie in *Trif*-defizienten Zellen nur vermindert war. Ihre Schlussfolgerung war, dass die durch poly I:C-RNA vermittelten Effekte einer Kooperation zwischen den Toll-like Rezeptoren und den zytoplasmatischen RNA-Helikasen bedürfen. Es ist bekannt, dass Rig-I in Nicht-Immunzellen, wie beispielsweise glatten Muskelzellen [104], Harnblasen-Epithelzellen [105], Astrozyten [106], Hepatozyten [107] und Gallengangs-Epithelzellen [108], vorhanden ist. Harada et al. zeigten, dass Gallengangs-Epithelzellen auf die meisten Viren antworten können und zwar dadurch, dass sie Viren über Rig-I und Mda5 im Zytosol infizierter Zellen erkennen. Die Wichtigkeit der zytosolischen Rezeptoren bei der antiviralen Immunantwort von Nicht-Immunzellen wurde ebenfalls von Hirata et al. beschrieben. Sie zeigten, dass das Rig-I/*Ips-1*-Signaling eine wichtige Rolle bei der angeborenen Immunantwort intestinaler Epithelzellen spielt [109]. Sie fanden heraus, dass mit kationischen Lipiden komplexierte poly I:C-RNA zur Typ I-Interferonproduktion in intestinalen Epithelzellen führt und dass hierbei nur die Expression von Rig-I, nicht aber die des Tlr-3 erhöht war. Sie schrieben diesen Effekt der unterschiedlichen Lokalisation der zwei Rezeptoren zu und der Tatsache, dass intestinale Epithelzellen nichtphagozytierende Zellen sind [109]. Eine wichtige Rolle in diesem Zusammenhang spielt auch das Adaptorprotein der Rig-like Helikasen *Ips-1*. Es wurde gezeigt, dass *Ips-1*-defiziente Mäuse auf Stimulation mit sämtlichen viralen Stimuli, die von Rig-I und Mda5 erkannt werden, weder Zytokine noch Interferone produzierten [110, 111]. Interessanterweise befindet sich dieses Protein mitochondrial, was bedeuten könnte, dass Mitochondrien neben ihrer Aufgabe im Metabolismus und Zelltod auch eine Rolle bei der Interferonantwort spielen könnten [112]. Wir zeigen hier erstmals, dass glomeruläre Mesangialzellen die zytosolischen Rezeptoren Rig-I und Mda5 sowie deren mitochondriales Adaptormolekül *Ips-1* exprimieren und dass ihnen eine wichtige Rolle bei der angeborenen antiviralen Immunantwort der glomerulären Mesangialzellen zukommt.

Mit Hilfe *Trif*-mutanter muriner Mesangialzellen liefern wir hier den experimentellen Beweis, dass sowohl die Tlr-3/*Trif*-abhängige als auch die Tlr-3/*Trif*-unabhängige Erkennung viraler RNA die spezifische antivirale Immunität in glomerulären Mesangialzellen triggern kann. Es zeigte sich, dass

sowohl die Interleukin-6-Produktion als auch die Typ I-Interferonproduktion in *Trif*-mutanten Mesangialzellen, die mit viraler RNA und kationischen Lipiden stimuliert wurden, im Vergleich zu Wildtypzellen nicht vermindert war. Dies ist dadurch zu erklären, dass die Erkennung viraler RNA, die durch kationische Lipide ins Zytosol gebracht wurde, Tlr-3/*Trif*-unabhängig über die zytosolische Rezeptoren Rig-I und Mda5 und deren mitochondriales Adaptormolekül Ips-1 abläuft [92]. Erstaunlicherweise war die Interleukin-6-Produktion in den *Trif*-defizienten Zellen bei alleiniger Stimulation mit viraler RNA verglichen mit den Wildtypzellen zwar vermindert, jedoch nicht ganz aufgehoben. Dies spricht dafür, dass die Erkennung nichttransfektierte poly I:C-RNA nicht vollständig über den Toll-like Rezeptorweg abläuft, sondern auch hierfür andere Rezeptoren eine Rolle spielen müssen. Yoshida et al. stimulierten humane Astrozyten mit poly I:C-RNA und konnten einen deutlichen Anstieg der RIG-I-mRNA und des RIG-I-Proteingehaltes feststellen. Dieselben Effekte sahen sie *in vivo* bei poly I:C-Injektionen in das Striatum von Mäusen [106]. Dies lässt vermuten, dass auch poly I:C-RNA, die nicht mit kationischen Lipiden komplexiert ist, ins Zytosol gelangt und dort Toll-like Rezeptor-unabhängig die zytosolischen Rezeptoren stimuliert.

Es ist bekannt, dass die Expression der Gene, die für die Rig-like Helikasen codieren, stark durch Interferone induziert wird [102]. Die zwei RNA-Erkennungsrezeptoren Rig-I und Mda5 konnten auch in Mesangialzellen durch Stimulation mit Interferon-beta induziert werden. Vor kurzem wurde nachgewiesen, dass Rig-I bei der Lupusnephritis exprimiert wird [113], einer Krankheitssituation, die mit dem Typ I-Interferonsignaling eng verbunden ist [114, 115].

Nach Prens et al. führt die Vorstimulation menschlicher Keratinozyten mit Interferon-alpha zur deutlichen Verstärkung der poly I:C-RNA-induzierten proinflammatorischen Antwort [116]. Sie konnten ebenfalls zeigen, dass dieser Effekt auf der Expression verschiedener RNA-Rezeptoren, wie dem Toll-like Rezeptor-3, RIG-I, MDA5 und der Protein-Kinase R, beruhte. Von klinischer Bedeutung sind insbesondere ihre Untersuchungen an beschädigter Haut von Psoriasis-Patienten, wo sie einen deutlichen Anstieg der RIG-I- und MDA5-Expression feststellen konnten. Da die Psoriasis eine chronisch-entzündliche Hauterkrankung mit vermehrter Interferon-alpha-Produktion ist, lässt dieser Anstieg darauf schließen, dass auch hierbei das Interferonsignaling eine wesentliche Rolle spielt [116].

Die genauen Unterschiede der Liganden für Rig-I und Mda5 sind allerdings noch nicht bekannt. Es wurde zwar bereits festgestellt, dass Rig-I und Mda5 eine strukturelle Homologie [93] und ein ähnliches Signalingmuster aufweisen [70], dennoch lassen sich unterschiedliche Reaktionen auf verschiedene virale Stimuli zeigen. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Rig-I, nicht aber Mda5, notwendig für die Immunantwort gegen Paramyxoviren, Influenza-Viren und das vesikuläre Stomatitis-Virus ist [55, 92]. Im Gegensatz dazu reagieren Mda5-defiziente Zellen nicht auf eine Infektion mit Picornaviren, wie dem Enzephalo-Myokarditis-Virus oder dem Theiler-Virus [102]. Des Weiteren wurde kürzlich die unterschiedliche Reaktion auf synthetische Liganden beschrieben. Erste

Ergebnisse belegen, dass Mda5 verantwortlich für die Erkennung von poly I:C-RNA ist [92, 117] und dass Rig-I 5'-Triphosphat Einzelstrang-RNA erkennt [118, 119]. Da dies aber noch nicht gänzlich geklärt ist, schreiben wir in der vorliegenden Arbeit die zytoplasmatische Erkennung viraler RNA den Rig-like Helikasen zu ohne genauer darauf einzugehen über welchen Rezeptor die Erkennung letztendlich abläuft.

4.2 Effekte der RNA-Erkennung in Mesangialzellen

Es wurde bereits nachgewiesen, dass virale RNA Mesangialzellen zur Produktion proinflammatorischer Zytokine, wie Interleukin-6, veranlasst [84]. Wir konnten dies bestätigen und zeigten außerdem einen Zeit- und Dosis-Verlauf der mRNA-Expression, der sein Maximum bei einer Stimulation mit 3 µg/ml poly I:C-RNA und nach 3-stündiger Inkubation hatte. Komplexierten wir diese synthetische Doppelstrang-RNA mit kationischen Lipiden, was eine gängige Methode ist, um die RNA ins Zytosol zu bringen, zeigte sich eine ca. 10-fache Interleukin-6-Produktion verglichen mit der alleinigen poly I:C-RNA-Stimulation. Da wir davon ausgehen, dass die RNA-Erkennung bei alleiniger poly I:C-RNA-Stimulation über den Toll-like Rezeptorweg abläuft, die RNA bei Transfektion ins Zytosol hingegen Tlr-unabhängig von den zytoplasmatischen Rezeptoren Rig-I und Mda5 erkannt wird, deutet dies darauf hin, dass die Toll-like Rezeptor-unabhängige Erkennung viraler RNA eine wesentliche größere Rolle bei der Aktivierung von Mesangialzellen spielt als die Toll-like Rezeptor-abhängige. Hierbei ist allerdings zu beachten, dass wir nur die Interleukin-6-Produktion als Marker der Zytokinantwort untersucht haben. In unserem Immunsystem spielen aber wesentlich mehr proinflammatorische Zytokine eine Rolle, über deren Expression wir keine Aussagen machen können. Es wäre ebenfalls denkbar, dass einige dieser Zytokine bei der Toll-like Rezeptor-abhängigen RNA-Erkennung vermehrt produziert werden.

Im Rahmen der angeborenen Immunantwort spielt nicht nur die Produktion von Interleukinen sondern auch die Interferonproduktion eine große Rolle. So wird durch die frühe Produktion von Typ I-Interferonen die virale Replikation in infizierten Zellen gehemmt. Außerdem haben Typ I-Interferone pleiotrophische immunmodulatorische Effekte auf Makrophagen, T-Zellen und natürliche Killerzellen [17, 66]. Die Hauptquelle der Typ I-Interferone sind plasmazytische dendritische Zellen (pDCs) im intravaskulären Kompartiment [120]. Verschiedene virale Komponenten können zur Bildung von Interferonen in pDCs führen. So aktivieren beispielsweise virale Proteine die Toll-like Rezeptoren-2 und -4 an der Zelloberfläche [91]. Im Gegensatz dazu können verschiedene virale Nukleinsäuren Tlrs in intrazellulären Endosomen, z.B. Tlr-3 (dsRNA), Tlr-7/8 (ssRNA) und Tlr-9 (CpG-DNA), aktivieren [91]. Weiterhin kann virale RNA auch im intrazellulären Zytosol erkannt werden. Dies geschieht z.B. über Mda5 (dsRNA) und Rig-I (dsRNA und 5'-Triphosphat RNA) [91-93]. Die Bindung von Liganden an jeden dieser RNA-Erkennungsrezeptoren der angeborenen Immunantwort führt rasch zur

Produktion von Typ I-Interferonen in pDCs. Es ist aber bekannt, dass nicht nur Immunzellen, wie die dendritischen Zellen sondern auch Nicht-Immunzellen, beispielsweise in der nasalen oder buccalen Mukosa, geringe Mengen Interferon-alpha als Antwort auf Viren und andere Pathogene produzieren können. Dies führt in einer parakrinen Weise dazu die Zellen der angeborenen Immunantwort auf eine stärkere Antwort vorzubereiten [121]. Solche Interferon-alpha-Signale von Nicht-Immunzellen der Mukosa können beispielsweise antigenpräsentierende Zellen auf die Zytokinantwort vorbereiten bevor es zu einer Immunstimulation kommt. Dies gewährleistet eine sofortige Kommunikation zwischen den antigenstimulierten Mukosazellen und den Immunzellen der regionalen Lymphknoten.

Wir untersuchten, ob auch Mesangialzellen zur Produktion von Interferon-alpha, -beta und -gamma fähig sind, wenn es zur Bindung von Liganden an diese RNA-Erkennungsrezeptoren kommt. Zunächst stimulierten wir die Mesangialzellen hierfür mit poly I:C-RNA. Hierbei zeigte sich jedoch keine Antwort. Interessanterweise führt die Transfektion von Doppelstrang-RNA ins Zytosol sowohl zur Produktion großer Mengen Interferon-alpha als auch -beta. Die Rolle der durch virale Doppelstrang-RNA ausgelösten lokalen Produktion von Interferon-alpha bei Gewebeschaden wurde kürzlich bei der autoimmunen Pankreas-Inselzell-Entzündung gezeigt [83]. Es wurde beschrieben wie das nach viraler Stimulation gebildete Interferon-alpha zur Hochregulation des MHC-1 in den Beta-Inselzellen des Pankreas führte. Mit Hilfe Typ I-Interferonrezeptor-defizienter Mäuse konnte nachgewiesen werden, dass Interferone für die Entstehung des virusinduzierten Diabetes notwendig sind [83]. Ebenso könnten die von Mesangialzellen produzierten Typ I-Interferone eine wichtige lokale Rolle bei der Entstehung von Glomerulonephritiden spielen. Eine weitere Funktion lokal gebildeter Interferone wurde von Salazar-Mather et al. beschrieben. Sie fanden heraus, dass es in der Leber nach CMV-Infektion zur Produktion von Typ I-Interferonen kommt und dass diese lokal gebildeten Interferone zur Rekrutierung von Makrophagen führen [122]. Warum Mesangialzellen kein Interferon-gamma produzieren, könnte mit den verschiedenen Funktionen, die den Typ I- und Typ II-Interferonen in der Immunität zukommen, zu erklären sein [17].

Neben der Zytokin- und Interferonproduktion sind Proliferation und Apoptose wichtige Mechanismen der angeborenen Immunantwort und spielen eine wesentliche Rolle bei der lokalen Kontrolle viraler Infektionen. Diese untersuchten wir mittels Proliferationsassay und Apoptose-FACS. Hierbei zeigte sich, dass die Stimulation mit poly I:C-RNA in niedrigen Dosierungen zunächst zur Erhöhung der Mesangialzellproliferation führte, die Anzahl proliferierender Zellen jedoch bei hohen Dosen poly I:C-RNA wieder zurückging. Erstaunlicherweise zeigte sich bei Transfektion der RNA ins Zytosol ein Rückgang der Proliferation auch schon bei niedrigen Dosen RNA. Wir führten diesen Rückgang der Proliferation auf ein Sterben der Zellen zurück. Dass dieser Zelltod bei zytosolischer RNA-Erkennung deutlich stärker war, bekräftigte unsere Vermutungen, dass die Toll like Rezeptor-unabhängige Erkennung ein wesentlich stärkeres Gefahrensignal zur Aktivierung von Mesangialzellen darstellt als die Toll like Rezeptor-abhängige Erkennung. Ein Zelltod kann entweder durch Nekrose oder durch

Apoptose erfolgen. Unter Nekrose versteht man den pathologischen Untergang von Zellen, der das Immunsystem und verschiedene Reparationsmechanismen aktiviert, um den Schaden zu begrenzen. Apoptose hingegen ist der programmierte, physiologische Zelltod. Dieser ist ein beabsichtigtes Element der Immunantwort, um eine Ausbreitung des Erregers zu verhindern und somit andere Zellen zu schützen. Im Anschluss daran ist es Ziel des Organismus, die toten Zellen zu beseitigen [123]. Um zu bestätigen, dass es sich bei dem Rückgang der Zellproliferation tatsächlich um einen Zelltod, genauer gesagt um Apoptose handelt, färbten wir die stimulierten Zellen mit Propidium Jodid und Annexin V und führten eine Durchflusszytometrie durch. Lebende Zellen färben sich dabei nicht an, tote Zellen sind PI-positiv, apoptotische Zellen sind Annexin-positiv und PI-negativ und Zellen, die sowohl PI- als auch Annexin-positiv sind, sind entweder schon tot oder befinden sich in später Apoptose. Da diese Durchflusszytometrie mit den Mesangialzellen jedoch schwierig durchzuführen war und sich bei den Färbungen kein eindeutiges Ergebnis zeigte, führten wir das FACS nochmals mit Mesangialzellen durch, die zusätzlich zur viralen RNA noch mit einem Caspase-8-Inhibitor stimuliert wurden. Die Caspase-8 ist ein Bestandteil des Apoptoseweges. Als sich bei den Zellen, die mit poly I:C-RNA plus kationischen Lipiden stimuliert waren und zusätzlich den Caspase-8-Inhibitor enthielten, ein vollständiger Rückgang der toten Zellen auf den Mediums-Ausgangswert zeigte, konnten wir die Schlussfolgerung ziehen, dass der Rückgang der Proliferation tatsächlich auf Apoptose zurückzuführen ist.

4.3 Reaktion der Mesangialzellen auf Interferone

Bislang untersuchten wir die Effekte, die von viraler RNA im Rahmen der angeborenen Immunantwort in Mesangialzellen ausgelöst werden. Diese beinhalten unter anderem auch die Produktion von Typ I-Interferonen. Wir konnten hier zeigen, dass Mesangialzellen zur Produktion von Interferon-alpha und -beta in der Lage sind, was für die glomeruläre Entzündung eine Rolle spielen könnte. Interferone sind sezernierte autokrine und parakrine Proteine, die das intra- und interzelluläre Netzwerk stimulieren, was die Resistenz gegen virale Infektionen reguliert, die angeborene und erworbene Immunantwort verstärkt und das Zellwachstum normaler und tumoröser Zellen beeinflusst [124]. Interferone spielen eine wichtige Rolle in der systemischen Abwehr von Krankheitserregern, beispielsweise bei viralen oder bakteriellen Infektionen, wie der septischen Peritonitis [125]. Interferone können andererseits aber auch proinflammatorisch wirken, z.B. bei der Entstehung und Verschlimmerung von Autoimmunerkrankungen. Die genaue Ursache dieser gegensätzlichen Effekte ist bislang unklar. Es wird angenommen, dass immunmodulatorische Effekte der Interferone in den unterschiedlichen Kontexten verschiedene Wirkungen entfalten und dass außerdem Unterschiede zwischen Interferon-alpha und Interferon-beta bestehen. Des Weiteren sind sie auch bei lokalen Infektionen von Bedeutung. So konnten beispielsweise Johansson et al. zeigen, dass die von

dendritischen Zellen bei intestinaler Reovirusinfektion produzierten Typ I-Interferone lokal direkte antivirale Effekte auf die intestinalen Epithelzellen und verschiedene Stromazellen haben und nötig sind für die lokale Kontrolle der intestinalen Infektion [126]. Katakura et al. beschrieben eine physiologische und protektive Rolle der Typ I-Interferone bei der Kolitis und zeigten eine wichtige Funktion der Interferone bei der intestinalen Homöostase auf [127]. Welche Reaktion die nach viraler Stimulation gebildeten Typ I-Interferone auf Speicheldrüsen-Epithelzellen haben, die für die Entstehung des Sjögren-Syndroms von Bedeutung sind, wurde kürzlich von Ittah et al. beschrieben [128]. Sie fanden heraus, dass es nach Stimulation der Speicheldrüsen-Zellen mit Interferonen zur starken Sekretion des B-Zell-Aktivierungsfaktors (BAFF) kommt [129]. Dieser spielt eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von B-Lymphozyten und könnte für die pathogenetische B-Zell-Aktivierung bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen verantwortlich sein. Außerdem untersuchten sie, ob die BAFF-Expression nach Stimulation der Speicheldrüsenzellen mit poly I:C-RNA und unter Verwendung eines Typ I-Interferonrezeptor-Antikörpers aufgehoben ist. Hierbei zeigte sich allerdings, dass die BAFF-Produktion nur verringert, nicht aber gänzlich aufgehoben war [128]. Dennoch lässt sich sagen, dass Typ I-Interferone eine Rolle bei der lokalen Expression von BAFF in Speicheldrüsen-Epithelzellen spielen. Dies wurde auch für bronchiale Epithelzellen [130], Synovialzellen bei rheumatoider Arthritis [131] und Astrozyten bei multipler Sklerose [132] gezeigt. Welche Rolle lokal produzierte Typ I-Interferone bei der Entstehung des kutanen Lupus erythematodes spielen, untersuchten Wenzel et al. [133]. Sie konnten nachweisen, dass in Hautbiopsien von betroffener Haut im Vergleich zu gesunder Haut vermehrt MxA exprimiert wird, was auf ein Typ I-Interferonsignaling hindeutet. Diese Interferone führen zur Induktion von Chemokinen wie IP-10 oder CXCL-10, welche T-Zellen in die betroffenen Gebiete locken, was die lokale Entzündung fördert [133]. Ebenso wurde bereits beschrieben, dass Interferone *in vivo* die lokale Entzündung und die extrapulmonale Ausbreitung von inhaliertem Bacillus anthracis fördern [134].

Ob und wie Mesangialzellen auf Interferone reagieren können, überprüften wir in den nächsten Versuchen. Zunächst stimulierten wir dazu murine glomeruläre Mesangialzellen mit Interferon- α , - β und - γ und untersuchten die darauf folgende Interleukinproduktion. Hierbei zeigte sich, dass die Typ I-Interferone, Interferon- α und Interferon- β , zur mäßigen Interleukin-6-Produktion führten. Interferon- γ hatte jedoch keine Auswirkungen. Vorstimulation der Mesangialzellen mit den drei Interferonen und nachfolgende Stimulation mit viraler RNA ergab, dass die Interleukinproduktion bei den mit Typ I-Interferonen vorstimulierten Zellen deutlich erhöht war im Vergleich zu den mit Interferon- γ vorstimulierten oder den nicht-vorstimulierten Zellen. Dies könnte dafür sprechen, dass es in entzündlicher Umgebung durch Interferone zur verbesserten und schnelleren Immunantwort kommt. Die Tatsache, dass die Typ II-Interferone keine solchen Reaktionen zeigen, könnte auf die unterschiedlichen Aufgaben der Typ I- und Typ II-Interferone im Rahmen der Immunantwort

zurückzuführen sein [17]. So wird Interferon- γ beispielsweise von natürlichen Killerzellen oder aktivierten T-Zellen im Rahmen der angeborenen Immunantwort produziert [135].

In unserem nächsten Versuch verglichen wir die Expression der RNA-Rezeptoren Tlr-3, Mda5 und Rig-I auf unstimulierten Zellen und auf Zellen, die mit Interferon-beta stimuliert wurden. Hierbei zeigte sich, dass die Stimulation mit Interferon zu deutlich erhöhter Expression aller drei Rezeptoren führte. Dies bestätigt unsere Annahme, dass es in entzündlichem Milieu zur Hochregulation der RNA-Rezeptoren und somit zur verstärkten Immunantwort kommt.

Da hierbei auch die zytosolischen Rezeptoren Mda5 und Rig-I hochreguliert wurden, gingen wir davon aus, dass bei Vorstimulation mit Interferonen und nachfolgender Stimulation mit poly I:C-RNA, komplexiert mit kationischen Lipiden, die Interleukinproduktion in den vorstimulierten Gruppen ebenfalls deutlich ansteigt. Erstaunlicherweise zeigte sich hierbei jedoch ein deutlicher, dosisabhängiger Rückgang der Interleukin-6-Produktion in den mit Interferon- α und - β vorstimulierten Gruppen. Worauf dies zurückzuführen ist, ist uns bislang unklar. Zunächst vermuteten wir, dass es zu einer Überstimulation und somit zur Apoptose gekommen war, gegen diese Vermutung sprach jedoch die Dosisverteilungskurve. Eine andere plausible Erklärung konnten wir bislang nicht finden.

4.4 Existenz einer autokrinen Aktivierung in Mesangialzellen

Wenn dendritische Zellen Interferon-alpha und -beta produzieren, hat das Auswirkungen auf andere Zellen und auf die dendritischen Zellen selbst, beispielsweise in einer autokrin-parakrinen Aktivierung [17, 136]. So kommt es in Interferonrezeptor-defizienten dendritischen Zellen aus dem Knochenmark oder aus Monozyten zu einer wesentlich geringeren Zytokinantwort nach Stimulation mit poly I:C-RNA als in Wildtypzellen [95]. Offensichtlich führt die Sekretion von Typ I-Interferonen in autokriner Weise zur Verstärkung des Interferonsignalings in dendritischen Zellen aus dem Knochenmark oder aus Monozyten. Dieser Mechanismus wurde ebenfalls für Endothel- und Epithelzellen gezeigt [137]. Erstaunlicherweise scheinen plasmazytische dendritische Zellen, die professionellen interferonproduzierenden Zellen, einen anderen Mechanismus der Interferonproduktion zu haben [138, 139]. Es konnte gezeigt werden, dass pDCs kontinuierlich große Mengen des Irf-7 produzieren, was zu einer schnellen und starken Interferonproduktion bei viraler Infektion führt. Im Gegensatz dazu ist die Interferonproduktion in Zellen, die den Irf-7 nicht oder nur in sehr geringem Maße kontinuierlich produzieren, stark vom positiven *Feedback* abhängig, da nur durch dieses der Irf-7 exprimiert wird und es somit zur verstärkten Interferonproduktion kommen kann [140]. Prakash et al. verfolgten die Hypothese, dass der Weg der Infektion bei der Aktivierung verschiedener Zellarten eine Rolle spielt und systemische Infektionen zur effizienten Aktivierung von pDCs führen, während lokale Infektionen nur die betroffenen lokalen Zellen beeinflussen, wobei jedoch eine autokrine Aktivierung für die Interferonproduktion nötig ist. Sie untersuchten die

Auswirkungen einer inhalativen Influenza-Virus-Stimulation auf Wildtyp-Mäuse, verglichen mit Mäusen, die nicht auf Interferone reagieren können, da ihnen entweder das Protein Stat-1 oder der Typ I-Interferonrezeptor fehlte. Hierbei zeigte sich, dass für die lokale respiratorische Immunantwort der positive Verstärkungsmechanismus über den Irf-7 und die Interferonproduktion nötig ist [140].

Unsere Hypothese war, dass derselbe Mechanismus die antivirale Antwort auf Exposition mit viraler Doppelstrang-RNA in Mesangialzellen verstärken kann. Es konnte mittels *real time* RT-PCR gezeigt werden, dass Mesangialzellen den Typ I-Interferonrezeptor exprimieren und mittels ELISA, dass Mesangialzellen dazu fähig sind, Typ I-Interferone zu produzieren. Außerdem zeigten wir, dass Mesangialzellen Interleukin-6 nach Stimulation mit Typ I-Interferonen produzieren und die Anwesenheit von Typ I-Interferonen, nicht jedoch von Typ II-Interferonen, die durch virale Doppelstrang-RNA induzierte Interleukin-6-Antwort verstärkte. Der endgültige Beweis für die Existenz einer autokrinen Aktivierung kam, als wir die intrinsischen Typ I-Interferone mittels neutralisierender Antikörper blockierten und dies zur drastischen Reduktion der auf RNA-Stimulation hin produzierten Interleukin-6-Menge führte. Dieses Ergebnis wurde unter Zuhilfenahme von Typ I-Interferonrezeptor-defizienten Mesangialzellen bestätigt. In diesen Zellen zeigte sich eine deutlich reduzierte Interleukin-6-Produktion im Vergleich zu den Wildtypzellen nach Stimulation mit viraler RNA. Somit konnten wir zeigen, dass virale Doppelstrang-RNA Mesangialzellen zur Produktion von Typ I-Interferonen aktiviert, was wiederum die Produktion proinflammatorischer Zytokine, wie Interleukin-6, in einer autokrin-parakrinen Weise über den Typ I-Interferonrezeptor verstärkt. Wir untersuchten hier jedoch immer die Typ I-Interferone, also Interferon-alpha und Interferon-beta gemeinsam. Yarilina et al. zeigten beispielsweise, dass es in Makrophagen durch Tnf-alpha zur Entstehung einer Interferon-beta-abhängigen autokrinen Aktivierung kommt [141]. Ob in Mesangialzellen eines dieser Interferone eine bedeutendere Rolle spielt oder ob beide Interferone für die autokrine Aktivierung in Mesangialzellen von gleicher Bedeutung sind, lässt sich somit nicht sagen.

Die pathogenetische Relevanz dieser autokrinen Aktivierung für die Glomerulonephritis wurde kürzlich von Jørgensen et al. gezeigt. Sie untersuchten die Produktion antinukleärer Antikörper und die Entstehung von Nierenerkrankungen in B6.Nba2 Mäusen und (B6.Nb2 x NZW)F1 Mäusen, denen der Typ I-Interferonrezeptor fehlte. Hierbei konnten sie zeigen, dass die (B6.Nb2 x NZW)F1 Mäuse, im Gegensatz zu den B6.Nba2 Mäusen, keine Glomerulonephritis entwickelten, obwohl Mäuse beider Gruppen wesentliche glomeruläre Immunkomplexablagerungen hatten [142]. Ihre Schlussfolgerung war, dass die endogenen Typ I-Interferone durch einen lokalen Mechanismus, der ein entzündliches Milieu erzeugt, zur Immunkomplex-Glomerulonephritis beitragen. Diese Daten zeigen die mögliche Relevanz, weitere endogene Aktivatoren für die glomeruläre Typ I-Interferonproduktion zu untersuchen.

Eine weitere mögliche Aufgabe der lokalen Interferonproduktion wurde kürzlich von Fairhurst et al. untersucht [143]. Sie konnten zeigen, dass die von Nierenzellen gebildeten Typ I-Interferone nicht nur die systemische Autoimmunantwort beim Lupus erythematoses beeinflussen, sondern auch lokal zum End-Organ-Schaden bei der durch Autoantikörper vermittelten Lupus-Nephritis führen können.

4.5 Klinische Bedeutung für die Glomerulonephritis

Die Rolle viraler Partikel bei der Aktivierung des Lupus erythematoses und die Möglichkeit der therapeutischen Intervention mittels Typ I-Interferon-Antagonisten wurde bereits beschrieben [144].

Unsere *in vivo* Studien unterstützen das Konzept, Komplexe aus viraler RNA und kationischen Lipiden können eine Glomerulonephritis verstärken und zwar dadurch, dass sie einen Mesangialzelltod (Mesangiolyse) induzieren. Dies zeigt sich im deutlichen Anstieg der Mesangiolyse in den Nierenschnitten von Mäusen, die an einer nephrotoxischen Serumnephritis litten und zusätzlich mit viraler RNA und kationischen Lipiden behandelt wurden, im Gegensatz zu Mäusen, die nur mit viraler RNA behandelt wurden. Außerdem lag der fokale Nekrosescore bei Tieren dieser Gruppe deutlich höher als bei Tieren, die nur mit viraler RNA oder mit dem Vehikel behandelt wurden.

Welche Relevanz die gezeigten Daten der lokalen Typ I-Interferonproduktion für den Menschen haben könnte, zeigt unser letztes Experiment. Wir untersuchten die Interferon-alpha-Expression in Nierenbiopsien an Glomerulonephritis erkrankter Patienten. Ein Teil dieser Patienten litt zusätzlich an einer chronischen Hepatitis C. Hierbei wollten wir unsere *in vitro* Entdeckungen bestätigen, dass es bei viralen Infektionen zur vermehrten Produktion von Typ I-Interferonen kommt und dass diese Interferone lokal in einer autokrin-parakrinen Weise zur Verstärkung der Immunantwort führen, was eine vorbestehende Entzündung verstärken kann. Unserer Hypothese zufolge führen bei der virusassoziierten Glomerulonephritis die auf virale Stimulation hin gebildeten Interferone zur verstärkten Immunantwort und somit zur Verschlimmerung der Glomerulonephritis. Tatsächlich unterstützen unsere Daten der menschlichen Nierenbiopsien die Theorie, dass die lokale Interferon-alpha-Produktion ein Merkmal der mit extrarenalen chronischen Verläufen assoziierten Glomerulonephritis ist. Wir konnten zeigen, dass bei den Hepatitis C-positiven Patienten die Interferon-alpha-Expression signifikant höher ist als bei den Hepatitis C-negativen Patienten. Hierbei ist allerdings zu beachten, dass der Hepatitis C-Nachweis in der Niere nur schwer möglich ist. Bei den von uns verwendeten Biopsien ist gesichert, dass diese Patienten an Hepatitis C leiden. Das bedeutet aber nur, dass das Virus in der Leber nachgewiesen ist, unklar ist, ob das Virus auch in den Nieren vorhanden ist.

Kapitel 5:

Zusammenfassung

5 Zusammenfassung

Virale Infektionen sind nicht selten mit einer vermehrten Aktivität einer vorbestehenden Glomerulonephritis assoziiert. Einige chronische Virusinfektionen können jedoch auch eine *de novo* Glomerulonephritis auslösen. Es ist bekannt, dass virale RNA das Interferonsignaling in dendritischen Zellen über die zytosolischen Rig-like Helikasen Mda5 und Rig-I und über Toll-like Rezeptoren in intrazellulären Endosomen triggern kann. Bisher unklar ist, ob virale RNA auch glomeruläre Mesangialzellen zur Produktion von Typ I-Interferon aktivieren kann, ob Mesangialzellen auf Interferone reagieren und ob dies eine autokrin-parakrine Aktivierung beinhaltet. Mesangialzellen könnten über diesen Mechanismus der angeborenen Immunantwort bei der Entstehung der virusassoziierten Glomerulonephritis mitwirken.

Mesangialzellen exprimieren Rig-I, Mda5 und deren Adaptor Ips-1 sowie den Toll-like Rezeptor-3. Virale RNA induziert die Produktion von Interleukin-6 in Mesangialzellen und führt, wenn sie mit kationischen Lipiden komplexiert ist, Trif-unabhängig zur Produktion großer Mengen Interleukin-6 und Typ I-Interferonen und zum Zelltod. Mesangialzellen produzieren Interleukin-6 nach Stimulation mit Interferon- α und - β . Vorstimulation mit Typ I Interferonen verstärkt die durch virale RNA induzierte Interleukin-6-Produktion in Mesangialzellen. Die virale Doppelstrang-RNA-induzierte Aktivierung von Mesangialzellen beinhaltet eine Typ I-Interferon autokrin-parakrine Aktivierung. Injektionen von Komplexen aus viraler Doppelstrang-RNA und kationischen Lipiden in Mäuse, die an nephrotoxischer Serumnephritis leiden, führen zu massiver Proteinurie und verstärken die fokale Nekrose und Mesangiolyse. Die Hepatitis C-Virus-assoziierte membranproliferative Glomerulonephritis beim Menschen ist assoziiert mit einer erhöhten glomerulären Interferon-alpha-Produktion.

Virale Doppelstrang-RNA veranlasst Mesangialzellen über angeborene RNA-Rezeptoren dazu, große Mengen Interleukin-6 und Typ I-Interferone zu produzieren, vor allem wenn die RNA ins intrazelluläre Zytosol gelangt. Die Typ I-Interferon-Produktion verstärkt sowohl die durch virale RNA induzierte Produktion proinflammatorischer Zytokine als auch den Zelltod in einer positiven autokrinen Aktivierung. Die durch Typ I-Interferone verstärkte Zytokinproduktion und der Zelltod könnten ein wesentliches Element der viral getriggerten glomerulären Entzündung sein (Abbildung 52).

Dieser bisher unbekannt Mechanismus lässt vermuten, dass Typ I-Interferone eine wichtige lokale Rolle bei der virusassoziierten Glomerulonephritis spielen.

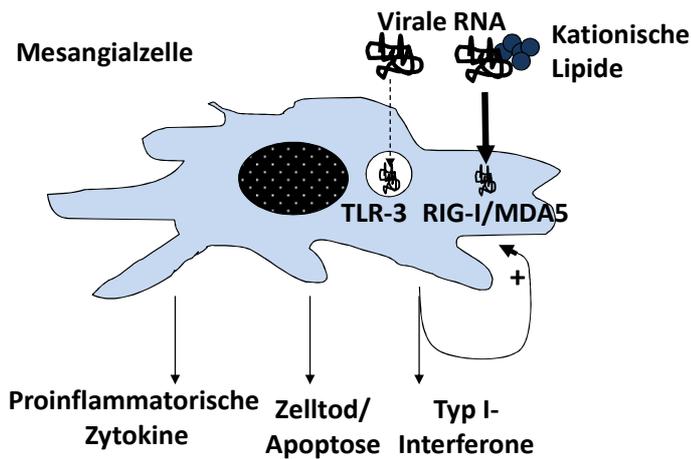


Abbildung 52: Hypothetisches Modell der viralen Doppelstrangerkennung in Mesangialzellen. Diese Grafik illustriert die durch virale Doppelstrang-RNA ausgelöste Antwort in Mesangialzellen. Mesangialzellen können virale RNA in intrazellulären Endosomen über den Tlr-3/Trif-Weg oder im intrazellulären Zytosol über Rig-I oder Mda5 erkennen. Als RNA-induzierte Antwort kommt es zur Produktion proinflammatorischer Zytokine (wie Interleukin-6), zur Produktion von Typ I-Interferonen und dem apoptotischen Zelltod ein. Die zytosolische RNA-Erkennung ist sensitiv in der Erkennung kleiner Mengen viraler RNA und löst eine stärkere Antwort aus. Die Typ I-Interferonaktivierung ist nötig für die Verstärkung der antiviralen Antwort, die von Mesangialzellen getriggert wird.

Kapitel 6:

Literaturangaben

6 Literaturangaben

1. QUASINiere: Qualitätssicherung in der chronischen Nierenersatztherapie (Dialyse und Nierentransplantation). Bericht 2005/2006
2. USRDS: Atlas of End-Stage Renal Disease in the United States, National Institute of Health. . *U.S. Renal Data System*, 2006 Annual Data Report
3. DAGKN: Dialysebehandlung. www.nephrologie.de, *Deutsche Arbeitsgemeinschaft für klinische Nephrologie*, 2006
4. DSO: Deutsche Stiftung Organtransplantation, Koordinierungsstelle Organspende. www.dso.de, 2007
5. Hebert LA, Wilmer WA, Falkenhain ME, *et al.*: Renoprotection: one or many therapies? *Kidney Int* 59:1211-1226, 2001
6. Mathieson PW: Glomerulonephritis: is it worth worrying about? *Clin Med* 5:264-266, 2005
7. Classen M, Diehl V, Kochsiek K: Innere Medizin. *Urban & Fischer*, 2003
8. Böcker W, Denk H, Heitz P: Pathologie. *Urban & Fischer* 3. Auflage, 2004
9. Renz-Polster H, Krautzig S, Braun J: Basislehrbuch Innere Medizin. *Urban & Fischer* 3. Auflage, 2004
10. Vinen CS, Oliveira DB: Acute glomerulonephritis. *Postgrad Med J* 79:206-213; quiz 212-203, 2003
11. Sinico RA, Fornasieri A, Oreni N, *et al.*: Polymeric IgA rheumatoid factor in idiopathic IgA mesangial nephropathy (Berger's disease). *J Immunol* 137:536-541, 1986
12. Winn MP: Approach to the evaluation of heritable diseases and update on familial focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant* 18 Suppl 6:vi14-20, 2003
13. Choi HJ, Lee BH, Cho HY, *et al.*: Familial focal segmental glomerulosclerosis associated with an ACTN4 mutation and paternal germline mosaicism. *Am J Kidney Dis* 51:834-838, 2008
14. di Belgiojoso GB, Ferrario F, Landriani N: Virus-related glomerular diseases: histological and clinical aspects. *J Nephrol* 15:469-479, 2002
15. Glasscock RJ: Immune complex-induced glomerular injury in viral diseases: an overview. *Kidney Int Suppl* 35:S5-7, 1991
16. Lai AS, Lai KN: Viral nephropathy. *Nat Clin Pract Nephrol* 2:254-262, 2006
17. Theofilopoulos AN, Baccala R, Beutler B, *et al.*: Type I interferons (alpha/beta) in immunity and autoimmunity. *Annu Rev Immunol* 23:307-336, 2005
18. Kimmel PL PT: Immune complex glomerulonephritis associated with HIV infection. *Kimmel PL, Berns JS, Stein JH, Eds. Renal and urological aspects of HIV infection, New York: Churchill Livingstone* 77-110, 1995

19. Couser WG: Mechanisms of glomerular injury in immune-complex disease. *Kidney Int* 28:569-583, 1985
20. Golbus SM, Wilson CB: Experimental glomerulonephritis induced by in situ formation of immune complexes in glomerular capillary wall. *Kidney Int* 16:148-157, 1979
21. Conaldi PG, Biancone L, Bottelli A, *et al.*: HIV-1 kills renal tubular epithelial cells in vitro by triggering an apoptotic pathway involving caspase activation and Fas upregulation. *J Clin Invest* 102:2041-2049, 1998
22. Segerer S, Nelson PJ, Schlondorff D: Chemokines, chemokine receptors, and renal disease: from basic science to pathophysiologic and therapeutic studies. *J Am Soc Nephrol* 11:152-176, 2000
23. Glasscock RJ, Cohen AH, Danovitch G, *et al.*: Human immunodeficiency virus (HIV) infection and the kidney. *Ann Intern Med* 112:35-49, 1990
24. Levy M, Chen N: Worldwide perspective of hepatitis B-associated glomerulonephritis in the 80s. *Kidney Int Suppl* 35:S24-33, 1991
25. Lai FM, Lai KN, Tam JS, *et al.*: Primary glomerulonephritis with detectable glomerular hepatitis B virus antigens. *Am J Surg Pathol* 18:175-186, 1994
26. Lai K: Hepatitis B associated renal disease. *Rheumatology and the Kidney* 377:396, 2001
27. Lai KN, Li PK, Lui SF, *et al.*: Membranous nephropathy related to hepatitis B virus in adults. *N Engl J Med* 324:1457-1463, 1991
28. Appel G: Viral infections and the kidney: HIV, hepatitis B, and hepatitis C. *Cleve Clin J Med* 74:353-360, 2007
29. Poland GA, Jacobson RM: Clinical practice: prevention of hepatitis B with the hepatitis B vaccine. *N Engl J Med* 351:2832-2838, 2004
30. Johnson RJ, Gretch DR, Yamabe H, *et al.*: Membranoproliferative glomerulonephritis associated with hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 328:465-470, 1993
31. Kayali Z, Buckwold VE, Zimmerman B, *et al.*: Hepatitis C, cryoglobulinemia, and cirrhosis: a meta-analysis. *Hepatology* 36:978-985, 2002
32. Pawlotsky JM, Ben Yahia M, Andre C, *et al.*: Immunological disorders in C virus chronic active hepatitis: a prospective case-control study. *Hepatology* 19:841-848, 1994
33. Tarantino A, Campise M, Banfi G, *et al.*: Long-term predictors of survival in essential mixed cryoglobulinemic glomerulonephritis. *Kidney Int* 47:618-623, 1995
34. Bourgoignie JJ: Renal complications of human immunodeficiency virus type 1. *Kidney Int* 37:1571-1584, 1990
35. Kimmel PL, Phillips TM, Ferreira-Centeno A, *et al.*: HIV-associated immune-mediated renal disease. *Kidney Int* 44:1327-1340, 1993

36. Eustace JA, Nuernberger E, Choi M, *et al.*: Cohort study of the treatment of severe HIV-associated nephropathy with corticosteroids. *Kidney Int* 58:1253-1260, 2000
37. Welsch U: Lehrbuch Histologie. *Urban & Fischer* 1. Auflage, 2003
38. Prols F, Hartner A, Schocklmann HO, *et al.*: Mesangial cells and their adhesive properties. *Exp Nephrol* 7:137-146, 1999
39. Schlondorff D: The glomerular mesangial cell: an expanding role for a specialized pericyte. *Faseb J* 1:272-281, 1987
40. Vollmar A, Dingermann T, Zündorf I: Immunologie. Grundlagen und Wirkstoffe. *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft*, 2005
41. Creagh EM: TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity. *Trends Immunol* 27, 2006
42. Horn F: Biochemie des Menschen. *Thieme*, 2003
43. Anderson KV, Jurgens G, Nusslein-Volhard C: Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product. *Cell* 42:779-789, 1985
44. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, *et al.*: The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86:973-983, 1996
45. Rock FL, Hardiman G, Timans JC, *et al.*: A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:588-593, 1998
46. Albiger B, Dahlberg S, Henriques-Normark B, *et al.*: Role of the innate immune system in host defence against bacterial infections: focus on the Toll-like receptors. *J Intern Med* 261:511-528, 2007
47. Anders HJ: Innate pathogen recognition in the kidney: Toll-like receptors, NOD-like receptors, and RIG-like helicases. *Kidney Int*, 2007
48. Akira S: TLR signaling. *Curr Top Microbiol Immunol* 311:1-16, 2006
49. Kawai T, Akira S: TLR signaling. *Cell Death Differ* 13:816-825, 2006
50. O'Neill LA, Fitzgerald KA, Bowie AG: The Toll-IL-1 receptor adaptor family grows to five members. *Trends Immunol* 24:286-290, 2003
51. Wang TY, Wang JM, Yao XX: [Trif: A new member of Toll-like receptor-associated signal transduction]. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue* 16:447-448, 2004
52. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, *et al.*: Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 301:640-643, 2003
53. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, *et al.*: Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature* 420:324-329, 2002

54. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, *et al.*: TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat Immunol* 4:1144-1150, 2003
55. Kato H, Sato S, Yoneyama M, *et al.*: Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity* 23:19-28, 2005
56. Yoneyama M, Fujita T: Function of RIG-I-like receptors in antiviral innate immunity. *J Biol Chem* 282:15315-15318, 2007
57. Seth RB, Sun L, Chen ZJ: Antiviral innate immunity pathways. *Cell Res* 16:141-147, 2006
58. Baccala R, Hoebe K, Kono DH, *et al.*: TLR-dependent and TLR-independent pathways of type I interferon induction in systemic autoimmunity. *Nat Med* 13:543-551, 2007
59. Janeway C: Immunobiology. *Garland Science*, 2005
60. Isaacs A, Lindenmann J: Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 147:258-267, 1957
61. Pestka S: Interferon from 1981 to 1986. *Methods Enzymol* 119:3-14, 1986
62. Pestka S: Cloning of the human interferons. *Methods Enzymol* 79:599-601, 1981
63. Pestka S, Langer JA, Zoon KC, *et al.*: Interferons and their actions. *Annu Rev Biochem* 56:727-777, 1987
64. Pestka S: The human interferon alpha species and receptors. *Biopolymers* 55:254-287, 2000
65. Pestka S: The human interferons--from protein purification and sequence to cloning and expression in bacteria: before, between, and beyond. *Arch Biochem Biophys* 221:1-37, 1983
66. Stark GR, Kerr IM, Williams BR, *et al.*: How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* 67:227-264, 1998
67. Pestka S, Krause CD, Walter MR: Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev* 202:8-32, 2004
68. Ozato K, Tsujimura H, Tamura T: Toll-like receptor signaling and regulation of cytokine gene expression in the immune system. *Biotechniques* Suppl:66-68, 70, 72 passim, 2002
69. Rothenfusser S, Goutagny N, DiPerna G, *et al.*: The RNA helicase Lgp2 inhibits TLR-independent sensing of viral replication by retinoic acid-inducible gene-I. *J Immunol* 175:5260-5268, 2005
70. Yoneyama M, Kikuchi M, Matsumoto K, *et al.*: Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *J Immunol* 175:2851-2858, 2005
71. Takeuchi O, Akira S: Recognition of viruses by innate immunity. *Immunol Rev* 220:214-224, 2007
72. Parmar S, Plataniias LC: Interferons: mechanisms of action and clinical applications. *Curr Opin Oncol* 15:431-439, 2003

73. Hengel H, Koszinowski UH, Conzelmann KK: Viruses know it all: new insights into IFN networks. *Trends Immunol* 26:396-401, 2005
74. Pestka S: The interferon receptors. *Semin Oncol* 24:S9-18-S19-40, 1997
75. Pestka S, Kelder B, Familletti PC, *et al.*: Molecular weight of the functional unit of human leukocyte, fibroblast, and immune interferons. *J Biol Chem* 258:9706-9709, 1983
76. Soh J, Donnelly RJ, Kotenko S, *et al.*: Identification and sequence of an accessory factor required for activation of the human interferon gamma receptor. *Cell* 76:793-802, 1994
77. Krause CD, Mei E, Xie J, *et al.*: Seeing the light: preassembly and ligand-induced changes of the interferon gamma receptor complex in cells. *Mol Cell Proteomics* 1:805-815, 2002
78. Takaoka A, Yanai H: Interferon signalling network in innate defence. *Cell Microbiol* 8:907-922, 2006
79. Gresser I: Biologic effects of interferons. *J Invest Dermatol* 95:66S-71S, 1990
80. Tovey MG, Streuli M, Gresser I, *et al.*: Interferon messenger RNA is produced constitutively in the organs of normal individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:5038-5042, 1987
81. Mitani Y, Takaoka A, Kim SH, *et al.*: Cross talk of the interferon-alpha/beta signalling complex with gp130 for effective interleukin-6 signalling. *Genes Cells* 6:631-640, 2001
82. Takaoka A, Mitani Y, Suemori H, *et al.*: Cross talk between interferon-gamma and -alpha/beta signaling components in caveolar membrane domains. *Science* 288:2357-2360, 2000
83. Lang KS, Recher M, Junt T, *et al.*: Toll-like receptor engagement converts T-cell autoreactivity into overt autoimmune disease. *Nat Med* 11:138-145, 2005
84. Patole PS, Grone HJ, Segerer S, *et al.*: Viral double-stranded RNA aggravates lupus nephritis through Toll-like receptor 3 on glomerular mesangial cells and antigen-presenting cells. *J Am Soc Nephrol* 16:1326-1338, 2005
85. Wornle M, Schmid H, Banas B, *et al.*: Novel role of toll-like receptor 3 in hepatitis C-associated glomerulonephritis. *Am J Pathol* 168:370-385, 2006
86. FACSLab UM: Was ist Durchflußzytometrie. <http://www.facslab.toxikologie.uni-mainz.de/zytometrie.jsp>
87. Hoebe K, Du X, Georgel P, *et al.*: Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. *Nature* 424:743-748, 2003
88. Schrijver G, Bogman MJ, Assmann KJ, *et al.*: Anti-GBM nephritis in the mouse: role of granulocytes in the heterologous phase. *Kidney Int* 38:86-95, 1990
89. Vielhauer V, Stavrakis G, Mayadas TN: Renal cell-expressed TNF receptor 2, not receptor 1, is essential for the development of glomerulonephritis. *J Clin Invest* 115:1199-1209, 2005
90. Cohen CD, Frach K, Schlondorff D, *et al.*: Quantitative gene expression analysis in renal biopsies: a novel protocol for a high-throughput multicenter application. *Kidney Int* 61:133-140, 2002

91. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O: Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124:783-801, 2006
92. Kato H, Takeuchi O, Sato S, *et al.*: Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* 441:101-105, 2006
93. Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, *et al.*: The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol* 5:730-737, 2004
94. Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, *et al.*: Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 413:732-738, 2001
95. Gautier G, Humbert M, Deauvieux F, *et al.*: A type I interferon autocrine-paracrine loop is involved in Toll-like receptor-induced interleukin-12p70 secretion by dendritic cells. *J Exp Med* 201:1435-1446, 2005
96. Meyers CM, Seeff LB, Stehman-Breen CO, *et al.*: Hepatitis C and renal disease: an update. *Am J Kidney Dis* 42:631-657, 2003
97. Yasuda Y, Cohen CD, Henger A, *et al.*: Gene expression profiling analysis in nephrology: towards molecular definition of renal disease. *Clin Exp Nephrol* 10:91-98, 2006
98. Lau CM, Broughton C, Tabor AS, *et al.*: RNA-associated autoantigens activate B cells by combined B cell antigen receptor/Toll-like receptor 7 engagement. *J Exp Med* 202:1171-1177, 2005
99. Savarese E, Chae OW, Trowitzsch S, *et al.*: U1 small nuclear ribonucleoprotein immune complexes induce type I interferon in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Blood* 107:3229-3234, 2006
100. Yasuda K, Richez C, Maciaszek JW, *et al.*: Murine dendritic cell type I IFN production induced by human IgG-RNA immune complexes is IFN regulatory factor (IRF)5 and IRF7 dependent and is required for IL-6 production. *J Immunol* 178:6876-6885, 2007
101. Gomez-Guerrero C, Lopez-Armada MJ, Gonzalez E, *et al.*: Soluble IgA and IgG aggregates are catabolized by cultured rat mesangial cells and induce production of TNF-alpha and IL-6, and proliferation. *J Immunol* 153:5247-5255, 1994
102. Takeuchi O, Akira S: MDA5/RIG-I and virus recognition. *Curr Opin Immunol* 20:17-22, 2008
103. Kumar H, Koyama S, Ishii KJ, *et al.*: Cutting edge: cooperation of IPS-1- and TRIF-dependent pathways in poly IC-enhanced antibody production and cytotoxic T cell responses. *J Immunol* 180:683-687, 2008
104. Imaizumi T, Yagihashi N, Hatakeyama M, *et al.*: Expression of retinoic acid-inducible gene-I in vascular smooth muscle cells stimulated with interferon-gamma. *Life Sci* 75:1171-1180, 2004
105. Imaizumi T, Yagihashi N, Hatakeyama M, *et al.*: Upregulation of retinoic acid-inducible gene-I in T24 urinary bladder carcinoma cells stimulated with interferon-gamma. *Tohoku J Exp Med* 203:313-318, 2004

106. Yoshida H, Imaizumi T, Lee SJ, *et al.*: Retinoic acid-inducible gene-I mediates RANTES/CCL5 expression in U373MG human astrocytoma cells stimulated with double-stranded RNA. *Neurosci Res* 58:199-206, 2007
107. Cheng G, Zhong J, Chung J, *et al.*: Double-stranded DNA and double-stranded RNA induce a common antiviral signaling pathway in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:9035-9040, 2007
108. Harada K, Sato Y, Itatsu K, *et al.*: Innate immune response to double-stranded RNA in biliary epithelial cells is associated with the pathogenesis of biliary atresia. *Hepatology* 46:1146-1154, 2007
109. Hirata Y, Broquet AH, Menchen L, *et al.*: Activation of innate immune defense mechanisms by signaling through RIG-I/IPS-1 in intestinal epithelial cells. *J Immunol* 179:5425-5432, 2007
110. Kumar H, Kawai T, Kato H, *et al.*: Essential role of IPS-1 in innate immune responses against RNA viruses. *J Exp Med* 203:1795-1803, 2006
111. Sun Q, Sun L, Liu HH, *et al.*: The specific and essential role of MAVS in antiviral innate immune responses. *Immunity* 24:633-642, 2006
112. Seth RB, Sun L, Ea CK, *et al.*: Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell* 122:669-682, 2005
113. Suzuki K, Imaizumi T, Tsugawa K, *et al.*: Expression of retinoic acid-inducible gene-I in lupus nephritis. *Nephrol Dial Transplant* 22:2407-2409, 2007
114. Crow MK, Kirou KA: Interferon-alpha in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol* 16:541-547, 2004
115. Ronnblom L, Alm GV: An etiopathogenic role for the type I IFN system in SLE. *Trends Immunol* 22:427-431, 2001
116. Prens EP, Kant M, van Dijk G, *et al.*: IFN-alpha enhances poly-IC responses in human keratinocytes by inducing expression of cytosolic innate RNA receptors: relevance for psoriasis. *J Invest Dermatol* 128:932-938, 2008
117. Gitlin L, Barchet W, Gilfillan S, *et al.*: Essential role of mda-5 in type I IFN responses to polyriboinosinic:polyribocytidylic acid and encephalomyocarditis picornavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:8459-8464, 2006
118. Hornung V, Ellegast J, Kim S, *et al.*: 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* 314:994-997, 2006
119. Pichlmair A, Schulz O, Tan CP, *et al.*: RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science* 314:997-1001, 2006
120. Shortman K, Liu YJ: Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* 2:151-161, 2002
121. Tompkins WA: Immunomodulation and therapeutic effects of the oral use of interferon-alpha: mechanism of action. *J Interferon Cytokine Res* 19:817-828, 1999

122. Salazar-Mather TP, Lewis CA, Biron CA: Type I interferons regulate inflammatory cell trafficking and macrophage inflammatory protein 1alpha delivery to the liver. *J Clin Invest* 110:321-330, 2002
123. Kono H, Rock KL: How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunol* 8:279-289, 2008
124. Borden EC, Sen GC, Uze G, *et al.*: Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine. *Nat Rev Drug Discov* 6:975-990, 2007
125. Weighardt H, Kaiser-Moore S, Schlautkotter S, *et al.*: Type I IFN modulates host defense and late hyperinflammation in septic peritonitis. *J Immunol* 177:5623-5630, 2006
126. Johansson C, Wetzel JD, He J, *et al.*: Type I interferons produced by hematopoietic cells protect mice against lethal infection by mammalian reovirus. *J Exp Med* 204:1349-1358, 2007
127. Katakura K, Lee J, Rachmilewitz D, *et al.*: Toll-like receptor 9-induced type I IFN protects mice from experimental colitis. *J Clin Invest* 115:695-702, 2005
128. Ittah M, Miceli-Richard C, Gottenberg JE, *et al.*: Viruses induce high expression of BAFF by salivary gland epithelial cells through TLR- and type-I IFN-dependent and -independent pathways. *Eur J Immunol* 38:1058-1064, 2008
129. Ittah M, Miceli-Richard C, Eric Gottenberg J, *et al.*: B cell-activating factor of the tumor necrosis factor family (BAFF) is expressed under stimulation by interferon in salivary gland epithelial cells in primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Res Ther* 8:R51, 2006
130. Kato A, Truong-Tran AQ, Scott AL, *et al.*: Airway epithelial cells produce B cell-activating factor of TNF family by an IFN-beta-dependent mechanism. *J Immunol* 177:7164-7172, 2006
131. Ohata J, Zvaifler NJ, Nishio M, *et al.*: Fibroblast-like synoviocytes of mesenchymal origin express functional B cell-activating factor of the TNF family in response to proinflammatory cytokines. *J Immunol* 174:864-870, 2005
132. Krumbholz M, Theil D, Derfuss T, *et al.*: BAFF is produced by astrocytes and up-regulated in multiple sclerosis lesions and primary central nervous system lymphoma. *J Exp Med* 201:195-200, 2005
133. Wenzel J, Worenkamper E, Freutel S, *et al.*: Enhanced type I interferon signalling promotes Th1-biased inflammation in cutaneous lupus erythematosus. *J Pathol* 205:435-442, 2005
134. Gold JA, Hoshino Y, Jones MB, *et al.*: Exogenous interferon-alpha and interferon-gamma increase lethality of murine inhalational anthrax. *PLoS ONE* 2:e736, 2007
135. Shi FD, Van Kaer L: Reciprocal regulation between natural killer cells and autoreactive T cells. *Nat Rev Immunol* 6:751-760, 2006
136. Honda K, Sakaguchi S, Nakajima C, *et al.*: Selective contribution of IFN-alpha/beta signaling to the maturation of dendritic cells induced by double-stranded RNA or viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:10872-10877, 2003

137. Tissari J, Siren J, Meri S, *et al.*: IFN-alpha enhances TLR3-mediated antiviral cytokine expression in human endothelial and epithelial cells by up-regulating TLR3 expression. *J Immunol* 174:4289-4294, 2005
138. Honda K, Yanai H, Mizutani T, *et al.*: Role of a transductional-transcriptional processor complex involving MyD88 and IRF-7 in Toll-like receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:15416-15421, 2004
139. Kawai T, Sato S, Ishii KJ, *et al.*: Interferon-alpha induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6. *Nat Immunol* 5:1061-1068, 2004
140. Prakash A, Smith E, Lee CK, *et al.*: Tissue-specific positive feedback requirements for production of type I interferon following virus infection. *J Biol Chem* 280:18651-18657, 2005
141. Yarilina A, Park-Min KH, Antoniv T, *et al.*: TNF activates an IRF1-dependent autocrine loop leading to sustained expression of chemokines and STAT1-dependent type I interferon-response genes. *Nat Immunol* 9:378-387, 2008
142. Jorgensen TN, Roper E, Thurman JM, *et al.*: Type I interferon signaling is involved in the spontaneous development of lupus-like disease in B6.Nba2 and (B6.Nba2 x NZW)F(1) mice. *Genes Immun* 8:653-662, 2007
143. Fairhurst AM, Xie C, Fu Y, *et al.*: Type I interferons produced by resident renal cells may promote end-organ disease in autoantibody-mediated glomerulonephritis. *J Immunol* 183: 6831-6838, 2009
144. Anders HJ: Pseudoviral immunity - a novel concept for lupus. *Trends Mol Med*, Nov 2009

Abkürzungsverzeichnis

APS, APES	Ammoniumpersulfat
ACE	<i>Angiotensin-converting enzyme</i>
BAFF	B-Zell-Aktivierungsfaktor
BKV	Polyoma-Virus BK
BSA	Bovines Serum-Albumin
cAMP	Zyklisches Adenosin-Mono-Phosphat
CARD	Caspase-Rekrutierungs-Domäne
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cGMP	Zyklisches Guanosin-Mono-Phosphat
CH ₃ COONa	Natriumacetat
CL	Kationisches Lipid
CMV	Zytomegalie-Virus
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanosin
DEPC	Diethyl-Pyrocbonat
dl	Deziliter
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
dsRNA	Doppelstrang-Ribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EBV	Eppstein-Barr-Virus
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
Fab	<i>Fragment antigen binding</i>
FBS	Fötales bovines Serum
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
Fc	<i>Fragment crystallizable</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i> , fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isocyanat
GBM	Glomeruläre Basalmembran
GN	Glomerulonephritis
h	Stunde
HBV, HCV	Hepatitis B-Virus, Hepatitis C-Virus
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HIVAN	HIV-assoziierte Nephropathie

HSV	Herpes simplex-Virus
IFN	Interferon
IFNAR	Interferon-alpha-Rezeptor
IgA	Immunglobulin A
IgM	Immunglobulin M
IKK ϵ /i	I κ B Kinase ϵ /i
IL	Interleukin
IPS	<i>Interferon-β promoter stimulator</i>
IRAK	IL-1 Rezeptor-assoziierte Kinase
IRF	Interferonregulierender Faktor
ISGF	<i>Interferon-stimulated gene factor</i>
ISRE	<i>Interferon-stimulated response element</i>
ITS	Insulin-Transferrin-Sodium Selenite
JAK	Janus-aktivierte Kinase
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
k.o.	Knock out
LGP	<i>Laboratory of genetics and physiology</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	<i>Leucin-rich repeat</i> , leucinreiche Wiederholungen
MAL	<i>MyD88 adaptor-like protein</i>
MAVS	<i>Mitochondrial antiviral signaling protein</i>
MDA	<i>Melanoma differentiation-associated gene</i>
mg	Milligramm
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
μ g	Mikrogramm
ml	Milliliter
MMTV	<i>Mouse mammary tumor virus</i> , Maus-Mammatumovirus
MPGN	Membranoproliferative Glomerulonephritis
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response gene 88</i>
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
Na ₂ HPO ₄	di-Natriumhydrogenphosphat
NDV	<i>Newcastle disease virus</i>
nm	Nanometer
NOD	<i>Nucleotide oligomerisation domain</i>

OD	Optische Dichte
PAMP	<i>Pathogen associated molecular pattern</i> , Musterstruktur
PAS	<i>Periodic acid Schiff</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> , Phosphat-gepuff. Kochsalz
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Ketten-Reaktion
pDC	Plasmozytische dendritische Zelle
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidium Jodid
pI:C	poly I:C
PKR	Protein-Kinase R
PRD	<i>Positive regulatory domain</i>
PRD-LE	<i>PRD-like element</i>
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i> , Mustererkennungsmolekül
PS	Penicillin/Streptomycin
RICK	<i>Rip-like interacting CLARP kinase</i>
RIG	<i>Retinoic acid-inducible gene</i>
RSV	<i>Respiratory syncytial virus</i>
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
SeV	Sendai-Virus
SMA	<i>Smooth muscle actin</i>
ssRNA	Einzelstrang-RNA
STAT	<i>Signal transducers and activators of transcription</i>
TBK	<i>TANK-binding kinase</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TICAM	<i>TIR-containing adaptor molecule</i>
TIR	<i>Toll/interleukin-1 receptor</i>
TIRAP	<i>TIR domain-containing adaptor protein</i>
TIRP	<i>TIR-containing protein</i>
TLR	Toll-like Rezeptor
TRAM	<i>TRIF-related adaptor molecules</i>
TRIF	<i>TIR domain-containing adaptor protein inducing IFN-β</i>
VISA	<i>Virus-induced signaling adaptor</i>
VSV	<i>Vesicular stomatitis virus</i>
WHO	<i>World health organisation</i> , Weltgesundheitsorganisation

Danksagung

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei meinem Doktorvater und Betreuer, Professor Dr. Hans-Joachim Anders, der mich in das wissenschaftliche Arbeiten eingeführt hat, mir ein neues Teilgebiet der Medizin aufgezeigt hat, mir immer wieder das Ziel vor Augen geführt hat und mir die Möglichkeit gab, mein Projekt bei verschiedenen Gelegenheiten vorzustellen. Danke für die vielen gemeinsamen Gespräche, die neuen Ideen und Vorschläge und das schnelle Beantworten aller Fragen.

Danke auch an Dr. Daniel Zecher, der mir sein Projekt überließ und mich in den ersten Wochen mit viel Geduld in meine neuen Aufgaben eingearbeitet hat.

Mein Dank gilt auch dem „Graduiertenkolleg 1202“, sowohl für die finanzielle Unterstützung als auch für die Möglichkeit mit den anderen Teilnehmern über mein Projekt zu diskutieren und somit hilfreiche Tipps für das weitere Vorgehen zu bekommen.

Mein besonderer Dank gilt der gesamten Arbeitsgruppe: danke für die vielen nützlichen Ratschläge mein Projekt und die Laborarbeit betreffend, danke für die Hilfe im Umgang mit dem Computer, danke für die gemeinsamen Diskussionen und die unzähligen aufmunternden Worte, die das Arbeiten auch am Wochenende angenehm werden ließen.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Hörrlein und meinem Papa, die meine Arbeit mit viel Geduld und Ausdauer Korrektur gelesen haben und mich noch auf einige Fehler hinweisen konnten.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die mir, obwohl sie von der Thematik wenig verstanden haben, immer mit offenem Ohr zuhörten und die mich in schwierigen Phasen immer wieder ermutigten, weiter zu machen.