

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. Martin Reincke

**Expression von Regulatoren der angeborenen Immunität in  
menschlichem und murinem Gewebe, bei gram-negativen  
Infektionen sowie beim akuten und chronischen Nierenschaden**

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

vorgelegt von

Roman Günthner  
aus Schongau

2016



Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Hans-Joachim Anders

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Ralph Mocikat  
Prof. Dr. Walter Hofmann  
Prof. Dr. Tomas Hoffmann

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. hum. biol. Maciej Lech

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 30.06.2016

Die vorliegende Arbeit wurde von Februar 2012 bis Juli 2013 am Nephrologischen Zentrum der Medizinischen Klinik IV des Universitätsklinikums der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt. Die Arbeit wurde betreut von Herrn Prof. Dr. med. Hans-Joachim Anders und Herrn Dr. hum. biol. Maciej Lech.

### **Förderung des Projekts**

Diese Arbeit wurde durch das Graduiertenkolleg 1202 „Oligonukleotide in Zellbiologie und Therapie“ der Deutschen Forschungsgemeinschaft unter Leitung von Prof. Dr. Stefan Endres gefördert.

### **Aus dem Promotionsprojekt ging folgende Originalarbeit hervor:**

Günthner, R., Kumar, V.R., Lorenz, G., Anders, H.J., und Lech, M.

*Pattern-recognition receptor signaling regulator mRNA expression in humans and mice, and in transient inflammation or progressive fibrosis.*

International Journal of Molecular Sciences, 2013, 18124-18147

## **Eidesstattliche Versicherung**

Ich, Roman Günthner, erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Expression von Regulatoren der angeborenen Immunität in menschlichem und murinem Gewebe, bei gram-negativen Infektionen sowie beim akuten und chronischen Nierenschaden**

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München,

## Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	2
1.1.	Akutes Nierenversagen und chronische Nierenerkrankung.....	2
1.2.	Sepsis und Endotoxintoleranz.....	5
1.3.	Abwehrmechanismen des Körpers gegen Pathogene .....	6
1.4.	Das angeborene Immunsystem .....	8
1.5.	Mustererkennungsrezeptoren.....	8
1.5.1.	Entdeckung und Struktur von Toll-like Rezeptoren .....	9
1.5.2.	Signalweg und Funktion am Beispiel von Toll-like Rezeptor 4.....	13
1.5.3.	Andere Mustererkennungsrezeptoren .....	15
1.6.	Kontrolle des angeborenen Immunsystems durch Negativregulatoren .....	16
1.6.1.	A20, CYLD DUBA und TANK .....	16
1.6.2.	SIGIRR, ST2 und CD180 .....	18
1.6.3.	SOCS1 und SOCS3 .....	19
1.6.4.	SHIP, SHP1 und SHP2 .....	20
1.6.5.	IRAK-M, DOK1, DOK2 und TOLLIP.....	21
1.6.6.	IRF4, SIKE, NLRX1 und Clec4a2 .....	22
1.6.7.	ERBIN und CENTB1 .....	23
1.7.	Unterschiede zwischen Maus und Mensch.....	24
1.8.	Zielsetzung und Hypothese.....	25
2.	Material und Methoden .....	28
2.1.	Material.....	28
2.1.1.	Geräte.....	28
2.1.2.	Chemikalien .....	29
2.1.3.	Zellkultur.....	30
2.1.4.	Blutentnahme und PBMC-Isolation.....	30
2.1.5.	Molekularbiologie.....	31
2.1.6.	Tierhaltung und Tiermodelle .....	32
2.1.7.	Histologie.....	32
2.2.	Methoden .....	33
2.2.1.	Murine Organentnahme .....	33
2.2.2.	Humane cDNA-Gewinnung.....	33
2.2.3.	Ischämie Reperusionsmodell der murinen Niere.....	35

2.2.4.	Isolation und Stimulation von PBMCs .....	36
2.2.5.	RNA-Isolation.....	38
2.2.6.	cDNA-Synthese .....	39
2.2.7.	RT-PCR .....	40
2.2.8.	Auswahl der Primer .....	43
2.2.9.	ELISA .....	47
2.2.10.	PAS-Färbung und immunhistochemische Färbungen .....	47
3.	Ergebnisse.....	50
3.1.	Negativregulatoren unterscheiden sich zwischen Maus und Mensch.....	50
3.1.1.	Expression in humanen Organen .....	51
3.1.2.	Expression in murinen Organen und Interspeziesvergleich.....	52
3.2.	Negativregulatoren werden im Rahmen von Infektionen induziert.....	56
3.3.	Akuter Nierenschaden führt zu Inflammation und induzierten Negativregulatoren	60
3.3.1.	Immunzellmigration und Regeneration nach 5 Wochen .....	60
3.3.2.	Verstärkte Expression von Negativregulatoren beim akuten Nierenschaden...	62
3.4.	Induktion von Negativregulatoren beim chronischen Nierenschaden.....	63
3.4.1.	Langzeitige renale Ischämie führt zu vermehrter Fibrose .....	64
3.4.2.	Expression von Negativregulatoren ist abhängig von der Ischämiedauer .....	66
4.	Diskussion .....	70
4.1.	Negativregulatoren bei Mensch und Maus .....	70
4.2.	Negativregulatoren und Sepsis .....	72
4.3.	Negativregulatoren und akutes Nierenversagen .....	77
4.4.	Negativregulatoren und chronisches Nierenversagen.....	80
4.5.	Limitationen der Studie.....	82
5.	Zusammenfassung .....	84
6.	Abkürzungsverzeichnis .....	88
7.	Danksagung .....	92
8.	Literaturverzeichnis.....	94



**Kapitel 1:**  
**Einleitung**

## 1. Einleitung

### 1.1. Akutes Nierenversagen und chronische Nierenerkrankung

Der akute Nierenschaden stellt ein großes intensivmedizinisches Problem dar. Bis zu 67 % der Patienten, die auf Intensivstationen aufgenommen werden, erleiden einen mehr oder weniger starken, akuten Nierenschaden.<sup>3</sup> Darüber hinaus haben bereits moderate Ausprägungen der Erkrankung signifikante Auswirkungen auf Mortalität und Dauer bzw. Kosten des Krankenhausaufenthalts. Das akute Nierenversagen ist ein Krankheitsbild, das durch eine rasche Abnahme der Exkretionsfunktion der Niere, innerhalb von Tagen oder sogar Stunden, charakterisiert ist. Zusätzlich kommt es zu erhöhten Kalium- und Phosphatspiegeln, verringerter Urinausscheidung und zur Anhäufung von Stoffwechselprodukten wie Harnstoff und Kreatinin.<sup>4,5</sup> Für die Diagnosestellung stehen mehrere Klassifikationssysteme zur Verfügung. Neben den etwas älteren RIFLE- und AKIN-Kriterien<sup>6,7</sup> enthalten die KDIGO-Leitlinien die aktuellsten Kriterien. Letztere berücksichtigen nur den Serumkreatininspiegel und die Urinausscheidung. Somit kann ein akuter Nierenschaden diagnostiziert werden, wenn mindestens eine der folgenden Bedingungen erfüllt ist:

Anstieg der Serumkreatininkonzentration um 0,3 mg/dl oder mehr innerhalb von 48 Stunden, sofern ein Volumenmangel zuvor adäquat ausgeglichen wurde;

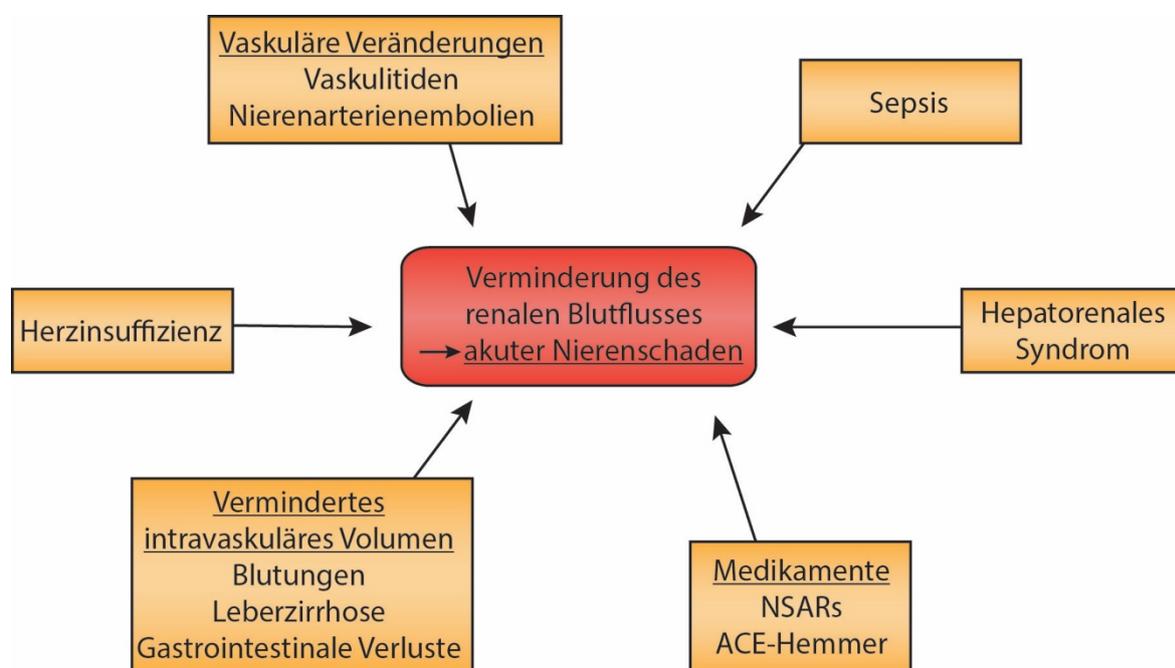
Anstieg der Serumkreatininkonzentration auf das 1,5-fache des Basalwertes innerhalb von 7 Tagen;

Urinausscheidung von weniger als 0,5 ml/kg/h innerhalb von 6 Stunden.<sup>8</sup>

Die therapeutischen Möglichkeiten sind begrenzt und umfassen zunächst nur die Sicherstellung eines suffizienten Kreislaufs, ausreichender Oxygenierung und Energiezufuhr sowie eine intensive Überwachung der Urinausscheidung, der Elektrolytspiegel und des Serumkreatinins. Letztendlich bleibt bei drastischen Veränderungen des Elektrolyt-, Säure-Basen- oder Wasserhaushalts nur eine notfallmäßige Nierenersatztherapie, um den Patienten vor den potentiell letalen Komplikationen zu bewahren.<sup>8</sup>

Das akute Nierenversagen lässt sich in eine prärenale, renale und postrenale Form einteilen. Während postrenale Formen durch eine Obstruktion der ableitenden Harnwege bedingt sind, umfassen renale Ursachen vor allem akute Glomerulonephritiden und nephrotoxische Medikamente wie z.B. einige Antibiotika oder Kontrastmittel.<sup>9</sup> Das prärenale Nierenversagen hingegen beruht auf einer Ischämie des Nierenparenchyms und stellt in modernen Ländern

bzw. bei hospitalisierten Patienten die häufigste Ätiologie dar.<sup>4</sup> Die Entstehung verläuft meist sekundär durch andere Erkrankungen wie Hypovolämie, Herzinsuffizienz, Sepsis oder Anaphylaxie.<sup>9</sup> (Abbildung 1) Durch die Minderdurchblutung der Niere kommt es zum Gewebeschaden und nachfolgend zu einer Entzündungsreaktion.<sup>10</sup> Hierbei spielen das angeborene Immunsystem und insbesondere Mustererkennungsrezeptoren wie *Toll-like Rezeptoren* (TLRs) eine wichtige Rolle.<sup>11,12</sup> Sie können durch Pathogenbestandteile, jedoch auch durch endogene Gefahrensignale wie z.B. dem Molekül HMGB1 aus nekrotischen Zellen aktiviert werden.<sup>13</sup> Die Bindung dieser Liganden an Mustererkennungsrezeptoren führt zur Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen und Immigration von Immunzellen.<sup>14</sup> Dadurch kann einerseits die Geweberegeneration gefördert werden, andererseits kommt es auch im großen Ausmaß zu einer Vernarbung und Destruktion des Nierenparenchyms.<sup>2,15</sup> Ein großes medizinisches und ökonomisches Problem stellt das chronische Nierenversagen dar. Zwei bis drei Prozent der jährlichen Kosten in Gesundheitssystemen entwickelter Länder werden durch die Behandlung von Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz verursacht. Wenn man bedenkt, dass diese Patientengruppe nur 0,02-0,03 % der Bevölkerung ausmacht, ist hier von einer extremen Belastung des Gesundheitssystems auszugehen.<sup>16</sup>



**Abbildung 1: Genese des ischämischen Nierenversagens. Nach Bonventre 2011<sup>17</sup>**

Eine Vielzahl von Erkrankungen und Faktoren beeinflussen auf verschiedene Art und Weise die Durchblutung der Niere. Kann die Sauerstoffversorgung der Zellen nicht mehr aufrechterhalten werden, kommt es zum akuten Schaden des Nierenparenchyms.

Definiert wird die chronische Nierenerkrankung durch eine mehr als 3 Monate bestehende Einschränkung von Struktur oder Funktion der Nieren. Dazu gehört z.B. ein Abfall der glomerulären Filtrationsrate (GFR) auf unter 60 ml/min/ 1,73 m<sup>2</sup> Körperoberfläche oder das Vorhandensein einer Albuminurie über 30 mg Albumin/g Kreatinin im Urin. Es können jedoch auch strukturelle Veränderungen, wie z.B. Abnormitäten in einem Nierenbiopsat, Ausdruck einer chronischen Nierenerkrankung sein.<sup>18</sup> Letztendlich kommt es bei jeder chronischen Nierenerkrankung zur Schädigung und Verlust von Nephronen, die für die Funktion der Niere essentiell sind.

Die Einteilung und Stadienbeschreibung, die vor allem für die weitere Prognose des Patienten wichtig ist, erfolgt anhand von drei Kriterien: Die GFR, das Ausmaß der Albuminurie und die zugrundeliegende Ursache für die entstandene Niereninsuffizienz. Je nach Ausprägung können hierbei sechs Stadien bezüglich der GFR und drei Stadien bezüglich der Albuminurie unterschieden werden. (Tabelle 1) Bei einer glomerulären Filtrationsrate von unter 15 ml/min pro 1,73 m<sup>2</sup> Körperoberfläche wird von einer terminalen Niereninsuffizienz gesprochen.<sup>18</sup> Wie jedes Organversagen führt der chronische Nierenschaden langfristig zu Komplikationen. Die verminderte Ausscheidung von Flüssigkeit bewirkt eine Volumenüberladung. Weiterhin entsteht bei der Vielzahl der Patienten eine arterielle Hypertonie, was zu einem großen Teil zur hohen kardiovaskulären Komplikationsrate der Erkrankung beiträgt.<sup>19</sup> Die Veränderungen im Mineralhaushalt umfassen vor allem Hyperkaliämie, Hyperphosphatämie und Hypokalzämie. Es wird auch die Entstehung eines sekundären Hyperparathyroidismus gefördert, wodurch es zur Osteopenie mit Neigung zu Frakturen kommt.<sup>20</sup> Die chronische Niereninsuffizienz beeinträchtigt auch die Bildung des körpereigenen Hormons Erythropoetin, das die Proliferation von Erythrozytenvorstufen im Knochenmark stimuliert. Folglich kommt es zur Ausbildung einer renalen Anämie.<sup>20</sup> Selbstverständlich sind akutes und chronisches Nierenversagen eng miteinander verstrickt. So führt ein akuter Nierenschaden in vielen Fällen zur Entwicklung einer chronischen Nierenerkrankung. Genauso ist die chronische Erkrankung ein Risikofaktor für die Entstehung des akuten Nierenversagens.<sup>21</sup>

**Tabelle 1: Einteilung der chronischen Nierenerkrankung nach KDIGO.<sup>18</sup>**

			Albuminurie in mg Albumin/ g Kreatinin im Urin		
			A1 < 30	A2 30-300	A3 >300
GFR in ml/min/1,73m <sup>2</sup>	G1	> 90	G1A1	G1A2	G1A3
	G2	60-89	G2A1	G2A2	G2A3
	G3a	45-59	G3aA1	G3aA2	G3aA3
	G3b	30-44	G3bA1	G3bA2	G3bA3
	G4	15-29	G4A1	G4A2	G4A3
	G5	< 15	G5A1	G5A2	G5A3

**GFR = glomeruläre Filtrationsrate**

Therapeutisch versucht man, wie beim akuten Nierenversagen, den Flüssigkeits- und Elektrolythaushalt in den Griff zu bekommen, was oft nur mit Hilfe einer Nierenersatztherapie möglich ist. Darüber hinaus wird eine renale Anämie mit Erythropoetin behandelt und durch Einsatz von Phosphatbindern der sekundäre Hyperparathyroidismus abgeschwächt.<sup>20</sup>

## 1.2. Sepsis und Endotoxintoleranz

Die Sepsis ist ein Krankheitsbild, das trotz einer Vielzahl an therapeutischen Möglichkeiten auch heutzutage eine nicht selten unbeherrschbare Situation auf Intensivstationen darstellt. Durchschnittlich beträgt die Letalität 40% bis 50%, selbstverständlich variierend je nach Schwere der Erkrankung des Patienten.<sup>22</sup> Auch im Fall einer erfolgreichen Behandlung kommt es oft zu Komplikationen wie z.B. neurologischen Folgeschäden und akutem Nierenversagen.<sup>23</sup> Die Diagnose umfasst sowohl klinische, als auch laborchemische Parameter. Dazu gehören der klinische oder mikrobiologische Nachweis einer Infektion und das Vorliegen eines „*Systemic Inflammatory Response Syndroms*“ (SIRS) durch Erfüllung mindestens zwei der folgenden Kriterien: Körpertemperatur > 38°C oder kleiner 36°C; Atemfrequenz > 20/min oder pCO<sub>2</sub> < 32mmHg; Herzfrequenz > 90/min; Leukozytenzahl im Blut > 12000/μl oder < 4000/μl.<sup>24</sup>

Eine Schlüsselrolle bei der Entstehung der Sepsis spielen Mustererkennungsrezeptoren.<sup>25</sup> Es kommt nach deren Aktivierung durch pathogene Bestandteile zu einer Ausschüttung einer

Vielzahl entzündlicher Zytokine. Dies führt beim Patienten zur Entstehung einer hyperinflammatorischen Phase mit klinischen Entzündungssymptomen, wie z.B. Fieber. Gleichzeitig schüttet der Körper antiinflammatorische Zytokine aus, die im Verlauf zur Entwicklung einer immunsuppressiven Phase beitragen, die auch als „*Compensatory Anti-Inflammatory Response Syndrom*“ (CARS) bekannt ist. Dies bedingt häufig die Entstehung von lebensgefährlichen Infektionen mit Krankenhauskeimen wie *Staphylococcus aureus* oder opportunistischen Keimen wie *Candida albicans*.<sup>26</sup>

Ein weiterer Erklärungsansatz für eine derart ausgeprägte Immunsuppression umfasst das Konzept der sogenannten Endotoxintoleranz. Dabei handelt es sich klassischerweise um das Phänomen, dass Monozyten, die mit dem Bakterienbestandteil Lipopolysaccharid (LPS) vorstimuliert wurden, nach erneuter Stimulation mit LPS eine abgeschwächte Entzündungsreaktion im Vergleich zu nicht vorstimulierten Zellen zeigen. Diese Beobachtung konnte bereits mehrfach an menschlichen, wie auch murinen Monozyten nachgewiesen werden.<sup>27</sup> Darüber hinaus zeigen Monozyten, die aus dem Blut von Sepsispatienten isoliert wurden, dasselbe Phänomen.<sup>28</sup>

Therapeutisch stehen bei der Sepsis in erster Linie die kalkulierte und später die spezifische Gabe eines Antibiotikums gegen den Krankheitserreger im Vordergrund. Weiterhin ist eine adäquate Versorgung mit intravenösen Flüssigkeiten und Volumenexpandern von Nöten, damit eine suffiziente Perfusion der Organe sichergestellt werden kann. Sollte der Kreislauf trotz dieser Maßnahmen instabil werden, bleiben schließlich noch der Einsatz von Vasopressoren wie Noradrenalin und Adrenalin.<sup>22</sup>

Interessanterweise besteht eine mögliche Alternativtherapie in der Gabe von Cortisol, um den relativen Glucocorticoidmangel beim schweren septischen Schock auszugleichen und überhöhte Entzündungsantworten zu dämpfen.<sup>29</sup> Kurzfristig kann durch kleine Dosen eine Besserung erreicht werden, die darauf beruht, dass der Blutdruck gesteigert werden kann und so eine ausreichende Blutversorgung der Organe herbeigeführt wird.<sup>30</sup>

### **1.3. Abwehrmechanismen des Körpers gegen Pathogene**

Jeder Mensch setzt sich tagtäglich unbewusst einer Vielzahl von Krankheitserregern wie Bakterien, Viren und Pilzen aus. Das Immunsystem eines jeden Menschen hat die Aufgabe zu verhindern, dass diese Mikroorganismen dem Körper Schaden zufügen. Es kann grob in das angeborene und in das adaptive Immunsystem eingeteilt werden. Letzteres wird auch als das erworbene Immunsystem bezeichnet.<sup>31</sup>

Die Reaktion des Körpers auf eine Infektion lässt sich vereinfacht in drei Teile untergliedern. Kurz nach der Infektion kommt es durch Strukturen des angeborenen Immunsystems zur unspezifischen Erkennung von potentiell pathogenen Erregern, und folglich zur sofortigen Entzündungsreaktion und ersten möglichen Beseitigung des Erregers.<sup>31</sup> Nach vier Stunden setzt eine weitere Reaktion des angeborenen Immunsystems ein, die durch die Anlockung und Aktivierung von Effektorzellen, wie z.B. Makrophagen gekennzeichnet ist.<sup>31</sup> Erst 96 Stunden nach der Primärinfektion kommt es allmählich zur adaptiven Immunantwort mit der klonalen Expansion von Lymphozyten, die spezifisch gegen den Krankheitserreger gerichtet sind.<sup>31</sup> (Abbildung 2) Dabei spielen antigen-präsentierende Zellen wie z.B. dendritische Zellen eine wichtige Rolle, indem sie kleinere Fragmente der Erregermoleküle auf ihrer Oberfläche exponieren und so Lymphozyten aktivieren können. Durch CD4-positive T-Zellen werden dann die Entzündungsvorgänge weiter vorangetrieben und durch CD8-positive T-Zellen werden von Pathogenen befallene Zellen gezielt eliminiert.<sup>31</sup> Im weiteren Verlauf kommt es durch B-Zellen zur Synthese von Antikörpern, die spezifisch gegen den Krankheitserreger gerichtet sind und somit eine endgültige Beseitigung des Erregers bewirken können.<sup>31</sup>



**Abbildung 2: Vereinfachte Darstellung der Abläufe des angeborenen und adaptiven Immunsystems in Folge einer Infektion. (nach Janeway et al)<sup>31</sup>**

## 1.4. Das angeborene Immunsystem

Bevor ein Krankheitserreger den Körper infizieren und ihm damit Schaden zufügen kann, müssen zuerst die diversen Barrieren des angeborenen Immunsystems überwunden werden. Das Erste dieser Hindernisse wird durch die inneren und äußeren Epithelien gebildet. Durch feste Zell-Zellverbindungen, die auch *tight junctions* genannt werden, kann an allen Oberflächen des Körpers ein mehr oder weniger effektiver Schutz gewährleistet werden. Sollte es trotzdem zum Eindringen von Pathogenen kommen, können diese unspezifisch von Mustererkennungsrezeptoren gebunden werden. Durch die Bindung wird eine intrazelluläre Signalkaskade in Gang gesetzt, die eine Entzündungsreaktion mit der Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen einleitet. Durch die Wirkung dieser Zytokine und der angelockten Immunzellen kann somit eine schnelle Bekämpfung des Erregers erfolgen. Klinisch kommt es in der Folge zur Ausbildung der Kardinalzeichen einer Entzündung: *dolor* (Schmerz), *calor* (Überwärmung), *rubor* (Rötung), *tumor* (Schwellung) und *functio laesa* (eingeschränkte Funktion). Die Erkennung der Pathogene durch Mustererkennungsrezeptoren findet hauptsächlich in Immunzellen wie Monozyten, Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, dendritischen Zellen und Lymphozyten statt. Jedoch sind auch Epithelzellen in Darm, Niere und Leber mit Mustererkennungsrezeptoren ausgestattet.<sup>32</sup>

Ein weiterer Mechanismus der Pathogenerkennung ist das Komplementsystem. Es ist ein System aus Plasmaproteinen, das entweder durch direkte Bindung an den Erreger oder indirekt durch Markierung mit Hilfe eines Antikörpers aktiviert wird. Durch die in Gang gesetzte Reaktionskaskade kommt es entweder zur Lyse des Mikroorganismus oder zur Zerstörung des Erregers durch Phagozyten.<sup>31</sup>

## 1.5. Mustererkennungsrezeptoren

Um pathogenen Erregern wenig Zeit zu geben, sich im Körper zu vermehren und diesem somit zu schaden, ist eine möglichst schnelle Erkennung und Abwehr sinnvoll. Mikroorganismen besitzen bestimmte repetitive Strukturen, die vom angeborenen Immunsystem erkannt werden können, obwohl eine frühere Exposition nie stattgefunden hat. Diese Bestandteile nennt man Pathogen-assoziierte molekulare Muster (*Pathogen Associated Molecular Patterns*, kurz PAMPs). Mustererkennungsrezeptoren (*Pattern Recognition Receptors*, kurz PRRs) sind in der Lage diese zu binden und werden dadurch aktiviert.<sup>33</sup> Zu

den wichtigsten PRRs zählen: *Toll-like Rezeptoren* (TLRs), *Retinoic Acid Inducible Protein-like Helicases* (RLHs)<sup>34</sup>, *Nod-like Rezeptoren* (NLRs) und *C-type Lectin Rezeptoren*.<sup>33</sup> Für jede Rezeptorfamilie gibt es spezifische Liganden. Jedoch stellen nicht nur Krankheitserreger Liganden für diese Rezeptoren dar, sondern auch von Körperzellen selbst freigesetzte Moleküle. Diese werden Gefahr-assoziierte molekulare Muster (*Danger Associated Molecular Patterns*, kurz DAMPs) genannt. DAMPs werden durch nekrotische bzw. apoptotische Zellen im Rahmen von ischämischen oder toxischen Schädigungen freigesetzt und aktivieren die Mustererkennungsrezeptoren in gleicher Weise wie PAMPs.<sup>33</sup>

Sobald ein Ligand an den Rezeptor gebunden hat, werden proinflammatorische Signalwege durch Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und IRF3 in Gang gesetzt.<sup>35</sup> Dadurch kommt es zur Freisetzung von Zytokinen wie z.B. IL-6, IL-1 $\beta$ , CXCL8, IL-12, TNF- $\alpha$ , oder Interferon- $\alpha$ / $\beta$ .<sup>35</sup> Diese Botenstoffe wirken alle proinflammatorisch und werden, je nach Infektionserreger, in unterschiedlichem Maße freigesetzt. Sie wirken jedoch auf diversen Ebenen des Immunsystems und verknüpfen teils das angeborene mit dem adaptiven Immunsystem.<sup>31</sup> IL-6 bewirkt lokal eine Lymphozytenaktivierung und erhöhte Antikörperbildung. Systemisch kommt es zu Fieber und zur Induktion von Akute-Phase-Proteinen.<sup>31</sup> IL-1 $\beta$  führt lokal zur Aktivierung des Gefäßendothels und ebenfalls zur Lymphozytenaktivierung, weiterhin kommt es zur vermehrten IL-6 Ausschüttung und wiederum zur Fieberentstehung.<sup>31</sup> IL-12 aktiviert NK-Zellen und T-Zellen, CXCL8 lockt neutrophile und basophile Granulozyten sowie T-Zellen zum Infektionsherd.<sup>31</sup> TNF- $\alpha$  erhöht die Permeabilität der Gefäßwände und kann bei systemischer Freisetzung durch intravasalen Volumenmangel zum Schock führen.<sup>31</sup> Darüber hinaus ist es ebenfalls an der Fieberentstehung beteiligt. Interferon- $\alpha$  bzw. Interferon- $\beta$  werden überwiegend durch virale Infektionen induziert und bewirken eine vermehrte Virusresistenz der nicht-infizierten Zellen und eine erhöhte Antigenpräsentation.<sup>31</sup>

### 1.5.1. Entdeckung und Struktur von Toll-like Rezeptoren

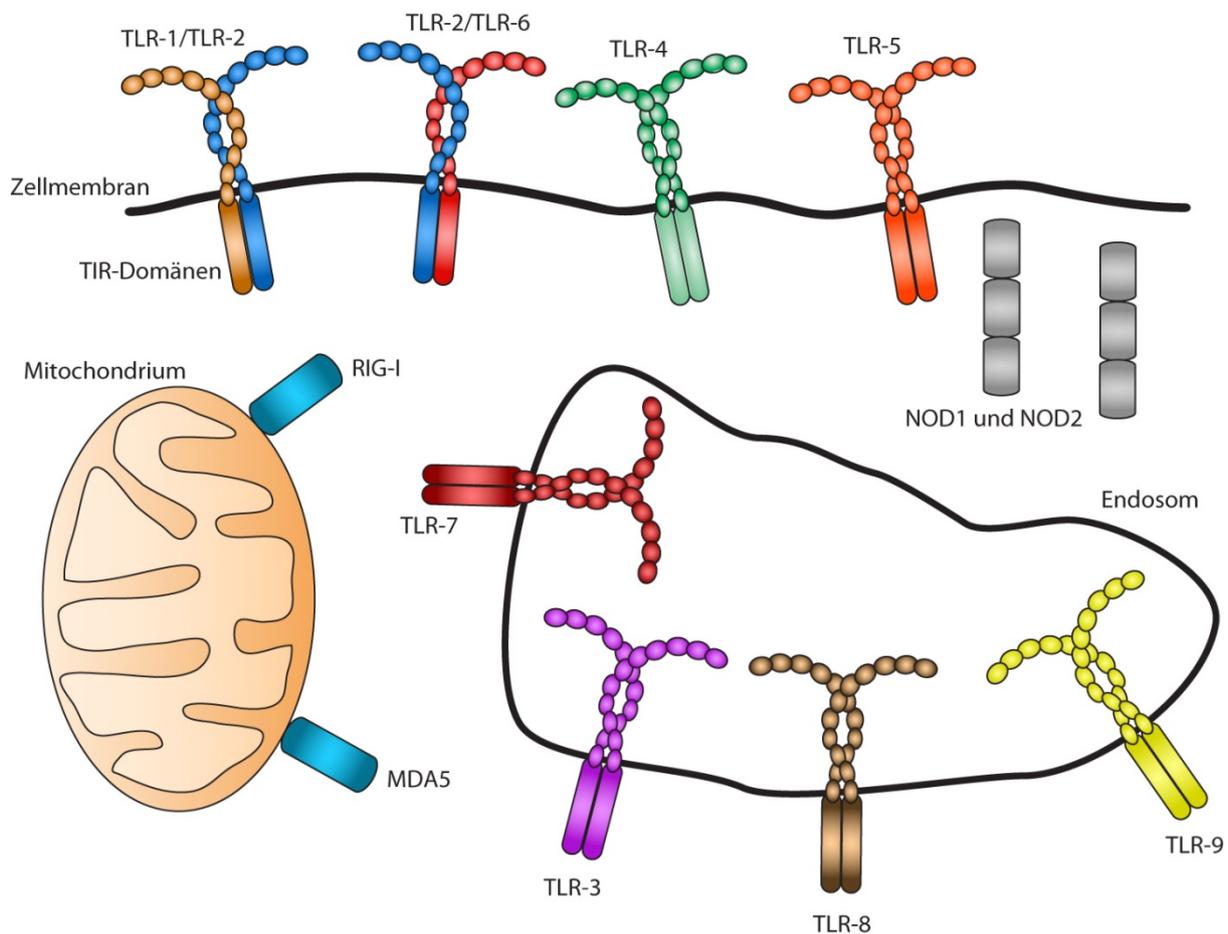
Die bekannteste und für die Funktion der angeborenen Immunität essentiellste Familie von Mustererkennungsrezeptoren sind die Toll-like Rezeptoren.<sup>36</sup> Vor der Entdeckung der Toll-like Rezeptoren war über die genauen molekularen Zusammenhänge des angeborenen Immunsystems wenig bekannt. Der Zweck der angeborenen Immunabwehr wurde ohne weitere Kenntnisse über den genauen Mechanismus in der Aktivierung des adaptiven Immunsystems gesehen. Die Entdeckung der Toll-like Rezeptoren zeigte auf durch welche

Signalwege diese wichtige Verknüpfung vermittelt wird und revolutionierte das damalige Verständnis von angeborener Immunität.<sup>37</sup>

Anfang der 90er Jahre des 20. Jahrhundert wurde die Entdeckung gemacht, dass das sogenannte Protein „Toll“ der Taufliege *D. melanogaster* homologe Sequenzen mit dem IL-1 Rezeptor Typ 1 (IL-1R1) teilt.<sup>38</sup> Wenige Jahre später wurde in Pflanzen ein weiteres Protein entdeckt, das an seiner N-terminalen Domäne ebenfalls Homologien mit IL-1R1 und Toll aufweist.<sup>39</sup> Diese homologe Sequenz, die später bezeichnend für die Toll-like Rezeptoren wurde, erhielt den Namen „*Toll-IL-1 receptor domain*“ oder auch TIR-Domäne. Den endgültigen Beweis, dass Toll eine enorm wichtige Rolle in der Immunabwehr gegen Pathogene spielt, wurde 1996 von Bruno Lemaitre aus dem Labor von Jules Hoffmann erbracht.<sup>40</sup> Letzterer erhielt für diese Entdeckung 2011 den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin.<sup>41</sup> Ein Jahr später konnte endlich auch bei Säugetieren ein, dem Toll-Protein in Funktion und Struktur ähnlicher, Rezeptor beschrieben werden, der später TLR4 getauft wurde.<sup>42</sup> Die Entdeckung der weiteren strukturverwandten Proteine TLR1, TLR2, TLR3 und TLR5 begründete im Jahr 1998 die Toll-like Rezeptorfamilie.<sup>43</sup>

Bis heute sind 10 humane und 12 murine Toll-like Rezeptoren bekannt.<sup>36</sup> Dabei handelt es sich bei allen Subtypen um integrale Membranglykoproteine vom Typ 1. In den N-terminalen, extrazellulären Domänen findet die Erkennung von spezifischen Liganden wie z.B. Pathogenen statt. Diese Mustererkennungssensoren bestehen aus ungefähr 16-28 sogenannten Leucin-reichen Regionen, die eine „*LxxLxLxxN*“-Sequenz enthalten.<sup>35</sup> Diese hoch konservierten Domänen können bei Pflanzen, Insekten und Säugetieren wiedergefunden werden und weisen somit auf ihre zentrale Rolle im Immunsystem hin.<sup>36</sup> Auf der intrazellulären Seite der Rezeptoren befindet sich die oben bereits erwähnte TIR-Domäne, die durch Interaktion mit Adapterproteinen die Weiterleitung der Rezeptorsignale bewirkt.<sup>35</sup> Jedoch befinden sich nicht alle Toll-like Rezeptoren an der Oberflächenmembran: TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 sind ausschließlich in intrazellulären Vesikeln lokalisiert.<sup>44</sup> TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 und TLR11 hingegen befinden sich an der Oberflächenmembran.<sup>44</sup> (Abbildung 3) Alle diese TLR-Subtypen binden verschiedene spezifische Liganden und vermögen so ein breites Spektrum an PAMPs abzudecken. Jedoch dienen Toll-like Rezeptoren - genauso wie viele andere PRRs - nicht nur der Erkennung von pathogenen Strukturen, sondern vermitteln auch Entzündungsreaktionen, die von nekrotischen Zellen verursacht werden. Beim ungeplanten Zelltod werden cytoplasmatische Komponenten wie z.B. das zum Chromatin gehörende Protein *High Mobility Group Box 1* (HMGB1) und Hitzeschockproteine freigesetzt, die verschiedene TLRs binden und diese aktivieren.<sup>45-47</sup>

Tabelle 2 gibt einen Überblick über die bereits bekannten Liganden von Mustererkennungsrezeptoren.



### Abbildung 3: Überblick über Mustererkennungsrezeptoren

Die Toll-like Rezeptoren TLR-1/TLR-2, TLR-2/TLR-6, TLR-4 und TLR-5 befinden sich direkt an der Plasmamembran und können mit ihren extrazellulären Domänen Pathogene erkennen. Die TIR-Domänen befinden sich auf der intrazellulären Seite und leiten bei Aktivierung Signale weiter. Die Toll-like Rezeptoren TLR-3, -7, -8 und -9 befinden sich in der Membran von Endosomen und können intrazellulär gelegene Liganden erkennen. Die RIG-I like Rezeptoren befinden sich am Mitochondrium. Weiterhin gibt es intrazelluläre NOD1 und NOD2 Rezeptoren, die ebenfalls PAMPs erkennen können.<sup>48,49</sup>

**Tabelle 2: Verschiedene PRRs mit Liganden, Lokalisation, Adaptermolekülen, Effektortranskriptionsfaktoren und Negativregulatoren.**  
 Die Schreibweisen TLR1/2 und TLR6/2 deuten auf das funktionelle Heterodimer der Isotypen hin. (Quellenangaben für die einzelnen Negativregulatoren, siehe 1.6)

	<b>PAMP-Liganden<sup>1</sup></b>	<b>DAMP-Liganden<sup>2</sup></b>	<b>Lokalisation<sup>1</sup></b>	<b>Adapter</b>	<b>Effektor</b>	<b>Negativregulatoren</b>
TLR1/2	Triacyl Lipopeptide aus Bakterien und Mykobakterien		Plasmamembran	MyD88	NF-κB	SIGIRR
TLR2	Peptidoglykane aus gram-positiven Bakterien, Candidabestandteile	Biglykane, Hitzeschockproteine, Hyaluronat, HMGB1	Plasmamembran	MyD88	NF-κB	A20, CYLD, ST2, SIGIRR, TANK, IRAK-M, TOLLIP, IRF4
TLR3	Einzelstrang RNA Viren, Doppelstrang RNA Viren,		Endolysosom	TRIF	NF-κB, IRF3, IRF7	A20, DUBA, SIGIRR, SHIP, SHP1/2, IRAK-M, SIKE
TLR4	LPS aus gram-negativen Bakterien, Mannan aus Candida, virale Proteine	Biglykane, Defensine, Fibrinogen, Hitzeschockproteine, Heparansulfat, Hyaluronat, HMGB1	Plasmamembran	MyD88 und TRIF	NF-κB, IRF3, IRF7	A20, CYLD, DUBA, ST2, CD180, SIGIRR, TANK, (SOCS1/3), SHIP, IRAK-M, DOK1/2, SHP1/2, TOLLIP, IRF4, NLRX1
TLR5	Flagellin aus Bakterien		Plasmamembran	MyD88	NF-κB	
TLR6/2	Diacyl Lipopeptide		Plasmamembran	MyD88	NF-κB	
TLR7	Einzelstrang RNA-Viren	U1snRNP-IgG	Endolysosom	MyD88	NF-κB, IRF7	DUBA, SIGIRR, TANK, IRF4
TLR8	Einzelstrang RNA-Viren		Endolysosom	MyD88	NF-κB, IRF7	DUBA, TANK, Clec4a2
TLR9	CpG-DNA aus Bakterien und Viren, Doppelstrang DNA-Viren	Endogene CpG-DNA, DNA-Nukleosomen-IgG	Endolysosom	MyD88	NF-κB, IRF7	A20, DUBA, SIGIRR, TANK, IRAK-M, IRF4
RIG-I/ MDA5	Kurze und Lange Doppelstrang-DNA aus Viren		Cytoplasma			A20, CYLD, DUBA, SIKE, NLRX1
NOD1	Bakterielle Peptidoglykane		Plasmamembran			CENTB1
NOD2	Bakterielle Peptidoglykane		Plasmamembran			A20, ERBIN, CENTB1

### 1.5.2. Signalweg und Funktion am Beispiel von Toll-like Rezeptor 4

Der membranständige Rezeptor TLR-4 ist einer der am besten untersuchten Rezeptoren der PRRs. Seine klinische Relevanz ist enorm, da der Zellwandbestandteil *Lipopolysaccharid* (LPS) aus gram-negativen Bakterien, ein Ligand von TLR-4 ist. So vermittelt er zum großen Teil die Entzündungsreaktion bei der oft letalen gram-negativen Sepsis.<sup>50</sup>

Dabei bildet TLR-4 zuerst einen Komplex mit seinem Ko-Rezeptor MD2. Gemeinsam findet die Bindung von LPS-Molekülen statt. Zwei dieser LPS-TLR4-MD2 Komplexe bilden dann ein Homodimer, und durch enges Aneinanderlegen der intrazellulären TIR-Domänen können über die Proteine TIRAP/Mal bzw. TRAM die Interaktionen mit den Adapterkomplexen MyD88 bzw. TRIF erfolgen. (siehe Abbildung 4) Bei den beiden letzteren handelt es sich um Schlüsselproteine, die über den weiteren Verlauf der Signalkaskade entscheiden. Im Falle von MyD88 werden die Kinasen IRAK1, IRAK2 sowie IRAK4 rekrutiert und führen zur Aktivierung des Ubiquitinylierungsenzyms TRAF6. Daraufhin kommt es durch die TRAF6-vermittelte Ubiquitinylierung der Kinase TAK1 und des Proteinkomplexes IKK/NEMO schlussendlich zur Aktivierung des Schlüsseltranskriptionsfaktors NF- $\kappa$ B. Dieser wandert in den Zellkern und kann dort die Expression von proinflammatorischen Genen bewirken. Letztendlich kommt es zur Ausschüttung von inflammatorischen Zytokinen wie IL-6, IL-12p40 und TNF.<sup>44</sup>

Wie vorher beschrieben wird im Signalweg von TLR-4 auch das Adaptermolekül TRIF aktiviert. Dieses führt, anders als beim MyD88-vermittelten Weg, zur Rekrutierung von TBK1 und IKKi, welche zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors IRF3 führen. Dieser Transkriptionsfaktor kann im Zellkern die Expression vom ebenfalls proinflammatorischen Interferon- $\beta$  vorantreiben. Über einen Zwischenweg über TRAF6 kann TRIF jedoch auch die von NF- $\kappa$ B exprimierten Gene induzieren.<sup>44</sup> (Abbildung 4)

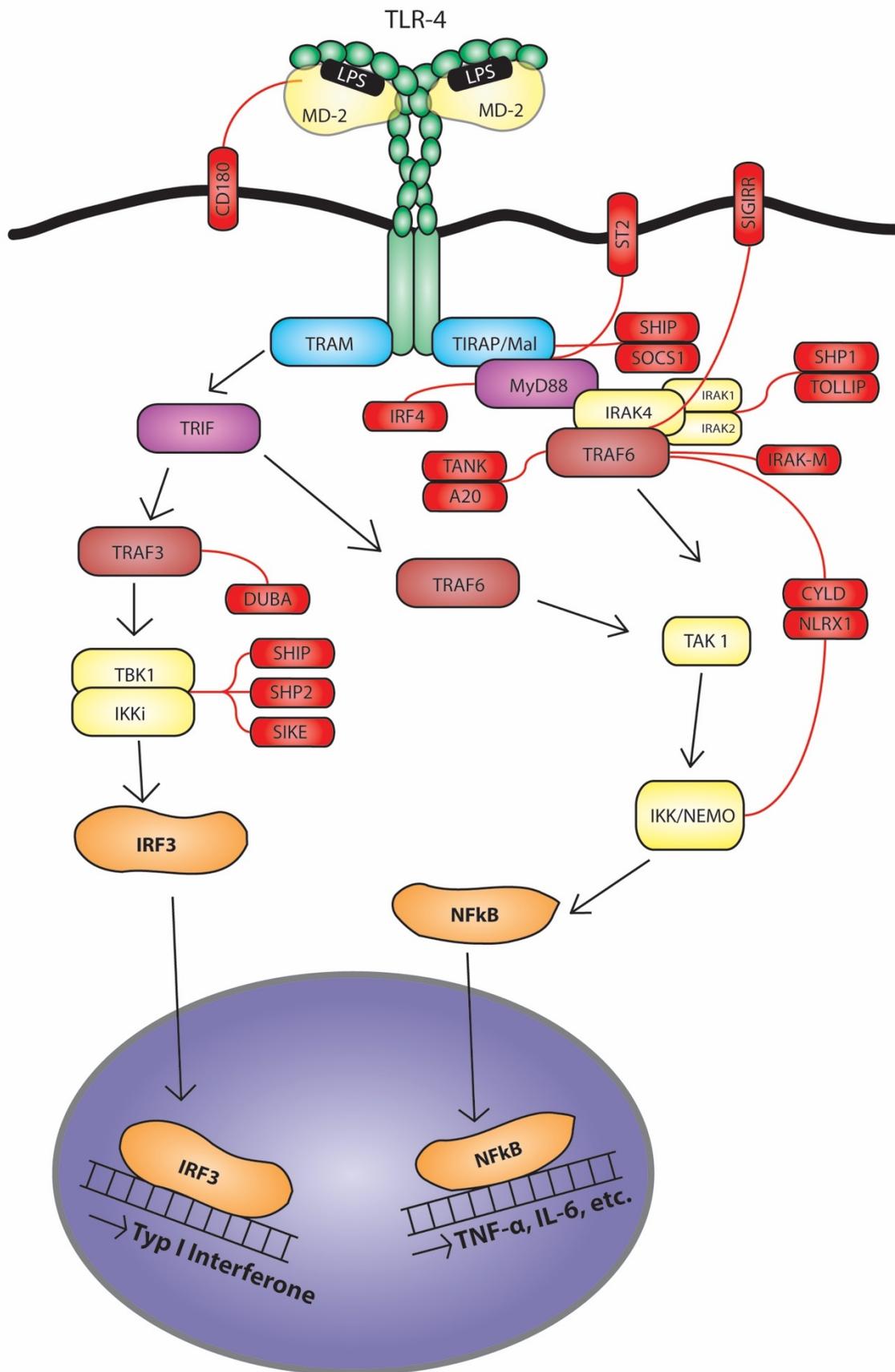


Abbildung 4

**Abbildung 4 (Vorseite): Schematische Darstellung des TLR-4 Signalwegs mit seinen Negativregulatoren**

Durch Bindung des LPS/MD2 Komplexes an TLR-4 kommt es zur Rekrutierung der Adapterproteine TRAM und TIRAP/Mal (blau). In der Folge wird entweder MyD88 oder TRIF (violett) aktiviert. MyD88 rekrutiert über verschiedene Kinasen (gelb) das Ubiquitinylierungsenzym TRAF6 (braun). Danach wird NF- $\kappa$ B über die Kinasen TAK1 und IKK/NEMO aktiviert und wandert in den Zellkern. Im Falle des TRIF-vermittelten Signalwegs können über die Ubiquitinylierungsenzyme TRAF3, TRAF6 und diverse Kinasen (gelb) sowohl IRF3, als auch NF- $\kappa$ B aktiviert werden. Die verschiedenen Negativregulatoren (rot) üben an unterschiedlichen Stellen des Signalwegs ihre Wirkung aus.

### 1.5.3. Andere Mustererkennungsrezeptoren

Die sogenannten *RIG-I-like Rezeptoren* (RLRs) sind neben den *Toll-like Rezeptoren* eine weitere Gruppe von Mustererkennungsrezeptoren, die jedoch spezifisch der Erkennung von viralen Nucleotiden dienen. RIG-I und MDA5 binden die RNA diverser Viren, wie z.B. die Erreger von Influenza, Ebola oder des Dengue-Fiebers.<sup>51</sup> Die Erkennung wird ermöglicht durch eine RNA Helikase Domäne, die es vermag RNA zu erkennen und zu binden.<sup>51</sup> Zur Signaltransduktion wird der Adapter MAVS gebunden. Dies führt letztendlich u.a. über TRAF6 zur Aktivierung der Komplexe NEMO/IKK $\alpha$ /IKK $\beta$  sowie TBK1, die bereits aus dem TLR-4 Signalwegen bekannt sind. Diese vermögen die Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und IRF3 zu mobilisieren und führen daraufhin zur Produktion proinflammatorischer Zytokine. Jedoch überwiegt bei RLRs die vermehrte Transkription der IRF3 vermittelten Typ I Interferone.<sup>52</sup>

Die nächste große Gruppe von PRRs ist die NOD-like Rezeptorenfamilie und besteht beim Menschen aus 22 unterschiedlichen intrazellulären Mustererkennungssensoren. Sie sind gekennzeichnet durch eine leucinreiche Domäne am C-terminalen Ende. Diese ist wichtig für die Erkennung von PAMPs und DAMPs. Zusätzlich gibt es eine N-terminale Domäne, die für die Signaltransduktion verantwortlich ist und eine *Nucleotide Binding Oligomerization*-Domäne enthält.<sup>53</sup> Diese ist für die Oligomerisierung zwischen den Rezeptoren verantwortlich und gibt der Familie ihren Namen.<sup>54</sup> Am besten charakterisiert sind die zwei Rezeptoren NOD1 und NOD2. Sie erkennen bestimmte molekulare Muster aus den Peptidoglykanen verschiedener Bakterien wie z.B. *Pseudomonas aeruginosa* (NOD1), *Streptococcus pneumoniae* und *Staphylococcus aureus* (beide NOD2) und sind so an der Immunabwehr gegen eine Vielzahl an Infektionen beteiligt.<sup>54-56</sup> Nach Bindung kommt es zur Aktivierung von MAP-Kinasen und NF- $\kappa$ B, wodurch vermehrt Gene von proinflammatorischen Entzündungsmediatoren wie TNF- $\alpha$  und IL-6 transkribiert werden. Darüber hinaus sind sie

wichtig in der Pathogenese von z.B. chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und Asthma.<sup>54</sup>

### **1.6. Kontrolle des angeborenen Immunsystems durch Negativregulatoren**

Ein Gleichgewicht zwischen Aktivierung und Suppression des Immunsystems ist im klinischen Alltag von enormer Bedeutung. Eine Überaktivierung im Rahmen eines septischen Schocks ist für den Körper potentiell genauso gefährlich wie eine medikamentöse Immunsuppression, die letztendlich auch zu lebensgefährlichen Infektionen führen kann. Das angeborene Immunsystem besitzt mehrere Mechanismen, um Immunantworten abzuschwächen und somit den Körper vor einer überschießenden Entzündungsreaktion zu schützen. Dabei kann man grundlegend zwischen zell-intrinsischen und zell-extrinsischen Regulatoren unterscheiden. Zu den extrinsischen Mechanismen zählen die antiinflammatorischen Zytokine IL-10 und TGF- $\beta$ . Weiterhin gehören hierzu Faktoren wie z.B. lösliche TLR-Rezeptoren, die Liganden wie LPS abfangen, jedoch nicht zur Aktivierung der TLR-Signalwege im Zellinneren führen. Somit können die LPS-Moleküle der Erkennung durch membranständige TLRs entzogen werden.<sup>57</sup> Intrinsische Regulatoren umfassen Signalmoleküle auf unterschiedlichen Ebenen und von unterschiedlichen Enzym- und Stoffklassen. Dabei sind vor allem zu nennen: Deubiquitinasen, Phosphatasen, Kinasen, Rezeptoren, Transkriptionsfaktoren und Micro-RNAs. Sie alle führen dazu, dass Entzündungsreaktionen kontrolliert verlaufen können. Dementsprechend führt der experimentelle Knockout dieser Gene oft zur exzessiven Inflammation.<sup>57</sup> Im Folgenden werden die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Negativregulatoren einzeln beschrieben und ihre Funktion näher beleuchtet.

#### **1.6.1. A20, CYLD DUBA und TANK**

Bei A20, CYLD (*Cylindromatosis*), DUBA (*Deubiquitinating Enzyme A*) und TANK (*TRAF associated NF- $\kappa$ B activator*) handelt es sich um Regulatoren, die bis auf TANK der Gruppe der Ubiquitylierungsenzyme zuzuordnen sind. Ubiquitin ist ein 76 Aminosäuren langes Polypeptid, das an Lysinreste von Proteinen gebunden wird.<sup>58</sup> Normalerweise wird es in der Zelle zur Markierung von Proteinen für den Abbau im Proteasom verwendet, jedoch kann es auch der Regulation und Steuerung von Signalwegen dienen.<sup>59</sup>

A20 beispielsweise ist eine Deubiquitinase und vermag das Signaling vieler PRRs abzuschwächen. In der Toll-like Rezeptorfamilie wurde für TLR-2, -3, -4, -9 und darüber hinaus für RIG-I/MAVS und NOD2 die negative Regulationsfunktion von A20 nachgewiesen.<sup>60</sup> Dabei interagiert A20 spezifisch mit TRAF6, einem integralen Bestandteil der Signalkette von TLR-4 und weiterer PRRs und schwächt die Signaltransduktion ab. Somit verhindert A20 die Aktivierung von NF- $\kappa$ B und die normalerweise darauf folgende Transkription von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- $\alpha$  und IL-6.<sup>59</sup> (siehe Abbildung 4) Abgesehen von den spezifischen Wirkungen auf molekularer Ebene, wird die essentielle Rolle von A20 bei dessen Abwesenheit deutlich: Mäuse, denen A20 gänzlich fehlt sind extrem empfindlich gegenüber Entzündungsreizen und sterben kurz nach der Geburt an Multiorganversagen. Der Grund ist eine überschießende Aktivierung von NF- $\kappa$ B wegen der fehlenden negativen Regulation von A20.<sup>61</sup> Ein weiterer Beweis für die wichtige Rolle von A20 im TLR Signalweg ist die Tatsache, dass durch gleichzeitige Abwesenheit von A20 und MyD88 die Mäuse vor dem Multiorganversagen gerettet werden können.<sup>62</sup> Durch die MyD88-Defizienz wird der Großteil der TLR Signalwege blockiert und die fehlende Regulation von A20 fällt nicht mehr ins Gewicht.

Der gleichen Enzymklasse wie A20 lässt sich die Deubiquitinase CYLD zuordnen. Die Mutation dieses Gens führt klinisch zu der autosomal-dominant vererbten Erkrankung „familiäre Zylindromatose“. Die Betroffenen leiden an multiplen gutartigen Hauttumoren, die meistens an Kopf und Nacken auftreten.<sup>63</sup> Außer bei der Entstehung von Neoplasien ist CYLD noch bekannt als Negativregulator von TLR-2, TLR-4 und RIG-I Signaling. Hierbei interagiert es mit NEMO und inhibiert TRAF6, IKK und NF- $\kappa$ B.<sup>64,65</sup> Dies wird auch daran deutlich, dass Makrophagen von CYLD-defizienten Mäusen, die mit dem TLR Liganden LPS (Ligand von TLR-4) und Pam3Csk4 (Ligand von TLR-2) stimuliert wurden, eine deutlich vermehrte Aktivierung von NF- $\kappa$ B und eine erhöhte Ausschüttung an proinflammatorischen Zytokinen zeigen.<sup>66</sup> Die Entstehung der Hauttumore bei familiärer Zylindromatose lässt sich auch auf die vermehrte Aktivierung von NF- $\kappa$ B, die mit einer Unterdrückung der Apoptose einhergeht, zurückführen.<sup>67</sup> Warum sich eine CYLD Mutation klinisch nur in der Tumorgenese und nicht in einer geschwächten Pathogenabwehr manifestiert bleibt unklar.

Ein weiterer Vertreter der Deubiquitinasen ist DUBA. Für das Enzym ist eine Abschwächung der Signalwege von TLR-3, -4, -7, -8, -9, und RIG-I/MDA5 nachgewiesen.<sup>68,69</sup> Dabei entfernt DUBA spezifisch Ubiquitinmoleküle von TRAF3 und führt somit zu einer Abschwächung des Signalings. In Folge dessen ist besonders die Produktion von IFN- $\beta$  abgeschwächt.<sup>68</sup>

Ein anderer Negativregulator von PRRs, der mit Ubiquitylierung in Zusammenhang gebracht werden kann, ist TANK. TLR-2, -4, -7, -8 und -9 werden nachweislich von TANK negativ reguliert. Das Protein bewirkt - ohne selbst eine Deubiquitinasedomäne zu besitzen - eine verminderte Ubiquitylierung von TRAF6 und somit eine unterdrückte Ausschüttung von IL-6 und TNF- $\alpha$ .<sup>70</sup> Außerdem werden die TLR-Signalwegkomponenten TBK1 und IKK $\epsilon$  durch TANK negativ reguliert.<sup>71</sup> Im Mausmodell bewirkt eine homozygote TANK-Defizienz *in vivo* die Entwicklung einer Immunkomplexglomerulonephritis mit oft fatalen Folgen nach drei Monaten.<sup>70</sup>

### 1.6.2. SIGIRR, ST2 und CD180

Der Negativregulator *Single Immunoglobulin Interleukin-1 Receptor-related Protein* (SIGIRR, auch TIR8) ist ein sogenannter Orphan-Rezeptor, d.h. ein membranständiges Protein für den noch kein Ligand gefunden wurde.<sup>72</sup> Der Rezeptor besitzt eine intrazelluläre TIR-Domäne und eine extrazelluläre Immunglobulindomäne und hat somit viel Ähnlichkeit mit der Struktur von TLRs und dem TLR-verwandten IL-1 Rezeptor. Allerdings besteht die Funktion von SIGIRR nicht wie bei TLRs in der Aktivierung, sondern in der Abschwächung von proinflammatorischen Signalwegen.<sup>73</sup> SIGIRR vermag sowohl die IL-1-, als auch TLR-4 Signaltransduktion abzuschwächen.<sup>74</sup> Darüber hinaus existieren Indizien, dass es auch die Signalwege von TLR-1/2, -3, -7 und -9 negativ reguliert.<sup>72</sup> Hierzu interagiert SIGIRR mit Hilfe seiner intrazellulären TIR-Domäne mit den Signalwegskomponenten IRAK-1 und TRAF6 und führt so zu einer abgeschwächten NF- $\kappa$ B Aktivierung.<sup>75</sup> Die Bedeutung dieser Regulation wird bei Fehlen des Rezeptors im Organismus deutlich: SIGIRR-defiziente Mäuse sind deutlich anfälliger für Tuberkulose- und Pilzinfektionen und erleiden deutlich häufiger fatale Komplikationen als Wildtyp Mäuse.<sup>76,77</sup> Eine besondere Rolle spielt SIGIRR in der Niere, wo es großzügig exprimiert ist und TLR-4 induzierte Entzündungsreaktionen im Rahmen von Nierenerkrankungen durch Abschwächung des TLR-4 Signalings dämpfen kann.<sup>78</sup>

ST2 ist genauso wie SIGIRR ein Rezeptor mit einer intrazellulären TIR-Domäne. Zusätzlich existiert eine lösliche Form von ST2, die jedoch im Rahmen der angeborenen Immunität keine große Rolle spielt.<sup>79</sup> Die membrangebundene Form wurde als Negativregulator des TLR-2 und TLR-4 Signalwegs beschrieben.<sup>80,81</sup> ST2 entfaltet seine Wirkung am Anfang der Signalkette, indem er die Adaptermoleküle MyD88 und TIRAP/Mal voneinander trennt und somit die Transduktion verhindert. Darüber hinaus ist der Regulator für die Entwicklung von

Endotoxintoleranz wichtig. In einer Studie wurden ST2-defiziente Mäuse und Kontrollmäuse mit subletalen Dosen von LPS behandelt. Dabei war zunächst kein Unterschied bezüglich Überlebensraten und Bestimmung der proinflammatorischen Zytokine festzustellen. Nach einer zweiten LPS-Dosis zeigten die ST2-defizienten Mäuse im Vergleich eine deutlich erhöhte Sterblichkeit und eine vermehrte Ausschüttung von IL-6 und IL-12. Dies deutet darauf hin, dass ST2 zunächst induziert werden muss, um als Negativregulator zu wirken.<sup>82</sup>

Ein weiteres membranständiges Protein, das als Negativregulator von PRRs fungiert, ist CD180. Es ist zu 30% identisch mit dem TLR-4-Rezeptor, jedoch besitzt es keine TIR-Domäne, die eine Signalweiterleitung bewirken könnte.<sup>83</sup> CD180 bindet den Faktor MD-1, ähnlich wie TLR4 seinen Co-Faktor MD-2 bindet. Der CD180/MD-1 Komplex interagiert direkt mit TLR4 und verhindert dort die Bindung des TLR-Liganden LPS.<sup>83</sup> Dementsprechend führte eine Stimulation von CD180-defizienten Peritonealmakrophagen mit LPS zu einer vermehrten Ausschüttung von TNF- $\alpha$ . Auch systemisch zeigten die CD180-Knockoutmäuse erhöhte TNF- $\alpha$ -Konzentrationen nach intraperitonealer LPS-Gabe.<sup>84</sup>

### 1.6.3. SOCS1 und SOCS3

Die Funktionen der *Suppressor Of Cytokine Signaling* (SOCS) Proteinfamilie wird als eine der wichtigsten Mechanismen der Regulation von Immunhomöostase betrachtet.<sup>85</sup> Aus der 8 Proteine umfassenden Familie sind zwei Regulatoren von besonderem Interesse: SOCS1 und SOCS3

SOCS1 interagiert mit dem Adapter Mal in der TLR-Signalkette und kann somit die Aktivierung von NF- $\kappa$ B abschwächen.<sup>86</sup> Dementsprechend schütten LPS-stimulierte Makrophagen, denen SOCS1 fehlt, vermehrt TNF- $\alpha$  und IL-12 aus. SOCS1-defiziente Mäuse zeigen nach einer intraperitonealen LPS-Injektion erhöhte Sterblichkeitsraten im Vergleich zu Kontrollmäusen.<sup>87,88</sup> Außerdem scheint SOCS1 eine Rolle bei der Endotoxintoleranz zu spielen: SOCS1-defiziente Mäuse, die mit Liganden von TLR-2, -4 und -9 vorbehandelt wurden, zeigten nach einer darauf folgenden LPS Stimulation deutlich höhere TNF- $\alpha$  Konzentrationen als Wildtypmäuse, die genauso vorbehandelt wurden. Somit ist SOCS1 ein wichtiger Regulator des TLR-4 Signalwegs, sowie ein Mediator der Endotoxintoleranz.<sup>87</sup>

Für den anderen wichtigen Vertreter SOCS3 sind neben proinflammatorischen Wirkungen<sup>89</sup> vor allem die anti-inflammatorischen Wirkungen beschrieben: SOCS3 übt seine Funktion als Negativregulator hauptsächlich über das sogenannte JAK/STAT Signaling aus.<sup>85</sup> Dabei handelt es sich um einen Signalweg, der durch Zytokine aus dem TLR-Signaling, wie z.B. IL-

6 aktiviert wird. SOCS3 schwächt die IL-6-vermittelte Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT3 ab und vermag so die Wirkung von TLR-Signaling indirekt zu hemmen.

Makrophagen, denen SOCS3 fehlt, haben nach Stimulation mit dem proinflammatorischen Zytokin IL-1 eine erhöhte IL-6 Produktion, verglichen mit Wildtypmakrophagen.<sup>90</sup> Dieses Phänomen konnte auch in SOCS3-defizienten Osteoblasten, die mit LPS stimuliert wurden, beobachtet werden.<sup>91</sup> Außerdem führt der Verlust des Regulators bei LPS-induzierter Sepsis zu erhöhten Plasmaspiegeln von IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und IL-6.<sup>92</sup> Somit ist SOCS3 ein wichtiger Regulator von TLR-vermittelten Immunantworten.

### 1.6.4. SHIP, SHP1 und SHP2

Der Negativregulator *SH2 Containing Inositol-5 Phosphatase* (SHIP) ist der Enzymklasse der Phosphatasen zuzuordnen. Das Enzym interagiert mit der Signalwegkomponente TBK1 und hemmt überwiegend die TLR-3-Aktivierung. Da der TLR-3 Signalweg ausschließlich über das Schlüsselmolekül TRIF verläuft, wird vor allem die Ausschüttung von IFN- $\beta$  gehemmt.<sup>93</sup> Auch die TLR-4 Signalkette wird über SHIP beeinflusst: In Makrophagen schwächt SHIP ebenfalls die TRIF-vermittelte IFN- $\beta$  Produktion ab und hindert darüber hinaus TLR-4 daran den Signaladapter MyD88 zu binden.<sup>94</sup> Somit wird auch die NF- $\kappa$ B Aktivierung negativ regulierend beeinflusst.<sup>95</sup> Zusätzlich ist SHIP eines der Proteine, das bei der Entstehung der Endotoxintoleranz benötigt wird.<sup>96</sup>

*SH2 Containing Protein Tyrosine Phosphatase 1* und *2* (SHP-1 und SHP-2) sind zwei verwandte Tyrosinphosphatasen. SHP-1 interagiert nach Aktivierung von TLR-3 und TLR-4 mit IRAK1 und verhindert so die Signaltransduktion zu NF- $\kappa$ B und folglich die Ausschüttung von vielen proinflammatorischen Zytokinen. Gleichzeitig steigert es jedoch die Produktion von IFN- $\alpha$ / $\beta$ . Somit besitzt SHP-1 einen wichtigen Effekt für die Homöostase von PRR-vermittelten Entzündungen.<sup>97</sup>

SHP-2 ist ebenfalls ein Negativregulator des TLR-3 und TLR-4 Signalwegs. Jedoch interagiert SHP-2 hier nicht wie im Fall von SHP-1 mit IRAK1, sondern mit TBK1 und vermindert vor allem die IFN- $\beta$  Produktion. Interessanterweise ist dieser Mechanismus nicht abhängig von der Phosphatasenfunktion von SHP-2, sondern allein den Protein-Protein Interaktionen des Enzyms zuzuschreiben.<sup>98</sup>

### 1.6.5. IRAK-M, DOK1, DOK2 und TOLLIP

Das Protein *IL-1R Associated Kinase-M* (IRAK-M oder IRAK3) stellt einen Negativregulator dar, der seine Funktion als Teil des IRAK-Komplexes im TLR-Signaling ausübt (siehe Abbildung 4). Dort verhindert IRAK-M die Aktivierung von IRAK1 und IRAK4 und sorgt somit dafür, dass diese Faktoren das Signal nicht an das zentrale Protein TRAF6 weiterleiten können. In Makrophagen, denen IRAK-M fehlt, wird dies bei der Aktivierung von TLR-2, -3, 4, und vor allem TLR-9 durch eine erhöhte Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen deutlich.<sup>99</sup> Ebenso vermittelt IRAK-M die Wirkungen der Endotoxintoleranz.<sup>100</sup> Ein besonders wichtiger klinischer Bezug ergibt sich bei der immunkompromittierten Phase nach oder während des septischen Schocks. Im Mausmodell konnte nachgewiesen werden, dass IRAK-M bei Peritonealsepsis vermehrt exprimiert wird und dazu führt, dass die Immunabwehr für eine zweite z.B. respiratorische Infektion geschwächt wird.<sup>101</sup> Somit konnte IRAK-M nicht nur auf zellulärer Ebene, sondern auch im klinischen Alltag als wichtiger Negativregulator der angeborenen Immunität identifiziert werden.

*Downstream Of Tyrosine Kinase 1* und *2* (DOK1 und DOK2) sind zwei Proteine, die spezifisch den TLR-4 Signalweg beeinflussen, jedoch explizit keinen Einfluss auf die Signalwege anderer TLRs haben.<sup>102</sup> Sie verhindern die Aktivierung der MAP Kinase Erk (in Abbildung 4 nicht dargestellt), die nach TLR-4 Aktivierung letztlich zur vermehrten Produktion von Entzündungszytokinen wie TNF- $\alpha$  führt.<sup>103</sup>

Dementsprechend sind in DOK1- und DOK2-defizienten Makrophagen die Erk-Aktivierung und die TNF- $\alpha$  Sekretion nach LPS-Stimulation deutlich erhöht. Ebenso bewirkt die forcierte Expression der beiden Negativregulatoren eine abgeschwächte Erk-Aktivierung. Im *in vivo* Modell zeigen Mäuse, denen DOK1 oder DOK2 fehlt, darüber hinaus eine erhöhte Sterblichkeit nach intraperitonealer LPS Gabe. Interessanterweise unterscheiden sich die Wirkungen von DOK1 und DOK2 kaum voneinander und auch der Funktionsmechanismus ist für beide Regulatoren gleich.<sup>102</sup>

*Toll Interacting Protein* (TOLLIP) wurde 2002 zum ersten Mal als Negativregulator von TLR-2 und TLR-4 beschrieben. TOLLIP befindet sich direkt an der intrazellulären Seite des TLR-2 und TLR-4 Rezeptors und vermag die Aktivität des IRAK-Komplexes zu unterdrücken.<sup>104</sup> Daraufhin werden auch nachweislich die NF- $\kappa$ B-Aktivierung sowie die Produktion von TNF- $\alpha$  und IL-6 z.B. in humanen PBMCs vermindert.<sup>104,105</sup> Jedoch konnte ein negativ regulativer Effekt auf systemische Konzentrationen von proinflammatorischen Zytokinen bisher nicht nachgewiesen werden. TOLLIP-defiziente Mäuse zeigen gar

erniedrigte TNF- $\alpha$  und IL-6 Spiegel.<sup>106</sup> Somit handelt es sich bei TOLLIP um einen Negativregulator dessen genaue Funktion *in vivo* noch nicht geklärt ist.

### 1.6.6. IRF4, SIKE, NLRX1 und Clec4a2

IRF4 gehört zur Familie der *Interferon Regulatory Factors*, die für die angeborene Immunität eine wichtige Rolle spielen.<sup>107</sup> Seine Funktion als Negativregulator des TLR-Signalings übt IRF4 dadurch aus, dass es mit dem verwandten Protein IRF5 um die Bindungsstelle an MyD88 konkurriert.<sup>108</sup> Der Transkriptionsfaktor IRF5 wird nach TLR-Aktivierung von MyD88 gebunden und führt daraufhin genauso wie eine Aktivierung von NF- $\kappa$ B direkt zur vermehrten Transkription von proinflammatorischen Zytokinen.<sup>109</sup> (nicht in Abbildung 4 dargestellt) Somit kann IRF4 durch Blockierung des IRF5 Signalings der Rezeptoren TLR-2, -4, -7, und TLR-9 eine Abschwächung der Entzündungsantwort vermitteln. Dementsprechend haben IRF4-defiziente Mäuse nach einer intraperitonealen Injektion des TLR-9 Liganden CpG-DNA eine deutlich erhöhte Sterblichkeitsrate.<sup>108</sup>

Außerdem zeigt IRF4 seine wichtige Rolle als Regulator von Immunantworten in der Makrophagendifferenzierung: Erstens wird die Differenzierung zu anti-inflammatorischen M2-Makrophagen von IRF4 vermittelt.<sup>110</sup> Zweitens verhindert IRF4 die Entwicklung in den proinflammatorischen M1-Phänotyp, indem es wie oben beschrieben die IRF5 Aktivierung kompetitiv hemmt.<sup>107,111</sup>

Das Protein *Suppressor Of IKK $\epsilon$*  (SIKE) hemmt spezifisch die Wirkungen von PRRs auf die Interferon- $\beta$  Ausschüttung. Dabei bindet es an die Signalwegkomponenten TBK1 und IKK $\epsilon$  und verhindert deren Interaktionen mit RIG-I, TRIF und IRF3.<sup>112</sup> Somit können die TLR-3-abhängige TRIF-Aktivierung und die RIG-I Signalkette geschwächt werden.

Jedoch wirkt SIKE nur auf die IRF3 vermittelte Expression von Interferon- $\beta$ . Die Aktivierung von NF- $\kappa$ B, die durch TRIF und RIG-I ebenfalls erfolgt, wird durch den Negativregulator nicht beeinflusst.<sup>113</sup>

Der erst 2011 entdeckte Rezeptor NLRX1 gehört zur NOD-like Rezeptorfamilie. Jedoch besteht seine Funktion nicht in der Erkennung von Pathogenen oder endogenen Gefahrensignalen, sondern in der Begrenzung der Signaltransduktion von RIG-I, TLR-2 und TLR-4. Zum einen verhindert es die Bindung von RIG-I mit seinem Adapter MAVS und kann so antivirale Entzündungsreaktionen abschwächen.<sup>114</sup> Zum anderen reduziert der Negativregulator die inflammatorische Reaktion auf LPS, indem es mit den TLR-

Signalkomponenten TRAF6, IKK $\alpha$  und IKK $\beta$  interagiert.<sup>115</sup> Im *in vivo* Modell zeigen daher NLRX1 Knockoutmäuse nach intraperitonealer LPS-Injektion höhere IL-6 Plasmaspiegel und entwickeln einen septischen Schock mit deutlich erhöhter Sterblichkeit.<sup>115</sup>

Clec4a2 (auch CLECSF6 und DCIR) ist ein Rezeptor, welcher der *C-type lectin* Familie zugeordnet werden kann. Diese Rezeptoren sind als Mustererkennungsrezeptoren gewöhnlich auch an der Erkennung von PAMPs beteiligt. Bisher wurden noch keine Liganden gefunden, die *in vivo* an Clec4a2 binden.<sup>116</sup> Allerdings ist bekannt, dass er als Negativregulator im TLR-8 Signalweg wirkt.<sup>117</sup> In der Tat besitzt Clec4a2 eine inhibitorische ITIM-Domäne, der genaue Wirkmechanismus ist aber nicht bekannt. *In vivo* führt der Verlust des Rezeptors bei Mäusen zur Entwicklung von diversen Autoimmunkrankheiten und ist somit wichtig für die Erhaltung der Homöostase des Immunsystems.<sup>118</sup>

### 1.6.7. ERBIN und CENTB1

Die beiden Proteine ERBIN und CENTB1 unterscheiden sich von den anderen untersuchten Negativregulatoren dadurch, dass sie nicht die Aktivierung von TLR-Rezeptoren oder RIG-I regulieren, sondern die Signalwege der NOD-like Rezeptoren, die auch zu den Mustererkennungsrezeptoren gehören. ERBIN interagiert direkt mit dem Rezeptortyp NOD-2 und vermag die Aktivierung von NF- $\kappa$ B abzuschwächen. So ist in ERBIN-defizienten Zellen nach Stimulation mit einem NOD-2 Liganden die Expression des proinflammatorischen Zytokins MCP-1 deutlich erhöht.<sup>119</sup>

Das Protein *Centaurin Beta 1* (CENTB1, auch ACAP1) ist ein Negativregulator der beiden NOD-like Rezeptor Subtypen NOD1 und NOD2. Dazu bindet es direkt an NOD1 bzw. NOD2 und führt genauso wie der andere NOD-Negativregulator ERBIN zur Abschwächung der Aktivierung von NF- $\kappa$ B.<sup>120</sup>

## 1.7. Unterschiede zwischen Maus und Mensch

Der Mausorganismus ist ein häufig genutztes Modell für immunologische Fragestellungen. Jedoch kommen Unterschiede des Immunsystems von Menschen und Mäusen bereits bei recht trivialen Untersuchungen zum Vorschein. Beispielsweise besteht humanes Blut zu 50%-70% aus neutrophilen Granulozyten und der Rest überwiegend aus Lymphozyten. Beim murinen Organismus finden sich hingegen 75%-90% Lymphozyten und nur 10%-25% neutrophile Granulozyten.<sup>121</sup>

Die enormen Unterschiede zwischen murinen und humanen Genexpressionen wurden erst vor kurzem näher untersucht. Dabei erhielten Versuchspersonen und Mäuse eine geringe Dosis LPS. Anschließend wurde die Korrelation der Expressionsprofile in den Leukozyten bestimmt. Hierbei konnte nur eine verschwindend geringe Übereinstimmung zwischen den zwei Spezies festgestellt werden.<sup>122</sup> Die Daten der Studie wurden zwar in Forschungskreisen in Frage gestellt und kritisiert, jedoch bleibt festzustellen, dass menschliches und murines Immunsystem keinesfalls als gleich anzusehen sind.<sup>123</sup>

Speziell auf dem Bereich der angeborenen Immunität sind einige Unterschiede bekannt: Die TLR-Untertypen 11-13 gibt es nur bei Mäusen. TLR-8 und TLR-10 konnten bisher nur beim Menschen nachgewiesen werden.<sup>36</sup> Noch größere Unterschiede zeigen sich bei den *NOD-like* Rezeptoren. Von diesen wurden 34 verschiedene murine und nur 22 humane Untertypen beschrieben.<sup>124</sup> Auch für *C-Typ Lectin* Rezeptoren wurden Unterschiede in der Expression entdeckt.<sup>125</sup>

Allerdings muss nicht nur auf morphologischer, sondern auch auf funktioneller Ebene zwischen menschlichem und murinem Immunsystem differenziert werden. In einer Studie zur Genexpression von Makrophagen der zwei Spezies wichen 25% der TLR-4 regulierten Gene nach Stimulation in ihrer Expression deutlich voneinander ab.<sup>126</sup> Außerdem kann man die Bedeutung dieser Unterschiede im klinischen Alltag beobachten. Mäuse, denen das integrale Signalmolekül MyD88 fehlt, entwickeln schnell Infektionen durch diverse Mikroorganismen. Im Kontrast dazu sind Säuglinge, die mit einem genetischen Defekt im MyD88-Gen zur Welt kommen, nur von Infektionen durch wenige pyogene Bakterien betroffen.<sup>34</sup>

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass die Maus als Modellorganismus mangels Alternativen eine wichtige Stellung einnimmt. Jedoch gibt es viele Indizien dafür, dass eine Übertragung tierexperimenteller Studien auf den humanen Organismus problematisch ist.

## 1.8. Zielsetzung und Hypothese

Das ischämische Nierenversagen und infektiös bedingte Erkrankungen wie die Sepsis stellen heutzutage große medizinische Probleme dar. Auf den ersten Blick unterscheidet sich die Pathogenese dieser zwei Krankheitsbilder voneinander, jedoch beruht sie in beiden Fällen zu einem großen Teil auf der Aktivierung von Mustererkennungsrezeptoren der angeborenen Immunität. Dadurch kommt es zur Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und zur Einwanderung von Immunzellen. So können im Fall der Sepsis bakterielle Erreger bekämpft werden, jedoch kann der Körper auch durch Entstehung eines septischen Schocks massiv geschädigt werden. Im Fall des Nierenschadens kommt es durch Aktivierung des angeborenen Immunsystems einerseits zur Regeneration des Gewebes, andererseits auch zur Narbenbildung und somit zur progredienten Zerstörung des Nierenparenchyms. Es ist bekannt, dass Negativregulatoren der Mustererkennungsrezeptoren für die Begrenzung und Homöostase dieser Entzündungsreaktionen verantwortlich sein können.

Das Ziel dieser Arbeit ist zu untersuchen, ob und in welcher Weise die ausgewählten Negativregulatoren der angeborenen Immunität bei diesen Entzündungsprozessen induziert werden und somit zur Begrenzung von Gewebeschäden beitragen können. Darüber hinaus soll eruiert werden, ob sich diese Mechanismen zwischen Mensch und dem immunologischen Modellorganismus Maus unterscheiden. Eine weitere Zielsetzung der Arbeit besteht darin, die Unterschiede der Basalexpression der ausgewählten Negativregulatoren zwischen den zwei Spezies näher zu beschreiben.

Zusammengefasst lauten die Hypothesen für die vorliegende Dissertation wie folgt:

- die basale Expression der hier untersuchten Negativregulatoren unterscheidet sich signifikant zwischen dem menschlichen und murinen Organismus
- Die hier untersuchten Negativregulatoren werden im Rahmen von infektiösen Immunantworten bei Mensch und Maus verstärkt exprimiert
- Die hier untersuchten Negativregulatoren werden im Rahmen eines sterilen, ischämischen Nierenschadens verstärkt exprimiert und bleiben auch im Langzeitverlauf eines chronischen Nierenschadens induziert.



**Kapitel 2:**  
**Material und Methoden**

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Geräte

##### RT-PCR:

LightCycler 480

Roche, Mannheim, D

##### Mikroskopie:

Leitz Wild MPS52

Leica Microsystems, Wetzlar, D

Leitz DMRBE

Leica Microsystems, Wetzlar, D

Olympus BX 61

Olympus, Hamburg, D

CellP Software

Olympus, Hamburg, D

##### Pipetten:

Multikanalpipette

Eppendorf AG, Hamburg, D

Pipetten Pipetman®

Gilson, Middleton, WI, USA

Pipettierhilfe Pipetus®-classic

Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, D

Pipettenspitzen Typ Gilson®

Peske, Aindling-Arnhofen, D

Pipettenspitzen epT.I.P.S

Eppendorf, Hamburg, D

Serologische Pipetten 5, 10, 25 ml

BD, Heidelberg, D

Pipettierhilfe Easypet

Eppendorf, Hamburg, D

##### Waagen:

BP 110S

Sartorius, Göttingen, D

EC-211

Acculab Sartorius Group, Bohemia, USA

Mettler PJ 3000

Mettler Toledo, Gießen, D

Mettler P 1200 N

Mettler Toledo, Gießen, D

##### Zellkultur:

Heracell 150

Heraeus Sepatech, Osterode, D

Neubauer Zählkammer

Roth, Karlsruhe, D

Steril Card Hood CII, Typ A/B3

Baker Company, Sanford, Maine, USA

Typ B5060 EC-CO2

Heraeus Sepatech, Osterode, D

UV-Licht

Bachofer Laborgeräte, Reutlingen, D

##### Zentrifugen:

Centrifuge 5415 D

Eppendorf, Hamburg, D

Centrifuge 5418

Eppendorf, Hamburg, D

Megafuge 1.0 R	Heraeus Sepatech, Osterode, D
Universal 16	Hettich, Bäch, CH
<b>Sonstiges:</b>	
Eppendorfbehältnisse 1,5ml	TPP, Trasadingen, CH
Falconbehältnisse 15ml, 50ml	TPP, Trasadingen, CH
Gel-Elektrophorese-Kammer	PeqLab Biotechnologie, Erlangen, D
Homogenisator	Ultra Turrax T25 IKA GmbH, Staufen, D
Microplate-Washer ELx50	Biotek, Bad Friedrichshall, D
pH-Meter WTW	WTW GmbH, Weilheim, D
Schneidgerät Jung CM 3000	Leica, Solms, D
Sicherheitswerkbank Microflow®	Nunc GmbH, Wiesbaden, D
Spektrophotometer NanoDrop® ND-1000	Peqlab Biotechnologie, Erlangen, D
Sterilwerkbank SterilGard	The Baker Company, Sanford, USA
Tecan, GENios Plus	Tecan, Crailsheim, D
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg, D
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, D
Vortex Genie 2TM	Scientific Industries, Bohemia, USA
Wasserbad HI 1210	Leica Microsystems, Solms, D
<b>Computerprogramme:</b>	
Adobe Illustrator	Adobe, San José, CA, USA
Adobe Photoshop	Adobe, San José, CA, USA
Microsoft Excel	Microsoft, Redmond, WA, USA
GraphPad Prism	GraphPad, La Jolla, CA, USA

### 2.1.2. Chemikalien

$\beta$ -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe, D
EDTA	Biochrom KG, Berlin, D
Ethanol	Merck, Darmstadt, D
HCl	Merck, Darmstadt, D
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Roth, Karlsruhe, D
NaCl	Merck, Darmstadt, D
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Merck, Darmstadt, D
NaHCO <sub>3</sub>	Merck, Darmstadt, D

NaOH	Merck, Darmstadt, D
Tween-20	Sigma, Deisenhofen, D

### 2.1.3. Zellkultur

LPS	Invivogen, Toulouse, Frankreich
DPBS (1x)	PAN Biotech KG, Aidenbach, D
Fötales Kälberserum (FCS)	Biochrom KG, Berlin, D
Penicillin / Streptomycin	PAA Laboratories, Pasching, A
RPMI 1640-Medium	Invitrogen, Karlsruhe, D
Trypanblau	Sigma, Deisenhofen, D
6 well-Platte	Costar Corning, Schiphol-Rijk, NL

### 2.1.4. Blutentnahme und PBMC-Isolation

#### Humane Blutentnahme:

Entn.röhrchen S-Monovette® 7,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, D
Cutasept® F Hautdesinfiziens	Bode Chemie, Hamburg, D
Multi-Adapter	Sarstedt, Nümbrecht, D
Blutentnahmesystem Valu-Set®	BD, Franklin Lakes, USA

#### Murine Blutentnahme:

Entn.röhrchen S-Monovette® 2,7 ml	Sarstedt, Nümbrecht, D
EDTA	Roth, Karlsruhe, D
Kanülen Microlance® 20G	BD, Franklin Lakes, USA

#### PBMC-Isolation:

Biocoll (Ficoll) Trennlösung	Biochrom, Berlin, D
Pipettierhilfe Pipetus®-classic	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, D
Serologische Pipettenspitzen	BD Biosciences, Heidelberg, D

### 2.1.5. Molekularbiologie

#### ELISA:

OptEIA™ Human IL-6 ELISA Kit	BD Biosciences, Heidelberg, D
TMB Substrate Reagent Set	BD Biosciences, Heidelberg, D

#### RNA-Isolation:

PureLink RNA Mini Kit	Invitrogen, Karlsruhe, D
RNase-free-Spray	Gene Choice, Frederick, USA

#### cDNA-Synthese:

lineares Acrylamid	Ambion, Darmstadt, D
0,1M DTT	Invitrogen, Karlsruhe, D
5x First Strand Buffer	Invitrogen, Karlsruhe, D
Hexanukleotid Mix	Roche, Mannheim, D
25mM dNTPs	GE Healthcare, München, D
RNAasin	Promega, Mannheim, D
Superscript II	Invitrogen, Karlsruhe, D

#### RT-PCR:

Sybr-Green Puffer:	
Taq Puffer	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
dNTPs	GE Healthcare, München, D
PCR-Optimizer	Bitop, Witten, D
BSA PCR grade	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
SybrGreen I	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
MgCl <sub>2</sub>	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA

Taq DNA- Polymerase	New England BioLabs, Ipswich, USA
96 Well Lightcycler Platten	Sarstedt, Nürnberg, D
Klebefolie	Sarstedt, Nürnberg, D
Primer	Metabion, Martinsried, D
Safe-Lock Eppendorfgefäße 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg, D
Human MTC Panel I und II	Clontech, Mountain View, CA, USA

### 2.1.6. Tierhaltung und Tiermodelle

C57BL/6 Wildtyp-Mäuse	Charles River, Sulzfeld, Deutschland
Einbettkassetten	Simport, Beloeil, Kanada
RNA-later®	Qiagen GmbH, Hilden, D
Isofluran Forene®	Abbott, Wiesbaden, D
<b>Ischämie-Reperfuisionsmodell:</b>	
Bepanthen® Salbe	Bayer, Leverkusen, D
Gazin® Tupfer	Lohmann & Rauscher, Rengsdorf, D
Mersilene Nahtmaterial 2-0	Ethicon, Somerville, USA
Novalgin®-Tropfen	Sanofi Aventis, Paris, Frankreich
Midazolam-ratiopharm®	Ratiopharm, Ulm, D
Naloxon-Actavis	Actavis, Steinhausen ZG, Schweiz
Flumazenil Hikma	Hikma, London, UK
Revertor® (Atipamezolhydrochlorid)	Cp-Pharma, Burgdorf, D
Fentanyl-Janssen	Janssen-Cilag, Beerse, Belgien
Domitor®(Medetomidinhydrochlorid)	Pfizer, Karlsruhe, D
Kanülen Microlance 26 G	BD, Franklin Lakes, USA
Spritzen 1 ml	Braun, Melsungen, D

### 2.1.7. Histologie

ABC-Substrat-Lösung	Vector, Burlingame, USA
Ammoniumpersulfat	BioRad, München, D
Formalin	Thermo Scientific, Waltham, USA
Methylgrün	Sigma, Deisenhofen, D
Mounting Med.	VectaMount Vector, Burlingame, USA
PAS	Bio-Optica, Mailand, I
biotinierter Sekundär-AK	Vector, Burlingame, USA
Xylol	Merck, Darmstadt, D
<b>Antikörper für Immunhistologie:</b>	
Rat anti-mouse neutrophils	Serotec, Oxford, UK
Rat anti-mouse F4/80	Serotec, Oxford, UK
Anti-smooth muscle actin	Dako, Glostrup, Denmark

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Murine Organentnahme

Zur Analyse der murinen Basalexpression der Negativregulatoren von Mustererkennungsrezeptoren wurden Organe von männlichen 12 Wochen alten C57BL/6-Mäusen (*Charles River*, Sulzfeld, Deutschland) verwendet. Die Mäuse wurden in Polypropylenkäfigen gehalten und hatten freien Zugang zu Wasser und Futter *ad libitum*. Es erfolgte zunächst die Betäubung der Mäuse in einer speziellen Kammer mit Hilfe eines Isofluran-Sauerstoffgemisches, das durch den Vernebler erzeugt und durch einen Schlauch in die Plastikkammer geleitet wurde. Nach 2 Minuten wurden die tief anästhesierten Mäuse durch zervikale Dislokation getötet und anschließend zur Desinfektion mit 70%-igem Ethanol gründlich eingesprüht. Danach erfolgte die Eröffnung des Abdomens ohne dabei Darmschlingen oder andere Organe zu verletzen. Zunächst wurden Leber, Milz, Nieren und Hoden, gefolgt von Dünn- und Dickdarm entnommen. Nach gründlichem Desinfizieren von Pinzetten und Scheren mit 100%-igem Ethanol wurde der Thorax mit einem Längsschnitt durch das Sternum eröffnet und der Thymus entfernt. Als nächstes erfolgten die Durchtrennung der großen Gefäße im Mediastinum, die Eröffnung der Perikardhöhle und die Entnahme von Herz und Lunge. Anschließend wurde das Fell am Schädelknochen entlang der Längsachse der Maus eingeschnitten und der Schädelknochen freigelegt. Mit Hilfe einer Schere erfolgten die Eröffnung der Schädelhöhle und die Vorluxation des Gehirns. Alle entnommenen Organe wurden entweder unmittelbar für die RNA-Isolation vorbereitet oder zur späteren Verwendung in Eppendorfgefäße, die mit 500µl *RNAlater*® gefüllt waren, gegeben. Bei Organen, deren Volumen für die komplette Verwendung zu groß war, wurde mit dem Skalpell ein kleineres Stück abgetrennt. Dabei erfolgte die Schnittführung so, dass die Probe repräsentativ für das ganze Organ war. Im Falle des Gehirns war solch eine Entnahme eines repräsentativen Stückes nicht möglich. Hier wurde stattdessen ein Stück vom Gehirnkortex verwendet.

### 2.2.2. Humane cDNA-Gewinnung

Zur Analyse der Basalexpression der Negativregulatoren von Mustererkennungsrezeptoren im menschlichen Organismus wurde die cDNA aus 10 humanen Organproben kommerziell von *Clontech* erworben. Diese beinhaltet ein Gemisch von cDNA aus Organen vieler gesunder

Individuen. Somit konnte beim späteren Ergebnis in den meisten Fällen von einer durchschnittlichen und damit repräsentativen Darstellung der Expression der Negativregulatoren beim gesunden Menschen ausgegangen werden. Um die Ergebnisse nicht aufgrund von ethniespezifischen Expressionsunterschieden zu verfälschen, handelte es sich bei den Spendern ausschließlich um Menschen kaukasischer Abstammung. Laut Herstellerangaben fand die Gewinnung aller Proben in Übereinstimmung mit den jeweiligen regionalen Gesetzen und Bestimmungen statt. Die Spender waren alle negativ gegen HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet. Weitere Ausschlusskriterien waren: manifeste Infektionen während der letzten 4 Wochen, Fieber, symptomatische Allergien, abnormes Blutbild, erhöhte Leberwerte, chronische Medikamenteneinnahme außer Vitamine und orale Kontrazeptiva.

Die cDNA wurde vom Hersteller aus sogenannter Poly A<sup>+</sup>-RNA hergestellt. Die mRNA enthält, im Gegensatz zu tRNA oder rRNA, einen Abschnitt, der polyadenyliert ist. (Poly A-Schwanz) Durch den angewandten Selektionsprozess wurde vom Hersteller spezifisch mRNA zur cDNA Synthese ausgewählt.<sup>127</sup> Die fehlende tRNA und rRNA hat keinen Einfluss auf die Menge der später detektierten Transkripte, jedoch bedingt dieses Verfahren, dass das gewöhnlich verwendete rRNA-Molekül 18S für die spätere Analyse mit RT-PCR nicht als Normalisierungs- oder Haushaltsgen verwendet werden konnte. Deswegen erfolgte die spätere mRNA Expressionsbestimmung mit Hilfe des Haushaltsgens GAPDH, das auch vom Hersteller empfohlen wird. Weiterhin waren die Proben frei von Verunreinigungen mit genomischer DNA und wurden vom Hersteller auf ihre einwandfreie Qualität geprüft.

**Tabelle 3: Anzahl und Alter der Individuen, deren Organproben für die cDNA-Synthese verwendet wurden**

<b>Organe</b>	<b>Anzahl der Individuen</b>	<b>Alter (Jahre)</b>
Lunge	1	50
Leber	1	35
Niere	4	28-48
Dünndarm	32	15-57
Dickdarm	5	27-61
Hoden	45	14-64
Milz	3	49-54
Thymus	9	20-40
Gehirn	8	43-65
Herz	3	24-41

### 2.2.3. Ischämie Reperusionsmodell der murinen Niere

An 8 Wochen alten C57BL/6 Mäusen wurde durch eine unilaterale Abklemmung der großen renalen Gefäße ein akuter Nierenschaden induziert. Vor der Operation wurden die Mäuse durch intraperitoneale Injektion eines Medikamentengemisches narkotisiert. Dieses bestand aus: 5 ml *Midazolam* (1 mg/ml), 0,5 ml *Medetomidin* (1 mg/ml) und 1 ml *Fentanyl* (0,05 mg/ml). Mit Hilfe einer Kanüle und Spritze wurden je nach Gewicht der Maus 150 µl - 200 µl des Narkosemixes intraperitoneal im linken unteren Abdominalbereich appliziert. Nach 10 Minuten waren die Mäuse tief anästhesiert und zeigten keine Reaktion auf Schmerzreize. Die Augen wurden mit *Bepanthen* Salbe bedeckt und somit die Hornhaut vor Austrocknung geschützt. Anschließend wurden die Mäuse mit einem Klebeband am Schwanz fixiert. Durch gezieltes Einsprühen der rechten Flanke mit 70%-igem Ethanol konnte eine grobe Desinfektion des Operationsgebietes erreicht werden. Um der Auskühlung der Maus aufgrund der Anästhesie und der Verdunstung des Desinfektionsmittels entgegenzuwirken, wurde über die gesamte Operationsdauer und auch postoperativ eine 100-Watt Infrarot-Wärmelampe eingesetzt. So konnte sichergestellt werden, dass die Körpertemperatur stets zwischen 35°C und 37°C betrug. Zusätzlich fand die Operation auf einem Wärmepad statt. Eine Überprüfung der Körpertemperatur erfolgte durch eine rektal angewendete Thermosonde.

Durch einen 1 cm langen Schnitt an der rechten Flanke konnte vorsichtig eine Niere freipräpariert und vorluxiert werden. Nachdem Nierengefäße und Ureter identifiziert werden konnten, wurde das komplette Gefäß-Ureter Bündel mit Hilfe eines wieder entfernbaren Clips abgeklemmt. Um die Niere vor Austrocknung zu schützen wurde sie wieder zurück in die Bauchhöhle geschoben und die offene Wunde mit einer 0,9%igen NaCl-Lösung getränkten Kompresse bedeckt. Nach Ablauf der Ischämiezeit erfolgten die vorsichtige Entfernung des Clips und eine visuelle Überprüfung der wiederhergestellten Perfusion. Die Inzision im Peritoneum und die Hautwunde wurden mit jeweils zwei Stichen vernäht. Kurz darauf konnte durch subkutane Injektion von 200µl eines Antagonistengemisches in die Nackenfalte der Maus eine Beendigung der Narkose herbeigeführt werden. Dieses Gemisch bestand aus: 0,5 ml *Atipamezol* (5 mg/ml), 5 ml *Flumazenil* (0,1 mg/ml) und 3 ml *Naloxon* (0,4 mg/ml)

Nach Aufwachen der Tiere aus der Narkose wurden zur postoperativen Analgesie zwei Tropfen *Metamizol* (2,5 mg/ml) per os verabreicht. Während der folgenden zwei Stunden wurde weiterhin mit einer Infrarotlampe verhindert, dass die Mäuse auskühlen.

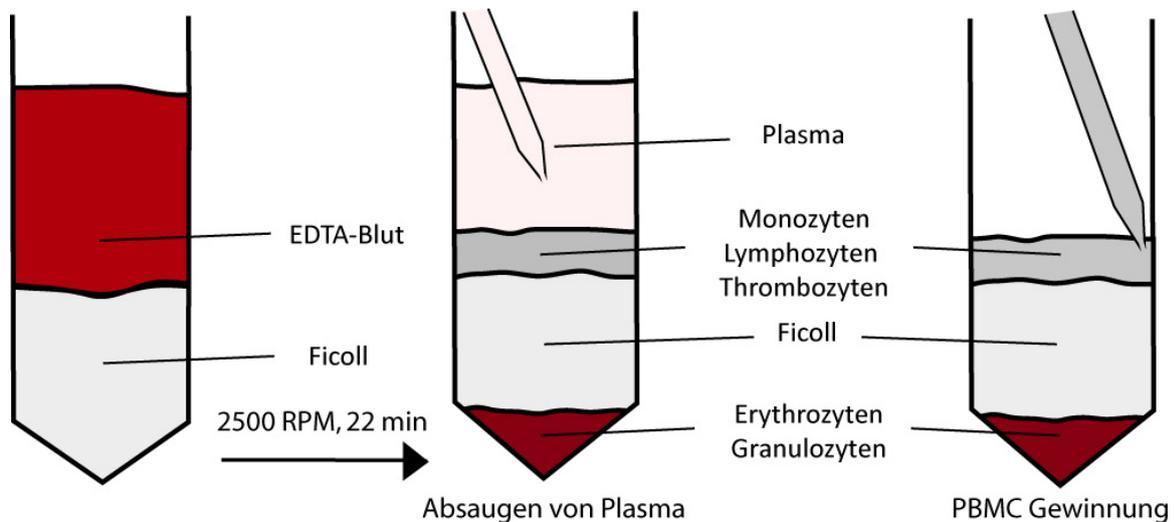
Alle durchgeführten Mausversuche wurden vorher genehmigt und fanden entsprechend der deutschen Tierschutzgesetze statt.

#### 2.2.4. Isolation und Stimulation von PBMCs

Bei PBMCs (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*) handelt es sich um alle mononukleären Zellen des peripheren Blutes.<sup>128</sup> Die Isolation der PBMCs wurde sowohl an Blut eines humanen Spenders sowie an murinem Blut durchgeführt.

Beim menschlichen Blutspender handelte es sich um einen gesunden, männlichen Erwachsenen im Alter von 24 Jahren. Die Blutentnahme und das nach der Isolation folgende Experiment mit humanen Zellen wurden im Vorfeld von der Ethikkommission der Universität München geprüft und genehmigt. Nach der schriftlichen Einverständniserklärung des Probanden erfolgten die Punktion einer gestauten Vene und die Aspiration von insgesamt 25 ml Blut mit Hilfe eines *Butterfly*-Blutentnahmesystems in 7,5 ml EDTA-Röhrchen.

Die Gewinnung von murinem Blut fand an anästhesierten sechs Wochen alten C57BL/6 Mäusen durch Punktion des Herzens statt. Die Mäuse wurden hierzu durch interperitoneale Injektion eines Gemisches aus Narkosemitteln anästhesiert. Die Narkotika enthielten wie bereits beim Ischämie-Reperfusionmodell 5 ml *Midazolam* (1 mg/ml), 0,5 ml *Medetomidin* (1 mg/ml) und 1 ml *Fentanyl* (0,05 mg/ml). Danach erfolgte in Rückenlage die Punktion unterhalb des Rippenbogens und unter Aspiration das Vorschieben der Kanüle in den linken Ventrikel.<sup>129</sup> Es wurden 15 männliche Tiere verwendet und pro Maus konnte 1 ml Blut mit Hilfe von sterilen Spritzen und Kanülen gewonnen werden. Die Spritzen enthielten EDTA, so dass die Konzentration in der entnommenen Probe genauso wie in den humanen Entnahmeröhrchen 1,6 mg EDTA/ml Blut betrug. Nach der Blutentnahme erfolgte die Tötung der anästhesierten Tiere durch zervikale Dislokation. Im Anschluss wurde mit dem für beide Spezies gleichen PBMC Isolationsprotokoll fortgefahren. Dazu wurden die Proben 1:1 mit PBS verdünnt und vorsichtig mit Hilfe der serologischen Pipette auf *Ficoll* geschichtet. Anschließend wurde mit 2500 Umdrehungen/min für 22 Minuten zentrifugiert. Es erfolgte ein sehr langsames Abbremsen der Zentrifuge, um einer Verwirbelung der Schichtung vorzubeugen. Durch die Zentrifugation stellen sich die unterschiedlichen Bestandteile des Blutes im Reaktionsgefäß von unten nach oben wie folgt dar: Erythrozyten/Granulozyten; *Ficoll*; Monozyten/Lymphozyten/Thrombozyten; Plasma.<sup>128</sup> Nach Absaugen des Plasmas konnte danach gezielt die Monozyten und Lymphozyten enthaltende Schicht abpipettiert werden. (siehe Abbildung 5)



**Abbildung 5: Experimentelles Vorgehen bei Isolation der PBMCs.**

Das EDTA-Blut wurde langsam auf *Ficoll* geschichtet und anschließend mit 2500 Umdrehungen pro Minute für 22 Minuten zentrifugiert. Dann erfolgte vorsichtig die Entfernung des überstehenden Plasmas und anschließend die Isolation der PBMC enthaltenden Schicht.

Die gewonnenen Zellen wurden anschließend zweimal mit PBS gewaschen und jeweils mit 1500 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Resuspension der Zellen in 2 ml Zellkulturmedium. Dieses bestand aus RPMI-Medium, 1% fetalem Kälberserum und 1% Penicillin/Streptomycin. Die Zählung der Zellen erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer. Hierfür wurden 10µl der Zellsuspension 1:100 mit PBS verdünnt und Trypanblau hinzugegeben. Mit Hilfe eines Mikroskops wurde die Anzahl der Zellen in der Zählkammer in 4 Großquadraten bestimmt. Durch die vorherige Anfärbung mit Trypanblau, das gezielt das Zytoplasma toter Zellen anfärbt, konnten selektiv nicht-vitale Zellen von der Zählung ausgeschlossen werden. Die Berechnung der Zellzahl erfolgte mit folgender Formel:

$$\text{Zellzahl/ml} = \frac{\text{gezählte Zellen in 4 Großquadraten}}{4} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

Anschließend wurden jeweils 1 Million Zellen zusammen mit 2 ml des oben beschriebenen Zellkulturmediums in *6-well* Kunststoffplatten ausgesät. Die Stimulation erfolgte anschließend mit 500ng LPS /ml oder PBS zur Kontrolle bzw. 10ng LPS /ml oder PBS zur Kontrolle. Anschließend wurden die Platten für 4, 12, 18 oder 24 Stunden inkubiert. Die Inkubation im Brutschrank fand bei einer Temperatur von 37°C und einer CO<sub>2</sub>-Luftkonzentration von 5% statt. Pro Versuchsgruppe und Dauer der Stimulation wurden drei unabhängige Stimulationen durchgeführt, wodurch die spätere statistische Ermittlung von Signifikanzen möglich wurde.

Die Überstände wurden nach den jeweiligen Zeiträumen abgenommen und bei -20 °C verwahrt. Ebenso wurden die adhärennten Zellen durch Zugabe von Lysepuffer mit 1%  $\beta$ -Mercaptoethanol lysiert und zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

Zur Gewährleistung steriler Bedingungen wurden alle Isolationen, Stimulationen bzw. Überführungen von Zellen mit Hilfe der Sterilbank durchgeführt. Darüber hinaus wurde die Arbeitsfläche zur Abtötung von Mikroorganismen täglich für 30 Minuten mit UV-Licht bestrahlt.

Verwendete Gebrauchsgegenstände wie Pipetten, Stifte sowie Oberflächen von Zellkulturflaschen, Reaktionsgefäßen und der Sterilbank wurden vor Gebrauch mit 70%-igen Ethanol zur Desinfektion gereinigt. Materialien, die mit den zu stimulierenden Zellen direkt in Berührung kamen wie Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße, Zellkulturflaschen, Blutentnahmesysteme waren vom Hersteller steril verpackt beziehungsweise wurden zuvor bei 120°C für 20 Minuten autoklaviert.

### **2.2.5. RNA-Isolation**

Von den bei der Organentnahme in *RNAlater*-Lösung konservierten Geweben wurden zunächst die Organkapseln entfernt und etwa 10 mg große Stücke entnommen. Diese wurden zusammen mit Lysepuffer und 1%  $\beta$ -Mercaptoethanol im Homogenisator für 30 Sekunden zerkleinert. Nach Zentrifugation für dreieinhalb Minuten mit 10000 Umdrehungen/min wurden die RNA-enhaltenden Überstände abgenommen und für die weitere Isolation mit dem *RNA Mini Kit* gemäß Herstellerangaben verwendet. Dazu wurden die Proben 1:1 mit 70%-igem Ethanol versetzt und mit Hilfe des Vortexers gemischt. Das entstehende Ethanol-Lysat-Gemisch wurde auf eine RNA-Säule aufgetragen, die sich in einem vom Hersteller bereitgestellten, 2 ml fassenden Röhrchen befand. Nach Zentrifugation mit 10000 Umdrehungen/min für 15 Sekunden verblieb die RNA in der Membran der Säule während die gefilterte Flüssigkeit verworfen wurde. Dann erfolgten mehrere Waschschriffe, um die RNA in der Säule aufzureinigen. Als erstes wurden 700 $\mu$ l des *Wash Buffer 1* auf die Säule gegeben, gefolgt von einer weiteren Zentrifugation mit 10000 Umdrehungen/min für 15 Sekunden. Nach erneutem Verwerfen der gefilterten Flüssigkeit wurden jeweils zweimal 500 $\mu$ l des *Wash Buffer 2* auf die Säule aufgetragen mit nachfolgender Zentrifugation mit 10000 Umdrehungen/min - beim ersten Mal für 15 Sekunden und beim zweiten Mal für 2 Minuten. Nach jedem Schritt wurde die gefilterte Flüssigkeit entfernt. Als letzter Schritt wurde die Säule ohne vorher *Wash Buffer* aufzutragen mit 14000 Umdrehungen/min für 1 Minute

„trocken“ zentrifugiert. Es folgte das Eluieren der RNA durch Auftragen von 33µl *RNase-free water*. Nach 2 Minuten Inkubationszeit wurde die nun in *RNase-free water* gelöste RNA durch Zentrifugieren mit 10000 Umdrehungen/min für 2 Minuten in einem sterilen Eppendorfgefäß gesammelt. Die RNA-Proben wurden zur weiteren Verwendung bei -20° C verwahrt.

Die Qualität der gewonnenen RNA wurde mit Hilfe eines Spektrometers durch Bestimmung der RNA-Konzentration und der optischen Dichte bei 260nm bzw. 280nm überprüft. Bei einem Verhältnis zwischen 1,95 und 2,05 wurde von einer reinen RNA-Probe ausgegangen. Werte größer als 2,05 sprachen für eine DNA-Kontamination, Werte unterhalb von 1,95 deuteten auf eine Protein-Kontamination hin. Proben, die nicht den Qualitätsstandards entsprachen wurden dementsprechend verworfen.

### **2.2.6. cDNA-Synthese**

Die Synthese der stabilen, doppelsträngigen cDNA aus der labilen, einsträngigen RNA erfolgte möglichst zeitnah. Dazu wurden zunächst die RNA Proben so mit *RNase-free water* verdünnt, dass sich in jedem Eppendorfgefäß 10 µl mit 1 µg RNA befanden. Es folgte ein Inkubationsschritt bei 65°C für 5 Minuten, gefolgt von einer kurzen Zentrifugation. Dann wurden pro verdünnter Probe 4µl *FS buffer 5x*; 0,4µl *dNTPs 25mM*; 1µl *DTT 0,1M*; 0,25µl *Acrylamid*; 0,215µl *Hexanucleotid*; 3,2µl *RNase free water* und 0,5µl *RNasin* hinzugegeben. Weiterhin wurden 0,435µl der Reversen Transkriptase *Superscript II* hinzupipettiert, ein Enzym das RNA in DNA umzuschreiben vermag. Bei der Herstellung der Negativkontrollen fand die Synthese bis auf die Zugabe von *Superscript II* nach dem gleichen Protokoll statt. Nach kurzem Mischen mit Hilfe der Pipette wurden alle Eppendorfgefäße für 90 Minuten bei 42°C inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzyms wurde die synthetisierte cDNA für 5 Minuten auf 90°C erhitzt und dann kurzfristig auf Eis bzw. langfristig bei -20°C aufbewahrt.

### 2.2.7. RT-PCR

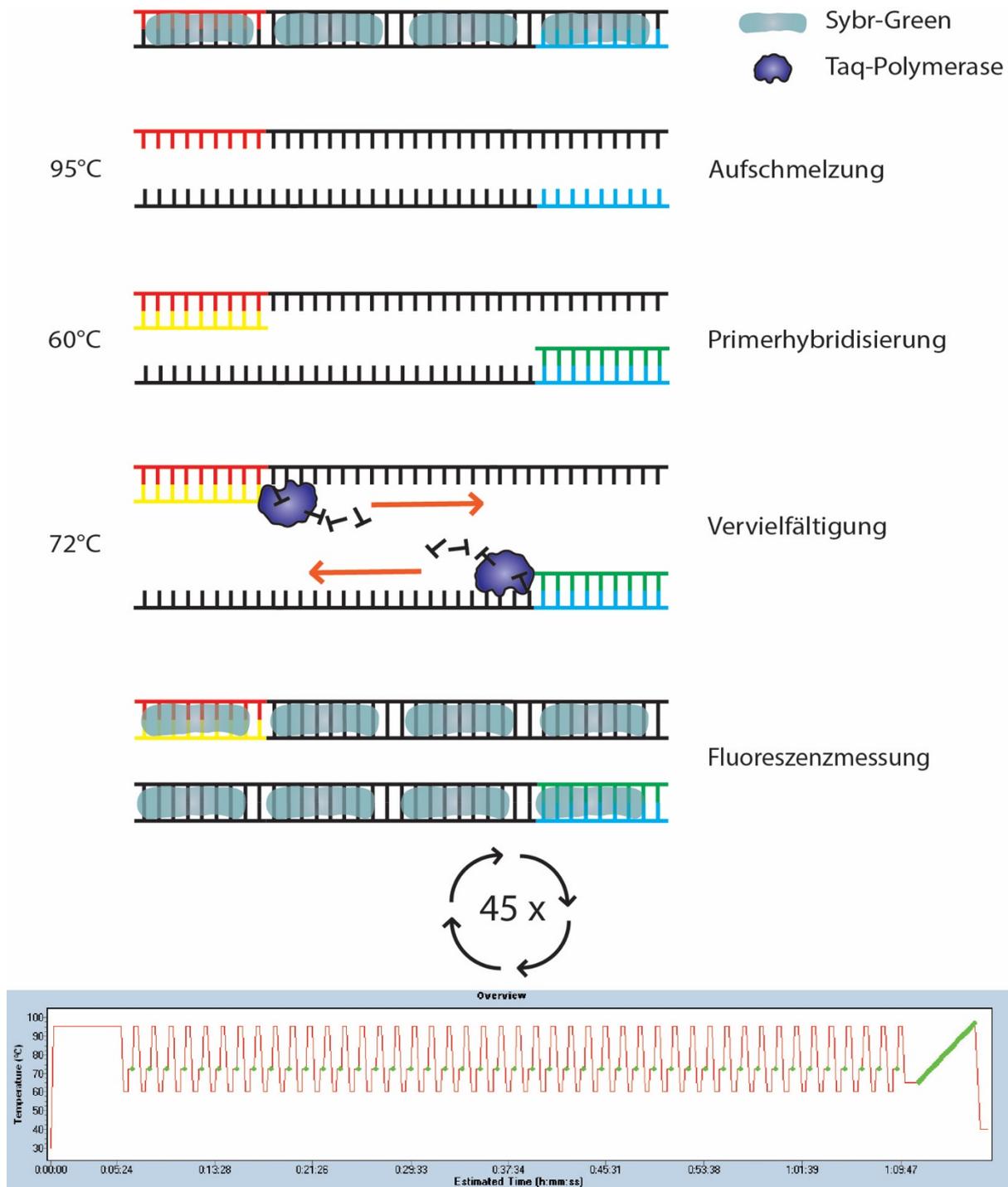
Um einen Rückschluss auf die mRNA-Expression in den Proben zu ziehen, wurde die synthetisierte cDNA anschließend mit Hilfe der Reversen-Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) untersucht. Das Prinzip der RT-PCR unterscheidet sich nur wenig zur klassischen Polymerasekettenreaktion. Jedoch wird als Analysat die aus RNA synthetisierte cDNA verwendet und nach jedem Vervielfältigungsschritt erfolgt eine Fluoreszenzmessung. Jede Reaktion erfolgte mit 0,2 µl der synthetisierten cDNA Probe, 8,44 µl sterilem Wasser, 10 µl des *SybrGreen*®-Puffers und 0,16 µl des Enzyms *Taq-Polymerase*. Zusätzlich wurden die für jedes Gen spezifischen Primer 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt und jeweils 0,6 µl des rechten und des linken Primers hinzugefügt. Nach Zusammenpipettieren der Reagenzien auf einer *96-well* RT-PCR Platte und Versiegelung mit einer Folie wurden im *LightCycler 480* die automatisierten PCR-Zyklen initiiert. Jeder Zyklus bestand aus einer Strangtrennungsphase bei 95°C, einer Primerhybridisierungsphase bei 60°C, in der sich die Primer spezifisch am geplanten Amplifikationstück in der DNA anlagern und einer Amplifikationsphase bei 72°C. Durch Wiederholung dieses Zyklus kommt es gezielt zu einer exponentiell steigenden Vervielfältigung des gesuchten DNA-Stückes (Amplicon). Der Ablauf wurde insgesamt 45-mal wiederholt. Der in dem Reaktionsgemisch enthaltene Fluoreszenzfarbstoff *SybrGreen*® besitzt die Eigenschaft sich an doppelsträngige DNA anzulagern. Nach jedem Zyklus wird eine automatisch ablaufende Fluoreszenzmessung durchgeführt, wodurch man auf die Anzahl der DNA-Kopien schließen kann. (siehe Abbildung 6)

Im Zyklus-Fluoreszenz Diagramm konnte für jede Analyse der sogenannte Cp-Wert bestimmt werden. Der Cp-Wert ist definiert als der Zeitpunkt, an dem die durch das amplifizierte DNA-Produkt verursachte Fluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz übersteigt. (siehe Abbildung 7) Sind in einer Probe von vornherein bereits viele der gesuchten cDNA-Fragmente vorhanden, kommt es zu einem verfrühten Anstieg der Fluoreszenz und folglich zu einem niedrigen Cp-Wert. Hingegen deutet ein hoher Cp-Wert auf einen späten Fluoreszenzanstieg hin und bedeutet, dass anfangs die Probe einen niedrigen Gehalt an dem gesuchten cDNA-Fragment aufwies. In Analysen mit einem Wert von 40 und höher wurden die jeweils bestimmten Genexpressionen als nicht nachweisbar angesehen. Als zusätzliche Kontrolle wurden für jeden Primer und jede Analysenplatte der Cp-Wert von *ddH<sub>2</sub>O* bestimmt, der stets nicht nachweisbar war.

Um eine relative Quantifizierung durchzuführen, wurden die Cp-Werte für das zu untersuchende Gen ins Verhältnis zum Cp-Wert eines *housekeeping* Gens wie z.B. 18S oder GAPDH gesetzt. Dabei handelt es sich um kontinuierlich in allen Zellen exprimierte Gene. 18S ist Teil der ribosomalen RNA und wurde als *housekeeping* Gen für das Ischämie-Reperusionsmodell und die LPS-Stimulation gewählt, da es vor allem in PBMCs unter Stimulierungsbedingungen das stabilste der *housekeeping* Gene ist.<sup>130</sup> GAPDH ist das Enzym *Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase* und wurde für die Analyse der humanen und murinen Basalexpression verwendet. Aufgrund des Herstellungsprozesses der erworbenen humanen cDNA von *Clontech* konnte hier 18S nicht zur Normalisierung verwendet werden. Deswegen wurde zum Zweck der späteren Vergleichbarkeit GAPDH gewählt. Ferner war bei der mRNA Expressionsbestimmung in humanen Organen, aufgrund des herstellerbedingten Vorhandenseins nur einer Probe pro Organ, keine Bestimmung biologisch unabhängiger Werte möglich. Deswegen konnten hierfür keine Standardabweichungen berechnet und Signifikanzbestimmungen durchgeführt werden.

Die Berechnung der Cp-Werte erfolgte durch *LightCycler® 480 Software*. Weitere Berechnungen, die statistische Auswertung sowie die Darstellung der Tabellen und Graphen erfolgte mit *Microsoft Excel®*, *GraphPad Prism®* und *Adobe Illustrator®*.

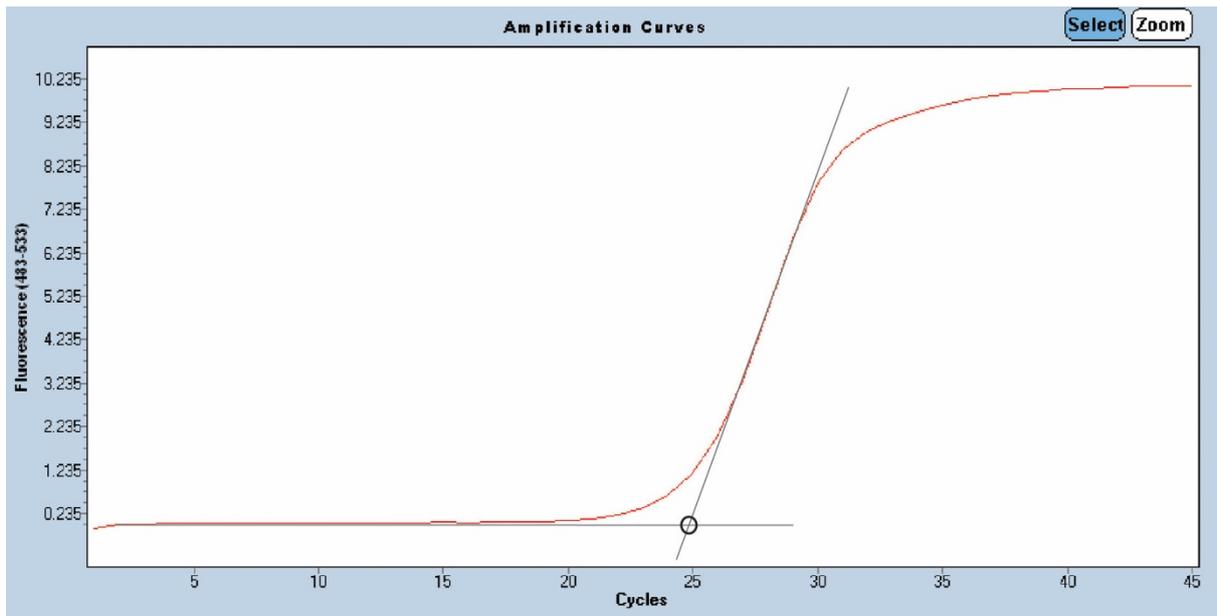
Um zu überprüfen, dass die amplifizierten DNA-Fragmente mit dem vorhergesagten Amplicon für das jeweilige Gen übereinstimmen, wurde nach der RT-PCR eine Gelelektrophorese der Produkte durchgeführt. Hierbei konnte die vorhergesagte Anzahl an Basenpaaren für jedes untersuchte Gen bestätigt werden.



**Abbildung 6: Schematisch dargestellter Ablauf der PCR Zyklen im Lightcycler.**

Das zu amplifizierende Stück wird im oberen Strang von der linken Primerzielsequenz (rot) und im unteren Strang von der rechten Primerzielsequenz flankiert. (blau) Nach Strangtrennung bei 95°C liegen die Primerzielsequenzen frei und können in der Primerhybridisierungsphase von den zwei jeweiligen Primern (gelb und grün) spezifisch gebunden werden. Mit Hilfe der Taq-Polymerase und freien dNTPs kommt es zur Elongation des Stranges und damit spezifisch zur Vervielfältigung des amplifizierten DNA-Stückes.

Mit Hilfe von *SybrGreen*<sup>®</sup>, das sich an doppelsträngige DNA anlagert, erfolgt nach jedem der 45 Zyklen eine Fluoreszenzmessung. In der Abbildung unten befindet sich die Verlaufskurve der Temperatur und die Zeitpunkte der Messungen.<sup>131</sup> Den Zyklen geht eine fünfminütige Initiationsphase bei 95°C voraus. Am Ende erfolgt die Bestimmung der Primerschmelzkurven zur Qualitätssicherung.



**Abbildung 7: Beispielhafte Cp-Wert Bestimmung aus Zyklus-Fluoreszenz Diagramm**

Auf der x-Achse ist die Anzahl der Zyklen im Verlauf der Zeit angegeben. Auf der y-Achse befinden sich die Fluoreszenzmesswerte. Die Ermittlung des Cp-Werts erfolgt automatisch und ergab hier beispielhaft 24,70. Das bedeutet, dass es nach errechneten 24,70 Zyklen zu einem signifikanten Anstieg der gemessenen Fluoreszenz gegenüber der Hintergrundfluoreszenz kam.

### 2.2.8. Auswahl der Primer

Das Entwerfen der Primersequenzen fand mit Hilfe von *Primer3* statt. Dabei handelt es sich um ein im Internet zugängliches Computerprogramm. *Primer3* ist in der Bioinformatik und medizinischen Forschung anerkannt und ein oft eingesetztes Instrument.<sup>132,133</sup> Nach Festlegen von diversen Parametern, wie z.B. Länge des amplifizierten Stückes auf der DNA sowie Länge und Schmelztemperatur des Primers, errechnet das Programm ein geeignetes Primerpaar. Darüber hinaus wurde *qPrimerDepot* zur Vorauswahl von möglichen Primerpaaren verwendet. Dabei handelt es sich um eine ebenfalls anerkannte Datenbank von Primern, die spezifisch auf die Anforderungen von RT-PCR zugeschnitten sind. Diese Datenbank nutzt ebenfalls das Programm *Primer3* für das Erstellen der Paare.<sup>134</sup> Die erstellten Sequenzen für die Primer erfüllten folgende Kriterien: Länge des amplifizierten DNA-Produkts zwischen 80 und 148 Basenpaaren und Länge der Primer zwischen 17 und 26 Basenpaaren. Darüber hinaus wurden - soweit möglich - nur Primerpaare gewählt deren Zielsequenz sich auf unterschiedlichen Exons befindet. Dadurch konnte vermieden werden, dass die Zielsequenz in eventuellen genomischen DNA-Verunreinigungen repliziert wird.

Hierbei kommt es aufgrund des enthaltenen Introns zu einem sehr langen Amplifikationsstück, das in der kurzen PCR-Zyklus Zeit nicht fertig synthetisiert werden kann. Somit wird die synthetisierte DNA-Kette abgebrochen bzw. es kommt im nächsten PCR-Zyklus zur Strangtrennung. Tabelle 4 zeigt die für die Analysen verwendeten humanen und murinen Primerpaare.

**Tabelle 4: Humane und murine Primer für RT-PCR**

**Humane Primer**

Gen		Sequenz
A20	NM_006290	LP: 5'- GGACTTTGCGAAAGGATCG -3'
		RP: 5'- TCACAGCTTTCCGCATATTG -3'
CYLD	NM_015247	LP: 5'- TTTGATGGAGTGCAGCTTTG -3'
		RP: 5'- CTCCTTTCCTGCGTCACACT -3'
DUBA	NM_017602	LP: 5'- GCAGGCTACAACAGTGAGGAC -3'
		RP: 5'- GCCTTTTCAAACCAATGCTC -3'
ST2	NM_003856	LP: 5'- CCCACTCAGGAAAGAAATCG -3'
		RP: 5'- TTCGCATATCCAGTCCTATTGA -3'
CD180	NM_005582	LP: 5'- CACCTCCTGGGATCAGATGT -3'
		RP: 5'- TGGTAGAGTGTGAGGGATTTC -3'
SIGIRR	NM_021805	LP: 5'- CCCAGCTCTTGGATCAGTCT -3'
		RP: 5'- AGTCAGGGGCCCTATCACAG -3'
TANK	NM_133484	LP: 5'- CAAAGGAAGACTTGTAACCTGGA -3'
		RP: 5'- AGTTGCTCGCCAATGTTTTT -3'
SOCS1	NM_003745	LP: 5'- GACCCCTTCTCACCTCTTGA -3'
		RP: 5'- GTAGGAGGTGCGAGTTCAGG -3'
SOCS3	NM_003955	LP: 5'- GGAGACTTCGATTCGGGACC -3'
		RP: 5'- GAAACTTGCTGTGGGTGACC -3'
SHIP	NM_005541	LP: 5'- GTGACCCATCTGCAATACCC -3'
		RP: 5'- GGGTGGAGACACGACACTTT -3'
IRAK-M	NM_007199	LP: 5'- CTCGGTCATCTGTGGCAGTA -3'
		RP: 5'- TTCTAGGTGGGACCGGAAGT -3'
DOK1	NM_001381	LP: 5'- AGAGTCAGCGCTTTGGGAC -3'
		RP: 5'- CGACCCCTTATGGTCAAAGA -3'
DOK2	NM_003974	LP: 5'- GTACAGCAGCGCAGTCACAG -3'
		RP: 5'- AGCCCGGAGGGTATAGGAC -3'
SHP1	NM_080548	LP: 5'- CCCTCCCTACAGAGAGATGCT -3'
		RP: 5'- GAAGCTACCGTGGACACCTC -3'

SHP2	NM_002834	LP: 5'- GCGGGAGGAACATGACATC -3'	RP: 5'- CGGAAAGTGTGAAGTCTCCAG -3'
TOLLIP	NM_019009	LP: 5'- GACAACGTCTCCGTCGCA -3'	RP: 5'- CGGGAGCTCACCGATGTA -3'
IRF4	NM_002460	LP: 5'- CCTGCAAGCTCTTTGACACA -3'	RP: 5'- GAGTCACCTGGAATCTTGGC -3'
SIKE	NM_025073	LP: 5'- GTGGATGCTGAACCAGTCCT -3'	RP: 5'- CCACCTGAACTGCTTTCCTC -3'
NLRX1	NM_024618	LP: 5'- CTGCCTCTGCTCTTCAACCT -3'	RP: 5'- CTCGAAACATCTCCAGCACC -3'
ERBIN	NM_018695	LP: 5'- AATCATGTCAAGCGAAGCCT -3'	RP: 5'- TGGGTTGAATTTATCTCCCTG -3'
CENTB1	NM_014716	LP: 5'- GCCTCTATTGAGCTGGTGGGA -3'	RP: 5'- ACTTTCAGGAGACCAGTGC -3'
Clec4a2	NM_011999	LP: 5'- AGAGCTGGTTCATACAACATTGG -3'	RP: 5'- TGACTIONCAATTCTTTGGGC -3'
GAPDH	NM_002046	LP: 5'- GAAGGTGAAGGTCGGAGTC -3'	RP: 5'- GAAGATGGTGATGGGATTTC -3'
18S	NR_003278	LP: 5'- GCAATTATCCCCATGAACG -3'	RP: 5'- AGGGCCTCACTAAACCATCC -3'

**LP = linker Primer, RP = rechter Primer,  
NM\_XXXX = offizieller Code für das jeweilige Gen**

### Murine Primer

Gen	Sequenz
A20	LP: 5'- AAGCTCGTGGCTCTGAAAAC -3' RP: 5'- TTCCTCAGGACCAGGTCAGT -3'
CYLD	LP: 5'- GGGATGGAAGGTTTGATGG -3' RP: 5'- CTCCTTTCCTGTGTCACGCT -3'
DUBA	LP: 5'- AGCGGGCTACAACAGTGAAG -3' RP: 5'- AAGGCCTTTTCAAACCAGTG -3'
ST2	LP: 5'- TGACGGCCACCAGATCATTACAG -3' RP: 5'- GCCAAAGCAAGCTGAACAGGCAATAC -3'
CD180	LP: 5'- GAGCCACCACATCCTCAGAT -3' RP: 5'- TGAGTTTGGTAAAGTGCCAGG -3'
SIGIRR	LP: 5'- GGATGACAAAGATCCCATGC -3' RP: 5'- ATGCAGATCCTGGTTTCCTG -3'
TANK	LP: 5'- GCTTCCAGAATGGGTACGTG -3' RP: 5'- TGGTAGGAATGCCAGCTCTC -3'

SOCS1	NM_009896	LP: 5'- ACTTCTGGCTGGAGACCTCA -3'
		RP: 5'- ACAAGCTGCTACAACCAGGG -3'
SOCS3	NM_007707	LP: 5'- AAGGCCGGAGATTTTCGCT -3'
		RP: 5'- AACTTGCTGTGGGTGACCAT -3'
SHIP	NM_010566	LP: 5'- GCTGTTCCGGAATTGTGTTT -3'
		RP: 5'- GTGAAGAACCTCATGGGGAC -3'
IRAK-M	NM_028679	LP: 5'- CACTGCTGGGAGAGCTTTG -3'
		RP: 5'- CCAGCCAGCTGTTTGAAAGT -3'
DOK1	NM_010070	LP: 5'- TTTTCTGCCTTGGAGATGCT -3'
		RP: 5'- GCTCCAGGATTTGACTCTGC -3'
DOK2	NM_010071	LP: 5'- ATGGTCAGGATGGAGGAGC -3'
		RP: 5'- ATATAACACGGCTGCGAACC -3'
SHP1	NM_013545	LP: 5'- GTACCCACTGAACTGCTCGG -3'
		RP: 5'- ATCACCAGGTTGGCTGAGAC -3'
SHP2	NM_011202	LP: 5'- GACGGGAGGAACATGACATC -3'
		RP: 5'- AAAACTGCCATCGACTCCTC -3'
TOLLIP	NM_023764	LP: 5'- GCGGGTCTCTGTGCAGTT -3'
		RP: 5'- TGTGGGTGTTATACGGAGGAA -3'
IRF4	NM_013674	LP: 5'- TGCAAGCTCTTTGACACACA -3'
		RP: 5'- CAAAGCACAGAGTCACCTGG -3'
SIKE	NM_025679	LP: 5'- TTCAGGTGGACGATAACCAA -3'
		RP: 5'- GAGATTCCTGCTGATGGACAG -3'
NLRX1	NM_178420	LP: 5'- CACCTGGGTACCTTCGTGTT -3'
		RP: 5'- GCCCACAAATTCAACCACTT -3'
ERBIN	NM_021563	LP: 5'- GCCCTGAGACACCCTGAGA -3'
		RP: 5'- CAACCGCACAAACAACTTC -3'
CENTB1	NM_153788	LP: 5'- CCTCGATTGAACTGGTGGAA -3'
		RP: 5'- AGGTAATGCTGTCCGCTCTC -3'
Clec4a2	NM_011999	LP: 5'- GCACAATGAATTGAACTGCAC -3'
		RP: 5'- GGAACCAAGTAGCAGTGGGA -3'
GAPDH	NM_008084	LP: 5'- CGTCCCGTAGACAAAATGGT -3'
		RP: 5'- TTGATGGCAACAATCTCCAC -3'
18S	NR_003278	LP: 5'- GCAATTATCCCCATGAACG -3'
		RP: 5'- AGGCCTCACTAAACCATCC -3'

---

**LP = linker Primer, RP = rechter Primer,  
 NM\_XXXX = offizieller Code für das jeweilige Gen**

### 2.2.9. ELISA

Beim ELISA handelt es sich um den sogenannten *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*. Dabei werden mit Hilfe von verschiedenen Antikörpern und einer enzymatischen Farbreaktion verschiedene Proteine nachgewiesen. In der vorliegenden Arbeit wurde der bei Entzündungen freigesetzte Mediator Interleukin-6 (IL-6) im Überstand der stimulierten PBMCs nachgewiesen. Dazu wurden spezielle ELISA Platten mit dem primären Antikörper für IL-6 beschichtet. Durch Zupipettieren der abgenommenen Überstände kommt es zur Bindung und Fixierung von IL-6 an die Antikörper. Nach Zugabe eines zweiten Antikörpers, der an ein Enzym gekoppelt ist, kommt es zu einer Farbreaktion die photometrisch quantifiziert werden kann. Die einzelnen Arbeitsschritte wurden entsprechend den Herstelleranweisungen durchgeführt. Dazu fand zunächst die Inkubation bei 4° C über Nacht mit dem verdünnten Primärantikörper statt. Anschließend wurden die Platten mit Waschpuffer gründlich ausgespült. Nach einer weiteren einstündigen Inkubation mit verdünntem FCS wurden die Analysate auf die Platten pipettiert. Danach wurde erneut gewaschen und ein Gemisch aus Sekundärantikörper und einer Peroxidase, die es vermag die Farbstoffreaktion zu starten, aufgetragen. Nach erneutem Waschen erfolgte das Pipettieren der Substratlösung und je nach Anzahl der gebundenen Antigene erfolgte eine mehr oder weniger starke Farbreaktion. Nach 30 Minuten wurde diese durch Zugabe von zweimolarer Schwefelsäure gestoppt.

Im ELISA Lesegerät wurde anschließend die photometrische Quantifizierung der Farbreaktion durchgeführt, die Rückschluss auf die Konzentration von IL-6 gibt. Die weitere Auswertung erfolgte mit *Microsoft Excel*®.

### 2.2.10. PAS-Färbung und immunhistochemische Färbungen

Zur Anfertigung der histologischen Schnitte wurden sowohl die *Periodic Acid Schiff*<sup>34</sup> (PAS)- Färbung als auch immunhistochemische Färbungen verwendet. Zunächst wurden die aus den Mäusen entnommenen Nierenstücke 24 Stunden in 4%-igem Formalin fixiert. Anschließend erfolgte die Einbettung in Paraffin und Anfertigung von 4 µm dünnen Schnitten. Diese wurden auf die mit Ammoniumpersulfat behandelten Objektträger aufgebracht und 12 Stunden lang bei 37°C getrocknet. Jeder Objektträger wurde zuerst in

Xylol, danach mit Hilfe einer absteigenden Ethanolverdünnungsreihe entparaffiniert und schließlich sorgfältig mit Wasser gespült.

Zur Anfärbung mit PAS wurden die Schnitte für 10 Minuten mit einer PAS-Lösung behandelt. Nach Abwaschen mit destilliertem Wasser wurde eine 20-minütige Inkubation mit Schiffschens Reagenz durchgeführt. 20 Minuten später erfolgte nach einem erneuten Waschschrift mit destilliertem Wasser eine Inkubation der Schnitte mit Kalium-Methabisulfit Lösung für 2 Minuten. Danach wurden die Schnitte nach kurzem Abtropfen der zuvor aufgetragenen Flüssigkeit für 2 Minuten in Fixierlösung gegeben. Anschließend erfolgte eine 3-minütige Behandlung mit Mayer's Hemalum Reagenz, danach fand ein weiterer Waschschrift statt. Durch Zugabe von Ethanol wurde dann den Schnitten Wasser entzogen.

Zur immunhistochemischen Färbung mussten die Schnitte zusätzlich zur bereits oben beschriebenen Entparaffinierung noch für 20 Minuten mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Methanol-Lösung behandelt werden. Nach einem Waschschrift mit PBS wurden die Präparate 20 Minuten in einer Demaskierungslösung inkubiert und danach abgekocht. Es folgte jeweils eine 15-minütige Inkubation mit Avidin und Biotin. Als nächstes kam es zur Inkubation mit dem primären Antikörper. Dabei handelte es sich entweder um Antikörper gegen Neutrophile, F4/80 oder gegen Aktin der glatten Muskulatur (SMA).

Je nach verwendetem Antikörper unterschieden sich die Schritte in Konzentration und Inkubationsdauer. Danach erfolgte die Zugabe des passenden sekundären Antikörpers für 30 Minuten und Behandlung mit ABC-Lösung für weitere 30 Minuten. Abschließend wurden die Schnitte noch mit Methylgrün angefärbt, gewaschen und mit hochprozentigem Ethanol fixiert.

**Kapitel 3:**  
**Ergebnisse**

### 3. Ergebnisse

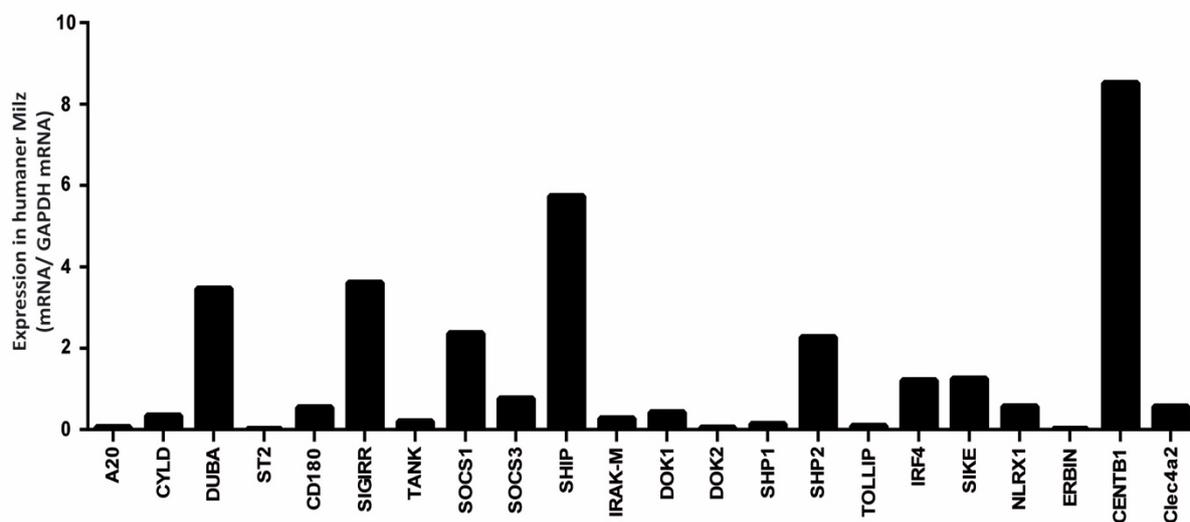
#### 3.1. Negativregulatoren unterscheiden sich zwischen Maus und Mensch

Um einen ersten Überblick über die Präsenz der Negativregulatoren in verschiedenen Geweben unter nicht-pathologischen Verhältnissen zu erhalten, wurde deren Basalexpression in 10 verschiedenen Organen von Maus und Mensch bestimmt. Da später unter Stimulationsbedingungen die relative Vermehrung der Expression dieser Gene gemessen wurde, sind diese Ergebnisse wichtig um die Bedeutung der Expressionsveränderungen einzuordnen. Die untersuchten Organe umfassten Milz, Lunge, Leber, Niere, Dünndarm, Dickdarm, Hoden, Thymus, Gehirn und Herz.

Dazu wurde die cDNA aus Mausorganen, wie im Methodenteil beschrieben, synthetisiert. Die cDNA aus menschlichen Organpräparaten wurde von Clontech, Mountain View, USA käuflich erworben. Mit Hilfe quantitativer RT-PCR wurde die Expression der Negativregulatoren im Vergleich zum Haushaltsgen *Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase* (GAPDH) bestimmt. Da die untersuchten Regulatoren überwiegend in Immunzellen vorkommen, wurde die immunzellreiche Milz als Referenzorgan gewählt und die Expression in anderen Organen im Vergleich zur Milz dargestellt. Hiermit konnte bei einem großen Quotienten zwischen Organexpression und Milzexpression auf eine außergewöhnlich hohe mRNA-Expression des jeweiligen Gens in bestimmten Organen geschlossen werden. Umgekehrt konnte bei einem kleinen Quotienten von einer, relativ zur Milz verminderten Expression ausgegangen werden.

### 3.1.1. Expression in humanen Organen

Alle Negativregulatoren waren kontinuierlich im humanen Milzgewebe exprimiert; nur A20, ST2, DOK2 und ERBIN wiesen einen sehr niedrigen Wert auf. Die meisten Negativregulatoren zeigten im Vergleich zur Milz eine verminderte Expression in fast allen Organen. Ausnahmen ergaben sich bei der Expression im Hoden: TOLLIP zeigte eine 4,3-fach erhöhte Expression, die restlichen Gene waren überwiegend ähnlich bis unterexprimiert. Darüber hinaus war SOCS3 in der Lunge 3,5-fach erhöht. ST2 ist mit einer 182,9-fach erhöhten mRNA-Expression in der Lunge und einer 20,1-fach erhöhten Expression in der Niere besonders hervorzuheben.



Human	A20	CYLD	DUBA	ST2	CD180	SIGIRR	TANK	SOCS1	SOCS3	SHIP	IRAK-M	DOK1	DOK2	SHP1	SHP2	TOLLIP	IRF4	SIKE	NLRX1	ERBIN	CENTB1	Clec4a2
Milz	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Lunge	1.3	0.3	0.4	182.9	0.2	0.3	0.3	0.6	3.5	0.1	0.7	0.3	0.6	1.2	0.6	0.5	0.1	0.6	0.7	0.3	0.1	0.8
Leber	0.1	0.1	0.1	0.2	0.0	0.1	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.2	0.2	0.9	0.0	0.4	0.4	0.1	0.0	0.1
Niere	0.0	0.1	0.2	20.1	0.0	0.2	0.0	0.1	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.9	0.2	0.4	0.0	0.2	0.4	0.2	0.0	0.0
Dünndarm	0.1	0.1	0.2	1.7	0.1	0.1	0.1	0.1	0.3	0.0	0.0	0.1	0.0	0.2	0.1	0.1	0.0	0.2	0.4	0.1	0.0	0.1
Dickdarm	0.1	0.2	0.3	0.1	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.0	0.0	0.1	0.0	1.4	0.4	0.1	0.0	0.3	0.5	0.0	0.1	0.4
Hoden	0.2	2.2	0.4	0.3	0.0	0.0	0.0	0.7	0.1	0.0	0.2	0.2	0.0	0.3	0.6	4.3	0.1	1.8	1.1	0.8	0.0	0.3
Thymus	0.4	0.2	0.3	0.1	0.1	0.1	0.1	0.4	0.3	0.1	0.1	0.1	0.2	0.3	0.2	0.2	0.1	0.2	0.3	0.2	0.3	0.1
Gehirn	0.0	0.1	0.1	0.2	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.3	0.3	0.0	0.1	0.1	0.0	0.0	0.2
Herz	0.0	0.0	0.0	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.0	0.0	0.1	0.2	0.0	0.0	0.0
Skala	0.0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.5	2.0	3.0	5.0	7.0	10.0										

**Abbildung 8: mRNA-Expression der Negativregulatoren in menschlichen Organen**

Es wurde die basale mRNA Expression der jeweiligen Negativregulatoren organspezifisch mit Hilfe von quantitativer RT-PCR bestimmt. GAPDH diente als Haushaltsgen. Das obere Balkendiagramm zeigt die Expression in der humanen Milz. Die untere Tabelle zeigt die x-fach vermehrte oder verminderte mRNA-Expression in den jeweiligen Organen im Vergleich zum Referenzorgan Milz. Grüne Farbtöne indizieren eine verminderte, gelbe Farbtöne eine ähnliche und rote Farbtöne eine übermäßige Expression. Wegen der herstellerbedingt begrenzten Verfügbarkeit nur einer, gepoolten Probe pro Organ konnten keine Standardabweichungen und Signifikanzen berechnet werden.

### 3.1.2. Expression in murinen Organen und Interspeziesvergleich

Als nächster Schritt wurden die mRNA-Expressionen von denselben Genen, die bereits beim Menschen untersucht wurden, bei 12 Wochen alten C57BL/6 Mäusen bestimmt. Die meisten Regulatoren waren in der Milz verstärkt exprimiert mit Ausnahme von SOCS3 und IRAK-M, die besonders niedrige mRNA Mengen aufwiesen.

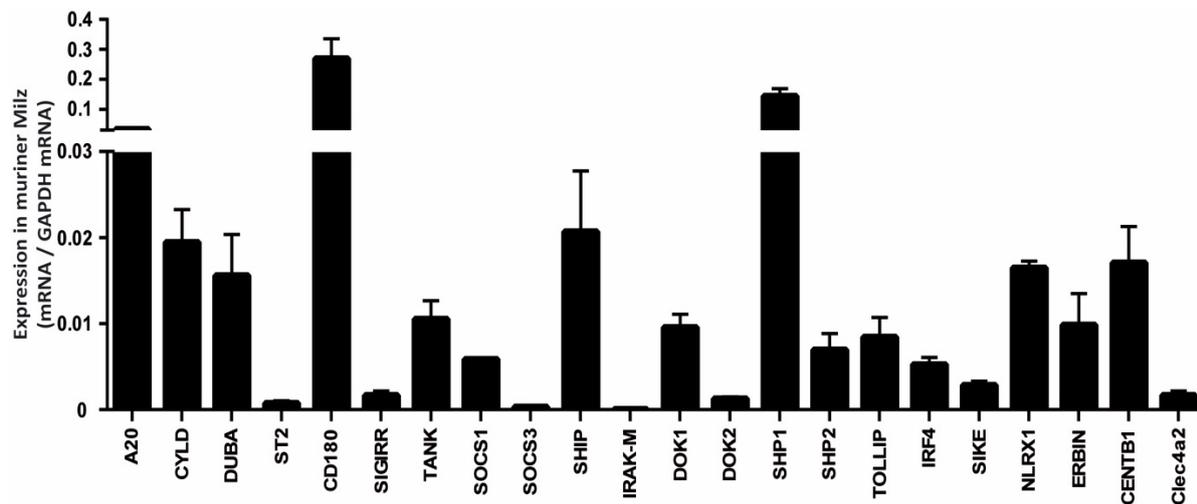
Entsprechend der Beobachtung bei menschlichen Organen, waren auch bei der Maus die meisten Gene im Vergleich zur Milz unterexprimiert, darunter vor allem CD180, TANK, SHIP, DOK1, SHP1, IRF4 und NLRX1. (Abbildung 9)

Dennoch zeigten sich einige Auffälligkeiten: TOLLIP war entgegen anderer Regulatoren in fast allen Organen im Vergleich zur Milz überexprimiert. Besonders hervorzuheben ist die mRNA Expression im Hoden, wo für TOLLIP eine 50,5-fache Erhöhung gegenüber der Milz feststellbar war. Weiterhin zeigte SHP2 eine signifikant vermehrte Expression in Lunge und Hoden. ERBIN war ebenfalls in einer Vielzahl der Organe im Vergleich zur Milz überrepräsentiert, jedoch nur in der Lunge in statistisch signifikantem Ausmaß. Ebenso war die SOCS3 mRNA Expression in der Lunge erhöht. Generell waren in der Lunge die Transkripte vieler Regulatoren wie ST2, SOCS3, SHP2, TOLLIP, SIKE und ERBIN statistisch signifikant vermehrt.

Beim direkten Vergleich zwischen Mensch und Maus, der in Abbildung 10 dargestellt ist, zeigten die meisten untersuchten Gene ein ähnliches mRNA-Expressionsprofil. Eine deutliche Diskrepanz konnte zwischen muriner und humaner Expression von TOLLIP festgestellt werden. In allen Mausorganen bis auf Herz, war TOLLIP im Vergleich zur Milz statistisch signifikant überrepräsentiert. Hierbei stachen vor allem Hirngewebe mit 4,8-facher Expression, Lunge mit 6,8-facher Expression und Hoden mit 50,5-facher Expression im Vergleich zur Milz hervor. In menschlichen Geweben war TOLLIP hingegen ausschließlich im Hoden mit lediglich 4,3-facher Expression erhöht. In allen anderen Geweben war das Gen im Vergleich zur Milz unterrepräsentiert.

Außerdem waren die beim menschlichen ST2 beobachteten Werte von 182,2 für Lunge und 20,1 für Niere nicht im murinem Gewebe beobachtbar.

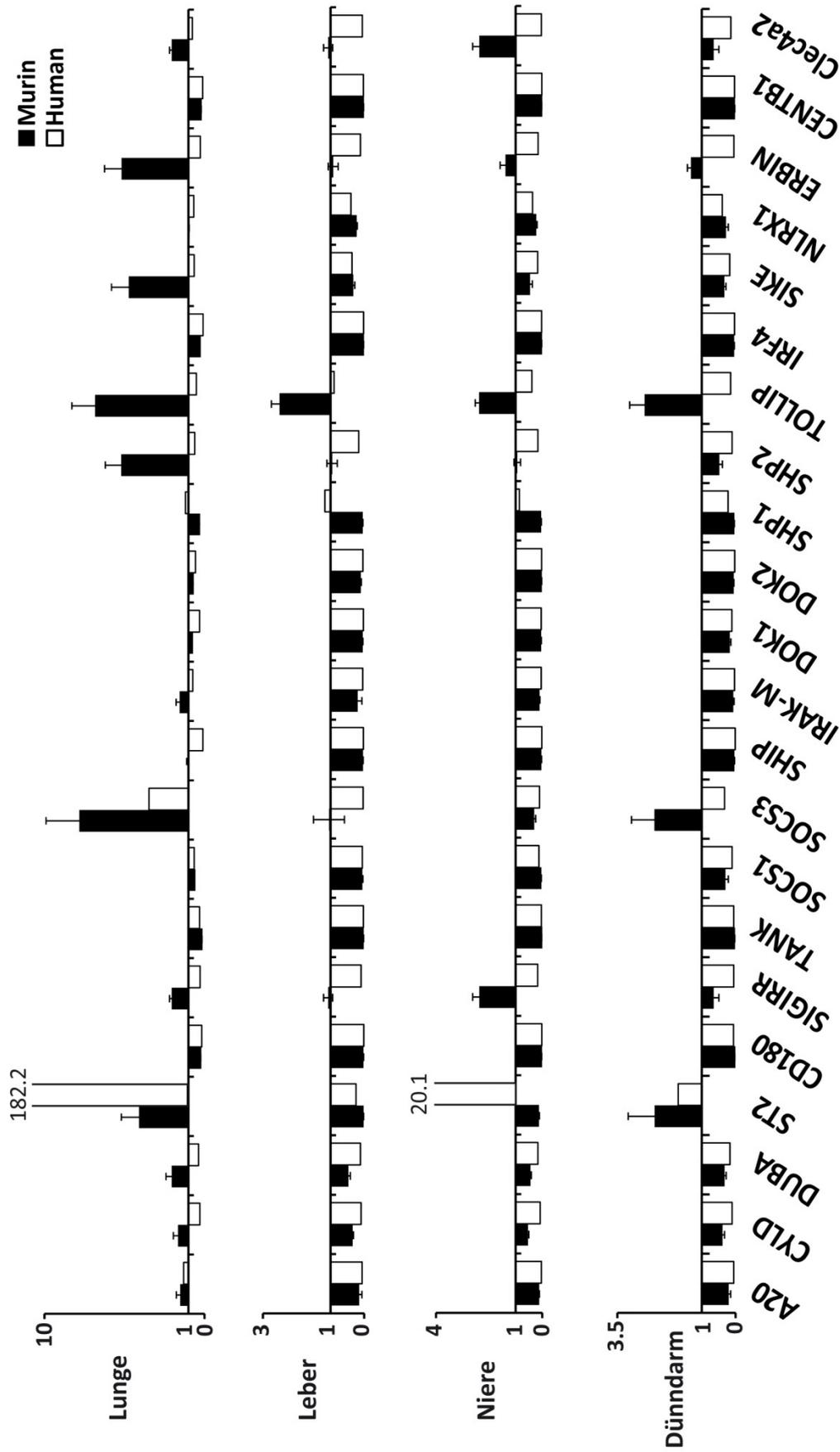
Zusammenfassend konnte beobachtet werden, dass die mRNA Expression der Negativregulatoren von Mensch und Maus nicht immer übereinstimmen, besonders TOLLIP und ST2 betreffend.



Murin	A20	CYLD	DUBA	ST2	CD180	SIGIRR	TANK	SOCS1	SOCS3	SHIP	IRAK-M	DOK1	DOK2	SHP1	SHP2	TOLLIP	IRF4	SIKE	NLRX1	ERBIN	CENTB1	Clec4a2
Milz	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Lunge	1.5	1.7	2.0	4.1*	0.2*	2.0*	0.1*	0.6*	7.8*	1.0	1.6	0.7	0.7	0.3*	5.2*	6.8*	0.2*	4.7*	0.9	5.2*	0.2*	2.0*
Leber	0.2*	0.3*	0.5	0.0*	0.0*	1.1	0.0*	0.1*	1.0	0.0*	0.2*	0.0*	0.1*	0.0*	1.0	2.5*	0.0*	0.3*	0.2*	0.9	0.0*	1.1
Niere	0.1*	0.5*	0.4	0.1*	0.0*	2.4*	0.0*	0.0*	0.3*	0.0*	0.1*	0.0*	0.0*	0.0*	0.9	2.4*	0.0*	0.5*	0.2*	1.4	0.0*	2.4*
Dünndarm	0.2*	0.4*	0.3	2.4	0.0*	0.6	0.0*	0.3*	2.4	0.0*	0.1*	0.2*	0.1*	0.0*	0.5	2.7*	0.0*	0.3*	0.3*	1.3	0.0*	0.6
Dickdarm	0.4*	0.4*	0.7	2.1	0.0*	1.0	0.0*	0.3*	1.0	0.0*	0.4*	0.2*	0.1*	0.1*	1.1	2.6*	0.1*	1.3	0.6*	2.7	0.0*	1.0
Hoden	0.5*	1.8	1.8	1.9	0.0	1.8	0.0*	0.8	0.8	0.4	0.7	0.2*	0.3	0.0*	2.7*	50.5*	0.1*	3.2	0.6	1.5	0.1	1.8
Thymus	1.6*	0.7	0.9	0.2	0.1*	0.7	0.2*	2.7*	1.2	0.3	0.1*	0.6	2.5*	0.3*	0.8	2.3*	0.1*	0.7	0.7	1.5	1.4	0.7
Gehirn	0.2*	1.0	0.6	0.1*	0.0*	0.1*	0.0*	0.2*	0.2*	0.0*	0.0*	0.0*	0.1*	0.0*	1.3	4.8*	0.0*	0.6*	0.1*	0.5	0.1*	0.1*
Herz	0.0*	0.2*	0.1*	0.2	0.0*	0.1*	0.0*	0.0*	0.1*	0.0*	0.1*	0.0*	0.1*	0.0*	0.8	1.3	0.0*	0.5*	0.1*	0.2	0.0*	0.1*
Skala	0.0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.5	2.0	3.0	5.0	7.0	10.0										

**Abbildung 9: mRNA-Expression der Negativregulatoren in murinen Organen.**

Es wurde die basale mRNA Expression der jeweiligen Negativregulatoren organspezifisch mit Hilfe von quantitativer RT-PCR bestimmt. GAPDH diente als Haushaltsgen. Das obere Balkendiagramm zeigt die Expression in der murinen Milz. Werte sind mRNA Expression  $\pm$  SEM. Die untere Tabelle zeigt die x-fach vermehrte oder verminderte Expression in den jeweiligen Organen im Vergleich zum Referenzorgan Milz. Grüne Farbtöne indizieren eine verminderte, gelbe Farbtöne eine ähnliche und rote Farbtöne eine übermäßige Expression. Asterisk weist auf einen p-Wert  $<0,05$  hin.



**Abbildung 10: Direkter Vergleich von humaner und muriner Expression in untersuchten Organen**  
 Werte sind Verhältnis von mRNA-Expression in Organ x und mRNA-Expression in Milz. Ein Wert größer 1 weist auf höhere Expression als in der Milz hin, Werte kleiner 1 auf eine niedrigere Expression. Darstellung erfolgt  $\pm$  SEM bei murinen Expressionsdaten. Berechnung von SEM war bei humanen Daten aufgrund der Verfügbarkeit nicht möglich (siehe Methoden)

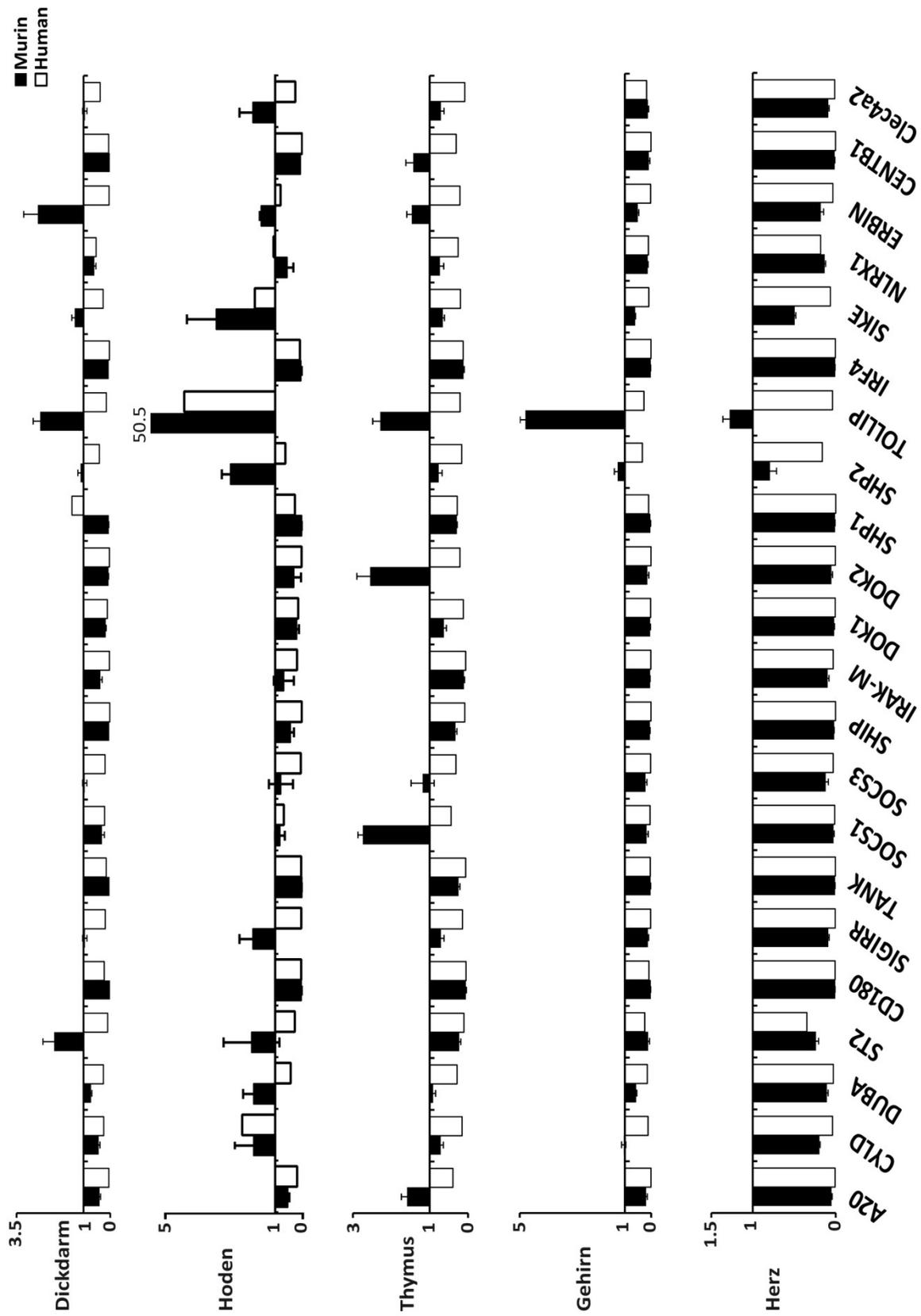


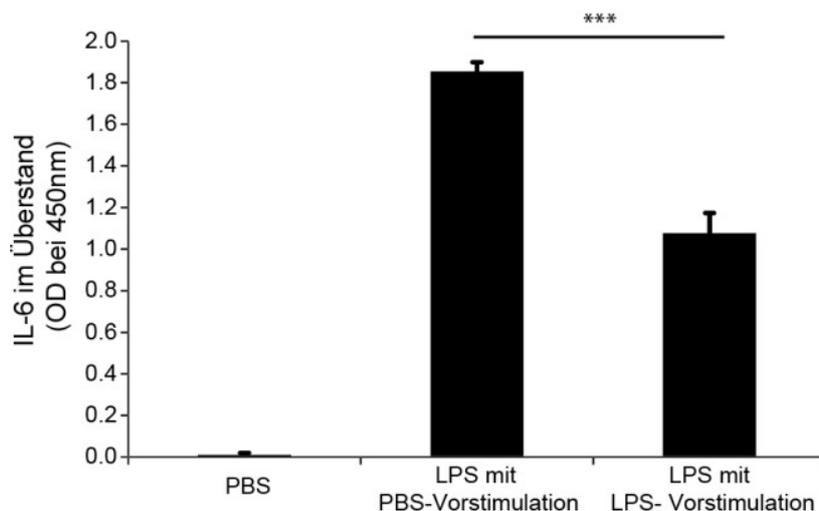
Abbildung 10: Direkter Vergleich von humaner und muriner Expression in untersuchten Organen (Fortsetzung)

### 3.2. Negativregulatoren werden im Rahmen von Infektionen induziert

Lipopolysaccharid (LPS) ist ein Zellwandbestandteil gram-negativer Bakterien, der eine Entzündungsreaktion durch TLR4 Aktivierung auslöst.<sup>1</sup> Im Rahmen der Endotoxintoleranz von Monozyten bewirkt eine Vorstimulation mit LPS eine abgeschwächte Ausschüttung von proinflammatorischen Mediatoren nach einer erneuten LPS Stimulation.<sup>135</sup> Ein essentieller Bestandteil dieses Mechanismus sind Negativregulatoren der PRRs.<sup>27</sup>

In einem Vorexperiment wurde an humanen PBMCs die LPS-vermittelte Ausschüttung des proinflammatorischen Zytokins IL-6 mit und ohne Vorstimulation untersucht. Dazu wurden von einem gesunden Spender PBMCs aus peripher-venösem Blut isoliert und für 12 Stunden entweder mit 500 ng/ $\mu$ l LPS oder PBS als Kontrolle inkubiert. Nach Entfernung der Überstände und spülen mit PBS erfolgte bei beiden Gruppen eine Stimulation mit 500 ng/ $\mu$ l LPS. Es ergab sich in den LPS-vorstimulierten Zellen eine, im Vergleich zu den PBS-vorstimulierten Zellen verminderte Ausschüttung von IL-6, die statistisch hoch signifikant war. (Abbildung 11)

Es muss also während der 12 Stunden langen Inkubation zu einer Art Abschwächung der Sensitivität der Zellen gegenüber dem Liganden kommen. Eine Erklärung hierfür sind Negativregulatoren der angeborenen Immunität, die vermehrt exprimiert werden und in der Lage sind TLR-Signalwege abzuschwächen.



#### Abbildung 11: LPS-vorstimulierte PBMCs zeigen verminderte Entzündungsreaktionen

PBMCs wurden mit Hilfe eines *Ficoll*-Gradienten aus Blut von menschlichen Spendern isoliert und für 12 Stunden mit 500 ng/ $\mu$ l LPS bzw. mit PBS als Kontrolle vorstimuliert. Nach einer Stunde wurde erneut mit 500 ng/ $\mu$ l LPS stimuliert. Nach weiteren 12 Stunden wurden die Überstände abgenommen und mit Hilfe von ELISA wurde IL-6 im Überstand gemessen.

Um die Induktion der ausgewählten 22 Negativregulatoren von PRRs im Zusammenhang mit der Aktivierung durch PAMPs wie LPS näher zu beschreiben, wurde die Veränderung der mRNA-Expression dieser Proteine nach Stimulation untersucht. Dazu wurden PBMCs, genauso wie bereits im Vorexperiment, aus humanem und zusätzlich murinem Blut mit Hilfe eines *Ficoll*-Gradienten isoliert und für 4, 12, 18 oder 24 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen von LPS inkubiert. Anschließend folgten die Lyse der Zellen, RNA-Isolation, Umschreibung der RNA auf cDNA und die Detektion der mRNA-Expression durch quantitative RT-PCR.

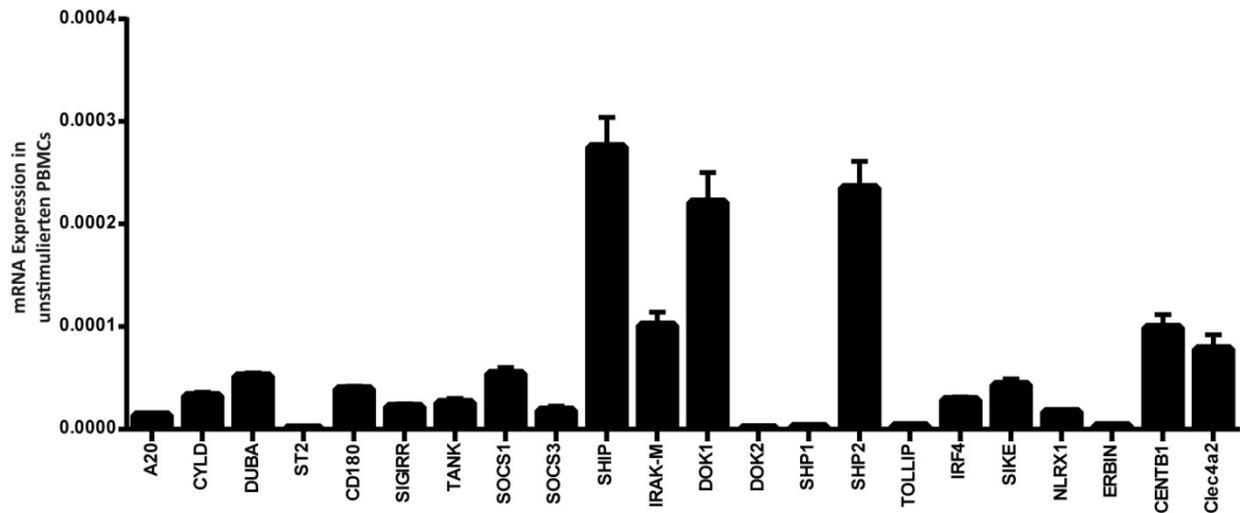
Bei den nativen PBMCs aus humanem Blut waren bis auf ST2, DOK2, SHP1, TOLLIP und ERBIN alle untersuchten Gene gut exprimiert. 4 Stunden nach Stimulation mit 500 ng/ml LPS konnten bereits erhebliche Veränderungen im Expressionsmuster beobachtet werden: A20, CYLD, ST2, TANK, SOCS3, IRAK-M und ERBIN zeigten eine signifikante Induktion der Expression. Besonders A20 und SOCS3 waren mit 8,77 und 17,44-facher Erhöhung vermehrt detektierbar. SOCS3 war zu allen vier Zeitpunkten der am stärksten induzierte Negativregulator. Hingegen war die Expression von CD180 und DOK2 nach 4 Stunden signifikant supprimiert und blieb auch zu den weiteren Zeitpunkten deutlich unter den Werten der Kontrollen. Viele der untersuchten Gene ließen im Zeitverlauf deutliche Muster erkennen: A20 mRNA erreichte nach 4 Stunden mit 8,77-facher Induktion den Maximalwert und nach 24 Stunden den Minimalwert von 2,39-facher Induktion. Einen ähnlichen Verlauf konnte man bei ST2 und ansatzweise bei TANK beobachten.

Mit zunehmender Stimulationsdauer zeigten sich vermehrt Clec4a2 mRNA-Transkripte mit einem Minimum von 0,25-facher Expression nach 4 Stunden und einem Maximum von 4,70-facher Expression nach 24 Stunden. IRAK-M wies ein ähnliches - jedoch abgeschwächtes - Muster auf. Somit konnten A20, ST2 und TANK als früh exprimierte, Clec4a2 und IRAK-M als spät exprimierte Regulatoren in humanen PBMCs identifiziert werden. (Abbildung 12)

Um die Ergebnisse nach Stimulation mit 500 ng/ml LPS zu bestätigen, wurden wiederum humane PBMCs aus peripherem Blut isoliert. Diesmal wurden diese jedoch mit einer deutlich geringeren Konzentration von 10 ng/ml LPS inkubiert.

Hierbei konnte man ein Expressionsmuster erkennen, das dem zuvor beobachteten - wenn auch etwas abgeschwächt - sehr ähnelt. Erneut waren A20 und SOCS3 nach 4 Stunden mit 3,37-facher und 4,97-facher Expression im Vergleich zu den Kontrollen am deutlichsten erhöht. Die Expression der zuvor herunterregulierten Gene CD180 und DOK2 war hier wiederum nach LPS-Stimulation deutlich vermindert. Auch die zuvor beobachteten Muster der frühen und späten Regulatoren konnten zum Teil wiedererkannt werden. A20 war erneut

eindeutig als früh exprimiertes Gen erkennbar, Clec4a2 erwies sich als spät exprimiertes Gen. Die bei der Stimulation mit 500 ng/ml LPS beobachteten Expressionsmuster von ST2, TANK und IRAK-M wurden hier nicht deutlich. Insgesamt konnten die Ergebnisse der Stimulation von humanen PBMCs mit höheren LPS-Konzentrationen durch die Versuche mit 10 ng/ml LPS bestätigt und untermauert werden.



A

500 ng/ml	AZO	CYLD	DUBA	ST2	CD180	SIGIRR	TANK	SOCS1	SOCS3	SHIP	IRAK-M	DOK1	DOK2	SHP1	SHP2	TOLLIP	IRF4	SIKE	NLRX1	ERBIN	CENTB1	Clec4a2
0 Stunden	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
4 Stunden	8.77*	2.23*	0.95	3.40*	0.48*	0.49	6.48*	1.26	17.44*	0.64	2.20*	1.05	0.18*	0.58	1.11	0.86	1.35	0.90	0.51*	4.11*	0.62	0.25
12 Stunden	3.10*	1.17	0.92	2.13*	0.60*	0.55	2.56*	1.90*	14.24*	0.51*	2.68*	0.70	0.28*	0.63	0.79	1.42	1.02	1.14	0.60	1.40	0.62	2.34*
18 Stunden	3.69*	2.10*	1.67*	1.98*	0.54*	0.86	3.59*	2.26*	18.31*	0.74	2.90*	1.16	0.35*	0.99	1.49	2.82*	1.40	1.56	0.92	2.23*	0.93	3.71*
24 Stunden	2.39*	1.61*	1.15	1.57*	0.46*	0.53	3.54*	1.83*	11.71*	0.66	3.21*	0.93	0.38*	1.22	0.93	1.76*	1.44	1.43	0.96	1.73*	0.69	4.70*
Skala	0.20	0.50	1.00	2.00	5.00	10.00	20.00															

B

10 ng/ml	AZO	CYLD	DUBA	ST2	CD180	SIGIRR	TANK	SOCS1	SOCS3	SHIP	IRAK-M	DOK1	DOK2	SHP1	SHP2	TOLLIP	IRF4	SIKE	NLRX1	ERBIN	CENTB1	Clec4a2
0 Stunden	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
4 Stunden	3.37*	1.26	0.51	1.01	0.27*	0.60	1.37	1.03	4.97*	0.48*	0.82	0.45	0.14*	0.45	0.46	0.62*	0.98	0.58	0.42	1.90*	0.44	0.33
12 Stunden	2.00*	0.86	0.68	1.99	0.40*	0.79	2.21*	1.62*	7.16*	0.61	2.28*	0.55	0.11*	0.78	0.64	0.85	0.86	0.85	0.57	1.10	0.65	0.64
18 Stunden	1.44	1.04	0.66	1.19	0.34*	0.62	1.39	1.38	6.43*	0.49	1.42	0.45	0.09*	0.51	0.55	0.88	0.76	0.68	0.52	1.06	0.52	1.16
24 Stunden	1.01	1.12	1.04	1.02	0.66	1.13	1.30	1.75*	6.06*	0.87	1.97*	0.89	0.38*	1.27	1.09	1.19	1.33	1.14	1.01	0.96	1.16	1.70*
Skala	0.20	0.50	1.00	2.00	5.00	10.00	20.00															

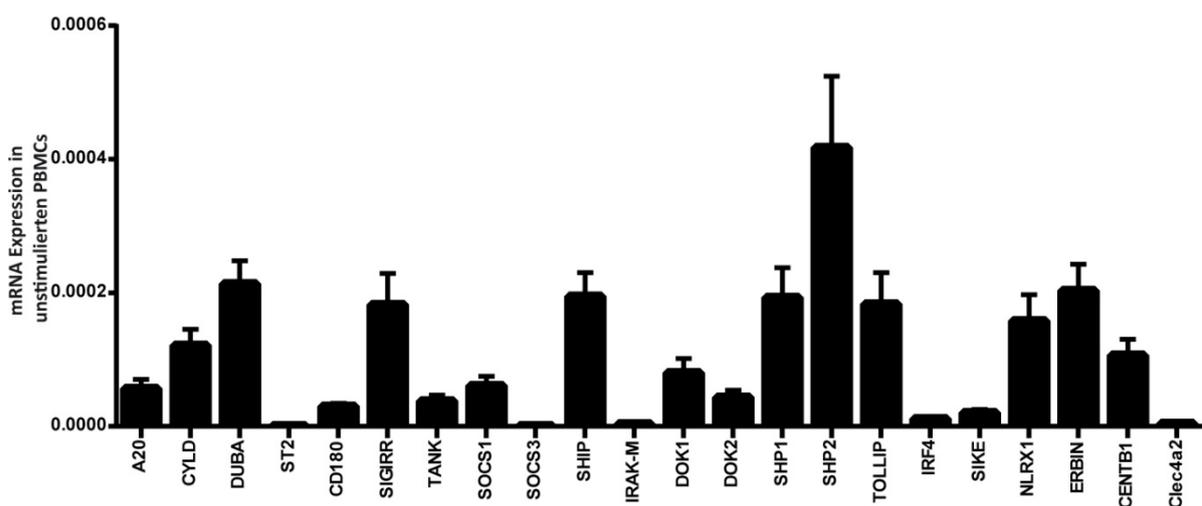
**Abbildung 12: Expression Negativregulatoren nach Stimulation von humanen PBMCs mit LPS**

A: Stimulation mit 500 ng/ml LPS B: Stimulation mit 10 ng/ml LPS

Balkendiagramme zeigen die basale mRNA-Expression ± SEM in Kontrollen. 18S diente als Haushaltsgen. Die Expression der einzelnen Regulatoren ist als x-fache Induktion im Vergleich zu den Kontrollen dargestellt. Grüne Farbtöne zeigen verminderte, gelbe zeigen ähnliche und rote zeigen vermehrte Expression an. Asterisken weisen auf einen p-Wert <0,05 hin.

Im Weiteren wurde die Expression bei PBMCs, die aus murinem Blut isoliert wurden, untersucht. Dazu fand die Stimulation ebenfalls mit 500 ng/ml LPS oder PBS statt. Die Basalexpression in den PBS-stimulierten Kontrollen zeigte eine kontinuierlich gute Expression der meisten untersuchten Gene mit Ausnahme von ST2, SOCS3, IRAK-M und Clec4a2. Bereits nach vierstündiger Inkubation mit 500 ng/ml LPS konnten A20, TANK und IRAK-M als signifikant induzierte Negativregulatoren identifiziert werden. Weiterhin waren SOCS3 und Clec4a2 zu allen Zeitpunkten mindestens mehr als doppelt so stark exprimiert wie in den unstimulierten Zellen. (Abbildung 13)

Bezüglich des Zeitverlaufs einiger Regulatoren konnte A20, mit einem Induktionsmaximum von 4,47 nach 4 Stunden und einem Expressionsminimum von 0,57 nach 24 Stunden, eindeutig als früher Negativregulator bei der Maus beschrieben werden. TANK und IRAK-M wiesen ebenfalls ähnliche, frühbetonte Expressionsmuster auf.



LPS murin	A20	CYLD	DUBA	ST2	CD180	SIGIRR	TANK	SOCS1	SOCS3	SHIP	IRAK-M	DOK1	DOK2	SHP1	SHP2	TOLLIP	IRF4	SIKE	NLRX1	ERBIN	CENTB1	Clec4a2
0 Stunden	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
4 Stunden	4.47*	1.10	0.93	0.33	0.17*	0.58	4.10*	0.96	2.52	1.07	6.93*	0.99	0.68	0.89	0.82	1.99	1.17	1.04	1.02	1.32	0.65	2.76
12 Stunden	2.32*	1.54	1.87*	1.15	2.46*	1.76	4.26*	2.11	2.73*	1.82	6.08*	2.26	1.42	2.20*	1.48	1.50	1.47	1.85	1.84	1.91	1.65	6.00*
18 Stunden	0.60	0.63	0.62	0.31	0.86	0.52	0.98	0.58	8.00*	0.51	2.03*	0.59	0.29	0.81	0.33	0.33	0.60	0.70	0.41	0.52	0.50	2.26
24 Stunden	0.57	0.56	0.80	0.25	0.43	0.54	1.47	0.64	2.60*	0.44	2.76*	0.57	1.37	0.96	1.09	0.42	0.50	0.54	0.52	0.52	0.43	2.25
Skala	0.00	0.3	0.60	1.00	2.00	4.00	8.00															

**Abbildung 13: Expression der Negativregulatoren nach Stimulation von murinen PBMCs mit LPS**

Die Stimulation isolierter PBMCs erfolgte mit 500 ng/ml LPS. Balkendiagramme zeigen die basale mRNA-Expression  $\pm$  SEM in Kontrollen. 18S diente als Haushaltsgen. Die Expression der einzelnen Regulatoren ist als x-fache Induktion im Vergleich zu den Kontrollen dargestellt. Grüne Farbtöne zeigen verminderte, gelbe zeigen ähnliche und rote zeigen vermehrte Expression an. Asterisken weisen auf einen p-Wert  $<0,05$  hin.

### **3.3. Akuter Nierenschaden führt zu Inflammation und induzierten Negativregulatoren**

Beim ischämischen Nierenversagen kommt es aufgrund der Freisetzung von DAMPs zu einer Entzündungsreaktion, die durch Mustererkennungsrezeptoren vermittelt wird.<sup>14</sup> Um festzustellen, ob dabei Negativregulatoren von Mustererkennungsrezeptoren vermehrt aktiviert werden und somit den Gewebeschaden begrenzen können, wurden diese im renalen Ischämie-Reperusionsmodell der Maus untersucht. Dazu wurde bei zuvor anästhesierten Mäusen eine der beiden Nierenarterien für 45 Minuten abgeklemmt und danach wieder zur Reperfusion freigegeben. Nach 4 Stunden, 12 Stunden, 24 Stunden, 5 Tagen, 10 Tagen und 5 Wochen wurden die Tiere getötet und beide Nieren entnommen. Um das Ausmaß des Nierenschadens festzustellen, wurde zunächst die histologische Aufbereitung und mikroskopische Untersuchung der Gewebsschnitte durchgeführt. Weiterhin folgten die RNA-Isolation mit cDNA-Synthese und RT-PCR Analyse der 22 ausgewählten Negativregulatoren.

#### **3.3.1. Immunzellmigration und Regeneration nach 5 Wochen**

Die Gewebeproben wurden zur Darstellung des strukturellen Nierenschadens mit PAS angefärbt. Zur Darstellung der Neutrophilenmigration wurde die Neutrophilen-Färbung, für die Makrophagen die F4/80 Färbung verwendet.

In der PAS-Färbung war 4 Stunden nach einem 45-minütigem Ischämieereignis kein eindeutiger Schaden im Parenchym erkennbar. Nach 12 Stunden wurde zunehmend nekrotisches Material in den Tubuli sichtbar, welches nach 1 - 10 Tagen, stark violett angefärbt, imponierte. Nach 5 Wochen erschien das Gewebe intakt und regeneriert. Bezüglich der Einwanderung von neutrophilen Granulozyten fand sich nach 4 Stunden kein eindeutiger Unterschied zu den kontralateralen Nieren. Nach 12 Stunden kam es zu einer massiven Neutrophileninfiltration, die sich jedoch im weiteren Verlauf abgeschwächt darstellte und nach 10 Tagen sowie nach 5 Wochen komplett verschwand. In der F4/80-Färbung konnte man nach 5 sowie 10 Tagen eine vermehrte Makrophageninfiltration beobachten, die an den vorhergehenden Zeitpunkten nicht vorhanden war. 5 Wochen nach Induktion des Nierenschadens waren fast alle Makrophagen verschwunden und im Vergleich zur Kontrollniere nicht signifikant erhöht. Zusammenfassend kommt es im renalen Ischämie-Reperusionsmodell zum strukturellen Nierenschaden mit nekrotischen Tubuli, einer nach 12 Stunden maximalen Neutrophileninfiltration und einer nach 5 - 10 Tagen maximalen Makrophageninfiltration.

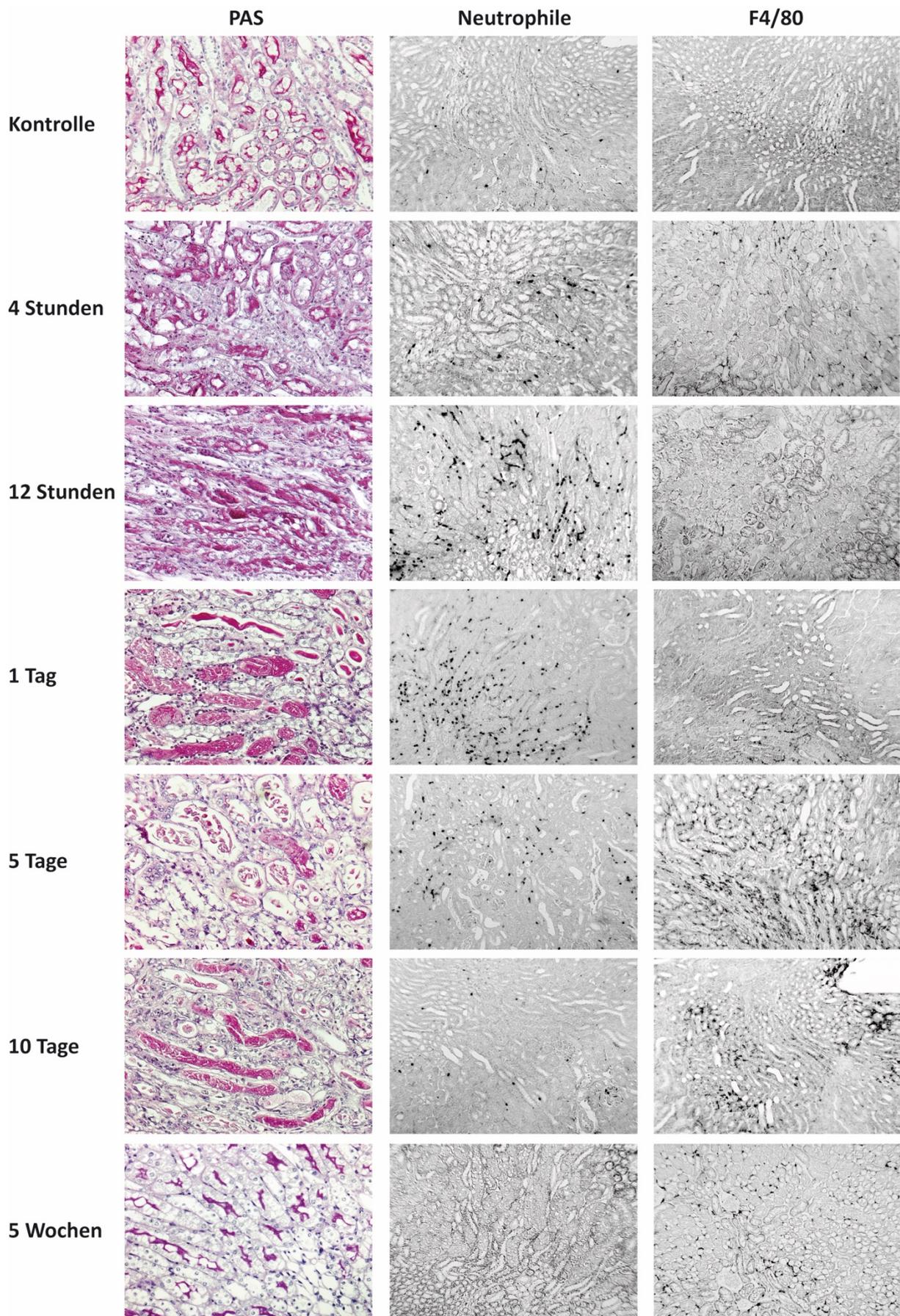


Abbildung 14

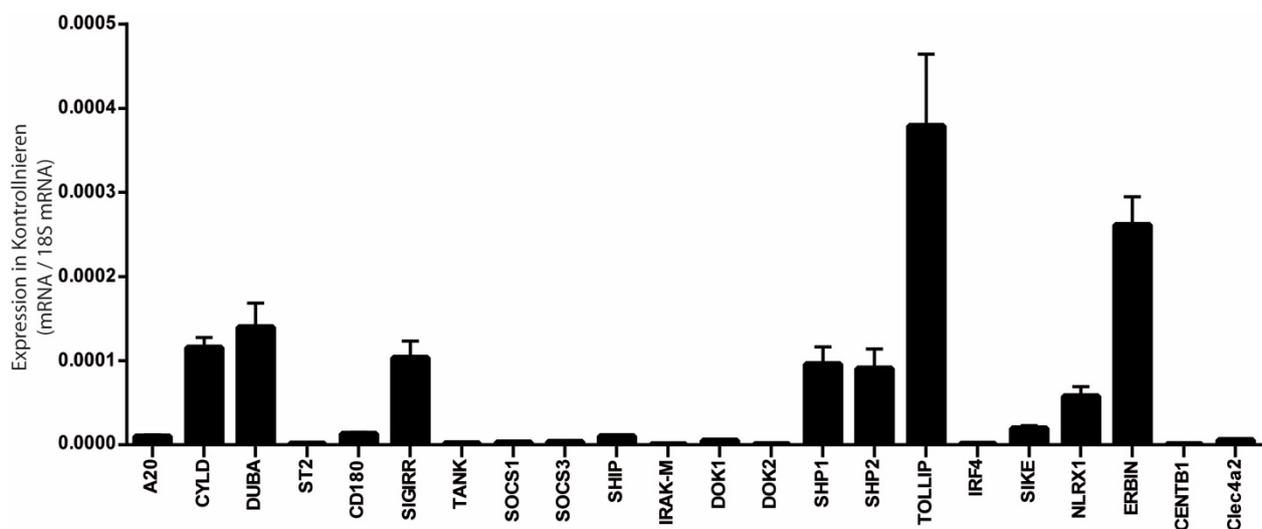
**Abbildung 14 (Vorseite): Struktureller Nierenschaden und Immuzellinfiltration nach 45-minütiger Ischämie**

Nach Abklemmen der Nierenarterie von C57BL/6-Mäusen wurden nach 4 Stunden, 12 Stunden, 1 Tag, 5 Tagen, 10 Tagen oder 5 Wochen die Nieren entnommen und histologisch aufbereitet. Es sind PAS-, Neutrophilen- und F4/80-Färbung gezeigt. Die Kontrollschnitte sind repräsentativ für alle untersuchten Zeitpunkte dargestellt.

**3.3.2. Verstärkte Expression von Negativregulatoren beim akuten Nierenschaden**

In den nicht operierten Nieren war die Basalexpression der meisten untersuchten Gene sehr niedrig. Nur die mRNA Transkripte von CYLD, DUBA, SIGIRR, SHP1, SHP2, TOLLIP, NLRX1 und ERBIN waren bereits im nicht ischämischen Nierengewebe vermehrt vorhanden. Bereits 4 Stunden nach Ischämie war die Expression der Negativregulatoren A20, TANK, SOCS1 und SOCS3 mindestens mehr als zweifach im Vergleich zu den Kontrollen induziert. (Abbildung 15) Interessanterweise waren diese Gene mit Ausnahme von SOCS1 auch schon bei der Stimulation der murinen PBMCs mit LPS nach 4 Stunden erhöht (Abbildung 13) und weisen somit Parallelen auf.

Ab 12 Stunden nach Ischämieereignis war ST2 mit 8,3-facher Expression im Vergleich zu den kontralateralen Nieren ebenfalls signifikant induziert. Nach einem Tag wurden bereits fast die Hälfte der untersuchten Negativregulatoren wie A20, ST2, SOCS3, SHIP, IRAK-M, DOK1, DOK2, CENTB1 und Clec4a2 mindestens fünffach vermehrt exprimiert. 5-10 Tage nach Operation konnten, zusätzlich zu den bereits zuvor exprimierten Genen noch CD180, TANK und IRF4 als spät induzierte Negativregulatoren ausgemacht werden. Dabei betrug die Anzahl der mRNA Transkripte stets mindestens das 9-fache des Wertes der kontralateralen Nieren. Nach fünf Wochen unterschieden sich die Expressionswerte vieler untersuchter Gene nicht mehr wesentlich zwischen operierten und nicht operierten Nieren. Einige Regulatoren waren jedoch im post-ischämischen Nierenparenchym immer noch deutlich vermehrt exprimiert. Besonders hervorzuheben ist hierbei ST2 mit einer 8,2-fach erhöhten Expression. Zusammenfassend konnte aufgezeigt werden, dass nicht nur bei mikrobieller Stimulation, sondern auch im Rahmen des sterilen Nierenschadens eine Vielzahl der untersuchten Regulatoren induziert wird. Die Zeitpunkte, zu denen die mRNA Transkripte erstmals vermehrt gefunden werden, unterscheiden sich von Regulator zu Regulator. Im Extremfall können die Negativregulatoren erst nach 5-10 Tagen signifikant vermehrt in den ischämischen Nieren nachgewiesen werden oder bleiben auch 5 Wochen nach Ischämieereignis noch induziert.



45 min IR	A20	CYLD	DUBA	ST2	CD180	SIGIRR	TANK	SOCS1	SOCS3	SHIP	IRAK-M	DOK1	DOK2	SHP1	SHP2	TOLLIP	IRF4	SIKE	NLRX1	ERBIN	CENTB1	Clec4a2
Kontrollen	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
4 Stunden	7.2*	1.7*	1.1	1.5	1.9	0.7	2.3*	2.4*	4.0*	0.8	1.0	0.9	0.8	0.5*	0.9	1.0	1.0	1.1	0.4*	0.9	0.8	1.0
12 Stunden	5.4*	1.3	1.4	8.3*	1.4	0.7	1.4	1.8*	2.6*	1.5	1.3	1.0	1.3	0.9	1.1	1.2	1.0	1.5	0.6	1.2	2.1*	1.8*
1 Tag	6.2*	1.3	2.0*	10.1*	3.9*	0.3*	3.6*	4.1*	16.8*	9.3*	6.8*	5.3*	22.9*	2.9*	1.7*	1.3	1.5	2.9*	1.1	1.3	16.3*	18.0*
5 Tage	6.2*	1.1	1.6*	27.2*	11.5*	0.5*	15.3*	4.8*	8.9*	7.5*	7.8*	8.7*	16.6*	2.9*	1.3	0.9	9.2*	2.0*	1.1	1.0	10.1*	20.5*
10 Tage	6.7*	1.2	1.6*	35.4*	13.3*	0.5*	22.3*	7.5*	9.4*	8.5*	7.1*	8.3*	21.7*	2.6*	1.3	1.0	10.2*	2.2*	1.1	1.0	13.1*	23.4*
5 Wochen	1.6	0.9	0.9	8.5	2.5	0.7*	4.5	1.1	3.2	1.9	1.5	1.5	3.7	1.0	0.8	0.8	1.9	1.1	0.9	0.7	3.1	3.8
Skala	0.0	0.3	0.5	0.8	1.0	1.5	2.0	3.0	5.0	7.0	10.0	15.0	20.0	30.0								

### Abbildung 15: Induktion der Negativregulatoren nach akutem Nierenschaden

Durch 45-minütige Ischämie wurde in C57BL/6 Mäusen ein akutes Nierenversagen induziert. Nach 4 Stunden, 12 Stunden, 1 Tag, 5 Tagen, 10 Tagen und 5 Wochen wurde mit Hilfe von RT-PCR die Expression der Negativregulatoren bestimmt. Obenstehendes Balkendiagramm zeigt die Expression in den nicht operierten Kontrollnieren. 18S wurde als Haushaltsgen verwendet. Werte geben die x-fache Induktion im Vergleich zur kontralateralen, nicht operierten Niere an. Grüne Farbtöne bedeuten verminderte, gelbe zeigen ähnliche und rote zeigen vermehrte Expression. Asterisken weisen auf einen p-Wert <0,05 hin.

### 3.4. Induktion von Negativregulatoren beim chronischen Nierenschaden

Wie bereits zuvor demonstriert, regeneriert sich das Nierenparenchym 5 Wochen nach 45-minütiger Ischämie - histologisch betrachtet - fast komplett. Trotz der stattgefundenen Geweberegeneration bleiben wenige der Negativregulatoren induziert. (siehe 3.3.1 und 3.3.2) Es stellte sich die Frage wie die untersuchten Regulatoren im Nierengewebe, das nicht mehr regenerationsfähig ist, exprimiert sind. Dies konnte experimentell dadurch erreicht werden, dass die Nierenarterie für eine längere Zeit abgeklemmt wurde und es somit zu einer deutlich stärkeren Ischämie kam.

Dazu wurde bei C57BL/6 Mäusen für 20, 45 oder 120 Minuten eine Nierenarterie abgeklemmt und anschließend wieder zur Perfusion freigegeben. 5 Wochen später wurden die Mäuse getötet und die Nieren histologisch aufgearbeitet. Zusätzlich erfolgten, wie bereits zuvor die Isolation der RNA, die cDNA-Synthese und die Analyse mit Hilfe von RT-PCR.

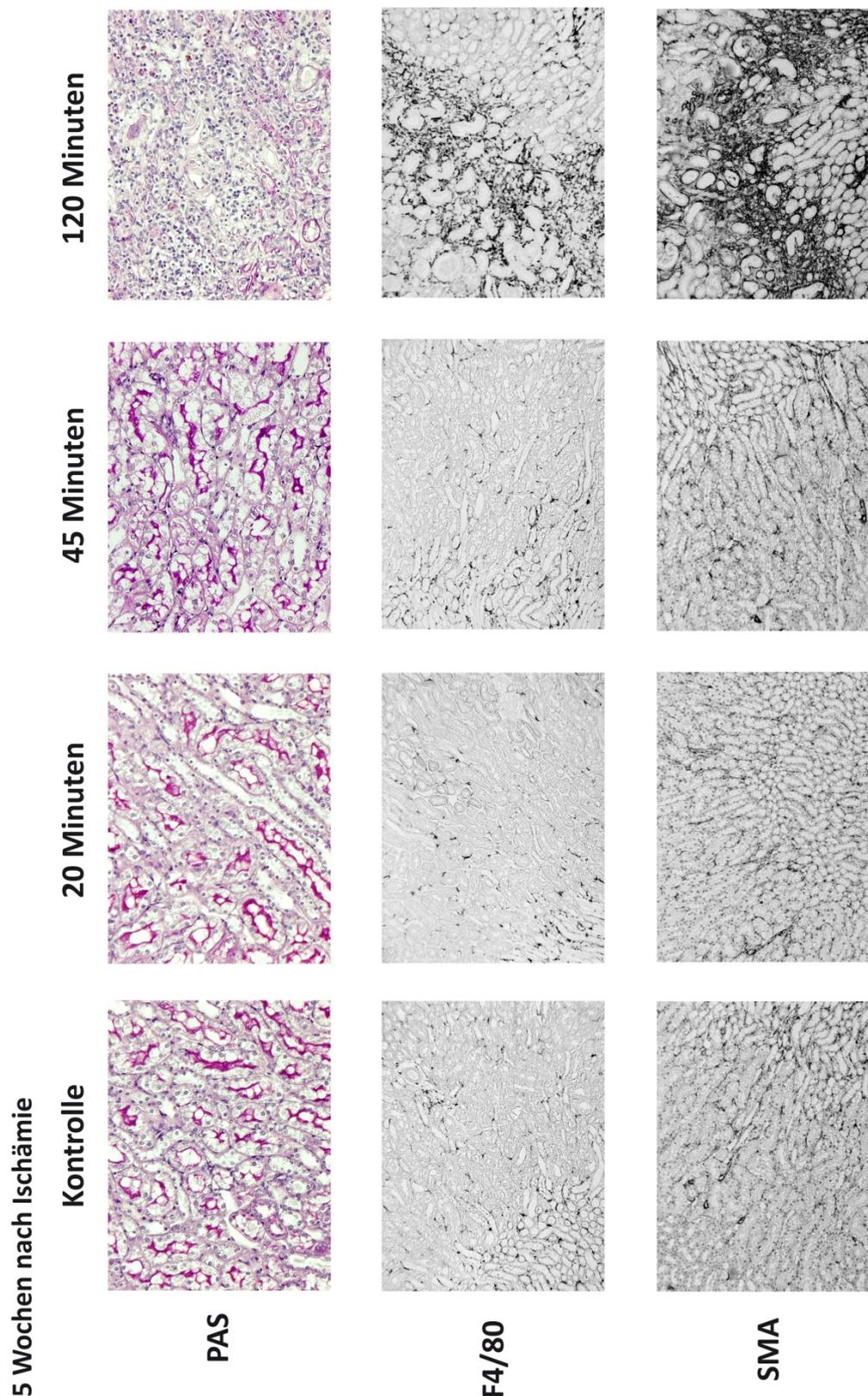
### **3.4.1. Langzeitige renale Ischämie führt zu vermehrter Fibrose**

Mit der PAS-Färbung konnte der strukturelle Nierenschaden und mit der F4/80 Färbung die Makrophageninfiltration im Schnittpräparat festgestellt werden. Zusätzlich wurden die Schnitte mit Antikörpern gegen SMA immunhistologisch angefärbt, um das Ausmaß der entstehenden Fibrose abzuschätzen.

Wie erwartet ergaben sich bei 20-minütiger Abklemmung keinerlei erhöhte Makrophageninfiltration oder Fibrose. Die 45 Minuten andauernde renale Ischämie konnte nach 5 Wochen in der PAS und F4/80 Färbung wiederum keine Unterschiede zu den Kontrollnieren erkennen lassen. In der SMA-Färbung war zu diesem Zeitpunkt keine deutlich vermehrte Fibrose erkennbar.

Eine 120-minütige Abklemmung resultierte hingegen in fast völliger Destruktion des Nierengewebes, welche in der PAS-Färbung erkennbar war. Weiterhin waren eine ausgeprägte Makrophageninfiltration und die Entstehung einer deutlichen Fibrose auffällig. (Abbildung 16)

Somit kommt es nach 45-minütigem Abklemmen im renalen Ischämie-Reperusionsmodell nach 5 Wochen zu einer weitgehenden Regeneration des Nierengewebes. Jedoch führen 120 Minuten renaler Ischämie zur langfristigen Entwicklung einer Fibrose und zur dauerhaften Makrophageninfiltration.



**Abbildung 16: Fibroseentstehung beim chronischen Nierenschaden 5 Wochen nach Ischämie**

5 Wochen nach 20-, 45- oder 120-minütigen Abklemmen einer Nierenarterie wurden die Nieren entnommen und Gewebeschnitte mit PAS bzw. mit Antikörpern gegen F4/80 und SMA angefärbt. Die jeweils nicht operierten Nieren dienten als Kontrolle und sind hier für alle Zeitpunkte repräsentativ dargestellt.

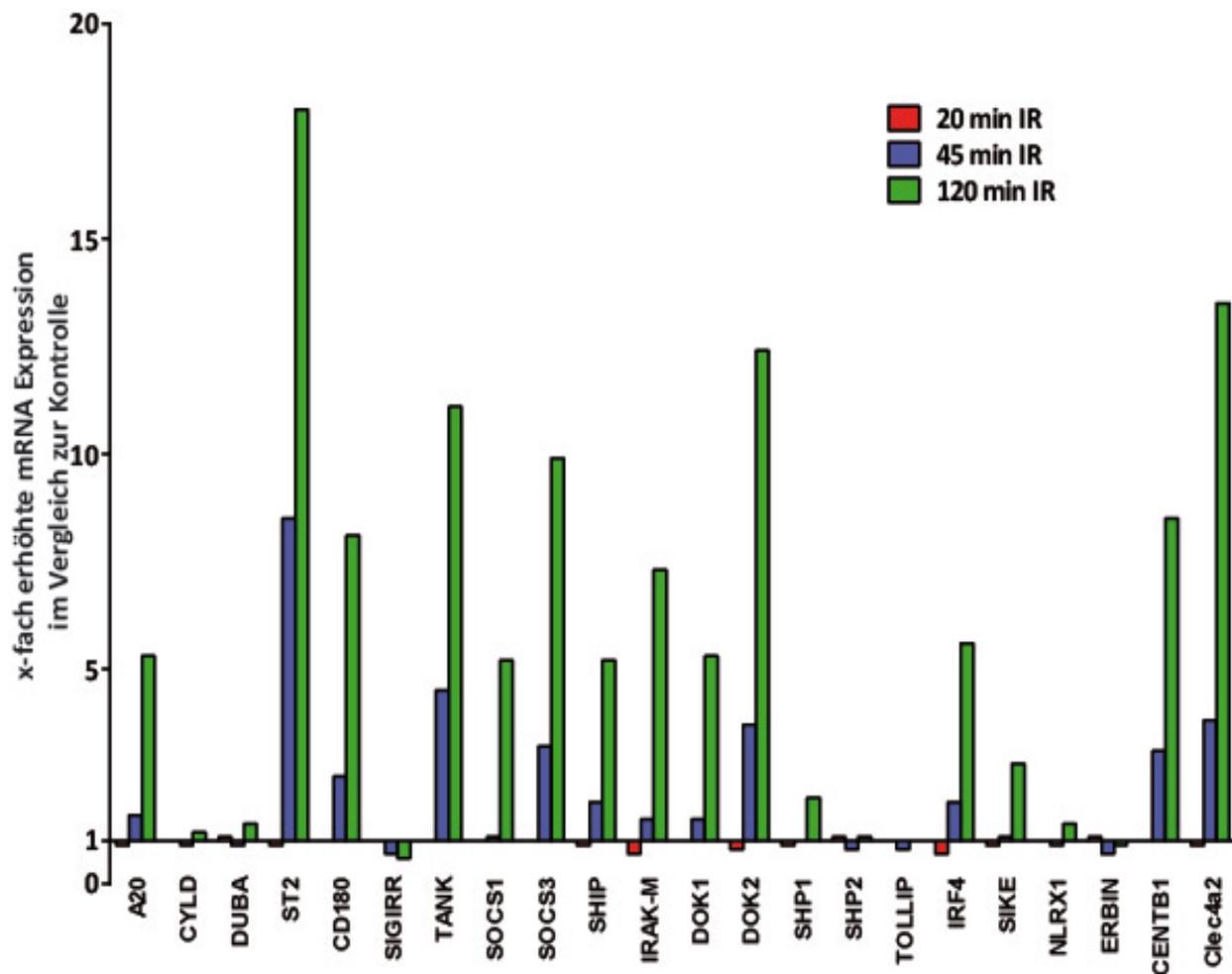
### **3.4.2. Expression von Negativregulatoren ist abhängig von der Ischämiedauer**

Um die Rolle der Negativregulatoren beim vorübergehenden bzw. progressiven Nierenschaden miteinander zu vergleichen, wurde nun die Induktion der Negativregulatoren in Abhängigkeit von der Ischämiedauer bestimmt. Die Nierenarterien wurden wieder für 20 Minuten, 45 Minuten bzw. 120 Minuten abgeklemmt.

Eine 20-minütige Ischämiezeit bewirkte nach 5 Wochen bei keinem der untersuchten Gene eine vermehrte Expression im Vergleich zu den kontralateralen Nieren. 45 Minuten langes Abklemmen der Nierenarterie führte, wie bereits vorher beschrieben (siehe 3.3.2), zur andauernden Expression vieler Negativregulatoren wie ST2, TANK, SOCS3, DOK2, CENTB1 und Clec4a2.

Der bei 120-minütiger Ischämie histologisch beobachtete ausgeprägte Nierengewebsschaden nach 5 Wochen, spiegelte sich auch in der mRNA Expression wider: Die Transkripte vieler Negativregulatoren wie A20, CD180, SOCS1, SHIP, IRAK-M, DOK1, IRF4 und CENTB1 waren mehr als 5-fach gegenüber der Kontrollniere vermehrt. ST2, TANK, SOCS3, DOK2, Clec4a2 waren darüber hinaus sogar mehr als 10-fach vermehrt in den post-ischämischen Nieren detektierbar. (Abbildung 17) Bei den induzierten Regulatoren handelte es sich überwiegend um diejenigen, welche auch schon nach 45-minütiger Ischämie vermehrt exprimiert waren.

Daraus kann geschlossen werden, dass die Expression der Negativregulatoren von Mustererkennungsrezeptoren im Rahmen des chronischen Nierenschadens abhängig von der Ischämiedauer und somit vom Ausmaß des Gewebes Schadens ist.



**Abbildung 17: Induktion der Negativregulatoren durch renale Ischämie nach 5 Wochen**  
 Unterschiedlich lang abgeklemmte Nieren wurden nach 5 Wochen mit Hilfe von RT-PCR auf mRNA-Expression der Negativregulatoren von PRRs untersucht. Werte auf der y-Achse sind x-fach erhöhte Expression im Vergleich zur Kontrollniere.



**Kapitel 4:**  
**Diskussion**

## 4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit hat zum Ziel zu bestimmen, ob und wie die Expression von Negativregulatoren der angeborenen Immunität im Rahmen der Aktivierung durch infekti- und ischämiebedingte Ursachen beeinflusst wird. Weiterhin wurde die Basalexpression der Regulatoren zwischen Mensch und Maus verglichen. Dabei zeigten sich vor allem beim Regulator ST2 im gesunden Lungen- und Nierengewebe und beim Regulator TOLLIP in fast allen untersuchten Organen enorme Unterschiede zwischen Maus und Mensch. Nach Stimulation von isolierten PBMCs mit LPS *in vitro* ergab sich eine deutliche Induktion der Regulatoren A20, TANK, SOCS3, IRAK-M und Clec4a2 sowohl in murinen, als auch in humanen Zellen. Nach Simulation eines akuten Nierenversagens im Mausmodell war eine Vielzahl von Regulatoren, darunter A20, CD180, ST2, SOCS1, SOCS3, SHIP, IRAK-M, DOK1, DOK2, IRF4, CENTB1 und Clec4a2 vermehrt exprimiert. 5 Wochen nach einem exzessiven Nierenschaden waren fast alle untersuchten Regulatoren dauerhaft induziert.

### 4.1. Negativregulatoren bei Mensch und Maus

Im ersten Teil der Arbeit wird die mRNA Basalexpression der verschiedenen Regulatoren im menschlichen, wie auch im murinen Organismus untersucht. Bereits vorhandene Expressionsdaten finden sich in diversen Internetdatenbanken in großem Ausmaß. Humane Datenbanken umfassen die *Gene Expression Omnibus*<sup>136</sup> (GEO) Datenbank und die *Genotype-Tissue Expression*<sup>137,138</sup> (GTEx) Datenbank des Nationalen Gesundheitsinstituts der USA. Weiterhin gibt es den *Gene Expression Atlas*<sup>139</sup> des Europäischen Bioinformatik Instituts und diverse andere Datenbanken wie z.B. „*Genecards*“ des *Weizmann Institute of Science*, welche die Informationen zusammenfassen und darzustellen versuchen. Viele der Expressionsdaten wurden jedoch mit unterschiedlichen Verfahren gewonnen, darunter z.B. Microarrays und „*RNA-Seq*“, das sich zur Sequenzierung der Gesamtheit aller vorhandenen Transkripte einer Probe eignet. Trotz der Effizienz dieser neuen, teuren Verfahren wird in vielen Fällen weiterhin empfohlen mRNA Expressionen mit Hilfe anderer Methoden wie z.B. RT-PCR zu validieren.<sup>140</sup> Dazu werden in solchen Datenbanken oft große Mengen unterschiedlicher Studien gemeinsam präsentiert, wodurch die Vergleichbarkeit und experimentelle Standardisierung angezweifelt werden kann. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten die bereits vorhandenen mRNA Expressionsdaten trotzdem zu einem großen

---

Teil bestätigen, jedoch ergaben sich je nach Datenbank Abweichungen. In unserer Analyse der humanen cDNA ergab sich eine relativ um den Faktor 182 bzw. 20 erhöhte Expression des Regulators ST2 in Lunge bzw. Niere. Diese zwei Beobachtungen konnten durch die GTEx-Datenbank und die *RNASeq* Analyse der *Genecards*-Datenbank bestätigt werden. Die Microarraydaten der *Genecards*- und der „Gene Expression Atlas“-Datenbank konnten die Ergebnisse jedoch nicht bestätigen. Unsere Ergebnisse zeigten auch, dass SOCS3 in der Lunge und TOLLIP im Hoden vermehrt exprimiert sind. Diese Beobachtungen konnten durch die GTEx Datenbank bestätigt werden, jedoch nicht durch die anderen Datenbanken. Die hohe Genauigkeit der GTEx Datenbank ist höchstwahrscheinlich darin begründet, dass sie einen sehr standardisierten und genau festgelegten Ablauf der Probengewinnung und Analyse vorschreibt.<sup>137,138</sup>

Bezüglich der murinen Expressionsdaten ist ein Vergleich sehr schwierig, da keine der Datenbanken einen genauen Vergleich der unterschiedlichen Organe bereitstellt. Zusätzlich kommt hier das Problem der verschiedenen Mausstämme und Altersstufen der Mäuse hinzu. Einzig die „Gene Expression Atlas“-Datenbank bietet einen *RNASeq*-basierten Vergleich, der allerdings nur fünf der untersuchten Organe umfasst und somit nicht bewertet werden kann.<sup>141</sup> Da sich die experimentellen Bedingungen in unserer Studie, bis auf den Probengewinn, nicht zwischen murinen und humanen Daten unterscheiden, kann hier ein guter Vergleich gezogen werden. Auffällig ist, dass die meisten untersuchten Gene ein ähnliches mRNA-Expressionsprofil aufweisen. Deutliche Unterschiede konnten zwischen der murinen und humanen Expression von TOLLIP festgestellt werden. TOLLIP war in allen Mausorganen besonders gut exprimiert, während TOLLIP in fast allen menschlichen Organen unterrepräsentiert war. Die hohen ST2 Expressionen in menschlicher Lunge und Nieren waren im murinen Organismus nicht nachweisbar. Natürlich geben diese Expressionsdaten keinen konkreten Beweis für die verstärkte oder abgeschwächte Funktion des Proteins, jedoch sollten diese Daten besonders bei der Interpretation von Tierexperimenten mit der Maus als immunologischem Modellorganismus in Betracht gezogen werden.

## 4.2. Negativregulatoren und Sepsis

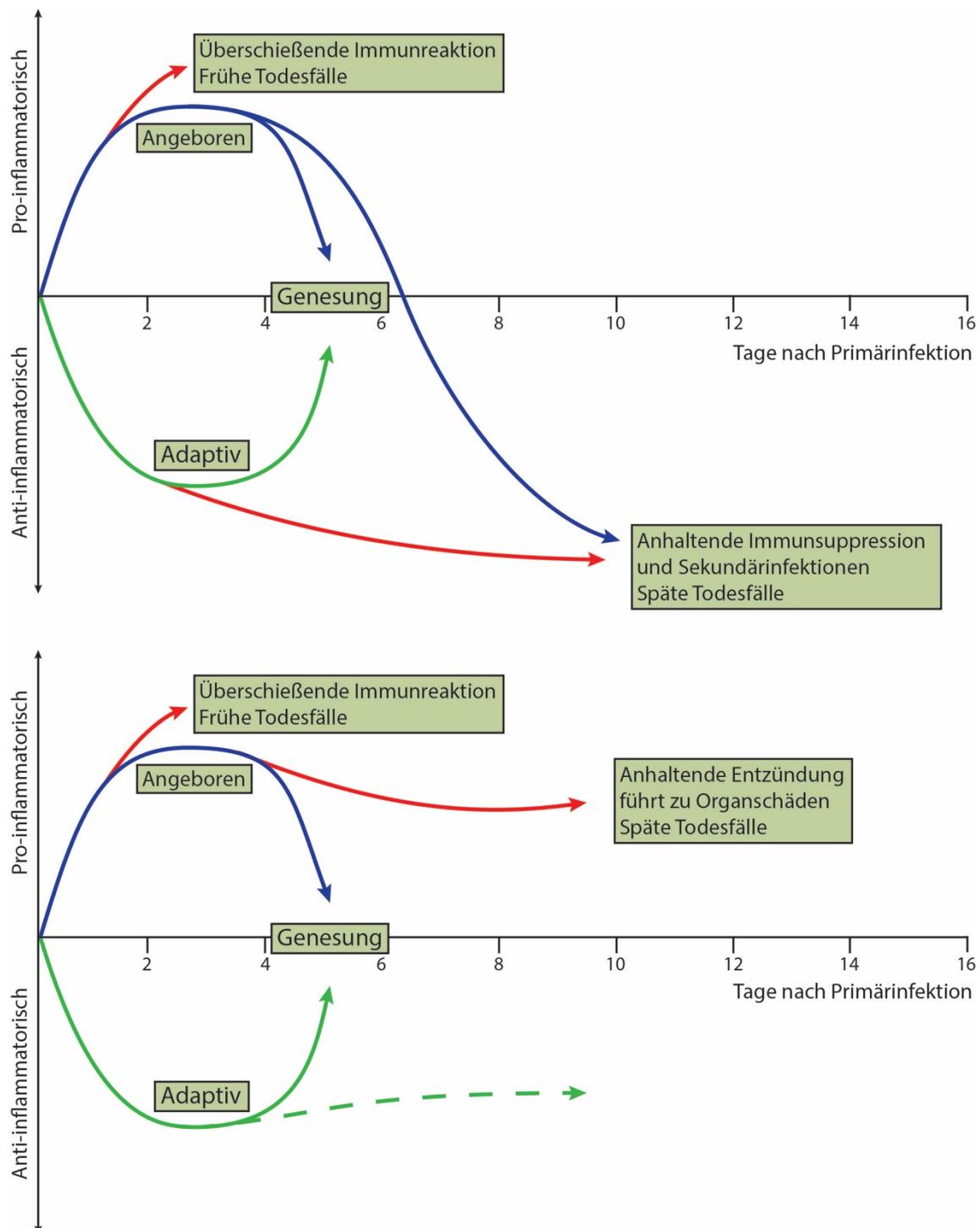
Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Induktion von Negativregulatoren der angeborenen Immunität im Rahmen von infektiösen Erkrankungen untersucht. Dazu wurden humane Monozyten mit LPS stimuliert, um die klinische Situation einer bakteriellen Sepsis zu simulieren.

Das Management von Patienten mit Sepsis gestaltet sich im klinischen Alltag schwierig. Wie bereits erwähnt kommt es häufig zur überschießenden Reaktion des Immunsystems, die letztendlich zum Organversagen führen kann.<sup>23</sup> Deshalb besteht eine therapeutische Option in der Gabe des immunsuppressiven Cortisols.<sup>29</sup> Es liegt nahe, dass es durch die Unterdrückung der inflammatorischen Signalwege zur verminderten Freisetzung von Zytokinen wie TNF- $\alpha$  und IL-1 kommt. Somit kann die systemische Entzündungsreaktion und eine reaktive Vasodilatation abgeschwächt werden. Jedoch besitzt Cortisol immunsuppressive Eigenschaften, wodurch die Entstehung von sekundären Infektionen begünstigt wird.<sup>142,143</sup>

Viele Sepsispatienten entwickeln aber ohne vorherige Steroidgabe im Verlauf sekundäre Infektionen.<sup>26</sup> Hierbei entwickelt sich spontan eine Phase der Immunsuppression, welche als CARS bezeichnet wird.<sup>26</sup> Dazu passt auch die Beobachtung, dass 70% der verstorbenen Sepsispatienten nicht erwartungsgemäß in der ersten hochinflammatorischen Phase der Sepsis versterben, sondern nach mehr als 3 Tagen oder erst nach mehreren Wochen.<sup>144</sup>

Die Mechanismen der Immunsuppression beim Krankheitsbild Sepsis sind Bestandteil aktueller Forschung. Momentan gibt es zwei unterschiedliche Ansätze zur Erklärung der immunsuppressiven Phase. (Abbildung 18) Beiden gemeinsam ist die gleichzeitige Aktivierung des angeborenen Immunsystems und Suppression des adaptiven Immunsystems kurz nach der Infektion. Ebenfalls kommt es in beiden Theorien entweder zum schnellen, hyperakuten Verlauf mit letalem Ausgang oder, im Fall der Beseitigung der Infektionsquelle, nach 4-5 Tagen zur Genesung. Nach der ersten Theorie wird bei nicht erfolgreicher Elimination des Pathogens, zusätzlich zur Suppression des adaptiven Immunsystems, das angeborene Immunsystem supprimiert. Somit kann entweder die Primärinfektion nicht vernünftig bekämpft werden oder es kommt gar zur Sekundärinfektion mit opportunistischen Erregern.<sup>145</sup>

Die neuere, zweite Theorie besteht darin, dass das angeborene Immunsystem nach nicht erfolgter Genesung weiterhin aktiv bleibt und durch die anhaltende Inflammation bleibende Gewebeschäden verursacht, welche die späten Todesfälle begründen.<sup>145</sup>



**Abbildung 18: Unterschiedliche Theorien über die Rolle des Immunsystems bei der immunsuppressiven Phase der Sepsis. Nach Hotchkiss, 2013<sup>145</sup>**

Der Verlauf des angeborenen Immunsystems ist mit dem blauen Pfeil dargestellt, der Verlauf des adaptiven Immunsystems mit dem grünen Pfeil. In beiden Theorien kommt es nach Infektion zur Stimulation des angeborenen Immunsystems und Suppression des adaptiven Immunsystems. Fällt die Immunreaktion zu stark aus, führt dies zum Tod des Patienten nach wenigen Tagen. Kann die Inflammation kontrolliert werden kommt es zur Genesung. Die späten Todesfälle werden im ersten Modell durch Sekundärinfektionen aufgrund des supprimierten Immunsystems verursacht. Im zweiten Modell kann die Entzündung nicht kontrolliert werden und führt damit zu Organschäden und zu den späten Todesfällen.

Gründe für die anti-inflammatorische Phase der Sepsis finden sich auf mehreren Ebenen der Immunantwort. Eine wichtige Rolle hierbei spielt vor allem die Apoptose von Immunzellen wie z.B. T-Zellen, B-Zellen und dendritische Zellen, die wichtig für die Funktion der adaptiven Immunität sind.<sup>144</sup> Neutrophile Granulozyten hingegen zeigen verminderte Apoptose, dafür jedoch eine eingeschränkte Funktion.<sup>146,147</sup> Weitere Ursachen sind eine verminderte Expression von HLA-DR Molekülen auf DCs und Makrophagen, eine erhöhte Ausschüttung des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 und die zunehmende „Erschöpfung“ von T-Zellen.<sup>145</sup> Ein anderes Phänomen, das zur immunsuppressiven Phase beiträgt, ist die bereits zuvor erwähnte Endotoxintoleranz.<sup>27</sup> Am einfachsten lässt sich diese Eigenschaft in *in vitro*-Experimenten nachweisen, indem Monozyten mit LPS vorstimuliert und nach einer bestimmten Zeit erneut stimuliert werden. Dieses Phänomen kann man auch bei Sepsispatienten beobachten. Isolierte Monozyten dieser Patientengruppe zeigen eine deutlich abgeschwächte Inflammationsreaktion nach Gabe von LPS.<sup>28</sup> Die genauen Mechanismen der Endotoxintoleranz sind noch nicht vollständig bekannt, jedoch kommen einige Erklärungsansätze in Frage: Diskutiert wird eine verminderte Expression des Rezeptors TLR-4, wodurch es letztendlich zur verminderten Aktivierung des proentzündlichen Transkriptionsfaktors NF-κB kommt.<sup>148</sup> Eine weitere Erklärung ist die verminderte Expression des Rezeptors CXCR3, der für die Leukozytenmigration eine Rolle spielt.<sup>27</sup> Ebenfalls wurde im Rahmen der Endotoxintoleranz eine niedrigere Anzahl an Lymphozyten im zirkulierenden Blut beobachtet.<sup>27</sup> Zuletzt bleiben noch die Negativregulatoren der angeborenen Immunität zu nennen. Wie eine Übersichtsarbeit zeigt, ist die Induktion von Negativregulatoren der angeborenen Immunität einer der verantwortlichen Gründe für die Endotoxintoleranz und kann als wichtiger Bestandteil der Ätiologie der immunsuppressiven Phase der Sepsis gesehen werden.<sup>27</sup>

Unsere Ergebnisse zeigen, dass nach Stimulation von humanen PBMCs mit LPS aus gram-negativen *E.coli* viele der Negativregulatoren vermehrt induziert wurden. Neben Regulatoren, die nur gering erhöht waren, stachen hier vor allem A20, ST2, TANK, SOCS3, IRAK-M, ERBIN und Clec4a2 mit einer mehr als 3-fach erhöhten Expression gegenüber den Kontrollen heraus. In einer Publikation im *Journal of Immunology* konnte von einer anderen Arbeitsgruppe eine vermehrte Induktion von Negativregulatoren in humanen Leukozyten bereits nachgewiesen werden. Nach einer intravenösen Gabe von LPS wurden nach bestimmten Zeitpunkten Leukozyten aus dem Blut isoliert und die Expression von A20, ST2, SOCS3 und IRAK-M bestimmt.<sup>149</sup> Dabei ergab sich für alle vier untersuchten Regulatoren ein ähnliches Expressionsprofil wie in unserer *in vitro* Analyse. In unserer Studie konnte darüber

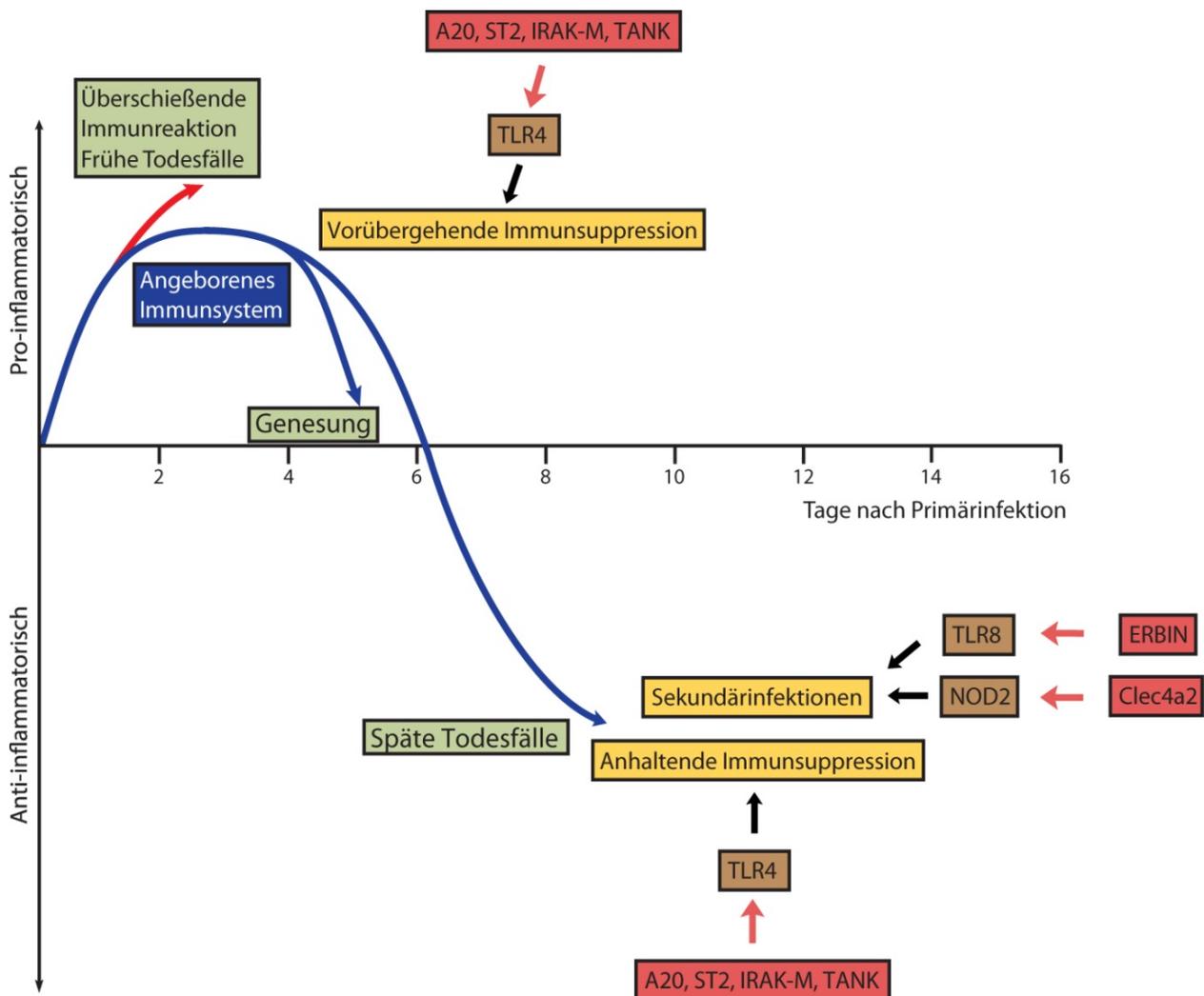
hinaus eine Induktion von TANK, ERBIN und Clec4a2 festgestellt werden. Damit stellen unsere Ergebnisse einen neuen Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen zur Bedeutung dieser Negativregulatoren dar.

TANK ist u.a. ein Negativregulator von TLR-4 vermittelten Immunantworten und könnte so in einer Art Feedbackschleife nach Aktivierung durch LPS eine überschießende Reaktion des Immunsystems bei der Sepsis verhindern.<sup>70</sup> Von ERBIN und Clec4a2 ist bisher nicht bekannt, dass sie den TLR-4 Signalweg beeinflussen. ERBIN führt bekanntermaßen zu einer Abschwächung der Aktivierung des Mustererkennungsrezeptors NOD-2.<sup>119</sup> Clec4a2 vermag hingegen TLR-8 Signalwege negativ zu regulieren.<sup>117</sup> Die Tatsache, dass die Stimulation eines Rezeptors (in unserem Experiment TLR-4 Aktivierung durch LPS) zu einer Abschwächung von Signalwegen anderer Rezeptorsubtypen oder ganz anderer Rezeptorgruppen führen kann, nennt man Kreuztoleranz.<sup>150</sup>

Es ist bekannt, dass z.B. eine Vorstimulation mit dem TLR-2 Liganden MALP-2 aus Mykoplasmen zu einer abgeschwächten Inflamationsreaktion gegenüber dem TLR-4 Liganden LPS aus gram-negativen Bakterien beitragen kann. Umgekehrt weiß man, dass sich nach Vorstimulation mit LPS - im geringeren Maße - eine abgeschwächte Reaktion gegenüber MALP-2 zeigt.<sup>151</sup> Da TLR-2 wie TLR-4 z.B. Candidabestandteile binden können, erscheint es logisch, dass Sepsispatienten eine größere Anfälligkeit für sekundäre Infektionen wie Pilzinfektionen haben.<sup>152</sup> Über eine mögliche Kreuztoleranz zwischen TLR-4 und TLR-8, das durch Clec4a2 negativ reguliert wird bzw. NOD-2, das durch ERBIN reguliert wird, ist bisher nichts bekannt. Unsere Studie zeigt allerdings nach Gabe des TLR-4-Agonisten LPS die Induktion dieser zwei Negativregulatoren und sollte als Ansatzpunkt für die weitere Untersuchung der Kreuztoleranz dienen.

Diese Beobachtungen führen zu einem neuen Erklärungsmodell der Pathophysiologie der immunsuppressiven Phase bei der gram-negativen Sepsis. (Abbildung 19) Bestimmte Negativregulatoren bewirken über eine Feedbackschleife, dass die überschießende Immunreaktion gedämpft wird und frühe Todesfälle verhindert werden können. Hierbei spielen vor allem A20, ST2, TANK und IRAK-M als Negativregulatoren des TLR-4 Signalwegs eine Rolle. Andererseits fördern andere Negativregulatoren wie ERBIN und Clec4a2 die Entstehung sekundärer Infektionen, in dem sie die Mustererkennungsrezeptoren TLR-8 bzw. NOD-2 über die Kreuztoleranz inhibieren. TLR-8 vermittelt die Pathogenerkennung von Einzelstrang-RNA Viren wie z.B. Influenza A.<sup>153</sup> NOD-2 ist als intrazellulärer Rezeptor an der Abwehr gegen eine Vielzahl von Mikroorganismen beteiligt. Darunter fallen *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium*

*tuberculosis*, sowie *Toxoplasma gondii*, der Erreger der häufig durch Immunsuppression verursachten Toxoplasmose.<sup>54,154</sup> Somit könnte die Induktion bestimmter Negativregulatoren im Rahmen einer gram-negativen Sepsis dazu führen, dass spezifisch einzelne Superinfektionen wie Pneumonien oder Reaktivierungen von Virusinfektionen begünstigt werden.



**Abbildung 19: Modell zur Rolle von Negativregulatoren der angeborenen Immunität bei der gram-negativen Sepsis**

Der blaue Pfeil zeigt den Verlauf der Reaktion des angeborenen Immunsystems. Die Negativregulatoren A20, ST2, IRAK-M und TANK können durch Einfluss auf den TLR-4 Signalweg überschießende Immunreaktionen abschwächen und frühe Todesfälle verhindern. Nach mehreren Tagen kommt es zur anhaltenden Immunsuppression und zur Gefahr von Sekundärinfektionen. Durch die Induktion von ERBIN und Clec4a2 werden TLR-8 sowie NOD-2 Signalwege inhibiert und dadurch spezielle Sekundärinfektionen begünstigt.

### 4.3. Negativregulatoren und akutes Nierenversagen

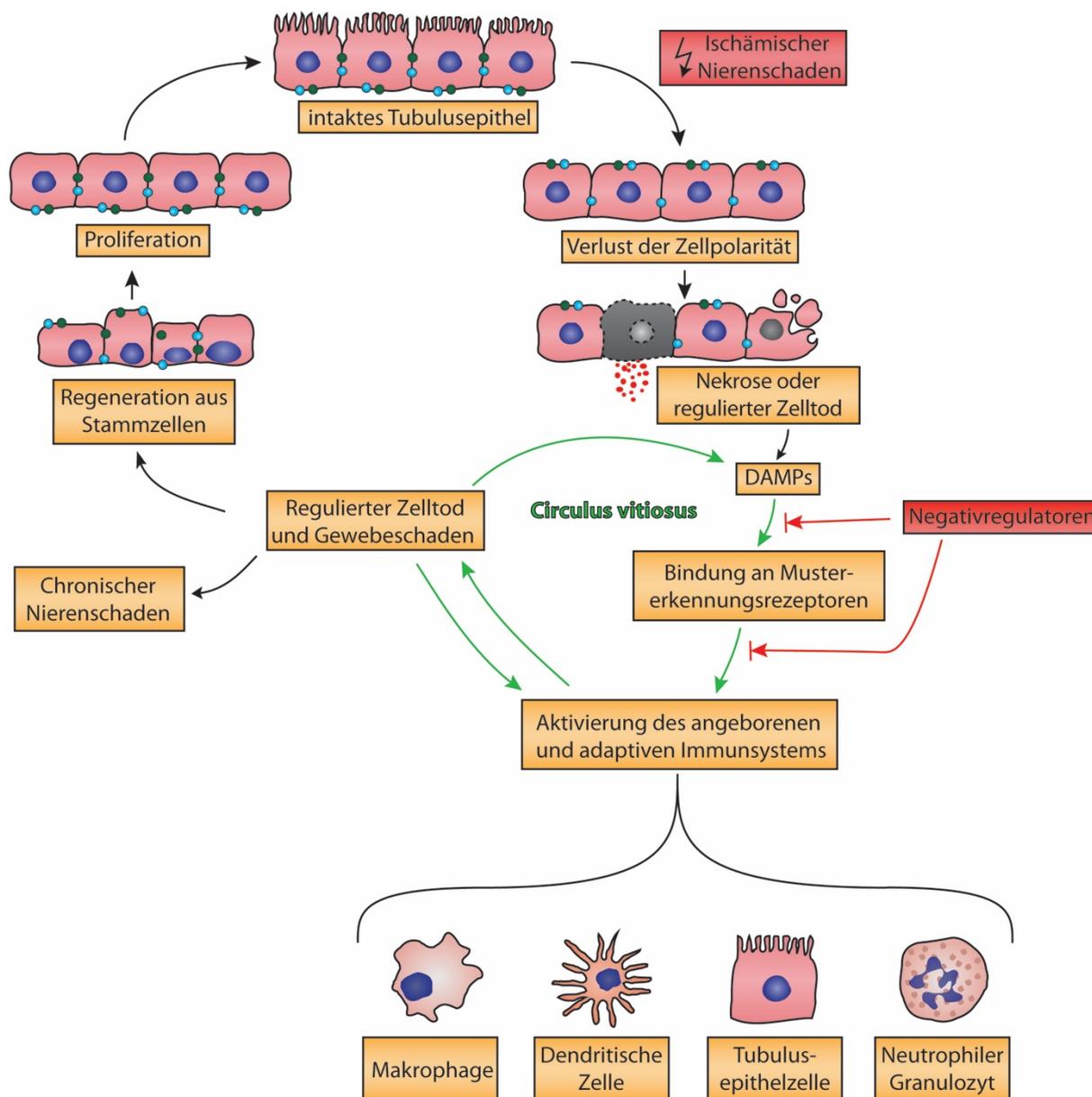
Das akute Nierenversagen wird heutzutage häufig in seiner Bedeutung unterschätzt. Bereits eine kleine Veränderung des Serumkreatinins von 0,3 mg/dl hat prognostisch sowohl einen Einfluss auf die kurzfristige Mortalität, als auch auf die Langzeitmortalität.<sup>155</sup> Die Ursachen für einen akuten Nierenschaden sind divers. Die meisten Fälle bei hospitalisierten Patienten werden durch Ischämie, Nephrotoxine oder Sepsis verursacht, wodurch es zur sogenannten akuten Tubulusnekrose kommt.<sup>155</sup>

Dabei verlieren die epithelialen Tubuluszellen ihr intaktes Zellskelett und die Verankerung vieler Membranproteine, wie z.B. von Adhäsionsmolekülen oder der Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase. In der Folge können die Tubuluszellen ihre Funktion nicht mehr ausüben und werden nekrotisch.<sup>16</sup> In Zellen, die noch nicht nekrotisch geworden sind, aber trotzdem Schaden genommen haben, wird häufig der sogenannte regulierte Zelltod induziert, wie z.B. die Nekroptose oder Ferroptose.<sup>156</sup> Bei diesen Arten des Zelltodes schüttet die absterbende Zelle gezielt proinflammatorische Zytokine aus, welche direkt Immunzellen aktivieren können.<sup>156,157</sup>

Bei der Nekrose, wie auch beim regulierten Zelltod kommt es darüber hinaus zur Freisetzung von DAMPs.<sup>17,158,156</sup> Hierbei werden vor allem HMGB1, ATP, Histone, Hitzeschockproteine, Hyaluronan, Fibronectin und Biklykane freigesetzt, die dann an Mustererkennungsrezeptoren binden können und die Strukturen der angeborenen Immunität aktivieren.<sup>159</sup> Dadurch werden nicht nur die Rezeptoren auf ortsständigen Immunzellen wie z.B. dendritischen Zellen, sondern auch auf tubulären Epithelzellen aktiviert. Es kommt zur Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen. Letztere führen vor allem zur Anlockung von neutrophilen Granulozyten, wodurch die Entzündungsreaktion weiter vorangetrieben wird.<sup>159</sup> Zusätzlich wandern überwiegend proinflammatorische Makrophagen in das Nierenparenchym ein und produzieren neben Zytokinen auch reaktive Sauerstoff- bzw. Stickstoffradikale. Gleichzeitig kommt es zu einer Aktivierung des adaptiven Immunsystems und zur Infiltration von T-Lymphozyten.<sup>159</sup> Die nekrotischen Zellen und der regulierte Zelltod führen also zu einer Rekrutierung von Zellen auf vielen Ebenen des Immunsystems. Die Entzündung und Immunzellinfiltration haben wiederum zur Folge, dass der regulierte Zelltod in den parenchymalen Zellen aktiviert wird. Dadurch entsteht ein *Circulus vitiosus*, der zum Organversagen und letztendlich zur systemischen Inflammation führt.<sup>156</sup> Dieser Automatismus muss möglichst früh aufgehalten werden, um weitere Gewebeschäden zu verhindern. Negativregulatoren von Mustererkennungsrezeptoren könnten, indem sie die Aktivierung des angeborenen Immunsystems verhindern, den Teufelskreis unterbrechen und so den Krankheitsprogress abschwächen. (Abbildung 20) Einer dieser Negativregulatoren ist

*Single Ig IL-1-Related Receptor* (SIGIRR), der als Membranprotein die TLR-4 vermittelten Reaktionen von ortsständigen Immunzellen in postischämischen Nieren abschwächen kann.<sup>160</sup> Ein weiterer Regulator, der in diesem Zusammenhang auf ähnliche Weise eine Rolle spielt ist der Transkriptionsfaktor IRF4. Er schützt durch Unterdrückung der Ausschüttung des proinflammatorischen Zytokins TNF-alpha das Nierenparenchym vor übermäßiger und destrukturierender Inflammation.<sup>161</sup> Es stellte sich die Frage, ob auch andere Regulatoren von Mustererkennungsrezeptoren im Rahmen von sterilen Entzündungen wie dem akuten Nierenversagen induziert werden.

Die Ergebnisse unserer Expressionsanalyse bei renaler Ischämie zeigen, dass die Regulatoren A20, TANK, SOCS1 und SOCS3 bereits nach 4 Stunden sowie ST2 nach 12 Stunden mehr als zweifach vermehrt waren im Vergleich zu den nicht ischämischen Kontrollnieren. 24 Stunden danach waren A20, ST2, SOCS3, SHIP, IRAK-M, DOK1, DOK2, CENTB1 und Clec4a2 mehr als fünffach exprimiert. Nach 5-10 Tagen waren CD180, TANK und IRF4 ebenfalls vermehrt induziert. Interessanterweise war die Expression des Negativregulators SIGIRR, dem eine wichtige Funktion beim akuten Nierenversagen zugeschrieben wird, nicht erhöht. Dies wurde bereits zuvor von unserer Arbeitsgruppe festgestellt.<sup>160</sup> Somit bieten mRNA- und Proteinmenge nicht immer eine Korrelation mit der Funktion. Trotzdem konnte die vermehrte Expression von IRF4 als bereits vorbeschriebener Negativregulator beim ischämischen Nierenversagen bestätigt werden. Die anderen induzierten Regulatoren sollten in weiteren Projekten mit den jeweiligen Knockout Mäusen speziell auf ihre Rolle im Ischämie-Reperusionsmodell überprüft werden. Bemerkenswert ist, dass - mit Ausnahme von SOCS1 - alle anderen, durch die Ischämie induzierten Gene auch schon bei den LPS Stimulationen der PBMCs vermehrt exprimiert waren. Diese Beobachtung ist ein weiteres Indiz, dass Mustererkennungsrezeptoren bei infektiösen, wie auch bei sterilen Gewebeschäden die gleichen entzündlichen Mechanismen in Gang setzen. Ob sich die negativen Regulationsmechanismen von Mustererkennungsrezeptoren zwischen den zwei Inflammationstypen unterscheiden, wurde bisher nicht genau untersucht. Eine interessante Studie zeigt jedoch die Bedeutung und den Zusammenhang der beiden Systeme. Mäuse, die mit geringen Dosen LPS vorbehandelt wurden, zeigen nach Induktion des Ischämie-Reperusionsmodells der Niere eine signifikant verringerte Mortalität, histologisch einen geringeren Nierenschaden sowie eine geringere Infiltration von Leukozyten. Somit kann man von einer Art Endotoxinkreuztoleranz, ähnlich dem bereits oben beschriebenen Phänomen auf *in vitro* Ebene sprechen.<sup>162</sup>



**Abbildung 20: Pathophysiologie des ischämischen Nierenschadens. Nach Kurts et al<sup>159</sup> und Bonventre et al<sup>17</sup>**

Ein Ischämie-Reperfusionsschaden führt zunächst zu einem Verlust der Zellpolarität am Tubulusepithel. Die Zellen werden entweder unmittelbar nekrotisch oder es kommt zur Einleitung des regulierten Zelltods. In Folge kommt es durch DAMPs zur Aktivierung des Immunsystems und zur Rekrutierung von Immunzellen. Die entstehende Inflammation leitet in vielen Parenchymzellen wiederum den regulierten Zelltod ein und ein *Circulus vitiosus* entsteht. Abhängig vom Ausmaß des Gewebeschadens kommt es entweder zur Regeneration des Epithels oder zum chronischen Nierenschaden. Negativregulatoren von Mustererkennungsrezeptoren könnten durch Inhibierung der proinflammatorischen Signalwege frühzeitig den Teufelskreis durchbrechen.

Darüber hinaus wurden bereits einige andere klinische Szenarien beschrieben, bei denen ein der Endotoxintoleranz ähnlicher Mechanismus dazu führt, dass ein Gewebeschaden abgeschwächt wird: In der Leber vermindert eine LPS-Vorstimulation einen Ischämie-Reperfusionsschaden.<sup>28</sup> Weiterhin können die Ausdehnung von Herzinfarkten oder die Folgen eines hämorrhagischen Schocks abgeschwächt werden.<sup>28</sup> Die Bedeutung der Regulation von TLR-4 Signalwegen für das akute Nierenversagen konnte bereits zuvor in einer anderen Studie gezeigt werden.<sup>11</sup> Dabei war die beobachtete Immunzellmigration nach einem ischämischen Nierenversagen zu einem großen Teil TLR-4 vermittelt. Dementsprechend war auch bei Mäusen, die mit einem Antikörper gegen den endogenen TLR-4 Liganden HMGB1 behandelt wurden, die Ausschüttung der Zytokine IL-1 $\beta$  und IL-6 sowie des Chemokins MCP-1 vermindert.<sup>11</sup> Somit liegt die Vermutung nahe, dass Negativregulatoren von TLR-4 oder anderer Mustererkennungsrezeptoren die Immunzellinfiltration und damit das Fortschreiten der sterilen Entzündung begrenzen.

Unsere Ergebnisse der histologischen Auswertung der ischämischen Nieren zeigten, dass es bereits 12 Stunden nach dem Ischämieereignis zu einer ausgeprägten Neutrophileninfiltration kommt, die sich im weiteren Verlauf abschwächt. Die Makrophageninfiltration zeigte sich zunehmend mit einem Maximum der Zellzahl nach 5 Tagen. Makrophagen können nicht nur zur Verschlimmerung der Entzündung und damit zum Gewebeschaden beitragen, sondern vermögen auch sich zu anti-inflammatorischen M2-Makrophagen zu differenzieren. Somit kann die Entzündung abgeschwächt werden und es kommt zur Regeneration des Epithels durch die übrigen Tubuluszellen oder durch Stammzellen.<sup>17,163</sup> (Abbildung 20)

#### **4.4. Negativregulatoren und chronisches Nierenversagen.**

Ein akuter Nierenschaden stellt nicht nur ein kurzfristiges Problem in der Patientenversorgung dar, sondern kann auch langfristige Auswirkungen haben. Eine Metaanalyse von 13 Kohortenstudien ergab, dass Patienten die ein akutes Nierenversagen erleiden, eine 3,1-fach erhöhte Wahrscheinlichkeit haben später eine endgradige Niereninsuffizienz zu entwickeln. Das Risiko für chronische Nierenerkrankungen per se ist bei diesem Patientenkollektiv sogar 8,8-fach erhöht. Dabei war die Ausprägung der chronischen Erkrankung von dem Ausmaß des akuten Nierenschadens abhängig.<sup>164</sup> Sobald eine Progression zum Endstadium des Nierenversagens stattgefunden hat, beträgt die mittlere Lebenserwartung 3-5 Jahre.<sup>165</sup>

Auf zellulärer Ebene kommt es im Rahmen fast jeder chronischen Nierenerkrankung zur vermehrten Fibrose. Zunächst handelt es sich hierbei um einen Wundheilungsprozess, der zur

Wiederherstellung der Funktionsfähigkeit des Organs beitragen soll. Kann jedoch der Gewebeschaden nicht durch funktionsfähiges Parenchym ersetzt werden, kommt es zur Ausbildung einer Fibrose und zum Funktionsverlust des Organs.<sup>166</sup> Dazu sezernieren hauptsächlich profibrotische M2-Makrophagen TGF- $\beta$  und andere Wachstumsfaktoren, welche den Prozess vorantreiben.<sup>163</sup>

Da das Ausmaß der Fibrose unter anderem durch die andauernde Entzündung bestimmt wird, kann diesem Prozess durch die Negativregulatoren der angeborenen Immunität entgegengewirkt werden. So konnte beispielsweise nachgewiesen werden, dass eine Blockade von SOCS1 in primären menschlichen Mesangialzellen zur vermehrten Expression von profibrotischen Proteinen wie TGF-beta und Kollagen führt.<sup>167</sup> Ein weiteres wichtiges Beispiel für die Rolle von Negativregulatoren bei der Ausbildung eines chronischen Nierenschadens ist IRAK-M. 5 Wochen nach einer akuten Ischämie bewirkt das Fehlen dieses Regulators einen chronischen Nierenschaden mit Verlust von Tubulusepithelzellen und ausgeprägten interstitiellen Narben.<sup>168</sup>

In unseren Ergebnissen sind die mRNA-Expressionen dieser zwei Gene 5 Wochen nach einem 120-minütigem Ischämieereignis deutlich erhöht. Darüber hinaus ist eine Vielzahl der anderen untersuchten Regulatoren ebenfalls vermehrt exprimiert. Bei der 45-minütigen Ischämie zeigen SOCS1 und IRAK-M 5 Wochen nach dem Ereignis keine signifikante Erhöhung. Jedoch stechen hier ST2, TANK, SOCS3, DOK2, CENTB1 und Clec4a2 besonders hervor. Dies ist erstaunlich, da zu diesem Zeitpunkt histologisch im Vergleich zur Kontrolle keine vermehrte Immunzellinfiltration mehr feststellbar ist.

Beim Blick in andere Fachgebiete der Inneren Medizin konnten weitere Negativregulatoren als potentielle Risikogene der Fibroseentwicklung entdeckt werden. Bei SOCS3-defizienten Mäusen entwickelt sich nach experimenteller Induktion viel schneller eine Leberfibrose als bei Wildtypmäusen. SOCS3 verhindert in der Leber die Ausschüttung von TGF-beta und kann so dem fibrotischen Umbau vorbeugen.<sup>169</sup> Auch wenn die Pathophysiologie dieses Modells nicht über eine TLR-getriggerte Inflammation mit nachfolgender Fibrosierung verläuft, sollte auch die Rolle von SOCS3 in der Niere auf einen antifibrotischen Effekt untersucht werden. Weitere ähnliche Beispiele finden sich in Herz und Lunge: Für den Negativregulator A20 konnte ein protektiver Effekt auf die TGF-beta vermittelte Fibroseentstehung im Herzmuskel nachgewiesen werden.<sup>170</sup> Weiterhin führt ein Fehlen des Regulators CYLD bei Mäusen zur Entwicklung einer Lungenfibrose nach einer Infektion mit *Streptococcus pneumoniae*.<sup>171</sup>

#### 4.5. Limitationen der Studie

Trotz der vielseitigen Einblicke in die Regulationsmechanismen des angeborenen Immunsystems muss bedacht werden, dass die Aussagekraft der Studie durch manche Kriterien limitiert wird. Im ersten Teil der Arbeit wird die Expression der Negativregulatoren in den verschiedenen Organen von Maus und Mensch bestimmt. Das murine Material stammt von Mäusen, die durch konsequente Inzucht über ungefähr 70 Jahre einen nahezu komplett identischen Genotyp besitzen.<sup>172</sup> Darüber hinaus handelte es sich ausschließlich um 6 Wochen alte, männliche Tiere. Die Spender der menschlichen Proben hingegen variieren beträchtlich bezüglich Alter, Geschlecht und selbstverständlich dem Genotyp. (siehe 2.2.2) Einerseits ist dieser Vergleich angebracht, weil von Ergebnissen aus tierexperimentellen Studien häufig auf den Nutzen für die Medizin generell geschlossen wird. Andererseits beeinträchtigt dieses Vorgehen die Präzision der Ergebnisse und führt dazu, dass falsche Aussagen getroffen werden könnten.

Die Folgerungen dieser Studie setzen weiterhin die Bedingung voraus, dass die erhobenen mRNA-Daten auch eine Aussage über das tatsächliche Vorhandensein des Proteins zulassen. Dies trifft sicher auf viele der Regulatoren zu, jedoch zeigten Studien, dass diese Annahme nicht immer zutrifft.<sup>173</sup> Für den quantitativen Nachweis der Regulatoren auf Proteinebene müssten die Erkenntnisse mit Hilfe von Western Blots bestätigt werden, jedoch übersteigt dies aufgrund der Anzahl der untersuchten Regulatoren und der mangelnden Verfügbarkeit von bestimmten Primärantikörpern den Rahmen der Arbeit. Eine weitere Beeinträchtigung der Aussagekraft ergibt sich aus der Tatsache, dass die enzymatische Aktivität, die in vielen Regulatoren über das Funktionsausmaß entscheidet, oft nicht über die quantitative Menge der einzelnen Regulatoren, sondern z.B. über deren Phosphorylierungszustand bestimmt wird. So ist bekannt, dass die Deubiquitinasenfunktion des untersuchten Regulators CYLD durch Phosphorylierung unterdrückt wird und somit seine negative regulatorische Wirkung auf die Aktivierung des angeborenen Immunsystems abgeschwächt wird.<sup>174</sup>

**Kapitel 5:**  
**Zusammenfassung**

## 5. Zusammenfassung

Mustererkennungsrezeptoren gehören zu den Strukturen des angeborenen Immunsystems und umfassen eine Vielzahl von Untergruppen. Die bekannteste Untergruppe stellen Toll-like Rezeptoren (TLRs) dar. Nach deren Aktivierung werden proinflammatorische Signalwege in Gang gesetzt, wodurch IL-6 und TNF-alpha freigesetzt werden, die systemische Reaktionen wie Fieber und Hypotension zur Folge haben. Die Aktivierung der Mustererkennungsrezeptoren erfolgt entweder durch körperfremde Strukturen, die *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (PAMPs) oder durch körpereigene Strukturen, die *Danger-Associated Molecular Patterns* (DAMPs) genannt werden. Ersteres passiert z.B. im Rahmen der Sepsis durch gram-negative Bakterien. Dabei wird der pathogene Zellwandbestandteil LPS freigesetzt und aktiviert den Rezeptor TLR-4. Nachfolgend werden Immunzellen mobilisiert und können die Krankheitserreger beseitigen. Diese systemische Entzündungsreaktion führt jedoch oft zu Herz-Kreislaufinstabilität mit letalen Folgen oder schwerwiegenden Organschäden. Auch im Rahmen von sterilen Gewebeschäden wie z.B. beim akuten Nierenversagen werden Mustererkennungsrezeptoren aktiviert und treiben Inflammationsreaktionen voran. Dabei kommt es durch lokale Ischämie oder anderweitige Gewebeschäden zur Freisetzung von DAMPs aus nekrotischen Zellen. Die Entzündungsreaktion führt zur weiteren Zerstörung des Gewebes und im Verlauf zur Narbenbildung und Fibrosierung. Damit die entstehende Entzündung nicht unkontrolliert verläuft und zu viel Schaden im Gewebe verursacht, muss diese durch bestimmte Signalwege bzw. Moleküle begrenzt werden. Dabei handelt es sich um sogenannte Negativregulatoren wie z.B. A20 und TANK. Bei der Erforschung dieser Vorgänge spielen Mäuse als häufig genutzter Modellorganismus eine große Rolle. Deswegen stellt sich zunächst die Frage, ob die Regulatoren von Mustererkennungsrezeptoren im humanen bzw. murinen Organismus überhaupt gleich exprimiert sind. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es zu klären, ob und in welcher Weise diese Negativregulatoren bei infektiösen, akut-sterilen und chronisch-sterilen Entzündungen exprimiert sind.

Dazu wurden 22 Gene ausgewählt, deren Produkte für die Begrenzung der Inflammation durch angeborene Immunität wichtig sind: A20, CYLD, DUBA, ST2, CD180, SIGIRR, TANK, SOCS1, SOCS3, SHIP, IRAK-M, DOK1, DOK2, SHP1, SHP2, TOLLIP, IRF4, SIKE, NLRX1, ERBIN, CENTB1 und Clec4a2.

Mit Hilfe von RT-PCR wurde die basale Expression dieser Negativregulatoren in 10 unterschiedlichen Organen von Maus und Mensch bestimmt und zwischen den beiden Spezies

verglichen. Aus folgenden Organen wurde cDNA analysiert: Milz, Lunge, Leber, Niere, Dünndarm, Dickdarm, Hoden, Thymus, Gehirn und Herz. Bei der humanen Basalexpression zeigte vor allem ST2 in der Lunge und in der Niere stark erhöhte Expressionswerte. Weiterhin waren TOLLIP im Hoden und SOCS3 in der Lunge leicht erhöht. Im murinen Organismus waren in der Lunge viele Regulatoren wie ST2, SOCS3, SHP2, TOLLIP, SIKE und ERBIN statistisch signifikant erhöht. TOLLIP war in fast allen Organen überexprimiert, wiederum besonders im Hoden. Im Interspeziesvergleich zeigten sich ähnliche Expressionsmuster; Abweichungen ergaben sich speziell bei TOLLIP und ST2.

Zur Untersuchung des Verhaltens der Negativregulatoren bei Aktivierung durch pathogene Bestandteile wurden PBMCs aus humanem und murinem Blut isoliert und mit LPS versetzt. Nach 4, 12, 18 und 24 Stunden wurde mit Hilfe von RT-PCR die Expression der 22 Gene bestimmt und zwischen Mensch und Maus verglichen. Bei menschlichen PBMCs konnten A20, ST2 und TANK als früh exprimierte, Clec4a2 und IRAK-M als spät exprimierte Regulatoren identifiziert werden. Darüber hinaus wurden die Regulatoren SOCS3 und ERBIN induziert. Bei den murinen Zellen waren A20, TANK und IRAK-M nach 4 Stunden schon stark exprimiert. SOCS3 und Clec4a2 waren zu allen Zeitpunkten vermehrt exprimiert.

Um den Einfluss der Negativregulatoren bei sterilen Gewebeschäden zu untersuchen wurde im Ischämie-Reperfusionmodell der murinen Niere eine lokale Ischämie durch 45-minütiges Abklemmen der Nierenarterie ausgelöst. Nach 4 Stunden, 12 Stunden, 24 Stunden, 5 Tagen, 10 Tagen und 5 Wochen wurden die Mäusenieren histologisch untersucht, um den Verlauf der Migration von Immunzellen in das Nierenparenchym darzustellen. Weiterhin wurde auch hier die Expression der Negativregulatoren mit Hilfe von RT-PCR untersucht. Ein Tag nach Ischämieereignis waren die Regulatoren A20, ST2, SOCS3, SHIP, IRAK-M, DOK1, DOK2, CENTB1 und Clec4a2 mehr als fünffach exprimiert. 5-10 Tage nach Ischämie waren zusätzlich CD180, TANK und IRF4 induziert. 5 Wochen nach Ischämie waren alle Regulatoren bis auf ST2 und TANK wieder auf dem basalen Expressionslevel. Ein 120-minütiges Ereignis führte zur dauerhaften Expression einer Vielzahl von Negativregulatoren und gleichzeitig zur ausgeprägten Fibrose.

Somit werden bei infektiösen, sowie bei sterilen Entzündungen viele Negativregulatoren von Mustererkennungsrezeptoren induziert, wodurch die Aktivierung des angeborenen Immunsystems abgeschwächt werden kann. Folglich könnten Negativregulatoren von Mustererkennungsrezeptoren in Zukunft einen vielversprechenden Ansatzpunkt für innovative Therapien von diversen Erkrankungen, wie beispielsweise der Sepsis und dem akuten bzw. chronischen Nierenversagen darstellen.



**Kapitel 6:**  
**Abkürzungsverzeichnis**

## 6. Abkürzungsverzeichnis

AKIN	<i>Acute Kindey Injury Network</i>
CARS	<i>Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrom</i>
CD180	<i>Cluster of Differentiation 180</i>
CD4/CD8	<i>Cluster of Differentiation</i>
CENTB1	<i>Centaurin Beta 1</i>
Clec4a2	<i>C-Type Lectin 4a2</i>
CXCR3	<i>CXC Motiv Chemokin Rezeptor 3</i>
CYLD	<i>Cylindromatosis</i>
DAMP	<i>Danger Associated Molecular Pattern</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleicacid (Desoxyribonukleinsäure)</i>
DOK1 bzw. DOK2	<i>Downstream of Tyrosine Kinase 1 und 2</i>
DUBA	<i>Deubiquitinating Enzyme A</i>
EDTA	<i>Ethylendiamintetraessigsäure</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ERBIN (auch ERBB2IP)	<i>ErbB2 Interacting Protein</i>
GAPDH	<i>Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase</i>
HMGB1	<i>High-Mobility-Group-Protein B1</i>
IFN- $\beta$	<i>Interferon <math>\beta</math></i>
IKK	<i>Inhibitor of NF-<math>\kappa</math>B Kinase</i>
IL-1R1	<i>IL-1 Rezeptor Typ 1</i>
IL-x (z.B. IL-1 $\beta$ , IL-6)	<i>Interleukin-1</i>
IRAK (z.B. IRAK1, IRAK4)	<i>Interleukin-1 Receptor Associated Kinase</i>
IRF	<i>Interferon Regulatory Factor</i>
ITIM	<i>Immunoreceptor Tyrosine Based Inhibition Motif</i>
JAK/STAT	<i>Januskinase/Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
KDIGO	<i>Kidney Disease: Improving Global Outcomes</i>
LPS	<i>Lipopolysaccharid</i>
MALP-2	<i>Macrophage Activating Lipopeptide 2</i>
MAP Kinasen	<i>Mitogen Activated Protein Kinasen</i>
MAVS	<i>Mitochondrial Antiviral Signaling Protein</i>
MCP-1	<i>Monocyte Chemotactic Protein 1</i>
MD1 (auch LY86)	<i>Lymphozyten Antigen 86</i>
MD2 (auch LY96)	<i>Lymphozyten Antigen 96</i>
MDA5	<i>Melanoma Differentiation Associated Protein 5</i>
MyD88	<i>Myeloid Differentiation Primary Response Gene 88</i>
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear Factor 'Kappa-Light-Chain-Enhancer' Of Activated B-Cells</i>

---

NLR	<i>NOD-like</i> Rezeptor
NLRX1	<i>NOD-like Receptor Family Member XI</i>
NOD	<i>Nucleotide-Finding Oligomerization Domain</i>
NSAR	Nicht-steroidales Antirheumatikum
PAMP	<i>Pathogen Associated Molecular Pattern</i>
PAS	<i>Periodic Acid Schiff</i>
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PRR	<i>Pattern-Recognition Receptor</i> (Mustererkennungsrezeptor)
RIFLE	Akronym für <i>Risk - Injury - Failure - Loss - ESRD</i> ; Einteilung des akuten Nierenversagens
RIG	<i>Retinoic-Acid-Inducible Protein</i>
RLH	<i>RIG-like</i> Helikasen
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
SHIP	<i>SH2 Containing Inositol Phosphatase</i>
SHP-1 bzw. SHP-2	<i>SH2 Containing Protein Tyrosine Phosphatase 1 und 2</i>
SIGIRR	<i>Single Immunoglobulin Interleukin-1 Receptor Related Protein</i>
SIKE	<i>Suppressor Of IKK<math>\epsilon</math></i>
SIRS	<i>Systemic Inflammatory Response</i> Syndrom
SMA	<i>Smooth Muscle Actin</i>
SOCS1	<i>Suppressor Of Cytokine Signaling 1</i>
SOCS3	<i>Suppressor Of Cytokine Signaling 3</i>
ST2 (auch IL1RL1)	<i>Interleukin 1 Receptor-like 1</i>
TAK 1	<i>TGF-beta Activated Kinase 1</i>
TANK	<i>TRAF Associated NF-<math>\kappa</math>B Activator</i>
TBK1	<i>TANK Binding Kinase 1</i>
TGF- $\beta$	<i>Transformin Growth Factor <math>\beta</math></i>
TIR	Toll/Interleukin-1 Rezeptor
TIRAP/Mal	<i>Toll-Interleukin 1 Receptor Domain Containing Adaptor Protein/MyD88 Adapter-like</i>
TLR	<i>Toll-like</i> Rezeptor
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TOLLIP	<i>Toll Interacting Protein</i>
TRAF	<i>TNF Receptor Associated Factors</i>
TRAM	<i>TRIF Related Adaptor Molecule</i>
TRIF	<i>TIR-Domain-Containing Adapter Inducing Interferon-<math>\beta</math></i>



**Kapitel 7:**  
**Danksagung**

## 7. Danksagung

Der größte Dank gilt zunächst meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Hans-Joachim Anders. Durch ihn wurde es mir ermöglicht meine Dissertation in einer professionellen und kollegialen Arbeitsgruppe anzufertigen.

Weiterhin möchte ich mich bei meinem Betreuer, Herrn PD Dr. hum. biol. Maciej Lech bedanken. Er stand mir zu jeder Tag- und Nachtzeit mit hilfreichen Tipps zur Umsetzung des Projekts bei Seite.

Außerdem bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Stefan Endres für die Aufnahme in das Graduiertenkolleg 1202 und die damit verbundene finanzielle Unterstützung. Durch die Teilnahme an Seminaren und jährlichen Retreats konnte ich interessante Einblicke in verwandte Forschungsgebiete bekommen und neue Denkanstöße für die Bearbeitung meines Dissertationsthemas gewinnen.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der AG Anders bedanken, die mir bei fachlichen wie methodischen Problemen stets geholfen haben. Vor allem möchte ich hier unserer technischen Assistentin Heni Eka Susanti erwähnen, die bei aufwändigen Experimenten und Prozeduren stets mitgeholfen hat.

Insbesondere danken möchte ich meinen Mitdoktoranden Georg Lorenz, Hauke Bruns und Ingo Hartter für die guten Gespräche, das freundschaftliche, gegenseitige Aushelfen und das exzellente Arbeitsklima. Durch sie wurden einige „Labornächte“ deutlich erträglicher.

Zuletzt bedanke ich mich noch bei meinen Eltern und meiner Freundin, die mich immer wieder motivieren konnten.

**Kapitel 8:**  
**Literaturverzeichnis**

## 8. Literaturverzeichnis

- 1 Takeuchi, O. & Akira, S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* **140**, 805-820 (2010).
- 2 Anders, H. J. Toll-like receptors and danger signaling in kidney injury. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **21**, 1270-1274 (2010).
- 3 Hoste, E. A., Clermont, G., Kersten, A., Venkataraman, R. et al. RIFLE criteria for acute kidney injury are associated with hospital mortality in critically ill patients: a cohort analysis. *Crit Care* **10**, R73 (2006).
- 4 Bellomo, R., Kellum, J. A. & Ronco, C. Acute kidney injury. *Lancet* **380**, 756-766 (2012).
- 5 Chertow, G. M., Burdick, E., Honour, M., Bonventre, J. V. et al. Acute kidney injury, mortality, length of stay, and costs in hospitalized patients. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **16**, 3365-3370 (2005).
- 6 Bellomo, R., Ronco, C., Kellum, J. A., Mehta, R. L. et al. Acute renal failure - definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. *Crit Care* **8**, R204-212 (2004).
- 7 Mehta, R. L., Kellum, J. A., Shah, S. V., Molitoris, B. A. et al. Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. *Crit Care* **11**, R31 (2007).
- 8 Bienholz, A., Feldkamp, T. & Kribben, A. KDIGO-Leitlinien zum akuten Nierenversagen. *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)* **138**, 1229-1232 (2013).
- 9 Basile, D. P., Anderson, M. D. & Sutton, T. A. Pathophysiology of acute kidney injury. *Comprehensive Physiology* **2**, 1303-1353 (2012).
- 10 Thurman, J. M. Triggers of inflammation after renal ischemia/reperfusion. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)* **123**, 7-13 (2007).
- 11 Wu, H., Chen, G., Wyburn, K. R., Yin, J. et al. TLR4 activation mediates kidney ischemia/reperfusion injury. *The Journal of clinical investigation* **117**, 2847-2859 (2007).
- 12 Pulskens, W. P., Teske, G. J., Butter, L. M., Roelofs, J. J. et al. Toll-like receptor-4 coordinates the innate immune response of the kidney to renal ischemia/reperfusion injury. *PloS one* **3**, e3596 (2008).
- 13 Wu, H., Ma, J., Wang, P., Corpuz, T. M. et al. HMGB1 contributes to kidney ischemia reperfusion injury. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **21**, 1878-1890 (2010).
- 14 Rosin, D. L. & Okusa, M. D. Dangers within: DAMP responses to damage and cell death in kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **22**, 416-425 (2011).
- 15 Kulkarni, O. P., Hartter, I., Mulay, S. R., Hagemann, J. et al. Toll-Like Receptor 4-Induced IL-22 Accelerates Kidney Regeneration. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* (2014).

- 16 Jha, V., Wang, A. Y. & Wang, H. The impact of CKD identification in large countries: the burden of illness. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* **27 Suppl 3**, iii32-38 (2012).
- 17 Bonventre, J. V. & Yang, L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *The Journal of clinical investigation* **121**, 4210-4221 (2011).
- 18 Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney Int Suppl* **3**, 1-150 (2013).
- 19 Gansevoort, R. T., Correa-Rotter, R., Hemmelgarn, B. R., Jafar, T. H. et al. Chronic kidney disease and cardiovascular risk: epidemiology, mechanisms, and prevention. *Lancet* **382**, 339-352 (2013).
- 20 Rosenberg, M. Overview of the management of chronic kidney disease in adults. *UpToDate*, (2014).
- 21 Chawla, L. S. & Kimmel, P. L. Acute kidney injury and chronic kidney disease: an integrated clinical syndrome. *Kidney international* **82**, 516-524 (2012).
- 22 Schmidt, G. A., Mandel, J. Evaluation and management of severe sepsis and septic shock in adults. *UpToDate*, (2014).
- 23 Angus, D. C. & van der Poll, T. Severe sepsis and septic shock. *The New England journal of medicine* **369**, 840-851 (2013).
- 24 Reinhart, K. e. a. in *Leitlinien der Deutschen Sepsis-Gesellschaft e.V.* (2010).
- 25 Wiersinga, W. J., Leopold, S. J., Cranendonk, D. R. & van der Poll, T. Host innate immune responses to sepsis. *Virulence* **5**, 36-44 (2014).
- 26 Hotchkiss, R. S., Coopersmith, C. M., McDunn, J. E. & Ferguson, T. A. The sepsis seesaw: tilting toward immunosuppression. *Nature medicine* **15**, 496-497 (2009).
- 27 Biswas, S. K. & Lopez-Collazo, E. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends in immunology* **30**, 475-487 (2009).
- 28 Cavillon, J. M. & Adib-Conquy, M. Bench-to-bedside review: endotoxin tolerance as a model of leukocyte reprogramming in sepsis. *Crit Care* **10**, 233 (2006).
- 29 Annane, D., Bellissant, E., Bollaert, P. E., Briegel, J. et al. Corticosteroids in the treatment of severe sepsis and septic shock in adults: a systematic review. *JAMA : the journal of the American Medical Association* **301**, 2362-2375 (2009).
- 30 Patel, G. P. & Balk, R. A. Systemic steroids in severe sepsis and septic shock. *American journal of respiratory and critical care medicine* **185**, 133-139 (2012).
- 31 Murphy, K., Travers, P., Walport, M. *Janeway Immunologie*. Vol. 7 (Garland Science, Taylor 2009).
- 32 Doan, T. *Immunology*. Lippincott's illustrated reviews. (Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2008).
- 33 Anders, H. J. & Schlondorff, D. O. Innate immune receptors and autophagy: implications for autoimmune kidney injury. *Kidney international* **78**, 29-37 (2010).

- 34 von Bernuth, H., Picard, C., Jin, Z., Pankla, R. et al. Pyogenic bacterial infections in humans with MyD88 deficiency. *Science (New York, N.Y.)* **321**, 691-696 (2008).
- 35 Kumar, H., Kawai, T. & Akira, S. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochemical and biophysical research communications* **388**, 621-625 (2009).
- 36 Moresco, E. M., LaVine, D. & Beutler, B. Toll-like receptors. *Current biology : CB* **21**, R488-493 (2011).
- 37 O'Neill, L. A., Golenbock, D. & Bowie, A. G. The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nature reviews. Immunology* **13**, 453-460 (2013).
- 38 Gay, N. J. & Keith, F. J. Drosophila Toll and IL-1 receptor. *Nature* **351**, 355-356 (1991).
- 39 Whitham, S., Dinesh-Kumar, S. P., Choi, D., Hehl, R. et al. The product of the tobacco mosaic virus resistance gene N: similarity to toll and the interleukin-1 receptor. *Cell* **78**, 1101-1115 (1994).
- 40 Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M. et al. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults. *Cell* **86**, 973-983 (1996).
- 41 Anders, H. J. & Kurts, C. Innate immunity and dendritic cells in kidney disease and the nobel prize. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **22**, 2139-2141 (2011).
- 42 Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P. & Janeway, C. A., Jr. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* **388**, 394-397 (1997).
- 43 Rock, F. L., Hardiman, G., Timans, J. C., Kastelein, R. A. et al. A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 588-593 (1998).
- 44 Kawai, T. & Akira, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature immunology* **11**, 373-384 (2010).
- 45 Li, M., Carpio, D. F., Zheng, Y., Bruzzo, P. et al. An essential role of the NF-kappa B/Toll-like receptor pathway in induction of inflammatory and tissue-repair gene expression by necrotic cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **166**, 7128-7135 (2001).
- 46 Yu, M., Wang, H., Ding, A., Golenbock, D. T. et al. HMGB1 signals through toll-like receptor (TLR) 4 and TLR2. *Shock (Augusta, Ga.)* **26**, 174-179 (2006).
- 47 Asea, A. Heat shock proteins and toll-like receptors. *Handbook of experimental pharmacology*, 111-127 (2008).
- 48 O'Neill, L. A. & Bowie, A. G. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nature reviews. Immunology* **7**, 353-364 (2007).
- 49 Trinchieri, G. & Sher, A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nature reviews. Immunology* **7**, 179-190 (2007).
- 50 Akira, S., Uematsu, S. & Takeuchi, O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**, 783-801 (2006).
- 51 Loo, Y. M. & Gale, M., Jr. Immune signaling by RIG-I-like receptors. *Immunity* **34**, 680-692 (2011).

- 
- 52 Kato, H., Takahasi, K. & Fujita, T. RIG-I-like receptors: cytoplasmic sensors for non-self RNA. *Immunological reviews* **243**, 91-98 (2011).
- 53 Richartz, E., Noda, S., Schott, K., Gunthner, A. et al. Increased serum levels of CD95 in Alzheimer's disease. *Dementia and geriatric cognitive disorders* **13**, 178-182 (2002).
- 54 Chen, G., Shaw, M. H., Kim, Y. G. & Nunez, G. NOD-like receptors: role in innate immunity and inflammatory disease. *Annual review of pathology* **4**, 365-398 (2009).
- 55 Inohara, N., Ogura, Y., Fontalba, A., Gutierrez, O. et al. Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *The Journal of biological chemistry* **278**, 5509-5512 (2003).
- 56 Chamaillard, M., Hashimoto, M., Horie, Y., Masumoto, J. et al. An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nature immunology* **4**, 702-707 (2003).
- 57 Murray, P. J. & Smale, S. T. Restraint of inflammatory signaling by interdependent strata of negative regulatory pathways. *Nature immunology* **13**, 916-924 (2012).
- 58 Wilkinson, K. D., Urban, M. K. & Haas, A. L. Ubiquitin is the ATP-dependent proteolysis factor I of rabbit reticulocytes. *The Journal of biological chemistry* **255**, 7529-7532 (1980).
- 59 Harhaj, E. W. & Dixit, V. M. Regulation of NF-kappaB by deubiquitinases. *Immunological reviews* **246**, 107-124 (2012).
- 60 Boone, D. L., Turer, E. E., Lee, E. G., Ahmad, R. C. et al. The ubiquitin-modifying enzyme A20 is required for termination of Toll-like receptor responses. *Nature immunology* **5**, 1052-1060 (2004).
- 61 Lee, E. G., Boone, D. L., Chai, S., Libby, S. L. et al. Failure to regulate TNF-induced NF-kappaB and cell death responses in A20-deficient mice. *Science (New York, N.Y.)* **289**, 2350-2354 (2000).
- 62 Turer, E. E., Tavares, R. M., Mortier, E., Hitotsumatsu, O. et al. Homeostatic MyD88-dependent signals cause lethal inflammation in the absence of A20. *The Journal of experimental medicine* **205**, 451-464 (2008).
- 63 Bignell, G. R., Warren, W., Seal, S., Takahashi, M. et al. Identification of the familial cylindromatosis tumour-suppressor gene. *Nature genetics* **25**, 160-165 (2000).
- 64 Friedman, C. S., O'Donnell, M. A., Legarda-Addison, D., Ng, A. et al. The tumour suppressor CYLD is a negative regulator of RIG-I-mediated antiviral response. *EMBO reports* **9**, 930-936 (2008).
- 65 Yoshida, H., Jono, H., Kai, H. & Li, J. D. The tumor suppressor cylindromatosis (CYLD) acts as a negative regulator for toll-like receptor 2 signaling via negative cross-talk with TRAF6 AND TRAF7. *The Journal of biological chemistry* **280**, 41111-41121 (2005).
- 66 Zhang, J., Stirling, B., Temmerman, S. T., Ma, C. A. et al. Impaired regulation of NF-kappaB and increased susceptibility to colitis-associated tumorigenesis in CYLD-deficient mice. *The Journal of clinical investigation* **116**, 3042-3049 (2006).
- 67 Brummelkamp, T. R., Nijman, S. M., Dirac, A. M. & Bernards, R. Loss of the cylindromatosis tumour suppressor inhibits apoptosis by activating NF-kappaB. *Nature* **424**, 797-801 (2003).
-

- 68 Kayagaki, N., Phung, Q., Chan, S., Chaudhari, R. et al. DUBA: a deubiquitinase that regulates type I interferon production. *Science (New York, N.Y.)* **318**, 1628-1632 (2007).
- 69 Gonzalez-Navajas, J. M., Law, J., Nguyen, K. P., Bhargava, M. et al. Interleukin 1 receptor signaling regulates DUBA expression and facilitates Toll-like receptor 9-driven antiinflammatory cytokine production. *The Journal of experimental medicine* **207**, 2799-2807 (2010).
- 70 Kawagoe, T., Takeuchi, O., Takabatake, Y., Kato, H. et al. TANK is a negative regulator of Toll-like receptor signaling and is critical for the prevention of autoimmune nephritis. *Nature immunology* **10**, 965-972 (2009).
- 71 Clark, K., Takeuchi, O., Akira, S. & Cohen, P. The TRAF-associated protein TANK facilitates cross-talk within the IkappaB kinase family during Toll-like receptor signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 17093-17098 (2011).
- 72 Garlanda, C., Anders, H. J. & Mantovani, A. TIR8/SIGIRR: an IL-1R/TLR family member with regulatory functions in inflammation and T cell polarization. *Trends in immunology* **30**, 439-446 (2009).
- 73 Thomassen, E., Renshaw, B. R. & Sims, J. E. Identification and characterization of SIGIRR, a molecule representing a novel subtype of the IL-1R superfamily. *Cytokine* **11**, 389-399 (1999).
- 74 Wald, D., Qin, J., Zhao, Z., Qian, Y. et al. SIGIRR, a negative regulator of Toll-like receptor-interleukin 1 receptor signaling. *Nature immunology* **4**, 920-927 (2003).
- 75 Qin, J., Qian, Y., Yao, J., Grace, C. et al. SIGIRR inhibits interleukin-1 receptor- and toll-like receptor 4-mediated signaling through different mechanisms. *The Journal of biological chemistry* **280**, 25233-25241 (2005).
- 76 Garlanda, C., Di Liberto, D., Vecchi, A., La Manna, M. P. et al. Damping excessive inflammation and tissue damage in Mycobacterium tuberculosis infection by Toll IL-1 receptor 8/single Ig IL-1-related receptor, a negative regulator of IL-1/TLR signaling. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **179**, 3119-3125 (2007).
- 77 Bozza, S., Zelante, T., Moretti, S., Bonifazi, P. et al. Lack of Toll IL-1R8 exacerbates Th17 cell responses in fungal infection. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **180**, 4022-4031 (2008).
- 78 Lech, M., Garlanda, C., Mantovani, A., Kirschning, C. J. et al. Different roles of TIR8/Sigirr on toll-like receptor signaling in intrarenal antigen-presenting cells and tubular epithelial cells. *Kidney international* **72**, 182-192 (2007).
- 79 Perez-Acosta, M., Delgado, F., Giovanni, I. & Castellanos, J. E. Soluble ST2 Does Not Regulate TNF- and IL-6 Production in Dengue Virus-Infected Human Monocytes. *ISRN Tropical Medicine* **2013**, 7 (2013).
- 80 Liew, F. Y., Liu, H. & Xu, D. A novel negative regulator for IL-1 receptor and Toll-like receptor 4. *Immunology letters* **96**, 27-31 (2005).
- 81 Liu, J., Buckley, J. M., Redmond, H. P. & Wang, J. H. ST2 negatively regulates TLR2 signaling, but is not required for bacterial lipoprotein-induced tolerance. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **184**, 5802-5808 (2010).

- 
- 82 Brint, E. K., Xu, D., Liu, H., Dunne, A. et al. ST2 is an inhibitor of interleukin 1 receptor and Toll-like receptor 4 signaling and maintains endotoxin tolerance. *Nature immunology* **5**, 373-379 (2004).
- 83 Yoon, S. I., Hong, M. & Wilson, I. A. An unusual dimeric structure and assembly for TLR4 regulator RP105-MD-1. *Nature structural & molecular biology* **18**, 1028-1035 (2011).
- 84 Divanovic, S., Trompette, A., Atabani, S. F., Madan, R. et al. Negative regulation of Toll-like receptor 4 signaling by the Toll-like receptor homolog RP105. *Nature immunology* **6**, 571-578 (2005).
- 85 Yoshimura, A., Suzuki, M., Sakaguchi, R., Hanada, T. et al. SOCS, Inflammation, and Autoimmunity. *Frontiers in immunology* **3**, 20 (2012).
- 86 Wang, J., Hu, Y., Deng, W. W. & Sun, B. Negative regulation of Toll-like receptor signaling pathway. *Microbes and infection / Institut Pasteur* **11**, 321-327 (2009).
- 87 Nakagawa, R., Naka, T., Tsutsui, H., Fujimoto, M. et al. SOCS-1 participates in negative regulation of LPS responses. *Immunity* **17**, 677-687 (2002).
- 88 Kinjyo, I., Hanada, T., Inagaki-Ohara, K., Mori, H. et al. SOCS1/JAB is a negative regulator of LPS-induced macrophage activation. *Immunity* **17**, 583-591 (2002).
- 89 Yasukawa, H., Ohishi, M., Mori, H., Murakami, M. et al. IL-6 induces an anti-inflammatory response in the absence of SOCS3 in macrophages. *Nature immunology* **4**, 551-556 (2003).
- 90 Wong, P. K., Egan, P. J., Croker, B. A., O'Donnell, K. et al. SOCS-3 negatively regulates innate and adaptive immune mechanisms in acute IL-1-dependent inflammatory arthritis. *The Journal of clinical investigation* **116**, 1571-1581 (2006).
- 91 Yan, C., Cao, J., Wu, M., Zhang, W. et al. Suppressor of cytokine signaling 3 inhibits LPS-induced IL-6 expression in osteoblasts by suppressing CCAAT/enhancer-binding protein {beta} activity. *The Journal of biological chemistry* **285**, 37227-37239 (2010).
- 92 Qin, H., Holdbrooks, A. T., Liu, Y., Reynolds, S. L. et al. SOCS3 Deficiency Promotes M1 Macrophage Polarization and Inflammation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **189**, 3439-3448 (2012).
- 93 Gabhann, J. N., Higgs, R., Brennan, K., Thomas, W. et al. Absence of SHIP-1 results in constitutive phosphorylation of tank-binding kinase 1 and enhanced TLR3-dependent IFN-beta production. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **184**, 2314-2320 (2010).
- 94 Sly, L. M., Hamilton, M. J., Kuroda, E., Ho, V. W. et al. SHIP prevents lipopolysaccharide from triggering an antiviral response in mice. *Blood* **113**, 2945-2954 (2009).
- 95 An, H., Xu, H., Zhang, M., Zhou, J. et al. Src homology 2 domain-containing inositol-5-phosphatase 1 (SHIP1) negatively regulates TLR4-mediated LPS response primarily through a phosphatase activity- and PI-3K-independent mechanism. *Blood* **105**, 4685-4692 (2005).
- 96 Sly, L. M., Rauh, M. J., Kalesnikoff, J., Song, C. H. et al. LPS-induced upregulation of SHIP is essential for endotoxin tolerance. *Immunity* **21**, 227-239 (2004).
- 97 An, H., Hou, J., Zhou, J., Zhao, W. et al. Phosphatase SHP-1 promotes TLR- and RIG-I-activated production of type I interferon by inhibiting the kinase IRAK1. *Nature immunology* **9**, 542-550 (2008).
-

- 98 An, H., Zhao, W., Hou, J., Zhang, Y. et al. SHP-2 phosphatase negatively regulates the TRIF adaptor protein-dependent type I interferon and proinflammatory cytokine production. *Immunity* **25**, 919-928 (2006).
- 99 Kobayashi, K., Hernandez, L. D., Galan, J. E., Janeway, C. A., Jr. et al. IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell* **110**, 191-202 (2002).
- 100 Escoll, P., del Fresno, C., Garcia, L., Valles, G. et al. Rapid up-regulation of IRAK-M expression following a second endotoxin challenge in human monocytes and in monocytes isolated from septic patients. *Biochemical and biophysical research communications* **311**, 465-472 (2003).
- 101 Deng, J. C., Cheng, G., Newstead, M. W., Zeng, X. et al. Sepsis-induced suppression of lung innate immunity is mediated by IRAK-M. *The Journal of clinical investigation* **116**, 2532-2542 (2006).
- 102 Shinohara, H., Inoue, A., Toyama-Sorimachi, N., Nagai, Y. et al. Dok-1 and Dok-2 are negative regulators of lipopolysaccharide-induced signaling. *The Journal of experimental medicine* **201**, 333-339 (2005).
- 103 Dumitru, C. D., Ceci, J. D., Tsatsanis, C., Kontoyiannis, D. et al. TNF-alpha induction by LPS is regulated posttranscriptionally via a Tpl2/ERK-dependent pathway. *Cell* **103**, 1071-1083 (2000).
- 104 Zhang, G. & Ghosh, S. Negative regulation of toll-like receptor-mediated signaling by Tollip. *The Journal of biological chemistry* **277**, 7059-7065 (2002).
- 105 Shah, J. A., Vary, J. C., Chau, T. T., Bang, N. D. et al. Human TOLLIP regulates TLR2 and TLR4 signaling and its polymorphisms are associated with susceptibility to tuberculosis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **189**, 1737-1746 (2012).
- 106 Didierlaurent, A., Brissoni, B., Velin, D., Aebi, N. et al. Tollip regulates proinflammatory responses to interleukin-1 and lipopolysaccharide. *Molecular and cellular biology* **26**, 735-742 (2006).
- 107 Gunthner, R. & Anders, H. J. Interferon-regulatory factors determine macrophage phenotype polarization. *Mediators of inflammation* **2013**, 731023 (2013).
- 108 Negishi, H., Ohba, Y., Yanai, H., Takaoka, A. et al. Negative regulation of Toll-like-receptor signaling by IRF-4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 15989-15994 (2005).
- 109 Takaoka, A., Yanai, H., Kondo, S., Duncan, G. et al. Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. *Nature* **434**, 243-249 (2005).
- 110 Satoh, T., Takeuchi, O., Vandenbon, A., Yasuda, K. et al. The Jmjd3-Irf4 axis regulates M2 macrophage polarization and host responses against helminth infection. *Nature immunology* **11**, 936-944 (2010).
- 111 Krausgruber, T., Blazek, K., Smallie, T., Alzabin, S. et al. IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses. *Nature immunology* **12**, 231-238 (2011).
- 112 Marion, J. D., Roberts, C. F., Call, R. J., Forbes, J. L. et al. Mechanism of endogenous regulation of the type I interferon response by suppressor of IkappaB kinase epsilon (SIKE), a novel substrate of TANK-binding kinase 1 (TBK1). *The Journal of biological chemistry* **288**, 18612-18623 (2013).

- 113 Huang, J., Liu, T., Xu, L. G., Chen, D. et al. SIKE is an IKK epsilon/TBK1-associated suppressor of TLR3- and virus-triggered IRF-3 activation pathways. *The EMBO journal* **24**, 4018-4028 (2005).
- 114 Allen, I. C., Moore, C. B., Schneider, M., Lei, Y. et al. NLRX1 protein attenuates inflammatory responses to infection by interfering with the RIG-I-MAVS and TRAF6-NF-kappaB signaling pathways. *Immunity* **34**, 854-865 (2011).
- 115 Xia, X., Cui, J., Wang, H. Y., Zhu, L. et al. NLRX1 negatively regulates TLR-induced NF-kappaB signaling by targeting TRAF6 and IKK. *Immunity* **34**, 843-853 (2011).
- 116 Bloem, K., Vuist, I. M., van der Plas, A. J., Knippels, L. M. et al. Ligand binding and signaling of dendritic cell immunoreceptor (DCIR) is modulated by the glycosylation of the carbohydrate recognition domain. *PloS one* **8**, e66266 (2013).
- 117 Meyer-Wentrup, F., Cambi, A., Joosten, B., Looman, M. W. et al. DCIR is endocytosed into human dendritic cells and inhibits TLR8-mediated cytokine production. *Journal of leukocyte biology* **85**, 518-525 (2009).
- 118 Fujikado, N., Saijo, S., Yonezawa, T., Shimamori, K. et al. Dcir deficiency causes development of autoimmune diseases in mice due to excess expansion of dendritic cells. *Nature medicine* **14**, 176-180 (2008).
- 119 McDonald, C., Chen, F. F., Ollendorff, V., Ogura, Y. et al. A role for Erbin in the regulation of Nod2-dependent NF-kappaB signaling. *The Journal of biological chemistry* **280**, 40301-40309 (2005).
- 120 Yamamoto-Furusho, J. K., Barnich, N., Xavier, R., Hisamatsu, T. et al. Centaurin beta1 down-regulates nucleotide-binding oligomerization domains 1- and 2-dependent NF-kappaB activation. *The Journal of biological chemistry* **281**, 36060-36070 (2006).
- 121 Mestas, J. & Hughes, C. C. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **172**, 2731-2738 (2004).
- 122 Seok, J., Warren, H. S., Cuenca, A. G., Mindrinos, M. N. et al. Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 3507-3512 (2013).
- 123 Osuchowski, M. F., Remick, D. G., Lederer, J. A., Lang, C. H. et al. Abandon the Mouse Research Ship? Not Just Yet! *Shock (Augusta, Ga.)* (2014).
- 124 Bryant, C. E. & Monie, T. P. Mice, men and the relatives: cross-species studies underpin innate immunity. *Open biology* **2**, 120015 (2012).
- 125 Lech, M., Susanti, H. E., Rommele, C., Grobmayr, R. et al. Quantitative expression of C-type lectin receptors in humans and mice. *International journal of molecular sciences* **13**, 10113-10131 (2012).
- 126 Schroder, K., Irvine, K. M., Taylor, M. S., Bokil, N. J. et al. Conservation and divergence in Toll-like receptor 4-regulated gene expression in primary human versus mouse macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, E944-953 (2012).
- 127 Kingston, R. E. Preparation of poly(A)+ RNA. *Current protocols in molecular biology / edited by Frederick M. Ausubel ... [et al.]* **Chapter 4**, Unit4 5 (2001).

- 128 English, D. & Andersen, B. R. Single-step separation of red blood cells. Granulocytes and mononuclear leukocytes on discontinuous density gradients of Ficoll-Hypaque. *Journal of immunological methods* **5**, 249-252 (1974).
- 129 Removal of blood from laboratory mammals and birds. First report of the BVA/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement. *Laboratory animals* **27**, 1-22 (1993).
- 130 Bas, A., Forsberg, G., Hammarstrom, S. & Hammarstrom, M. L. Utility of the housekeeping genes 18S rRNA, beta-actin and glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase for normalization in real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of gene expression in human T lymphocytes. *Scandinavian journal of immunology* **59**, 566-573 (2004).
- 131 Grunert, P., Espinosa, J., Busert, C., Gunthner, M. et al. Stereotactic biopsies guided by an optical navigation system: technique and clinical experience. *Minimally invasive neurosurgery* : *MIN* **45**, 11-15 (2002).
- 132 Rozen, S. & Skaletsky, H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **132**, 365-386 (2000).
- 133 Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J. et al. Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic acids research* **40**, e115 (2012).
- 134 Cui, W., Taub, D. D. & Gardner, K. qPrimerDepot: a primer database for quantitative real time PCR. *Nucleic acids research* **35**, D805-809 (2007).
- 135 Broad, A., Jones, D. E. & Kirby, J. A. Toll-like receptor (TLR) response tolerance: a key physiological "damage limitation" effect and an important potential opportunity for therapy. *Current medicinal chemistry* **13**, 2487-2502 (2006).
- 136 Barrett, T., Troup, D. B., Wilhite, S. E., Ledoux, P. et al. NCBI GEO: archive for functional genomics data sets--10 years on. *Nucleic acids research* **39**, D1005-1010 (2011).
- 137 Matthews, S. Gene expression database scales up, providing baseline data. *Nature medicine* **19**, 799 (2013).
- 138 Consortium, G. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project. *Nature genetics* **45**, 580-585 (2013).
- 139 Kapushesky, M., Adamusiak, T., Burdett, T., Culhane, A. et al. Gene Expression Atlas update--a value-added database of microarray and sequencing-based functional genomics experiments. *Nucleic acids research* **40**, D1077-1081 (2012).
- 140 Fang, Z. & Cui, X. Design and validation issues in RNA-seq experiments. *Briefings in bioinformatics* **12**, 280-287 (2011).
- 141 Keane, T. M., Goodstadt, L., Danecek, P., White, M. A. et al. Mouse genomic variation and its effect on phenotypes and gene regulation. *Nature* **477**, 289-294 (2011).
- 142 Coutinho, A. E. & Chapman, K. E. The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights. *Molecular and cellular endocrinology* **335**, 2-13 (2011).
- 143 Liu, D., Ahmet, A., Ward, L., Krishnamoorthy, P. et al. A practical guide to the monitoring and management of the complications of systemic corticosteroid therapy. *Allergy, asthma, and*

- clinical immunology : official journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology* **9**, 30 (2013).
- 144 Hotchkiss, R. S., Monneret, G. & Payen, D. Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *The Lancet infectious diseases* **13**, 260-268 (2013).
- 145 Hotchkiss, R. S., Monneret, G. & Payen, D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nature reviews. Immunology* **13**, 862-874 (2013).
- 146 Tamayo, E., Gomez, E., Bustamante, J., Gomez-Herreras, J. I. et al. Evolution of neutrophil apoptosis in septic shock survivors and nonsurvivors. *Journal of critical care* **27**, 415 e411-411 (2012).
- 147 Kovach, M. A. & Standiford, T. J. The function of neutrophils in sepsis. *Current opinion in infectious diseases* **25**, 321-327 (2012).
- 148 Nomura, F., Akashi, S., Sakao, Y., Sato, S. et al. Cutting edge: endotoxin tolerance in mouse peritoneal macrophages correlates with down-regulation of surface toll-like receptor 4 expression. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **164**, 3476-3479 (2000).
- 149 van 't Veer, C., van den Pangaart, P. S., van Zoelen, M. A., de Kruif, M. et al. Induction of IRAK-M is associated with lipopolysaccharide tolerance in a human endotoxemia model. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **179**, 7110-7120 (2007).
- 150 Dobrovolskaia, M. A., Medvedev, A. E., Thomas, K. E., Cuesta, N. et al. Induction of in vitro reprogramming by Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 agonists in murine macrophages: effects of TLR "homotolerance" versus "heterotolerance" on NF-kappa B signaling pathway components. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **170**, 508-519 (2003).
- 151 Sato, S., Nomura, F., Kawai, T., Takeuchi, O. et al. Synergy and cross-tolerance between toll-like receptor (TLR) 2- and TLR4-mediated signaling pathways. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **165**, 7096-7101 (2000).
- 152 Xie, G. H., Fang, X. M., Fang, Q., Wu, X. M. et al. Impact of invasive fungal infection on outcomes of severe sepsis: a multicenter matched cohort study in critically ill surgical patients. *Crit Care* **12**, R5 (2008).
- 153 Wang, J. P., Bowen, G. N., Padden, C., Cerny, A. et al. Toll-like receptor-mediated activation of neutrophils by influenza A virus. *Blood* **112**, 2028-2034 (2008).
- 154 Moreira, L. O. & Zamboni, D. S. NOD1 and NOD2 Signaling in Infection and Inflammation. *Frontiers in immunology* **3**, 328 (2012).
- 155 Okusa, M. D., Rosner, M.H. Overview of the management of acute kidney injury (acute kidney failure). *UpToDate*, (2014).
- 156 Linkermann, A., Stockwell, B. R., Krautwald, S. & Anders, H. J. Regulated cell death and inflammation: an auto-amplification loop causes organ failure. *Nature reviews. Immunology* **14**, 759-767 (2014).
- 157 Ashkenazi, A. & Salvesen, G. Regulated cell death: signaling and mechanisms. *Annual review of cell and developmental biology* **30**, 337-356 (2014).
- 158 Anders, H. J., Banas, B. & Schlondorff, D. Signaling danger: toll-like receptors and their potential roles in kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **15**, 854-867 (2004).

- 159 Kurts, C., Panzer, U., Anders, H. J. & Rees, A. J. The immune system and kidney disease: basic concepts and clinical implications. *Nature reviews. Immunology* **13**, 738-753 (2013).
- 160 Lech, M., Avila-Ferruffino, A., Allam, R., Segerer, S. et al. Resident dendritic cells prevent postischemic acute renal failure by help of single Ig IL-1 receptor-related protein. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **183**, 4109-4118 (2009).
- 161 Lassen, S., Lech, M., Rommele, C., Mittrüecker, H. W. et al. Ischemia reperfusion induces IFN regulatory factor 4 in renal dendritic cells, which suppresses postischemic inflammation and prevents acute renal failure. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **185**, 1976-1983 (2010).
- 162 Heemann, U., Szabo, A., Hamar, P., Müller, V. et al. Lipopolysaccharide pretreatment protects from renal ischemia/reperfusion injury : possible connection to an interleukin-6-dependent pathway. *The American journal of pathology* **156**, 287-293 (2000).
- 163 Anders, H. J. & Ryu, M. Renal microenvironments and macrophage phenotypes determine progression or resolution of renal inflammation and fibrosis. *Kidney international* **80**, 915-925 (2011).
- 164 Coca, S. G., Singanamala, S. & Parikh, C. R. Chronic kidney disease after acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis. *Kidney international* **81**, 442-448 (2012).
- 165 Levey, A. S. & Coresh, J. Chronic kidney disease. *Lancet* **379**, 165-180 (2012).
- 166 Lee, S. B. & Kalluri, R. Mechanistic connection between inflammation and fibrosis. *Kidney Int Suppl*, S22-26 (2010).
- 167 Zhou, H., Hasni, S. A., Perez, P., Tandon, M. et al. miR-150 promotes renal fibrosis in lupus nephritis by downregulating SOCS1. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **24**, 1073-1087 (2013).
- 168 Lech, M., Grobmayer, R., Ryu, M., Lorenz, G. et al. Macrophage phenotype controls long-term AKI outcomes--kidney regeneration versus atrophy. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **25**, 292-304 (2014).
- 169 Ogata, H., Chinen, T., Yoshida, T., Kinjyo, I. et al. Loss of SOCS3 in the liver promotes fibrosis by enhancing STAT3-mediated TGF-beta1 production. *Oncogene* **25**, 2520-2530 (2006).
- 170 Huang, H., Tang, Q. Z., Wang, A. B., Chen, M. et al. Tumor suppressor A20 protects against cardiac hypertrophy and fibrosis by blocking transforming growth factor-beta-activated kinase 1-dependent signaling. *Hypertension* **56**, 232-239 (2010).
- 171 Lim, J. H., Jono, H., Komatsu, K., Woo, C. H. et al. CYLD negatively regulates transforming growth factor-beta-signalling via deubiquitinating Akt. *Nature communications* **3**, 771 (2012).
- 172 Watkins-Chow, D. E. & Pavan, W. J. Genomic copy number and expression variation within the C57BL/6J inbred mouse strain. *Genome research* **18**, 60-66 (2008).
- 173 Maier, T., Guell, M. & Serrano, L. Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. *FEBS letters* **583**, 3966-3973 (2009).
- 174 Reiley, W., Zhang, M., Wu, X., Granger, E. et al. Regulation of the deubiquitinating enzyme CYLD by I $\kappa$ B kinase gamma-dependent phosphorylation. *Molecular and cellular biology* **25**, 3886-3895 (2005).

