

Aus der Medizinischen Poliklinik – Innenstadt

der Ludwig-Maximilians-Universität München

Komm. Direktor: Prof. Dr. med. Martin Reincke

Rolle Nukleinsäure-spezifischer Pathogenerkennungsrezeptoren in Podozyten



Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Humanmedizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Liliana Castrezana López

aus Iguala, Mexiko

2012

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

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

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dr. h.c. Ulrich Koszinowski
Priv. Doz. Dr. Wolfgang Neuhofer
Prof. Dr. Dr. Ulrich Welsch
Prof. Dr. André Brändli

Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter: Dr. hum. biol. Rahul D. Pawar

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

Tag der mündlichen Prüfung: 14.06.2012

Vorbemerkungen

Die vorliegende Arbeit wurde von Februar 2007 bis November 2008 in der Abteilung für Klinische Biochemie in der Medizinischen Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt.

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

Förderung des Projekts

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

Aus dieser Arbeit ging folgende Originalarbeit hervor

Pawar RD, **Castrezana López L**, Allam R, Kulkarni OP, Segerer S, Radomska E, Meyer TN, Schwesinger CM, Akis N, Gröne HJ, Anders HJ. *Bacterial lipopeptide triggers massive albuminuria in murine lupus nephritis by activating Toll-like receptor 2 at the glomerular filtration barrier*. Immunology, 2009. 128(1 Suppl): p. e206-21.

Con todo el amor para Papi y Mami

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	2
1.1 Aufbau und Funktion der Nieren	2
1.2 Filtrationsbarriere der Niere	3
1.2.1 Das fenestrierte Kapillarendothel.....	5
1.2.2 Die glomeruläre Basalmembran	5
1.2.3 Podozyten.....	6
1.3 Das Immunsystem	26
1.3.1 Die angeborene Immunantwort.....	27
1.3.2 Die erworbene Immunantwort	31
1.4 Erkennung viraler RNA.....	31
1.4.1 Toll-like Rezeptoren	31
1.4.2 RIG-like Helikasen	33
1.4.3 Immunantwort nach Aktivierung von TLRs oder RLRs	34
1.5 Interferone und ihre Rezeptoren	35
1.5.1 Typ I-Interferone.....	35
1.5.2 Typ II-Interferone	37
1.6 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	39
2 Material und Methoden	42
2.1 Verwendete Geräte und Materialien	42
2.2 Zellkultur	44
2.3 ELISA	48
2.4 RNA-Isolation und cDNA-Synthese	54
2.5 Real-time RT-PCR (TaqMan [®])	57
2.6 Viabilitätsassay	59
2.7 Permeabilität mittels Fluorescein-Albumin.....	60
2.8 Zellfärbung	61
2.9 Durchflusszytometrie.....	62
2.10 Statistische Auswertung	64

3 Ergebnisse	67
3.1 Toll-like Rezeptor-Expression auf Podozyten.....	67
3.2 Pathogenerkennungsrezeptoren in Podozyten	68
3.3 Synthese proinflammatorischer Zytokine, Chemokine, Typ-I IFN und IFN induzierter Mx-Proteine durch Podozyten nach IFN- β Stimulation.....	70
3.4 Virale Nukleinsäuren stimulieren die Produktion von Typ-I Interferon in Podozyten ..	71
3.5 Virale RNA und DNA induzieren die Expression von IL-6, IL-1 β und MCP-1 in Podozyten	74
3.6 Zytokinproduktion nach exogener Typ-I und -II Interferonen Exposition.....	76
3.7 Aufnahmemechanismus von viraler RNA und DNA in Podozyten.....	80
3.8 Signalerkennung von RNA und DNA in Podozyten unabhängig von MyD88	83
3.9 Endogene Typ-I IFN stimulieren Podozyten weder autokrin noch parakrin.....	84
3.10 Effekte der Aktivierung von TLRs und RLRs auf die Podozytenviabilität	86
3.10.1 Die Podozytenviabilität nimmt nach Aktivierung von TLR 1/2, TLR 4 und TLR 7/8 im Entzündungsmodell ab.....	86
3.10.2 Die Aktivierung von RLRs hat keinen Einfluss auf die Podozytenviabilität	87
3.11 B7-1 / CD80 Expression in Podozyten nach TLR-Aktivierung.....	89
3.12 Albuminübertritt durch Podozyten nach Nukleinsäure-Stimulation	91
3.13 Die Fußfortsätzeanzahl nimmt nach TLR 2 und 4 Aktivierung nicht ab	92
4 Diskussion	96
4.1 Bedeutung der Pathogenerkennungsrezeptoren in Podozyten.....	98
4.2 Effekte der Nukleinsäureerkennung in Podozyten	101
4.3 Antwort der Podozyten auf Typ-I Interferone	103
4.4 Effekte der Aktivierung von Pathogenerkennungsrezeptoren auf Albuminpermeabilität und Podozytenviabilität	105
5 Zusammenfassung	108
6 Literaturverzeichnis.....	111
7 Abkürzungsverzeichnis	124
8 Danksagung	130

Erstes Kapitel:

Einleitung

1 Einleitung

1.1 Aufbau und Funktion der Nieren

Die Nieren sind ein Paar von bohnenförmigen Organen im paravertebralen Retroperitonealraum. Jede Niere eines erwachsenen Menschen ist ungefähr vier cm dick, sieben cm breit und elf cm lang und wiegt etwa 120 bis 200 g. Sie werden jeweils von drei anatomischen Hüllen umgeben: einer Faserkapsel aus straffem Bindegewebe mit glatten Muskelzellen, einer Fettkapsel als Polsterung und der äußeren Nierenfaszie.

Die Niere erfüllt verschiedene wichtige Aufgaben: (1) die Aufrechterhaltung der Volumen- und Elektrolythomöostase und Regulierung des Säuren-Basen-Haushaltes, (2) die Ausscheidung von wasserlöslichen Stoffwechselprodukten und Pharmaka; so müssen täglich beispielweise mehr als 1200 mosmol stickstoffhaltiger Endprodukte aus dem Eiweißstoffwechsel als harnpflichtige Substanzen (z.B. Kreatinin, Harnstoff, Ammoniak, Harnsäure) ausgeschieden werden, (3) die Hormonsynthese (Erythropoetin, Renin, sowie die Hydroxylierung von 1-Hydroxycholecalciferol zu 1,25-Dihydroxycholecalciferol (4) und auch die Blutdruckregulation (Renin-Angiotensin-Aldosteron-System, Kinin-Kallikrein-System) [1].

Wird die Niere von lateral nach medial in zwei symmetrische Hälften aufgeschnitten, kann man das Hohlsystem und das Nierenparenchym als zwei deutliche Bereiche unterscheiden. Zum Hohlsystem gehören die Nierenkelche und das Nierenbecken. Das Nierenparenchym wird in Rinde und Mark unterteilt, wobei in der Rinde die Glomeruli liegen und das Tubulussystem das Mark durchzieht. Die Funktionseinheit der Niere wird als Nephron bezeichnet und besteht aus einem Nierenkörperchen und den Harnkanälchen. Jede Niere enthält knapp über eine Million Nephrone. Täglich wird 150-180 Liter Primärharn von den Nierenkörperchen gebildet. Dabei besteht jedes Nierenkörperchen aus einem Glomerulus (Kapillarknäuel), einem Kapselraum und einer Glomeruluskapsel (Bowman-Kapsel). Ein Glomerulus setzt sich aus den Kapillarschlingen mit dem dazu gehörenden Gefäß- und Harnpol zusammen. Die Kapillarschlingen stellen eine Filterbarriere dar und sind aus Endothelzellen, Basalmembran und Podozyten aufgebaut. Das zuführende Vas afferens, das aus der Arteria interlobularis entspringt, ist für die Versorgung der Kapillarschlingen des Glomerulus zuständig. In den Nierenkörperchen bilden diese zuführenden Arteriolen ein Kapillarnetz, in welchem der Primärharn abgepresst wird. Nach dieser Verzweigung sammeln sich die Kapillaren wieder und bilden dabei das Vas efferens, welches das Glomerulum verlässt. Jede Minute fließen ungefähr 1,2 Liter Blut durch beide Nieren. Dies entspricht ungefähr 25% des

Herzzeitvolumens. Die Nierendurchblutung wird durch den Bayliss-Effekt in den Vasa afferentia weitgehend konstant gehalten [1].

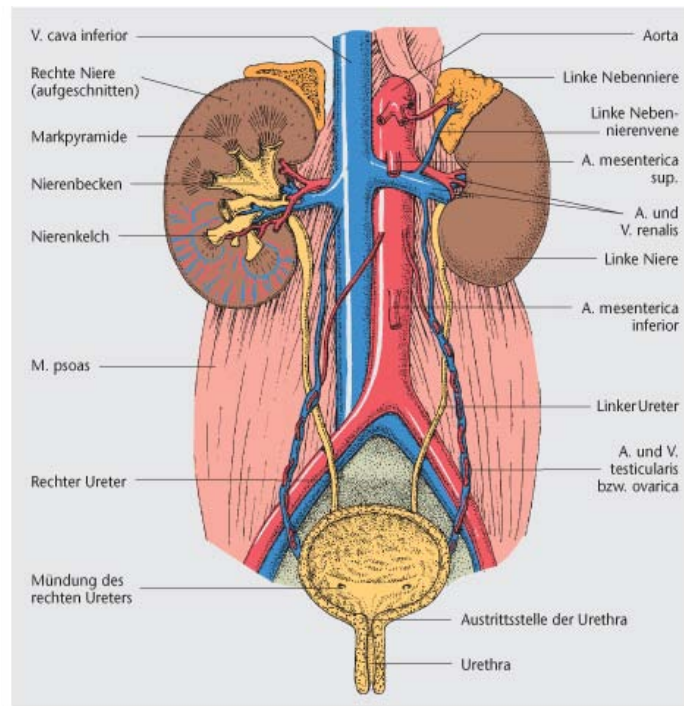


Abbildung 1. Makroskopische Anatomie der Niere. Dargestellt sind beide Nieren und das ableitende Harnsystem. Im Längsschnitt der rechten Niere sind die Markpyramiden, das Nierenbecken, die Nierenkelche und die intrarenale Verzweigung der Blutgefäße zu erkennen [1].

1.2 Filtrationsbarriere der Niere

Die Filtrationsbarriere der Niere ist eine komplexe biologische Einheit. Diese ermöglicht die Filtration von hohen Wassermengen und erlaubt den ungehinderten Durchgang von kleinen und mittelgroßen Molekülen, verhindert aber den Albumin- und Großproteinenverlust. Im menschlichen Körper werden jeden Tag ungefähr 180 Liter Primärharn unter einem hohen Kapillardruck abfiltriert. Trotz dieser gewaltigen Arbeitsleistung bleiben die Glomeruli jahrelang intakt. Zur Filtrationsbarriere gehören das fenestrierte Kapillarendothel mit Poren von je etwa 70 nm Durchmesser, die glomeruläre Basalmembran (GBM) und die viszeral glomerulären Epithelzellen (Podozyten) [2] (Abb. 2).

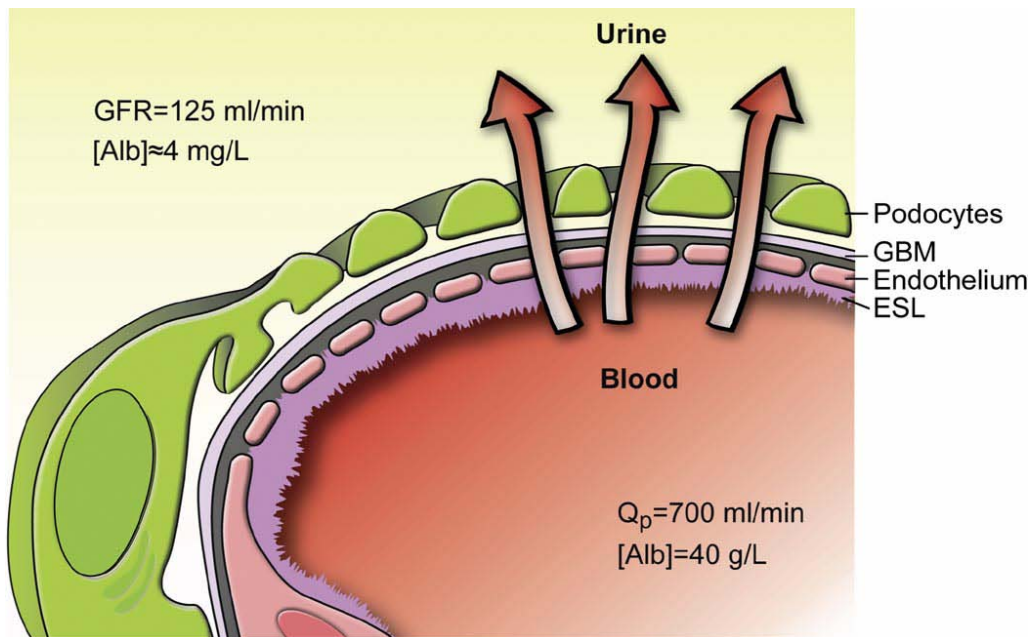


Abbildung 2. Filtrationsbarriere der Niere. Die Abbildung stellt die Lage von Podocytes: Podozyten, GBM: glomeruläre Basalmembran, Endothelium: Kapillarendothel und ESL: Glykokalix in der Filtrationsbarriere dar. Die Pfeile zeigen die Richtung der Filtration von Plasma, dabei wird Primärharn in Menschen zu einer glomerulären Filtrationsrate (GFR) von 125 ml/min gebildet. Der Plasmadurchfluss (Q_p) beträgt ca. 700 ml/min. Die Abbildung zeigt zudem die Albuminkonzentrationen im Serum (40g/L) und im Primärharn (4mg/L) [3].

Die Plasmamoleküle werden je nach Größe und Ladung durch den glomerulären Filter durchgesiebt [3]. Das Trennvermögen der renalen Filtration nach Größe wird allgemein akzeptiert, während das der Ladung immer noch umstritten ist [4, 5]. Mehrere Studien der letzten Jahre haben gezeigt, dass alle drei Schichten der glomerulären Filtrationsbarriere intakt sein müssen, um die normale Filterfunktion der Niere aufrechtzuerhalten. Jedoch heben Studien vom letzten Jahrzehnt die Rolle des Podozyten im Filtrationsprozess hervor [6].

Die Filtrationsbarriere ist bei vielen systemischen und nierenspezifischen Krankheiten geschädigt, was zu Proteinurie und progressiven renalen Schäden führt. Eine Dysfunktion des Glomerulus ist die häufigste Ursache für das chronische Nierenversagen. Aus diesem Grund ist es wichtig, den genauen Aufbau dieser Filtrationsbarriere zu verstehen.

1.2.1 Das fenestrierte Kapillarendothel

Im menschlichen Körper existieren grundsätzlich drei verschiedene Arten von Endothel: kontinuierliches, fenestriertes und diskontinuierliches. Die Arten unterscheiden sich untereinander in ihrem Aufbau und in ihrer Durchlässigkeit für verschiedene Stoffe des Bluts. Im Glomerulus kommt ausschließlich stark fenestriertes Endothel vor. Diese Strukturen haben einen Durchmesser von ca. 70-100 nm und bilden 20-50% der glomerulären Kapillarfläche [7]. Diese ungewöhnlich starke Fenestrierung ermöglicht eine hohe Permeabilität für Wasser und kleine gelöste Stoffe vom Vas afferens in den Glomerulus [3]. Im Vergleich zu Albumin sind diese Fenster größer und somit kann aus aktuellen Forschungsergebnissen geschlossen werden, dass glomeruläre Endothelzellen (GECs) keine wichtige Rolle in der Filtrationsbarriere für Proteine spielen. Allerdings sind GECs von einer Zelloberflächenschicht (Abb. 2) bedeckt, welche hauptsächlich aus Glykokalix besteht, die den Durchgang von Albumin und anderen Plasmaproteinen durch die GBM hindern könnte. Hauptbestandteile dieser Zelloberflächenschicht sind negativ geladene Glykoproteine, Glykosaminoglykane und membranständige Proteoglykane. Dieser Aufbau unterstützt die These, dass GECs zur Ladungselektivität der Filtrationsbarriere beitragen [7]. Mehrere Studien zur Proteinurie im Tiermodell belegen die Rolle von GECs bei der Filtration, da ein Zusammenhang zwischen verminderter Glykokalix und Proteinurie nachgewiesen werden konnte [3]. Quaggin et al. haben durch Forschung der Wirkung von *vascular endothelial growth factor* (VEGF) im Glomerulus bewiesen, dass GECs zur Ausbildung und Aufrechterhaltung der Filtrationsbarriere notwendig sind [8, 9].

1.2.2 Die glomeruläre Basalmembran

Podozyten und Endothelzellen sind jeweils an ihrer Seite an der glomerulären Basalmembran verankert (Abb. 3b). Im Vergleich zu anderen Basalmembranen im Kapillarbett (40-80 nm) [10] ist die GBM dicker (240–370 nm) [11]. Die Hauptbestandteile der GBM sind Kollagen Typ IV ($\alpha 3$, $\alpha 4$ und $\alpha 5$), Laminin (Laminin 11, $\alpha 5$, $\beta 2$, $\gamma 1$), Entactin, Agrin und Perlecan [12]. Die komplizierten Wechselwirkungen zwischen diesen Molekülen bilden ein einzigartig durchlässiges Gerüst, welches der Kapillarwand Spannungskraft und Flexibilität verleiht. Das netzbildende Kollagen Typ IV ist als Tripel-Helix organisiert, welches in erster Linie die Struktur der glomerulären Kapillarwand unterstützt und wenig zur Größe- oder Ladungselektivität der Filtrationsbarriere beiträgt [6]. Mutationen von Genen, die Defekte in der Synthese von Kollagen Typ IV bewirken, führen zum Alport-Syndrom mit milder

Proteinurie und Hämaturie [13]. In der GBM befindet sich hauptsächlich Laminin-521, welches aus α 5-, β 2- und γ 1-Ketten besteht [7]. Da Laminin β 2 knockout Mäuse eine massive Proteinurie zeigen [14] und Patienten mit Mutationen im Laminin β 2- Gen das Piersons-Syndrom entwickeln [15], kann angenommen werden, dass Laminin-521 in der glomerulären Filtrationsbarriere eine wichtige Funktion übernimmt. Zudem geht die Zerstörung der GBM dem Ausbruch der Proteinurie in Laminin β 2 knockoutmäusen voraus, während Podozytenfortsätze und die Schlitzmembran ihre Funktionalität beibehalten [16]. Heparansulfat-Proteoglykane sind in der GBM reichlich vorhanden und sie sind für die anionische Ladung der GBM zuständig [17].

1.2.3 Podozyten

Podozyten oder viszeral glomeruläre Epithelzellen (VGEC) sind strukturell differenzierte Zellen der Niere. Ihre Lage, Architektur und Bedeutung sind einzigartig. Sie bilden die äußere Schicht der glomerulären Filtrationsbarriere. Da Podozyten unfähig zur Proliferation sind [18], ist ihre Schädigung ein besonderes Merkmal von progredienten glomerulären Erkrankungen [19]. Podozyten bestehen aus einem großen Zellkörper und Fortsätzen, mit denen die Zellen an der GBM haften. Dabei berühren die Zellkörper selbst die GBM nicht, flottieren jedoch im Ultrafiltrat des Kapselraums [20] (Abb. 3a).

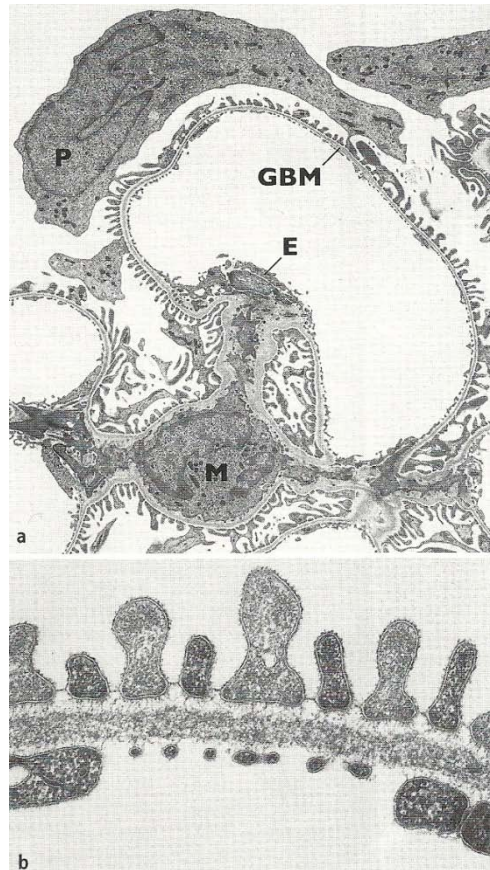


Abbildung 3. Transmissionselektronenmikroskopische Bilder. **a** Glomeruluskapillare mit Mesangium (M), GBM, Porenendothel (E) und Podozytenschicht (P). Zu Erkennen ist, dass der Zellkörper des Podozyten nicht direkt auf der GBM aufsitzt, sondern sozusagen an seinen Fortsätzen hängend im Harnraum flottiert und **b** Detailbild der Filtrationsbarriere bestehend aus dem Endothel mit offenen Poren, der GBM mit Lamina rara interna, Lamina densa und Lamina rara externa und der zwischen den Podozytenfüßchen ausgespannten Schlitzmembran [20].

Die primären Zellausläufer werden ausgehend vom Zellkörper gebildet und verzweigen sich dann in feinere sekundäre Fußfortsätze (Abb.4). Die sekundären Fußfortsätze verzahnen sich mit den Fußfortsätzen benachbarter Podozyten und bilden wiederum ein dichtes Netzwerk interdigitierender Zellausläufer, die das gesamte glomeruläre Kapillarknäuel bedecken und so die Filtrationsschlitzte formen [21].

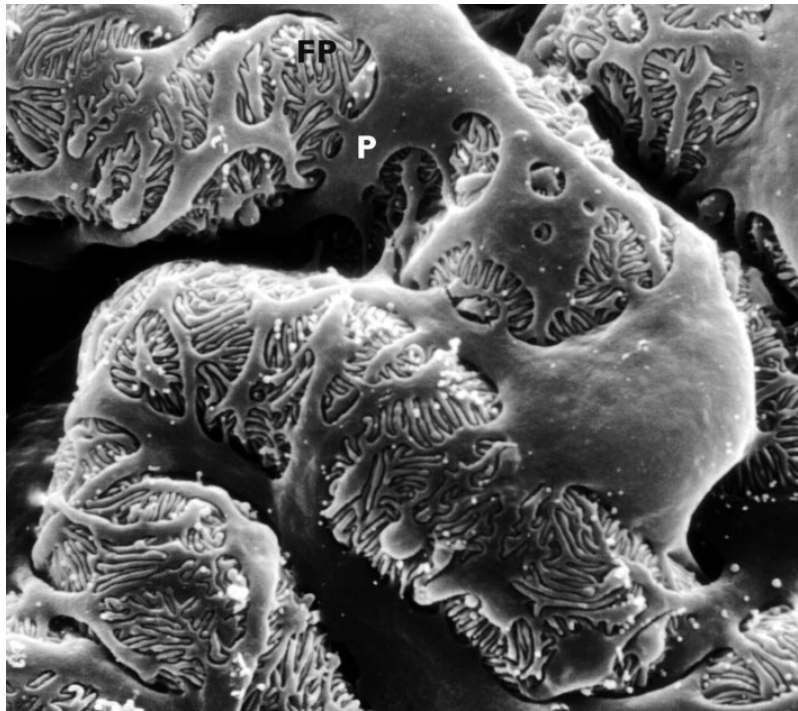


Abbildung 4. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Außenseite einer Glomeruluskapillare. Zu sehen ist ein Podozyt, von dessen Körper zunächst Primärfortsätze entspringen, die sich in die fingerförmigen Fußfortsätze aufspalten; zwischen letzteren erkennt man die Filtrationsschlitze [20].

Podozyten sind an mehreren glomerulären Funktionen beteiligt und bilden in der Ontogenese die GBM und sind dann für ihren „Turnover“ verantwortlich. Zusammen mit den Endothelzellen und der GBM sind die Podozyten für die Filtrationsbarriere zuständig. Ähnlich den Mesangiumzellen tragen Podozyten zur Stützfunktion des glomerulären Kapillarknäuels bei. Außerdem sind sie bei der Regulierung der glomerulären Filtration beteiligt und besitzen immunologische Funktionen [19].

Im Verlauf glomerulärer Krankheiten wie beispielsweise der Minimal-change-Glomerulopathie, der Fokal-segmentalen Glomerulosklerose, der diabetischen Nephropathie, der membranösen Glomerulonephritis, der rasch progredienten Glomerulonephritis und der Lupusnephritis werden Podozyten geschädigt [22, 23]. Die frühen Krankheitserscheinungen werden durch Veränderungen der Fußfortsätze und der Filtrationsschlitzstruktur gekennzeichnet. Der Verlust der Podozytenarchitektur und die Fußfortsatzverschmelzung („*effacement*“) sind mit dem Ausbruch der Proteinurie verbunden [24] und werden von einer Restrukturierung des Aktin-Cytoskeletts zu einem dichten Netzwerk begleitet [25]. Allerdings sind die molekularen Mechanismen, die die morphologischen Alterationen der Podozytenfußfortsätze verursachen, noch nicht komplett verstanden und es bedarf weiterer Forschung [26].

Das podozytäre Zytoskelett

Da Podozyten polarisierte Zellen sind, wird ein spezialisiertes inneres Stützwerk für die Aufrechterhaltung ihrer komplexen Morphologie benötigt. Dank ihres aktinreichen Zytosketts, das den Zellen eine Art „Wirbelsäule“ verleiht, ist ihre einzigartige Form möglich [27]. Dieses Aktinskelett ist mit anderen Proteinen verbunden und bezogen auf die molekuläre Anatomie der jeweiligen Seite sind Podozyten in apikal, basal und junktionale Zellmembranbezirke eingeteilt worden [28]. Das Zytoskelett besteht aus drei verschiedenen Klassen von Zytoskelettfilamenten, die jeweils von unterschiedlichen Proteinen gebildet werden: Mikrotubuli (24 nm Durchmesser), Intermediärfilamente (10 nm) und Mikrofilamente (7-9 nm). Der apikale Zellmembranbezirk ist negativ geladen, wobei diese Eigenschaft durch anionische Oberflächenproteinen wie Podocalyxin [29], Podoplanin [30] und Podoendin festgelegt wird. Dies hat zwei Funktionen: (1) der Durchgang von ebenfalls negativ geladenem Albumin wird verhindert und (2) benachbarte Podozyten werden durch diese anionische Ladung auseinander gehalten [31].

Das Zytoskelett der Primärfortsätze (Abb. 4) besteht neben dem Aktinskelett aus Mikrotubuli die in Längsrichtung verlaufen [32] und aus Intermediärfilamenten, die aus Vimentin aufgebaut sind [19]. Diese Mikrotubuli weisen keine einheitliche Polarität auf [33].

Das Zytoskelett der sekundären Fußfortsätze basiert auf Mikrofilamenten. Die Verankerung der sekundären Fußfortsätze in die GBM wird durch $\alpha 3, \beta 1$ -Integrine [34] und Dystroglycan [35, 36] vermittelt (Abb. 5). Integrine und Dystroglycan sind im Zytoplasma über Adaptermoleküle (Talin, Vinculin, Paxillin [37] und Utrophin [28]) mit dem Aktinfilamentsystem verknüpft.

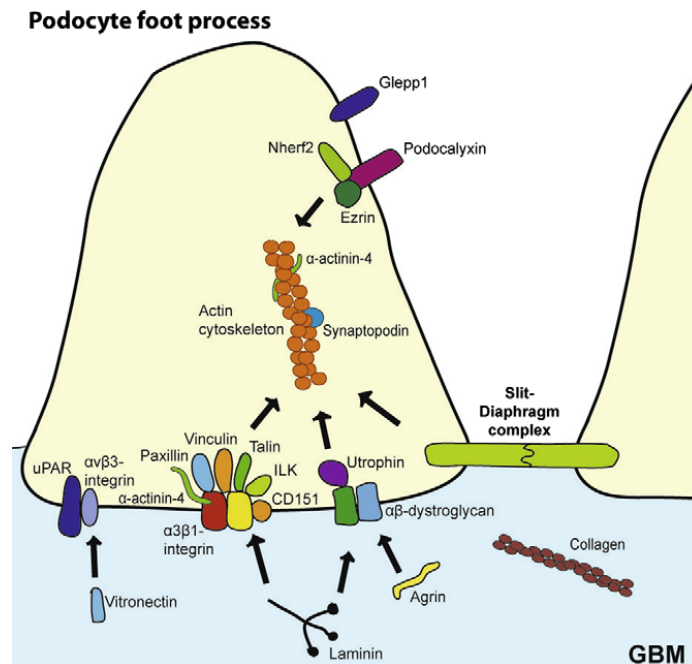


Abbildung 5. Aufbauschema eines Podocyten-Fußfortsatzes. Die Verankerung an die GBM erfolgt durch $\alpha\beta 1$ -Integrine und Dystroglycan. Der Proteinkomplex der Schlitzmembran ist ebenfalls am Aktinskelett gebunden. Podocalyxin befindet sich im apikalen Membranbezirk und benötigt Adaptermoleküle für die Bindung an den Zytoskelett. A-Aktinin-4 und Synaptopodin sind die aktin-assoziierten Proteine am Zytoskelett [7].

Hauptbestandteile dieses kontraktiven Apparats sind F-Actin, Myosin-II, Alpha-Actin-4, Talin und Vinculin. Ein F-Actin-Bündel befindet sich innerhalb der Fußfortsätze apikal der Ebene der Schlitzmembran, welches keinen direkten Kontakt mit der Plasmamembran hat [38]. Direkt unterhalb der zytoplasmatischen Seite der Schlitzmembran und an der basalen und apikalen Seite des Fußfortsatzes befindet sich ein kortikales F-Actin Netzwerk [32]. Filamente des kortikalen Actin-Netzwerkes stehen mit den Actin-Bündeln des apikalen Bereiches der sekundären Fußfortsätzen in Kontakt. Das actin-bündelnde Protein Alpha-Actinin-4 ist für die Vernetzung der Mikrofilamente der Podocyten-Ausläufer zuständig. Alpha-Actinin-4 gehört zu den homologen Alpha-Actinin-Proteinen, die „head-to-tail“ Homodimere formen [39] und ubiquitär exprimiert werden. Die Unterteilung der Alpha-Actinine erfolgt in muskuläre (Alpha-Actinin-2 und -3) und nicht-muskuläre Isoformen (Alpha-Actinin-1 und -4) [40, 41]. In den Z-Scheiben lokalisiertes Alpha-Actinin vernetzt in Skelett und Herzmuskel-Zellen anti-parallele Actin-Filamente angrenzender Sarkomere quer.

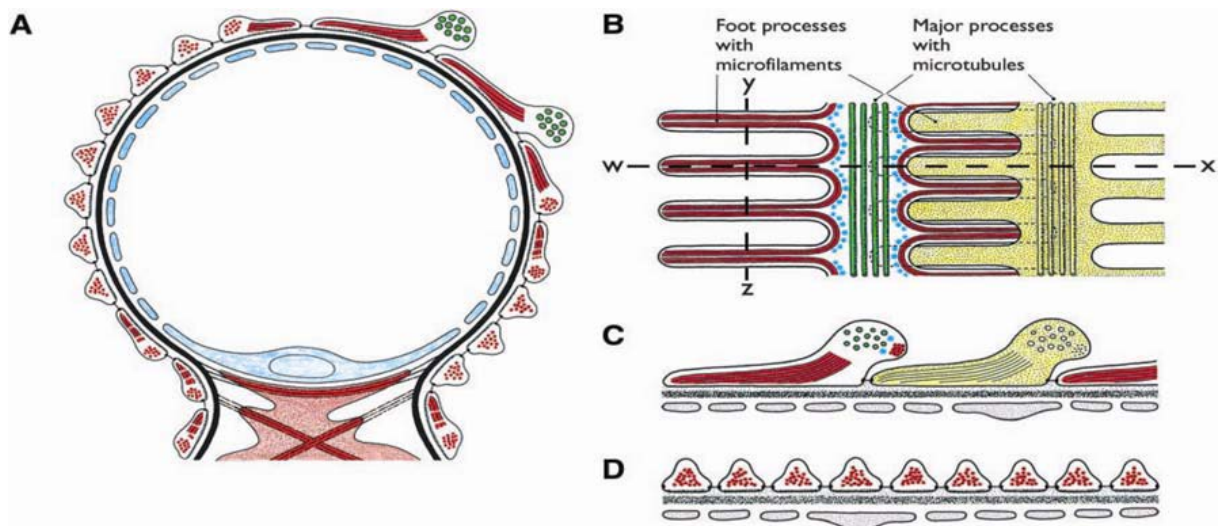


Abbildung 6. Zytoskelett der Podozyten-Fußfortsätze. **A:** Querschnitt durch eine Kapillarschlinge. Die sekundären Fußfortsätze, die von den primären Fußfortsätzen (zwei werden gezeigt) entspringen und die Außenseite der GBM bedecken, besitzen einen actin-basierten kontraktilen Apparat (rot). Die primären Fußfortsätze beinhalten longitudinal angeordnete Bündel von Mikrotubuli (grün). Details der Anordnung der zytoskelettalen Elemente in Podozyten-Fußfortsätzen werden in B-D gezeigt. **B:** Interdigitierende Podozyten-Fußfortsätze (weiß und gelb). **C:** paralleler (w-x Linie) und **D:** senkrechter (y-z Linie) Abschnitt zur longitudinalen Achse von Fußfortsätzen. Die Aktinfilamente (rot) enden am basalen Ende der sekundären Fußfortsätze und bilden die „Sohlen“ der Fußausläufer [42].

Bei nicht-muskulären Zellen nimmt α -Actinin an der Organisation des kortikalen Zytoskeletts teil und befindet sich an Stressfasern und in Fokalkontakten, wo es mit mehreren zytoskelettalen und membran-assoziierten Molekülen. Das Bündeln und Quervernetzen von Actin-Filamenten gilt als die bisher am besten definierte Funktion von α -Actinin [43].

Synaptopodin ist ein prolinreich aktin-assoziiertes Protein, das ausschließlich in Podozyten-Fußfortsätzen in der Niere und innerhalb des Gehirns in den Dendriten des Telencephalons vorkommt [44]. Synaptopodin bindet in Podozyten an α -Actinin-4 und reguliert die Vernetzung von Actin-Filamenten. Zudem ist Synaptopodin an der Regulation der Struktur von Podozyten-Fußfortsätzen beteiligt [45].

Die Schlitzmembran

Die Schlitzmembran (SM) ist eine hochspezifische Zell-Zell Verbindung zwischen interdigitierenden Podozyten-Fußfortsätzen. Durch die Einführung des Transmissions-Elektronen-Mikroskops (TEM) wurde es ermöglicht, die reißverschlussähnliche („zipper-like“) Architektur der Schlitzmembran zu entdecken [46]. Der extrazelluläre überbrückte Abstand ist ca. 30 bis 40 nm breit und die rechteckigen Poren in den reißverschlussähnlichen

Strukturen erreichen die Größe eines Albuminmoleküles [46]. Die SM wurde zunächst als eine modifizierte „*Tight Junction*“ (TJ) beschrieben. Die Beschreibung leitet sich aus der Existenz des TJ-assoziierten Proteins Zonula Occludens-1 (ZO-1) an der zyttoplasmatischen Seite der Schlitzmembran ab [47]. Allerdings sind andere TJ-assoziierte Proteine, wie beispielsweise Symplekin und Occludin, nicht in Podozyten nachweisbar [48, 49]. Außerdem befindet sich ZO-1, das ursprünglich als „*Tight-Junction*“-spezifisches Protein galt, auch in sogenannten „*Adherens Junction*“ (AJ) [50]. Auch andere typische AJ-Proteine, wie beispielsweise P-Cadherin, α -, β - und γ -Catenin, konnten in der glomerulären Schlitzmembran nachgewiesen werden. Aufgrund der Kolo-kalisation von ZO-1 und AJ-Proteine wird die Schlitzmembran aktuell einer modifizierten „*Adherens Junction*“ zugeordnet [51]. Im Gegenteil zu klassischen AJ-Proteinen nimmt Vinculin nicht an diesem Komplex teil [52]. ZO-1 verbindet den Cadherin-Catenin-Komplex mit dem F-Actin des Zytoskeletts [53]. Der Proteinkomplex der Schlitzmembran wird von Nephrin (NPHS1) [54], NEPH1-3 [6], Podocin [55] und drei Cadherin-Proteinen gebildet: (1) Protocadherin Fat1 [56], (2) P-Cadherin und (3) Vaskulär Endothelial Cadherin (VE-Cadherin) (Abb.7). Während P-Cadherin für die normale glomeruläre Filtration nicht notwendig erscheint [57], sind die Transmembran-Moleküle Nephrin, NEPH1 und Fat1 sowie Podocin für die Bildung der Filtrationsbarriere erforderlich [58].

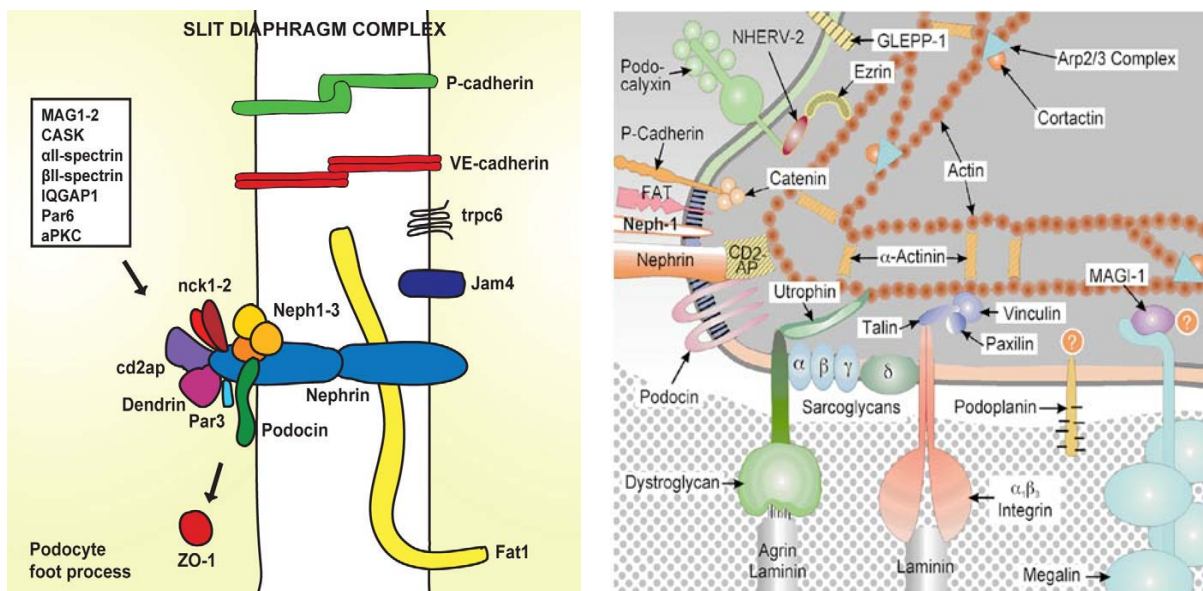


Abbildung 7. Molekularer Aufbau der Schlitzmembran. Der SM-Komplex wird extrazellulär von mindestens Nephrin, Neph 1-3, P-Cadherin, VE-Cadherin und Fat1 gebildet. Für die Bindung an das Aktin-Skelett ist eine große Anzahl an Adapter-Moleküle zuständig [7, 28].

Nephrin ist das erste identifizierte Transmembranprotein der SM gewesen [54] und es gehört zur Superfamilie der Ig-Proteine. Eine Mutation im Gen NPHS1, das für Nephrin kodiert, ist die Ursache des kongenitalen nephrotischen Syndroms vom Finnischen Typ (CNF) [59].

Intrazellulär erfolgt die Bindung von Nephrin und Schlitzmembran an das Aktin-Skelett durch Linkerproteine (Abb.7), wie zum Beispiel CD2-assoziiertes Protein (CD2AP) [60] und die Nck-Proteine (Nck 1 und Nck2) [61, 62]. CD2AP ist im Cytoplasma innerhalb der Podozyten-Fußfortsätze auf Seiten der Schlitzmembran lokalisiert und verankert Nephrin und Podocin mit dem F-Actin der Zellen [63]. Es ist gezeigt worden, dass in Podozyten Nck-Proteine und Tyrosin-phosphoryliertes Nephrin zusammenwirken [61, 62]. Diese Wechselwirkung ist für den Aufbau der normalen Filtrationsbarriere ausschlaggebend [62].

Neph1-3 sind weitere Schlitzmembranproteine [6]. Neph-Proteine interagieren mit Nephrin, Neph1 scheint mit Nephrin bei der Rekrutierung von Aktin via Nck-Proteinen zusammenzuwirken [64]. Die Wichtigkeit von Neph1 wird durch die Tatsache, dass Neph1-Knockout-Mäuse perinatal auf Grund einer massiven Proteinurie sterben, hervorgehoben [65].

Das haarnadel-ähnliche Transmembran-Protein Podocin wird innerhalb des Glomerulus nur in Podozyten exprimiert, es besitzt zwei cytoplasmatische Enden und befindet sich in unmittelbarer Nähe zu den extrazellulären Proteinen der SM [55]. Podocin interagiert mit Nephrin, Neph1 und CD2AP [66, 67] und es scheint notwendig für die Rekrutierung von Nephrin in der Schlitzmembran zu sein [67]. Mutationen im NPHS2-Gen, das für Podocin kodiert, sind für das steroidresistente nephrotische Syndrom verantwortlich [55].

Weitere Proteine wie zum Beispiel Trpc6 [6], ZO-1 junctionale Adhäsions-Molekül (Jam4), Densin, MAGI-1/2, CASK, IQGAP1, α II Spektrin und β II Spektrin [7] sind mit der Schlitzmembran assoziiert, ihre Anwesenheit ist aber nicht für die Aufrechterhaltung der Struktur entscheidend oder ihre Funktion ist noch immer unbekannt.

Proteinurie und Podozyten-„Effacement“

Eine Ausscheidung von mehr als 150 mg Eiweiß pro Tag wird als Proteinurie bezeichnet. Proteinurie betrifft mehrere hundert Millionen Menschen weltweit. Proteinurie ist ein Haupthinweis auf das Vorliegen einer glomerulären Nierenerkrankung und gibt prognostische Aussagen über den Verlauf. Zudem stellt es ein eigenständiges Risiko für kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität dar [68]. Proteinurie spiegelt üblicherweise eine Zunahme der

glomerulären Permeabilität für Albumin und andere Makromoleküle des Plasmas wider [69].
 Man kann die Proteinurie in mehrere Typen einteilen (Tabelle 1).

Tabelle 1 Einteilung der Proteinurie [68]

Typen	Merkmale
Glomerulär	Häufigste Form (> 90%) Hauptmerkmal eines chronischen Nierenversagens Ausscheidung von Albumin und anderen großmolekularen Proteinen
Tubulär	Kleinmolekuläre Proteine, wie z.B. β 2-Mikroglobulin
Überlauf-Proteinurie	Überschreitung der tubulären Rückresorptionskapazität durch übermäßigen Anfall von Leichtketten, Myoglobin oder Hämoglobin, z.B. Bence-Jones-Proteinurie
Post-Belastung	Vorübergehend gutartig
Postprandial	Vorübergehend physiologisch, möglicherweise durch Insulinwirkung auf Podozyten
Infekt-assoziiert	Durch Toll-Like-Rezeptoren vermittelt, Beteiligung an der Bekämpfung von Krankheitserregern im Kreislauf möglich

Alle drei Bestandteile der Filtrationsbarriere Endothelzellen, GBM und Podozyten sind für die normale Filterfunktion notwendig. Allerdings haben Studien in den letzten Jahren gezeigt, dass Podozyten eine besondere Rolle bei der Aufrechterhaltung der Integrität des glomerulären Filters spielen [6]. Verschiedene morphologische Alterationen in der Podozytenarchitektur deuten auf den Podozyt als den „Hauptverdächtigen“ bei der Entwicklung und dem Verlauf von glomerulären Erkrankungen hin [70]. Häufig enden die verschiedenen glomerulären Erkrankungen in einem chronischen Nierenversagen mit starker Proteinurie, das wiederum nicht selten eine Dialyse-Behandlung und/oder eine Nieren-Transplantation unumgänglich machen. Auf Grund von morphologischen Veränderungen der Podozyten und somit der Schlitzmembran geht die Siebfunktion verloren und eine Proteinurie wird hervorgerufen. Je nach Milligramm Protein im Urin kann man die Ursache der Proteinurie und die Menge der geschädigten, nicht mehr funktionstüchtigen Nephrone in der Niere vermuten (Tabelle 2).

Tabelle 2 Ursachen einer Proteinurie [71]

Proteinurie	Proteintyp	Vorkommen
30 - 300 mg/d	Mikroalbuminurie	Frühphase der diabetischen und der hypertensiven Nephropathie
Bis 1,5 g/d	Kleinmolekulare Proteine:	Tubulopathien
	Großmolekulare Proteine:	Geringe Glomerulopathien
1,5 bis 3,0 g/d	Klein- und großmolekulare Proteine	Chronische Glomerulonephritiden, Transplantatnieren, Nephrosklerose
>3,0 g/d	Großmolekulare Proteine:	Nephrotisches Syndrom

Beim Ausbruch einer Nierenerkrankung findet anfangs eine selektive Albuminausscheidung statt, andere Proteine werden durch die funktionstüchtige Filtrationsbarriere gerade noch aufgrund der Größenselektivität zurückgehalten [51]. Albumin ist ein wasserlösliches, monomeres Protein und macht ungefähr die Hälfte der Blutserum-Proteine aus. Im menschlichen Körper dient Albumin der Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Drucks, außerdem ist es als Trägerprotein für den Transport von Steroidhormonen, Fettsäuren, Bilirubin und Schilddrüsenhormonen unter anderem zuständig. Eine erhöhte Durchlässigkeit der Filtrationsbarriere wird durch kleine Alterationen an der Podozytenarchitektur verursacht und von einer selektiven Proteinurie begleitet. Eine unselektive Proteinurie sieht man bei größerem Defekt der Filtrationsbarriere und sie ist durch Verlust von Makromolekülen wie beispielsweise IgG gekennzeichnet. Bleibt dieser Verlust von Makromolekülen unbehandelt, so hat er den Tod der Betroffenen zur Folge.

Im Jahr 1957 ist zum ersten Mal das Podozyten-„*Effacement*“ anhand von Biopsien von Patienten mit nephritischem Syndrom beschrieben worden [72]. Es beschreibt den Verlust der Podozytenarchitektur bei Verletzung oder Zerstörung durch Toxine, freie Radikale, ROS (reaktive-Sauerstoff-Spezies), Antikörper, Komplementfaktoren oder mechanischen Stress. Das Podozyten-„*Effacement*“ ist nicht die Verschmelzung von benachbarten Zellen, vielmehr stellt es die Einziehung, Ausweitung oder Verkürzung der Fußfortsätze dar. Die stufenartige Simplifizierung der interdigitierenden Podozyten-Fußfortsätze endet mit der Verformung der Podozyten in eine abgeplattete und gestreckte Zelle und ist nicht krankheitsspezifisch [31] (Abb.8). Bei vielen Nierenkrankheiten findet man als charakteristisches Merkmal eine Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts der betroffenen Fußfortsätze, welche typischerweise zum „*Effacement*“ und zur Unterbrechung der Schlitzmembran führt [73, 74]. Bis heute sind

fünf Hauptursachen für die Entwicklung des Podozyten-„*Effacement*“ und dem damit einhergehenden Verlust der Filtrationsschlitze bekannt [68]:

1. Veränderungen in der Struktur oder Funktion der Schlitzmembran
2. Beeinträchtigungen der GBM oder der Adhäsion der Podozyten an die GBM
3. Funktionsstörung des Actin-Zytoskeletts oder der zytoskelett-assoziierten Moleküle
4. Veränderungen an der apikalen Membran der Podozyten
5. Aktivierung der CatL-vermittelten Proteolyse

Gehen Nephrone zugrunde, kommt es bei den verbleibenden zu einer kompensatorischen Hyperfiltration; wobei die noch funktionierenden Podozyten hypertrophieren und sich die sekundären Fußfortsätze verbreitern. Im ausgereiften Glomerulus besitzen Podozyten noch die Fähigkeit zur DNA-Synthese, der Zellzyklus läuft aber nicht mehr komplett durch. Eine Proliferation ist dann weder unter normalen Bedingungen noch bei verschiedenen Nierenerkrankungen möglich [42]. Im pathologischen Zustand konnten bei Podozyten *in vivo* bis heute nur Kernteilungen aber keine erneuten Zellteilungen beobachtet werden [75, 76]. Nach Abschluss der Organogenese sind ausdifferenzierte Podozyten nicht mehr zu mitotischer Zellteilung befähigt [77, 78]; aus diesem Grund macht sich der Verlust dieses Zelltyps bei renalen Erkrankungen besonders deutlich bemerkbar.

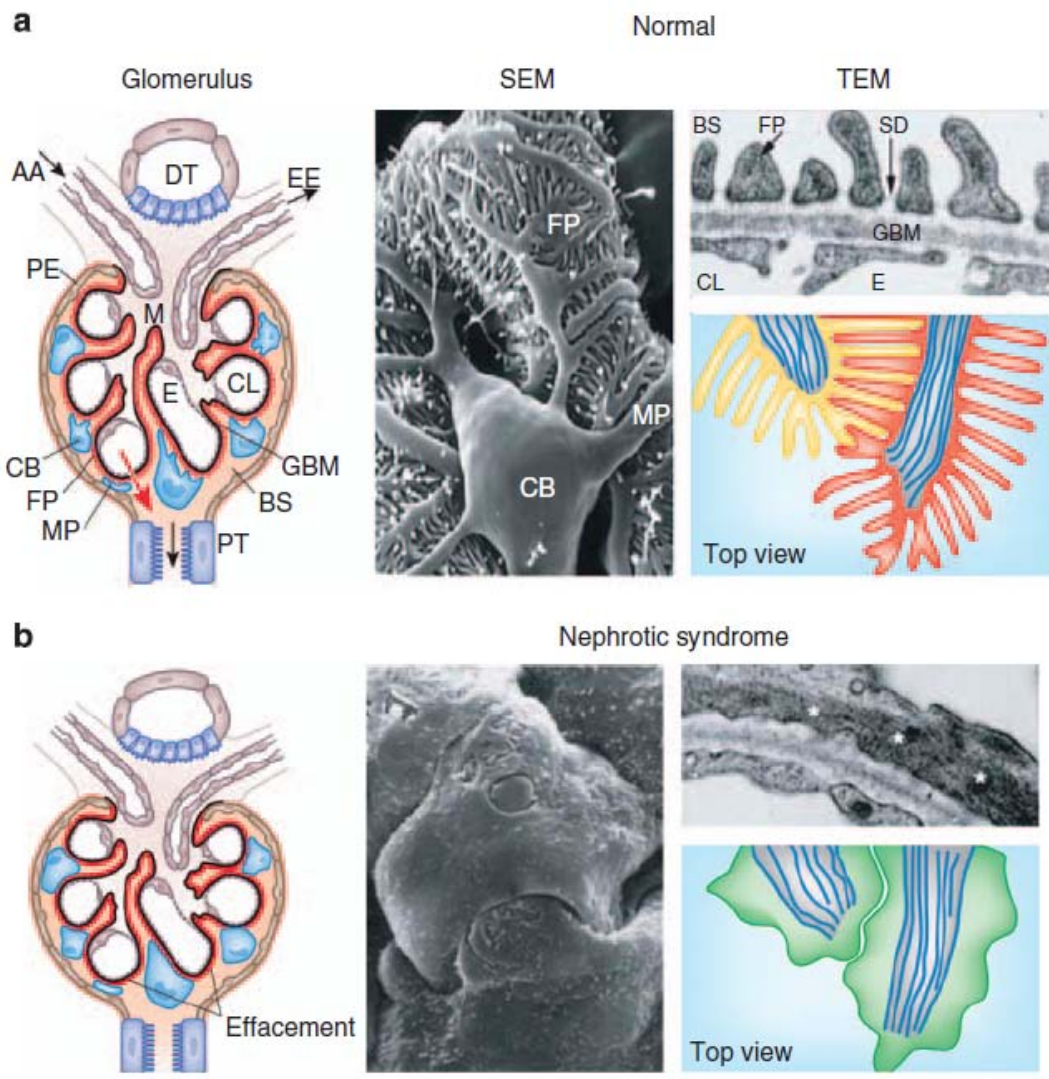


Abbildung 8. Veränderung der Podozyten-Struktur bei Nierenerkrankungen. **a links:** Struktur des Glomerulus im Querschnitt bei der gesunden Niere. Endothelzellen (E) um das Kapillarlumen (CL) und Mesangialzellen (M) befinden sich auf der Blutseite der glomerulären Basalmembran (GBM). Podozyten-Fußfortsätze (FP) decken die Außenseite der GBM ab. Der Zellkörper (CB) der Podozyten und die primären Fußfortsätze (MP) schwimmen im Primärharn innerhalb der Bowman-Kapsel (BS). Der Primärharn durchdringt entlang der Strecke von der Blutseite in die Urinseite (roter Pfeil) des fenestrierten Kapillarendothels, die GBM und die Filtrationsschlitze. Afferente (AA) und efferente (EE) Arteriole, Distaler (DT) und proximaler (PT) Tubulus, Parietales Epithel (PE). **Mitte:** Rasterelektronenmikroskopische Darstellung (SEM) eines Podozyten mit Zellkörper und primären sowie sekundären Fortsätzen. Nur die Podozyten-Fußfortsätze stehen in direktem Kontakt mit der GBM. **Rechts oben:** Transmissionselektronenmikroskopisches Bild (TEM) der Filtrationsbarriere zusammengesetzt aus dem fenestrierten Kapillarendothel (E), GBM und Podozyten-Fußfortsätzen (FP) und der dazwischen liegenden Schlitzmembran (SD). **Rechts unten:** Ansicht von oben. Im gesunden Zustand greifen die Podozyten regelmäßig ineinander. Gezeigt werden die hoch organisierten kontraktilen Aktinfilamente von zwei interdigitierenden Fußfortsätzen benachbarter Podozyten (gelb und rot); Mikrotubuli von primären Fortsätzen sind blau gezeigt. **b links:** Im nephrotischen Syndrom mit Proteinurie verlieren die Fußfortsätze ihr normales interdigitierendes Muster und zeigen anstatt dessen „Effacement“. **Mitte:** Der Verlust der normalen Zytoarchitektur und die Entwicklung einer abgeplatteten und gestreckten Zelle ist am besten im SEM erkennbar. **Rechts oben:** Der eingezogene Podozyt entwickelt ein kontinuierlich zytoplasmatisches Band, das einen dichten Bereich aus kurzen verzweigten Aktinfilamenten enthält (*). **Rechts unten:** Ansicht von oben. Eingezogene Podozyten-Fußfortsätze zeigen kein regelmäßiges interdigitierendes Muster. Stattdessen ist der Zellrand der angrenzenden Podozyten gewunden. Das kontinuierliche Zytoplasma wird von reorganisierten, kurzen, verzweigten Aktinfilamenten ausgefüllt (grün) [68].

Podozyten bei glomerulären Erkrankungen

Proteinurie und Glomerulosklerose sind oft das Resultat eines Podozytenverlustes [31]. Nach aktuellen Angaben sind glomeruläre Erkrankungen in 90% der Fälle für ein terminales Nierenversagens verantwortlich zu machen. Je nach glomerulärer Entwicklungsphase sowie umweltassoziierten Faktoren können Podozytenfehlfunktion, -verletzung oder -verlust zu einem breiten Spektrum an klinischen Symptomen führen (Abb. 9) [79].

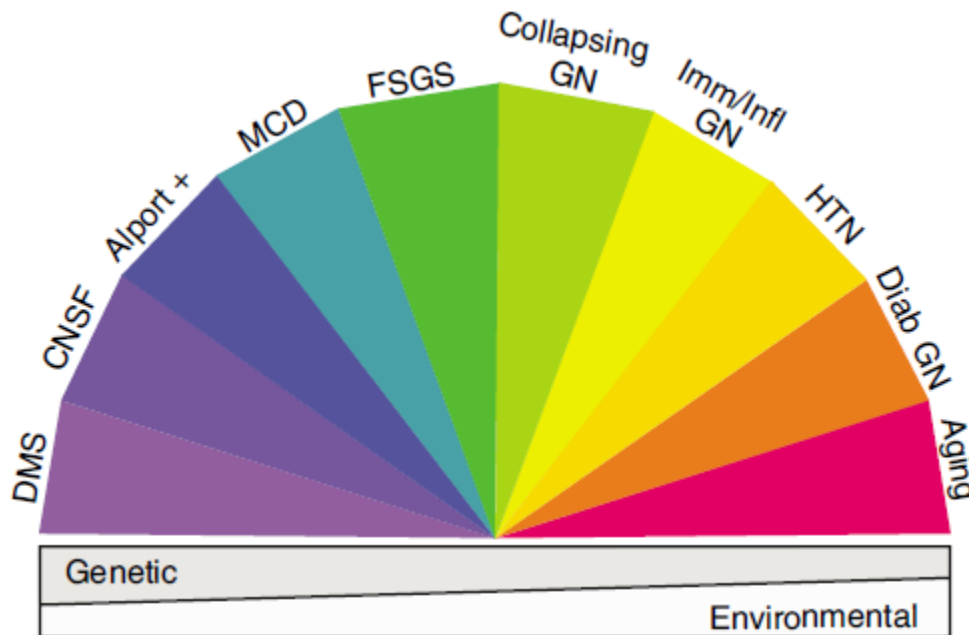


Abbildung 9. Spektrum der Podozytopathien. Eine Podozytendysfunktion, welche durch genetische und/oder umweltbedingte Faktoren ausgelöst wird, kann als Ursache für Glomerulopathien in Betracht kommen. Der klinische Phenotyp variiert abhängig von dem Zeitpunkt der glomerulären Entwicklung und der Progression sowie von der Signifikanz und der Schnelligkeit der Auswirkungen auf die Glomeruli. Die klinischen Symptome äußern sich durch die diffuse Mesangialsklerose (DMS), das kongenitale nephrotische Syndrom vom Finnischen Typ (CNSF), das Alport-Syndrom und seinen Varianten (Alport +), die Minimal change-Glomerulonephritis (MCD), die fokale segmentale Glomerulosklerose (FSGS), die kollabierende Glomerulopathie (collapsing GN), die immun- und entzündlichen Glomerulopathien (Imm/Infl GN), die hypertensive Nephropathie (HTN), die diabetische Nephropathie (Diab GN) sowie die altersbedingte Glomerulopathie (Aging) [79].

Eine Anzahl von verschiedenen Krankheiten geht mit glomerulären Erkrankungen einher. Infektionen oder Medikamente können die Niere direkt schädigen, aber auch systemische Erkrankungen, wie z.B. Diabetes Mellitus (DM) oder systemischer Lupus Erythemathodes (SLE) beeinträchtigen die Niere.

Eine Anzahl von glomerulären Erkrankungen, die zu chronischem Nierenversagen führen können sind durch Vereinfachung der Podozytenarchitektur und Einziehung der Podozytenfußfortsätzen gekennzeichnet [80]. Podozyten-„Effacement“ benötigt ein präzises Zusammenspiel von Zellfunktionen, wozu strukturelle Alterationen vom Aktinzytoskelett,

Umlagerung von Fußfortsätzen über der GBM und Reorganisation der Schlitzmembran gehören [23]. Podozyten sind in vielen menschlichen und experimentellen glomerulären Krankheiten mitverletzt, darunter Minimal Change Glomerulonephritis, Fokal Segmentale Glomerulosklerose, Diabetes Mellitus und Lupus Nephritis [68].

Die frühe Schädigung der Podozyten beinhaltet die Bildung von Vakuolen und Pseudozyten sowie die Abtrennung der Podozytenfußfortsätze von der GBM. Der Verlust von Podozyten ist das Ergebnis davon [81].

Die Entdeckung von mehreren Podozyten-Proteinen und ihre Mutationsanalyse, einschließlich Nephrin [54], CD2AP [60], α -Actinin-4 [73] und Podocin [55], hat Aufschluss über die Pathogenese von Fußfortsätze-„Effacement“ und Proteinurie gegeben und hat die entscheidende Rolle der sekundären Fußfortsätze und der Schlitzmembran bei der Aufrechterhaltung der glomerulären Filtrationsbarriere hervorgehoben [82].

Im Folgenden werden verschiedene glomeruläre Erkrankungen, bei denen die Podozyten-Schädigung eine zentrale Stellung einnimmt, diskutiert.

IgA-Nephropathie

Die IgA-Nephropathie ist eine klassische mesangioproliferative Glomerulonephritis. Sie ist eine entzündliche Erkrankung idiopathischer Genese, die durch Ablagerung von Immunglobulin A im Mesangium gekennzeichnet ist. Weltweit ist sie mit 25% die am häufigsten vorkommende Glomerulonephritis. Die IgA-Nephropathie betrifft vor allem Männer zwischen 20 und 40 Jahren. Histologisch findet man vergrößerte Glomeruli mit Mesangialzellenvermehrung ebenso wie eine Verbreitung der mesangialen Matrix. Granuläre Ablagerungen von Immunglobulinen und Komplement lassen sich erst im Mesangium und später in den Basalmembranen immunhistologisch nachweisen [83]. In der Immunfluoreszenz findet man mesangiale IgA-Ablagerungen. Bei der IgA-Nephropathie kann es nach unspezifischen Infekten der oberen Luftwege zu Flankenschmerzen - ein Kapselschmerz der durch die Nierenschwellung verursacht wird - und zu intermittierender Makrohämaturie kommen. Bei der Mehrzahl der Patienten ist das Leitsymptom die asymptomatische Mikrohämaturie mit oder ohne Proteinurie, sie kann aber auch stumm verlaufen und jahrelang unentdeckt bleiben. Bei ca. 10% der Patienten besteht ein nephrotisches Syndrom mit starker Proteinurie ($>3,5$ g/24h), Hypoproteinämie, Ödeme und Hyperlipoproteinämie. Die Diagnose

stellt man klinisch und mit einer Nierenbiopsie, häufig ist es aber ein Zufallsbefund. Die Therapie ist asymptomatisch nach dem Schweregrad der Erkrankung, bei nephrotischem Syndrom und rasch progredienter Glomerulonephritis stellt sich die Indikation zur Kortikosteroid- und Cyclophosphamidtherapie. Circa 25% der Patienten entwickeln innerhalb von 25 Jahren nach Diagnosestellung eine terminale Niereninsuffizienz. Nach einer Nierentransplantation besteht ein Rezidivrisiko von ca. 40% [71].

Lupusnephritis

Der systemische Lupus Erythemathodes (SLE) ist eine Autoimmunerkrankung aus der Gruppe der Kollagenosen. Die Bildung von Autoantikörpern und deren Ablagerung im Bindegewebe zahlreicher Organe ist ein Merkmal dieser Erkrankung. Frauen im gebärfähigen Alter werden überwiegend befallen. Die Diagnose SLE ist wahrscheinlich, wenn mindestens vier von den elf Kriterien des *American College of Rheumatology* erfüllt sind [84]. Eine Nierenbeteiligung ist sehr häufig und spielt eine wichtige Rolle bei der Mortalität und Morbidität des SLE. Die Klassifikation dieser Immunkomplexnephritis wird gemäß der *International Society of Nephrology/ Renal Pathology Society* (ISN-RPS) in sechs Klassen unterteilt [85] (Tabelle 3).

Tabelle 3 Klassifikation der Lupusnephritis gemäß der ISN-RPS [85]

Klasse I	Minimale mesangiale Lupusnephritis
Klasse II	Mesangiale proliferative Lupusnephritis
Klasse III	Fokale Lupusnephritis
Klasse IV	Diffuse Lupusnephritis
Klasse V	Membranöse Lupusnephritis
Klasse VI	Fortgeschrittene sklerosierende Lupusnephritis

Die Klinik der LN beinhaltet Proteinurie (100%), nephrotisches Syndrom (45-56%), Mikrohämaturie (80%), Erythrozytenzylinder (10%), Makrohämaturie (1%), eingeschränkte Nierenfunktion (40-80%), akutes Nierenversagen (30%) und Hypertonie (50%) [86]. Zur Feststellung der Diagnose ist eine perkutane Nierenbiopsie durchzuführen. Histologisch sind tubuloretikuläre Strukturen in den glomerulären Endothelzellen relativ spezifisch, außerdem können tubuloinsterstitielle Nephritiden mit oder ohne Immunkomplexablagerungen in der

tubulären Basalmembran, vaskuläre Veränderungen mit Immunkomplexablagerungen in den Gefäßen, mikrovaskuläre Zylinder oder thrombotische Mikroangiopathien und sehr selten eine „pauci-immune“ Glomerulonephritis mit wenigen oder keinen Immunkomplex-Ablagerungen beobachtet werden [87]. Die Therapie der LN richtet sich nach der Klassifikation und reicht von einer optimalen Blutdruckeinstellung bis zur Immunsuppression mit Glukokortikoiden und anderen immunsuppressiven Medikamenten, wie z.B. Cyclophosphamid, Mycofenolat oder Cyclosporin A.

Fokal segmentale Glomerulosklerose

Die fokal segmentale Glomerulosklerose (FSGS) ist keine Krankheitsentität oder Diagnose, sondern die morphologische Beschreibung einer histologischen Läsion unterschiedlicher Ursachen [88]. Bei der FSGS sind zunächst einige Glomeruli beteiligt und man beobachtet im Elektronenmikroskop eine Retraktion der Podozyten-Fußfortsätze, in denen segmental Podozyten fehlen. Da die hochdifferenzierten Podozyten nicht teilungsfähig sind, ist dieser Zellverlust nicht auszugleichen. Es resultiert eine Denudierung der Basalmembran mit Adhäsionen zwischen den glomerulären Kapillarschlingen und der Bowman-Kapsel mit anschließender Degeneration und fokal-segmentaler Vernarbung des Glomerulus. Außer der Sklerose sind immunhistologisch diffuse und mesangiale Ablagerungen von IgG, IgM und C3-Komplement zu finden. Eine FSGS findet sich bei circa 5% der Erwachsenen mit Nierenerkrankungen im Endstadium [89]. Die Ätiologie ist weitgehend unklar, es existiert eine primär idiopathische Form und eine sekundäre Form, die bei immunologischen Erkrankungen, Heroinabusus, Neoplasien und Infektionen (z.B. HIV) auftritt. In 30% der Fälle ist die FSGS genetisch bedingt [71]. Beim Auftritt einer Mutation im ACTN4-Gen, welches für das α -Aktinin-4 codiert, entsteht die familiäre FSGS, die autosomal-dominant weiter vererbt wird [90]. Genmutationen im Podocin codierenden Gen, NPHS2, führen zur Entstehung eines autosomal-rezessiv vererbten steroidresistenten nephrotischen Syndroms [89]. Die FSGS geht mit Proteinurie und nephrotischem Syndrom einher und führt nicht selten zum Verlust der Nierenfunktion mit Notwendigkeit einer Dialysebehandlung. Eine gesicherte Therapie existiert nicht, jedoch kann man eine konsequente antiproteinurische und nephroprotektive Therapie in Kombination mit Immunsuppression in erster Linie mit Steroiden einsetzen [91].

Diabetische Nephropathie

Die diabetische Nephropathie ist die Hauptursache einer chronischen Niereninsuffizienz in den Industrieländern. Die Nierenbeteiligung ist eine von mehreren Komplikationen durch erhöhten Glukosespiegel im Blut, das charakteristische Merkmal vom Diabetes Mellitus. Bei manifester DN entwickeln innerhalb von 20 Jahren 75% der Typ 1-Diabetiker und 20% der Typ 2-Diabetiker eine terminale Niereninsuffizienz [71]. Die diabetische Nephropathie ist eine progressive Erkrankung, die für ihre Entwicklung mehrere Jahre benötigt. Eine glomeruläre Hyperfiltration und eine Mikroalbuminurie sind frühe Manifestationen der DN. Hypertrophie, Verdickung der GBM und Vergrößerung des Mesangiums mit Anreicherung von extrazellulären Matrixproteinen, wie z.B. Fibronectin, Laminin und Kollagen sind frühe Veränderungen der diabetischen Nephropathie im Glomerulus [92]. Mit dem Voranschreiten der diabetischen Nephropathie werden immer mehr Glomeruli vernichtet, daraus resultiert eine Makroalbuminurie, später eine Glomerulosklerosis und am Ende die Niereninsuffizienz. Hyperglykämie bewirkt schädliche und protektive zelluläre Signalwege in Podozyten, welche mit anderen Zellen im Glomerulum in Verbindung stehen. Weiterhin ist der Podozyt eine insulin-empfindliche Zelle, die durch Einflussfaktoren ihre Sensitivität zu Insulin direkt steigern oder reduzieren kann [93].

Minimal change-Glomerulonephritis

Im Kindesalter ist die minimal change-Glomerulonephritis (MCGN) die häufigste Ursache des nephrotischen Syndroms. Die Ätiologie ist idiopathisch oder sekundär bei malignen Erkrankungen, Einnahme von nichtsteroidalen Antirheumatika oder Nahrungsmittelallergien [71]. Histologisch ist die minimal change-Glomerulonephritis durch einen Normalbefund gekennzeichnet, die charakteristische Veränderung ist das Fehlen von Podozyten-Fußfortsätzen im ultrastrukturellen Bild [94]. Das nephrotische Syndrom und die Podozyten-Schädigung kann spontan reversibel oder die Antwort auf eine systemische Steroidtherapie sein [81].

Kongenitales nephrotisches Syndrom

Das kongenitale nephrotische Syndrom ist eine autosomal-rezessive Erkrankung, die in Finnland eine Inzidenz von 1 zu 10000 Neugeborenen hat und weniger häufig in anderen Bevölkerungen vorkommt [95]. Eine Mutation im NPHS1-Gen, das für Nephrin codiert, ist für die Entwicklung dieser Erkrankung zuständig [54]. Es findet sich schon intrauterin eine massive nicht selektive Proteinurie. Aufgrund des Proteinverlustes entwickeln die Betroffenen Infektionen, Malnutrition und Niereninsuffizienz. Kortikoide und Immunsuppressiva sind unwirksam. Dialyse und Nierentransplantation sind die einzigen Therapieoptionen.

Virusassoziierte Glomerulonephritis

Virale Infektionen sind in der Lage glomeruläre Erkrankungen zu verursachen. Sie können aber auch vorbestehende glomeruläre Erkrankungen, wie z.B bei der IgA-Nephropathie, verschlechtern. Eine direkte virale Infektion des Glomerulus bei der akuten Glomerulonephritis führt zu proliferativen Veränderungen und zur Ausschüttung von Zytokinen [96]. Eine persistierende virale Entzündung führt hingegen bei chronischen Formen zur kontinuierlichen Antigenstimulation mit nachfolgender Antikörperproduktion und Immunkomplexbildung, die sich entweder mesangial oder perimembranös ablagern [97]. Tabelle 4 zeigt die viralen Infektionen, die glomeruläre Erkrankungen verursachen bzw verschlechtern können [98].

Tabelle 4 Virale Infektionen, die Nierenerkrankungen verursachen/verschlechtern können [98]

Hepatitis B-Virus (HBV)	Membranöse Nephropathie, mesangiokapillare GN, IgA-Nephritis
Hepatitis C-Virus (HCV)	Kryoglobulinämie, mesangiokapillare GN
Humanes Immundefizit-Virus (HIV)	HIV-Nephropathie
Parvovirus B 19 (PV19)	FSGS
Cytomegalie-Virus (CMV)	Allograf-Nephropathie?
Epstein-Barr-Virus (EBV)	Lupusnephritis?
Polyoma-Virus BK (BVK)	BK (Allograf)-Nephropathie
Hantavirus	Akutes Nierenversagen
Coronavirus	Akutes Nierenversagen

Ob andere Viren, wie z.B. Gelbfieber-, Mumps-, Masern-, Varizellen- und Herpesviren, ebenso eine Rolle bei der Entstehung der Glomerulonephritis spielen, ist nicht klar [97]. Die systemische antivirale Immunität wird bei viralen Infektionen über verschiedene Mediatoren aktiviert. Diese Aktivierung führt zu einer verstärkten Autoantikörperproduktion, zur Immunkomplexbildung oder zur systemischen Interferonfreisetzung [99] und letztlich zu Sklerose und Verschlechterung der Glomerulonephritis.

Derzeit leben weltweit über 350 Millionen Menschen mit einer chronischen Hepatitis B Infektion. Es wird geschätzt, dass jedes Jahr 600 000 Menschen an den Folgen einer akuten oder chronischen Hepatitis B Infektion sterben [100]. Die renale Beteiligung ist eine häufige extrahepatische Erscheinungsform. Die membranöse Glomerulonephritis, die mesangiokapillare Glomerulonephritis und die IgA-Nephropathie sind die drei Hauptformen der Hepatitis B-assoziierten Glomerulonephritis [101]. Die Manifestation der HBV-assoziierten membranösen GN ist geringfügig unterschiedlich in Kindern und Erwachsenen. Bei Kindern, überwiegend bei Jungen, ist das nephrotische Syndrom mit Hämaturie und normaler bis leicht eingeschränkter Nierenfunktion die häufigste Erscheinungsform [102]. Männliche Erwachsene sind im Vergleich zu Kindern nicht häufiger betroffen. Die Hauptmanifestation ist eine Proteinurie oder ein nephrotisches Syndrom, [97] wobei die Nierenfunktion stark eingeschränkt sein kann [103]. Die Prognose der Hepatitis B-assoziierten GN ist bei Kindern günstig mit einer stabilen Nierenfunktion und hohen Raten spontaner Remission [104], bei Erwachsenen dagegen ist der Verlauf typischerweise fortschreitend [105]. Eine ideale Therapie der Hepatitis B-assoziierten GN ist zur Zeit nicht etabliert, eingesetzte Medikamente sind Lamivudin, pegyliertes Interferon und Kortikosteroide [106]. Die Vorbeugung mit der aktiven Hepatitis B-Impfung ist immer noch der beste Schutz [107].

Die WHO schätzt, dass derzeit weltweit 170-200 Millionen Menschen mit Hepatitis C infiziert sind. Die mesangiokapillare Glomerulonephritis Typ I ist die häufigste renale Manifestation der Hepatitis C-Infektion, sie ist meist mit einer gemischten Kryoglobulinämie assoziiert [108]. Das Hepatitis C-Virus ist in der Lage die Immunelimination zu umgehen und dadurch zur chronischen Infektion und Akkumulation von Immunkomplexen zu führen. Das HCV stimuliert die Produktion von monoklonalen Rheumafaktoren und verursacht dabei eine gemischte Kryoglobulinämie [97]. Diese zwei Tatsachen werden für die extrahepatischen Manifestationen der Hepatitis C verantwortlich gemacht. Eine gemischte Kryoglobulinämie wird bei 35 bis 90% der HCV-Infizierten beobachtet [109, 110]. Es leiden maximal 1% der

Patienten an einer symptomatischen Kryoglobulinämie [97]. Eine HCV assoziierte GN ist im Kindesalter selten, das typische Alter für den Beginn der Erkrankung ist um die fünfte oder sechste Lebensdekade. Eine palpable Purpura und Arthralgien sind Kryoglobulinämiesymptome. Renale Manifestationen sind nephrotische (20%) und nicht-nephrotische Proteinurie und Mikrohämaturie [111]. Ein Viertel der Patienten zeigen ein nephritisches Syndrom und über 80% der Patienten leiden unter therapierefraktärer Hypertonie [97]. Der klinische Verlauf der Erkrankung kann stark variieren. 15% der Patienten mit Hepatitis C-assoziierten Nierenerkrankungen werden laut einer italienischen Studie dialysepflichtig [112]. Die Behandlung beinhaltet mehrere Ansätze, Plasmapherese zur Entfernung der Immunkomplexe, Glukokortikoide für die Unterdrückung der Immunkomplexneubildung und die Gabe von Interferon und Ribavirin zur Verhinderung der viralen Replikation.

Weltweit sind mehr als 25 Millionen Menschen an AIDS (acquired immune deficiency syndrome) gestorben [113]. Es wird geschätzt, dass jedes Jahr 4,9 Millionen Menschen neu infiziert werden [114]. Die Einteilung der HIV-assoziierten Glomerulonephritiden erfolgt in vier Gruppen. Die erste Gruppe ist die klassische HIV-assoziierte Nephropathie (HIVAN) mit dem histologischen Bild der fokal-segmentalen Glomerulosklerose [115]. Die diffuse proliferativ mesangiokapilläre oder lupus-ähnliche GN mit mesangialen Immunablagerungen stellt die zweite Gruppe dar [116]. Die pathologischen Mechanismen der dritten Gruppe, die heterogen mit glomerulären Läsionen ist, sind noch nicht geklärt. Das HIV-assoziierte thrombotisch hämolytisch-urämische Syndrom vertritt die letzte Gruppe [97]. Die Mehrheit der Patienten mit HIV-assoziiierter Nephropathie hat eine hohe Viruslast, aber die Erkrankung ist nicht mit anderen spezifischen Risiken, einschließlich Alter des Patienten, Dauer oder Stadium der HIV-Infektion oder gleichzeitigen opportunistischen Erkrankungen, assoziiert [106]. Bis zu 10% der HIV-Infizierten sind von der HIV-assoziierten Nephropathie betroffen. Typische Symptome bei Vorstellung der Patienten sind eine schwere Proteinurie, ein voll ausgebrochenes nephrotisches Syndrom und ein Nierenversagen mit stark erhöhten Kreatininwerten. Im Lichtmikroskop zeigt die fokale Sklerose eine kollabierende Form, die Kapillarschlingen in den Glomeruli scheinen geschlossen und zeigen Epithelproliferationen in der Bowman-Kapsel. Außerdem finden sich große, zystische Tubuli [106]. Dank einer intensiven antiretroviralen Therapie ist es heutzutage möglich, die rasche Progression der Erkrankung zu verzögern [117]. Außerdem werden ACE-Hemmer oder Angiotensin-2-Rezeptorblocker bei der Behandlung der schweren Proteinurie eingesetzt [106].

1.3 Das Immunsystem

Der menschliche Organismus wird durch das Immunsystem vor Infektionen durch Bakterien, Viren, Parasiten und Pilzen geschützt, aber auch entartete körpereigene Zellen werden dadurch eliminiert. Aufgrund der Variabilität der Pathogene sind verschiedene Abwehrmechanismen erforderlich, deswegen ist das Immunsystem aus einer Vielzahl unterschiedlicher Komponenten zusammengesetzt, die im Zusammenspiel mit verschiedenen Abwehrstrategien die Bekämpfung von Krankheitserregern gewährleisten. Die erfolgreiche Abwehr wird durch eine ausgewogene Balance zwischen Immunität und Toleranz erreicht, damit werden einerseits effektiv Tumorzellen und Krankheitserreger bekämpft und andererseits körpereigenes Gewebe und harmlose Fremdkörper toleriert.

Die Immunität ist teilweise antigen-unspezifisch (angeboren) und zu einem anderen Teil antigen-spezifisch (erworben). Beide Systeme ergänzen sich und arbeiten sowohl mit humoralen als auch mit zellulären Komponenten. Die „erste Linie“ der Abwehr wird durch die angeborene Immunität vermittelt. Sie wird direkt, d.h. ohne Vorprozessierung des Antigens, aktiviert. Der Vorteil der Schnelligkeit steht dem Nachteil der mangelnden Spezifität gegenüber: Durch die „breitflächige“ Immunantwort kann es im Rahmen der Abwehr leicht zur Gewebeschädigung des Wirtsorganismus kommen. Makrophagen, Monozyten, Mastzellen, Granulozyten und Natural-Killer-Lymphozyten zählen zu den unspezifischen Abwehrzellen, Komplement, Akute-Phase-Proteine und Zytokine stellen die humoralen Faktoren dar. Die „zweite Linie“ der Abwehr stellt die spezifische Immunität dar. Sie basiert auf antigenspezifisch arbeitenden Immunzellen (T- und B-Lymphozyten). Die T-Lymphozyten können intakte, nicht-lösliche Antigene (wie z.B. Virusbestandteile, pathogene Zellen) nicht erkennen. Die Arbeit der spezifischen Immunität setzt deshalb eine „Prozessierung“ dieser Antigene, d.h. ihre Zerlegung in lösliche Peptide voraus. Diese Prozessierung wird vor allem von den Zellen des unspezifischen Systems geleistet [1]. Besondere Merkmale der erworbenen Immunität sind die Spezifität der Pathogenerkennung und das immunologische Gedächtnis, dadurch wird ein verstärkter Schutz gegen eine erneute Infektion gewährleistet. Die zelluläre Abwehr wird durch die T-Lymphozyten vermittelt, die andere Zellen unterstützen (T-Helferzellen) oder infizierte Zellen abtöten (zytotoxische T-Zellen). Die B-Lymphozyten produzieren Antikörper, die extrazelluläre Pathogene binden, und sind dadurch für die humorale Abwehr zuständig [118].

1.3.1 Die angeborene Immunantwort

Die erste Station in der Abwehr von Krankheitserregern wird vom angeborenen Immunsystem gebildet. Dieser Abwehrmechanismus ist in allen Mehrzellorganismen vorhanden. Die Körperepithelien stellen eine chemische, mechanische und mikrobielle Barriere dar und verhindern dadurch das Eindringen von Erregern. Beim Versagen dieses Abwehrmechanismus versuchen Phagozyten und Komplement die Infektion zu stoppen. Für die sofortige erfolgreiche Phagozytose sind die neutrophilen Granulozyten verantwortlich (Abb. 10) [118].

Makrophagen besitzen zwei wichtige Aufgaben: erstens die Phagozytose und zweitens die Signalweiterleitung und damit die Induktion weiterer Reaktionen. Der Toll-like Rezeptorsignalweg ist hierbei von Bedeutung. Die Freisetzung von Chemokinen und Zytokinen wird über diesen aktiviert und das klassische Bild der Entzündung kommt zustande, d.h. die Erweiterung lokaler Blutgefäße (Rötung und Erhitzung), die Extravasation von Leukozyten, insbesondere Granulozyten, und die erhöhte Durchlässigkeit der Gefäßwand, wodurch sich Flüssigkeit und Plasmaproteine wie Komplement am Infektionsherd anreichern können (Schwellung und Schmerz). Diese akute Entzündung verursacht eine Beseitigung des Erregers, sowie die Verhinderung der Ausbreitung des Pathogens (Abb. 10).

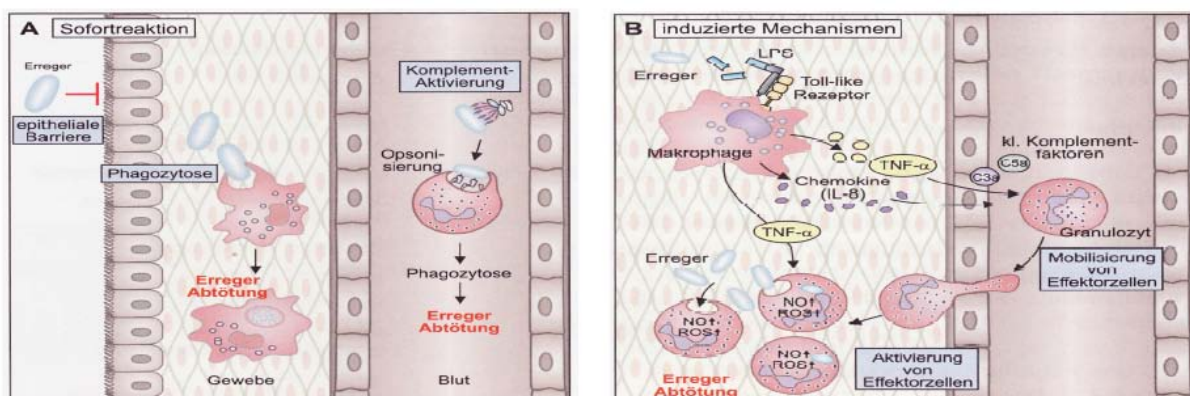


Abbildung 10. Angeborene Effektormechanismen. **A** Sofortreaktion. Epithelien stellen die ersten physikalischen und chemischen Abwehrmaßnahme dar. Dringt der Erreger ins Blut vor, kommt es durch die Aktivierung von Komplement zur Opsonierung und Phagozytose durch Granulozyten und ggf. zur Abtötung des Pathogens. Dringt der Erreger ins Gewebe ein, kommt es zur Aufnahme durch ortsständige Makrophagen, die durch Phagozytose aktiviert werden und mikrobizide Faktoren produzieren, was ggf. zur Vernichtung des Pathogens führt. Gelingt die Beseitigung nicht in der Sofortreaktion, werden weitere Effektormechanismen induziert. **B** Induzierte Mechanismen. Aktivierte Toll-like Rezeptoren auf phagozytierenden Makrophagen bewirken die Ausschüttung von Zytokinen, insbesondere TNF- α und Chemokinen, was zur Endothelaktivierung und Mobilisierung von weiteren Effektorzellen in das infizierte Gewebe führt. Kleine Komplementfaktoren sind hier ebenfalls beteiligt. Makrophagen-Zytokine stimulieren dann wiederum Effektorzellen, um mit den Erregern auf unterschiedlichste Art fertig zu werden. Insbesondere TNF- α spielt hier eine wesentliche Rolle [118].

Das angeborene Immunsystem ist im Vergleich zur erworbenen Immunität nicht antigenspezifisch, es muss aber auch dazu fähig sein, Eigen von Fremd zu unterscheiden. Rezeptoren sind für die Erkennung von Krankheitserregern und Aktivierung der Immunantwort erforderlich. Diese Rezeptoren, die generell Pathogene erkennen, werden als Mustererkennungsmoleküle (pattern recognition receptors, PRR) bezeichnet. Sie erkennen und binden sich regelmäßig an wiederholende Strukturmuster von Mikroorganismen. Die Strukturen, die gebunden werden, nennt man Musterstrukturen (*pathogen associated molecular pattern*, PAMP). Innerhalb einer Klasse von Krankheitserregern gibt es keine Unterschiede in den Musterstrukturen, damit ist die Erkennung unterschiedlicher Erreger durch eine limitierte Menge an Rezeptoren möglich. Über welchen Mechanismus das angeborene Immunsystem zwischen Musterstrukturen der physiologischen Mikroflora und Musterstrukturen pathogener Erreger unterscheiden kann, ist noch nicht geklärt. Der Einfluss der Kompartimentierung und antiinflammatorischer Zytokine wird diskutiert [118].

Lösliche Rezeptoren, Zelloberflächenrezeptoren und intrazelluläre PRRs sind mögliche Mustererkennungsmoleküle, die Mikroorganismen in allen intra- und extrazellulären Kompartimenten erkennen. Beispiele für Mustererkennungsstrukturen der angeborenen und erworbenen Immunantwort sind in Abbildung 11 dargestellt.

Die Identifikation von drei Pathogenerkennungsfamilien hat zum besseren Verständnis der angeborenen Immunantwort beigetragen. Diese sind die Toll-like Rezeptoren (TLRs), die RIG-like Rezeptoren (RLRs) und die NOD-like Rezeptoren (NLRs). Es ist wahrscheinlich, dass das Zusammenspiel dieser drei Familien die Koordination der angeborenen Immunantwort entweder über synergistische oder über kooperative Wege sichergestellt und somit in der ersten Phase der Infektionsabwehr ein wirkungsvoller Abwehrmechanismus gewährleistet wird [119].

Eindringende Pathogene werden oft von Antikörpern (Abb. 12) gebunden. So entstehen Immunkomplexe, die aus einem Antikörper (Immunglobulin) und einem Antigen bestehen. Der Fc-Rezeptor von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten erkennt diesen Antigen-Antikörper-Komplex und dadurch wird ihre Phagozytose eingeleitet. Ob die virale RNA dieser Immunkomplexe auch direkt über *pattern recognition receptors* erkannt werden kann, ist noch nicht geklärt (Abb. 13).

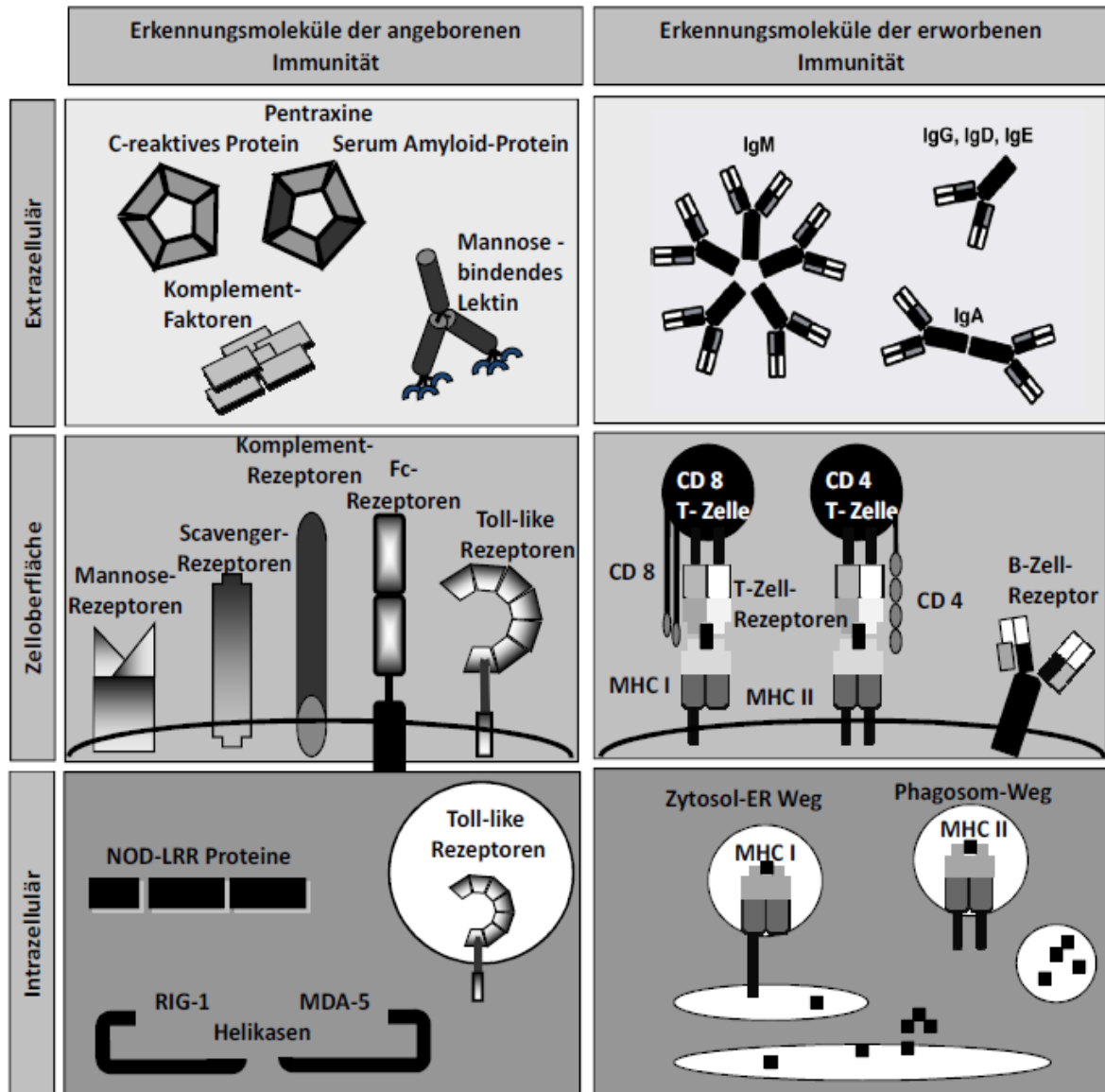


Abbildung 11. Mustererkennungsmoleküle der angeborenen und erworbenen Immunität. PRR befinden sich intra- und extrazellulär sowie auf der Zelloberfläche. Komplementfaktoren, TLRs, NLRs und RLRs gehören zur angeborenen Immunität. Immunglobuline, T- und B-Zellen sowie MHC (major histocompatibility complex) sind Teil der erworbenen Immunität [120].

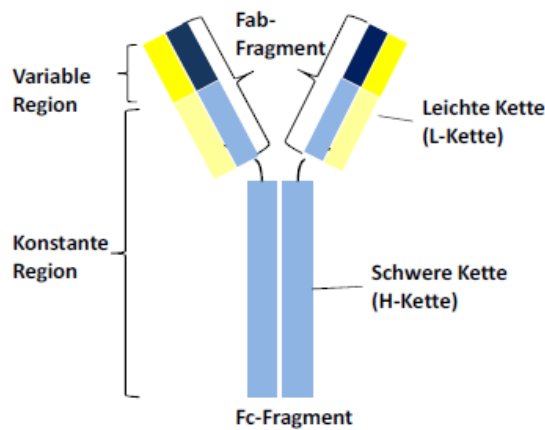


Abbildung 12. Aufbau eines Antikörpers (Ak). Antikörper sind y-förmige Glykoproteine, sie bestehen aus zwei identischen schweren und zwei identischen leichten Ketten. Innerhalb der Ketten kann man variable und konstante Regionen unterscheiden. Die variablen Domänen liegen am N-terminalen, die konstanten Domänen am C-terminalen Ende des Moleküls [121]. Das Fab (fragment antigen binding)-Fragment ist ein proteolytisches Fragment eines Immunglobulinmoleküls, das aus einer kompletten leichten Kette, gepaart mit einem Fragment der schweren Kette, das die variable und die erste konstante Region enthält, besteht. Das Fab-Fragment kann ein Antigen binden, aber nicht mit Fc-Rezeptoren interagieren oder Komplement binden. Fc (fragment crystallizable)-Fragmente bestehen aus den über Disulfidbrücken verbundenen carboxyterminalen Regionen der beiden schweren Ketten. Fc-Regionen medieren Effektorfunktionen von löslichen Antikörpern wie Komplementaktivierung oder Bindung an Fc-Rezeptoren von Makrophagen [118].

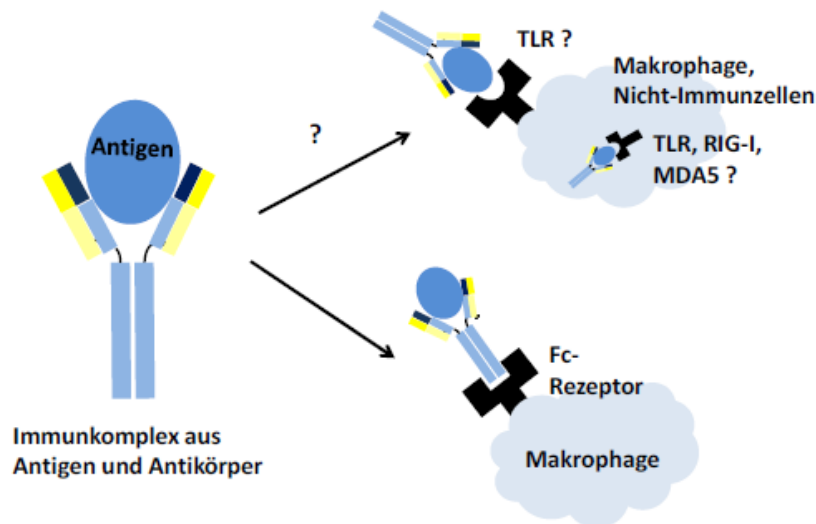


Abbildung 13. Immunkomplexerkennung über Fc-Rezeptoren und PRRs. Der Fc-Rezeptor auf der Zelloberfläche von Makrophagen erkennt das Fc-Fragment des Ak von Immunkomplexen. Unklar bleibt, ob die Erkennung von dem Antigenteil der Immunkomplexe auch über PRR auf der Zelloberfläche oder intrazellulär erfolgt [118].

1.3.2 Die erworbene Immunantwort

Falls die Eliminierung des Erregers durch das angeborene Immunsystem nicht erfolgreich war, wird das erworbene Immunsystem eingeschaltet. Die erworbene Immunantwort ist antigenspezifisch und setzt eine enorme Diversität in den Erkennungsstrukturen voraus. B-Lymphozyten produzieren Antikörper, die Krankheitserreger extrazellulär bekämpfen. Die T-Zellen sind in der Lage, intrazelluläre Erreger zu beseitigen. Mit Hilfe der MHC-Moleküle werden die angebauten Antigene an die Oberfläche der infizierten Wirtszelle gebracht. Der Typ vom MHC/Peptid-Komplex bestimmt die Wechselwirkungen der Wirtszelle mit den verschiedenen T-Effektorzellen. MHC I-Komplexe werden durch zytotoxische T-Zellen (CD8 positiv) erkannt und die infizierte Zelle wird dadurch abgetötet. T-Helferzellen (CD4 positiv) erkennen MHC II-Komplexe und setzen die Aktivierung der gebundenen Makrophagen bzw. der B-Zellen in Gang. T-Zellen sind sowohl für die zelluläre als auch für die humorale adaptive Immunantwort von Bedeutung. Bei der Beseitigung von Krankheitserregern erzeugt das erworbene Immunsystem durch klonale Selektion gleichzeitig eine Population von ausdifferenzierten Gedächtniszellen. Eine schnellere und wirksamere Effektorreaktion wird bei einer erneuten Infektion dadurch ermöglicht [118].

Die erworbene Immunantwort wird hier nicht näher diskutiert, da sie in der vorliegenden Arbeit nicht weiter von Bedeutung ist.

1.4 Erkennung viraler RNA

1.4.1 Toll-like Rezeptoren

1984 wurde der Rezeptor Toll in der *Fliege Drosophila melanogaster* entdeckt, er spielt dort eine wesentliche Rolle in der dorso-ventralen Ausrichtung des Embryos [122] und in der Pilzabwehr der erwachsenen Fliege [123]. In Säugetieren fand man Homologe von Toll, die sogenannten Toll-like Rezeptoren (TLR). Mittlerweile sind 13 TLRs identifiziert worden, 10 humane (TLR 1-10) und 12 murine (TLR 1-9 und 11-13), von denen einige homolog sind [124, 125]. Die Mehrheit der TLRs befindet sich an der Zelloberfläche, nur TLR 3, 7, 8 und 9 sind endosomal lokalisiert. Im Gegensatz zum *Drosophila* Toll werden TLRs direkt durch Fremdstrukturen aktiviert, einige ihrer Liganden sind bisher bekannt (Abb.14). Nach einer Aktivierung von TLRs durch spezifische Liganden kommt es zur Produktion verschiedener Zytokine, Chemokine, und Typ I Interferone [126], deren Wirkung lokal und systemisch erfolgt und essentiell für die angeborene und erworbene Immunantwort ist.

Toll-like Rezeptoren gehören zu den Typ I-Transmembranproteinen, sie bestehen aus einem extrazellulären leucinreichen Bereich (*leucin-rich repeats*, LRR) und aus einem intrazellulären oder zytoplasmatischen Bereich, der homolog zum Interleukin-1-Rezeptor (Toll/II-1-receptor, TIR) ist [126, 127]. Eine Dimerisierung der TLRs findet nach Erkennung ihrer Liganden statt, damit beginnt die Signalkaskade, die zur Aktivierung der proinflammatorischen Antwort führt [127]. Nach Ligandenbindung wird die Produktion proinflammatorischer Zytokine und Interferone über zwei Signalwege induziert, einen MyD88-abhängigen und einen MyD88-unabhängigen. Vier Adaptormoleküle sind für die Auslösung dieser zwei Signalwege erforderlich: MyD88, TIR-assoziiertes Protein (TIRAP), TIR domain-containing adaptor protein inducing IFN- β (TRIF) und TRIF related adaptor molecules (TRAM) [126]. MyD88 und TIRAP sind für die Induktion der proinflammatorischen Gene zuständig, TRIF und TRAM für die Induktion der Interferone [125]. Abbildung 14 zeigt die TLRs-vermittelte Immunantwort mit Liganden und Adaptormolekülen.

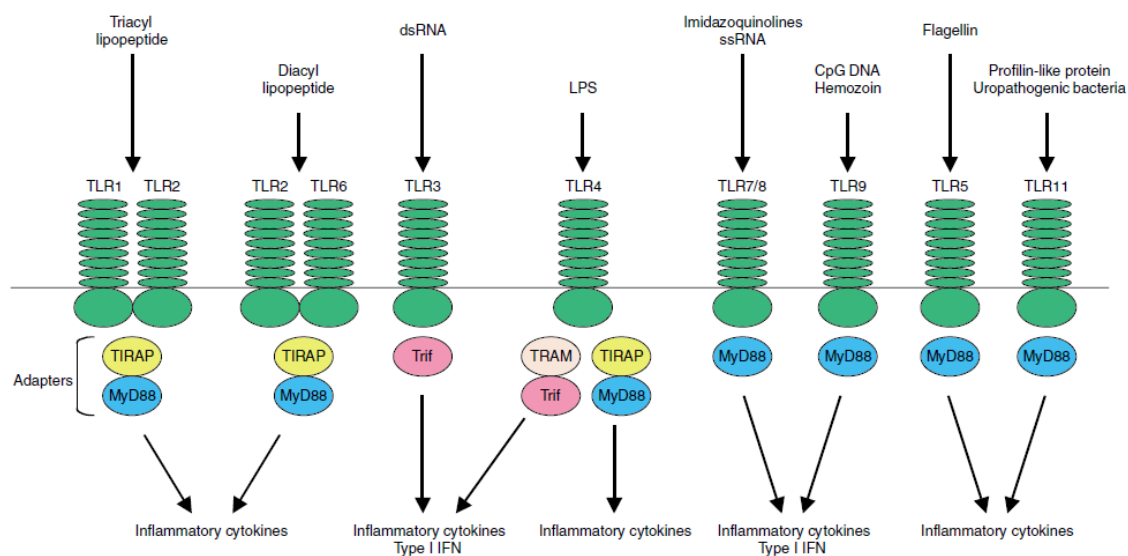


Abbildung 14. TLRs-vermittelte Immunantwort. TLR 2 in Verbindung mit TLR 1 oder TLR 6 unterscheidet zwischen den molekularen Mustern von jeweils Triacyl- und Diacyl-Lipoproteine. TLR3 erkennt dsRNA. TLR 4 erkennt bakterielle Lipopolysaccharide. TLR 7/8 vermittelt die Erkennung von Imidazoquinoline und ssRNA. TLR9 erkennt CpG DNA von Bakterien und Viren. TLR5 erkennt bakterielles Flagellin. Der murine TLR 11 erkennt Komponenten von uropathogenen Bakterien. TLR 1/2 and TLR 2/6 sind MyD88 und TIRAP/MAL abhängig. TLR 3 benutzt Trif als Adaptermolekül. TLR benötigt vier Adaptermoleküle MyD88, TIRAP/MAL, Trif und TRAM, TLR 7/8, TLR 9, TLR 5 und TLR 11 brauchen nur MyD88. Der MyD88-abhängige Signalweg kontrolliert die Entzündungsreaktion, während Trif die IFN Typ I Antwort vermittelt. Zusätzlich induzieren TLR 7/8 und TLR9 die IFN Typ I Produktion in dendritischen Zellen MyD88-abhängig [126].

1.4.2 RIG-like Helikasen

RIG-like Helikasen (*Retinoic acid-inducible gene*, Retinsäure-induziertes Gen) enthalten RNA-Helikasen und gehören wie die Toll-like Rezeptoren zu den PRRs des angeborenen Immunsystems (Abb. 15). Im Unterschied zu TLRs, die vor allem in dendritischen Zellen bei einer Virusinfektion exprimiert werden, schützen RLRs alle virusinfizierten Zellen [119]. Bisher sind drei Vertreter dieser PRR-Familie bekannt: das *Retinoic acid-inducible gene 1* (RIG-1), das *melanoma differentiation-associated gene 5* (MDA5) und das *laboratory of genetics and physiology 2* (LGP2) [128]. RIG-1 und MDA5 zeichnen sich durch eine DexD/H-Box-RNA Helikase-Domäne und zwei *caspase recruitment domains* (CARD-Domänen) aus [129, 130]. Im Gegensatz dazu fehlt bei LGP2 die CARD-Domäne, aus diesem Grund scheint LGP2 nicht zur Vermittlung einer Signaltransduktion fähig zu sein. Die RIG-like Rezeptoren liegen im Zytoplasma. RIG-1 und MDA5 erkennen mit unterschiedlicher Spezifität virale RNA und lösen Signalkaskaden aus, die zur Transkription von Typ I Interferonen und inflammatorischen Zytokinen führen [131]. *Interferon beta promoter stimulator-1* (IPS-1) auch bekannt als *mitochondrial antiviral signaling* (MAVS), *CARD adaptor inducing interferon beta* oder *virus-induced signaling adaptor* (VISA), ist das Adaptermolekül zwischen den RLRs und der Signalkaskade. Die Produktion antiviraler Proteine erfolgt nach Aktivierung von IRF-3 (Interferon regulating factor) und NF- κ B.

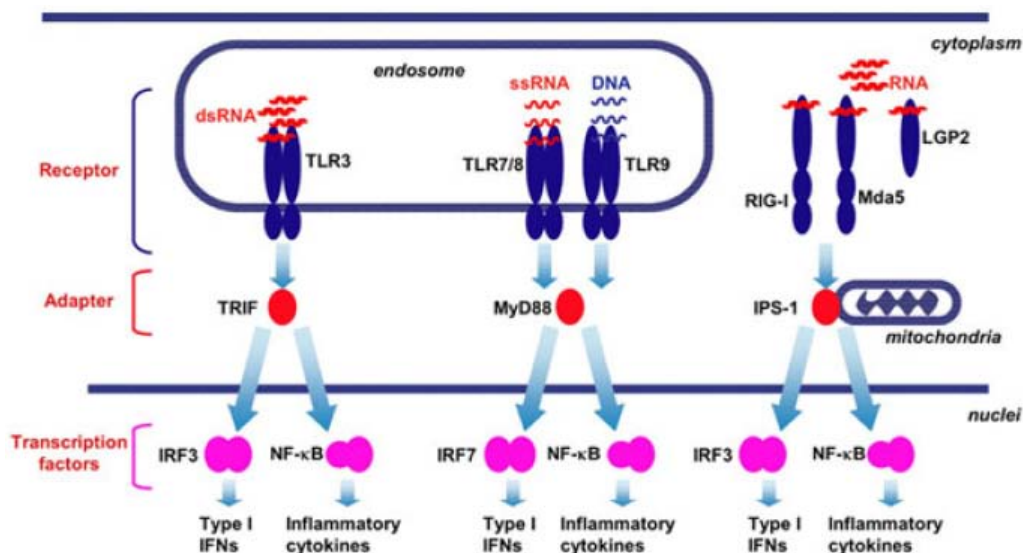


Abbildung 15. TLR- und RLR-vermittelte Erkennung viraler Nucleinsäuren und Signalkaskaden. TLR3, TLR7 und TLR9 erkennen jeweils dsRNA, ssRNA, und DNA abgeleitet von Viren in den Endosomen. RIG-1, MDA5 und LGP2 erkennen RNA im Zytoplasma. TLR3 benutzt TRIF als Adaptermolekül, TLR7 und TLR9 dagegen MyD88. IPS-1 befindet sich in den Mitochondrien und wird als Adapterprotein von RIG-1 und MDA5 benötigt. TRIF- und IPS-1-abhängige Signalwege aktivieren die Transkriptionsfaktoren IRF3 und NF- κ B und induzieren die Produktion von Typ I Interferonen und inflammatorischen Zytokinen. Bei dem MyD88-abhängigen Signalweg erfolgt diese Produktion mittels IRF7 und NF- κ B [131].

1.4.3 Immunantwort nach Aktivierung von TLRs oder RLRs

Eine Infektion entsteht, wenn Mikroorganismen die äußeren Barrieren überwunden haben und in den Körper eingedrungen sind. Handelt es sich bei diesen Mikroorganismen um Viren, werden diese über Toll-like Rezeptoren oder RIG-like Helikasen erkannt. Nach der Erkennung werden die Erreger von den aktivierten Makrophagen phagozytiert und verdaut, oder sie werden durch die Generierung von Sauerstoffradikalen und Stickoxiden abgetötet. Das Komplementsystem erhöht dabei die Effizienz der Phagozytose durch die Opsionierung. Ist das Problem dadurch nicht zu beheben, setzen Makrophagen und Mastzellen Zytokine frei. Zytokine sind lösliche Polypeptide mit lokaler Wirkung und einer kurzen Halbwertszeit von einigen Minuten. Sie spielen eine Rolle als Mediatoren der Immunantwort sowie im Entzündungsgeschehen. Es existieren sechs Zytokinfamilien mit jeweils mehreren Vertretern (Tabelle 5). Die Zytokinfreisetzung setzt eine Entzündung mit den vier Kardinalsymptomen *rubor* (Röte), *calor* (Hitze), *tumor* (Schwellung) und *dolor* (Schmerz) in Gang. Zeitlich parallel zu den Entzündungsvorgängen wird durch dendritische Zellen, die den T-Zellen des erworbenen Immunsystems Antigene präsentieren, die adaptive Immunantwort induziert. Für eine effektive Bekämpfung der Erreger ist das Zusammenspiel der eingewanderten Zellen der angeborenen und der erworbenen Immunität erforderlich [132].

Tabelle 5 Zytokinfamilien und einige wesentliche Vertreter [132]

Interleukine	IL1 β , IL2-4, IL8, IL10, IL12, IL17,IL18, IL23
Koloniestimulierende Faktoren	G-CSF, GM-CSF, IL3
Interferone	INF α , INF β , INF γ
Cytotoxine	TNF α , TNF β
Chemokine	IL8, MIP1 α , MCP1
Wachstumsfaktoren	TGF α , TGF β , PDGF

Eine virusinfizierte Zelle ist aber auch in der Lage die Nekrose oder die Apoptose einzuleiten. Bei einer Virusinfektion findet man meist Nekrosen. Die pathologischen Zellschädigungen können auf einer Kombination von direkten, virusverursachten und indirekten, immunologisch verursachten Schäden beruhen. Bei der Nekrose schwellen die Zellen an, es kommt zum Verlust der Membranintegrität und- relativ spät- zum Abbau der DNA. In der Umgebung der nekrotischen Zellen werden immunologische, entzündliche Reaktionen ausgelöst, die zusätzlich zum Krankheitsbild beitragen.

Der programmierte Zelltod (Apoptose) beginnt mit einer Schrumpfung des Zellkerns und dem raschen Abbau der DNA. Der Zerfall der Plasmamembran und die Auflösung der Zelle finden relativ spät statt. Die gebildeten apoptotischen Vesikel werden rasch von Makrophagen in der Umgebung aufgenommen. Entzündliche oder immunologische Reaktionen werden nicht induziert. Im Unterschied zur Nekrose ist die Apoptose ein induzierbarer, energieabhängiger Vorgang mit gesteigerter RNA- und Proteinsynthese.

1.5 Interferone und ihre Rezeptoren

Die Entdeckung des Interferons (IFN) erfolgte 1957 von Isaacs und Lindenmann durch ihre Arbeiten an Hühnerembryonen. Bei der Infizierung von der Hühnerechorionallantoismembran mit Influenzaviren haben sie eine Substanz entdeckt, die die Zelle vor einer nachfolgenden Infektion schützte. Aufgrund der Interferenz mit der Virusreplikation wurde diese Substanz als Interferon bezeichnet. [133].

Interferone üben in der Zelle viele Funktionen aus und erfüllen wichtige Aufgaben bei der Regulierung der Zellphysiologie. Interferone gehören zur Gruppe der induzierbaren Zytokine und lassen sich grundsätzlich in Typ I- und Typ II-Interferone einteilen. Außerdem kennt man interferonähnliche Zytokine, die man auch als Typ III-Interferone bezeichnet [134].

1.5.1 Typ I-Interferone

Die säurestabilen Typ I-Interferone können in acht Untergruppen gegliedert werden: Beim Menschen gibt es IFN- α , IFN- β , IFN- ϵ , IFN- κ , IFN ω , sie werden alle auf dem kurzen Arm des Chromosoms 9 kodiert. Bei Tieren konnte bisher nur IFN- δ , IFN- τ und IFN- ζ (Limitin) nachgewiesen werden. Mit Ausnahme von IFN- ϵ , IFN- δ und IFN- τ sind Typ I-Interferone antiviral wirkende Zytokine. Sie werden in virusinfizierten Zellen synthetisiert, in die Umgebung abgegeben und wirken in der Regel speziesspezifisch durch die Bindung an Rezeptoren in der Zytoplasmamembran anderer Zellen, in welchen sie dann einen Schutz vor Infektion ausüben. Sie hemmen die Vermehrung von Viren, aber auch die Zellteilung und haben dadurch auch tumorhemmende Eigenschaften. Ihre Wirkung entfalten sie, indem sie sich an den Interferon- α -Rezeptor binden, ein Heterodimer aus einer IFN α R1- und einer IFN β R2-Kette, das sich auf fast allen Zelltypen befindet.

IFN- α und IFN- β sind am häufigsten bekannt und am besten untersucht. Sie weisen ein ähnliches serologisches Verhalten auf, was auf einer Sequenzhomologie von etwa fünfzig Prozent beruht, sind 166 Aminosäuren lang und haben ein Molekulargewicht von 20 kD. Es existieren mehrere Subtypen von IFN- α , jedoch nur einer von IFN- β . Diese Interferone werden vor allem von dendritischen Zellen, Monozyten und Makrophagen nach der Phagozytose pathogener Erreger exprimiert. Ihre Expression wird außerdem in allen Typen infizierter Zellen durch PAMPs eingeleitet, die mit TLRs (bei Viren TLR 7,8 und 9) oder RLRs (RIG-I oder MDA-5) interagieren (siehe Abschnitt 1.4).

Nach der Bindung am IFN- α -Rezeptor werden in der Zelle Signalkaskaden ausgelöst, die vielfältige Reaktionen zur Folge haben können: den Aufbau eines antiviralen Status, die Hemmung der Zellteilung, die Erhöhung der Konzentration von MHC-Klasse-I-Antigenen sowie von anderen Oberflächenmarkern, die Einleitung der Expression von proapoptotisch wirkenden Proteinen bzw. der Repression von antiapoptotisch wirkenden Faktoren und die Freisetzung von weiteren Cytokinen.

Die Konformationsänderung des IFN- α -Rezeptors steht an erster Stelle der Kaskade (Abb.16). Dies aktiviert die Tyk2- und die Jak1-Kinasen durch Phosphorylierung. Dadurch wird bewirkt, dass die Faktoren Stat2 und Stat1 (*signal transducers and activators of transcription*) sich an die IFN α R2-Kette anlagern und ebenfalls phosphoryliert und aktiviert werden. Die phosphorylierten Stat1 und Stat2 Faktoren lösen sich von dem Rezeptorkomplex an der Innenseite der Cytoplasmamembran ab und treten in Wechselwirkung mit dem Protein p48. Die Stat1-/Stat2-/p48-Komplexe gelangen in den Zellkern und lagern sich an die ISRE-Promotoren (*interferon stimulated regulatory elements*) an, welche die Expression der *interferon stimulated genes* (ISG) regulieren [134].

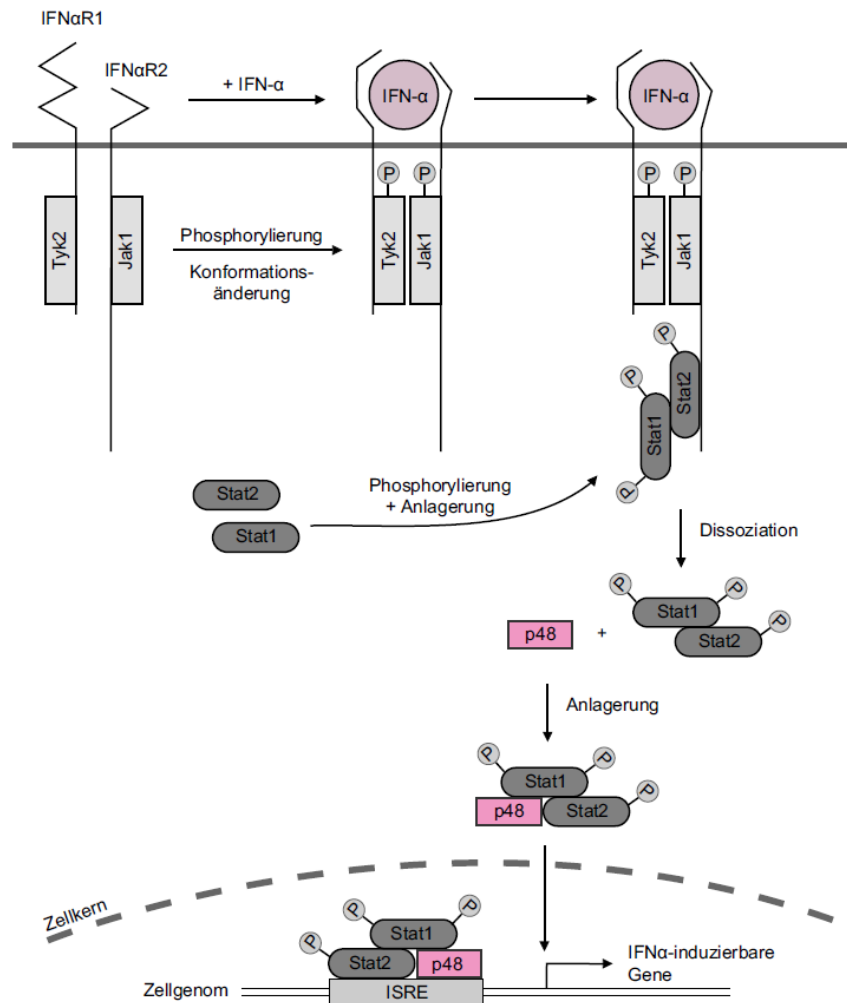


Abbildung 16. Signalkaskade, die durch Wechselwirkung von IFN- α mit dem Rezeptor IFN- α induziert wird. Bei der Bindung von IFN- α verändert der Rezeptorkomplex IFN- α seine Konformation und die Kinasen werden phosphoryliert. Dies bewirkt die Anlagerung der Proteine Stat1 und Stat2 und ihre Phosphorylierung. Die phosphorylierten Proteine Stat1 und Stat2 lösen sich aus dem Komplex, treten in Wechselwirkung mit weiteren Zellproteinen (p48) und gelangen als Komplex in den Zellkern. Hier binden sie sich an die ISRE-Promotoren und aktivieren die Expression der IFN- α induzierbaren Gene [134].

1.5.2 Typ II-Interferone

Das IFN- γ ist ein säurelabiles Typ II-Interferon, das bei allen Säugetieren vorkommt und von dem nur ein Subtyp bekannt ist. Es ist ein Homodimer aus zwei glykosylierten Proteinuntereinheiten, die 146 Aminosäuren lang sind und ein Molekulargewicht von 22 kD haben. Das Gen für IFN- γ befindet sich beim Menschen auf dem Chromosom 12. Nach Antigenkontakt wird IFN- γ hauptsächlich von den TH1-Zellen, die durch aktivierte dendritische Zellen, Makrophagen sowie natürliche Killerzellen stimuliert werden, gebildet. Interferon- γ leitet seine Wirkung durch die Bindung an den Interferon- γ -Rezeptor (IFN γ R) ein, einem Protein aus zwei IFN γ R1-Ketten. Die Bindung des IFN- γ an den IFN γ R1 bewirkt die Komplexbildung mit zwei Ketten IFN γ R2 und induziert die Signalkaskade (Abb.17). Die

Jak1- und Jak2-Kinasen, die mit den IFN γ R1 und IFN γ R2 assoziiert sind, phosphorylieren sich zuerst gegenseitig und dann phosphorylieren sie die Tyrosin-Reste an Position 457 der IFN γ R1. Dadurch wird die Anlagerung der Stat1-Proteine und deren Phosphorylierung verursacht. Die Stat1-Dimere dissoziieren vom Komplex, werden in den Zellkern transportiert und binden sich an die entsprechenden ISRE der durch IFN- γ kontrollierten Gene. Durch die Wirkung des IFN- γ wird die Expression der MHC-Klasse-II-Proteine sowie die Synthese und Freisetzung weiterer Zytokine eingeleitet und die Effektorfunktion der zytotoxischen T-Zellen, der natürlichen Killerzellen und der mononuclearen Phagozyten gesteigert; IFN- γ gilt als eines der zentralen Zytokine bei der Einleitung der spezifischen Immunantwort. IFN- α bzw. - β und IFN- γ verstärken sich gegenseitig und beeinflussen die Expression und somit das Netzwerk der Zytokine [134].

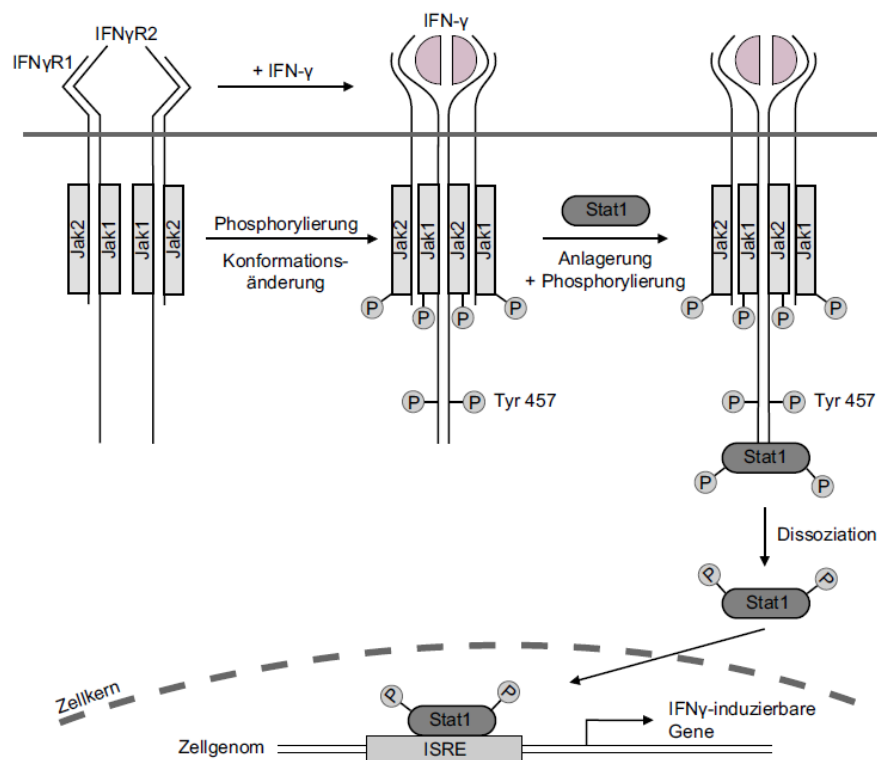


Abbildung 17. Signalkaskade, die durch die Wechselwirkung von IFN- γ mit dem Rezeptorkomplex IFN γ R1/R2 induziert wird. In der Cytoplasmamembran sind Proteinketten des Rezeptors IFN γ R1 verankert. Bei Interaktion mit dem homodimeren IFN- γ assoziieren diese miteinander und mit zwei Ketten des IFN γ R2. Bei Bindung von IFN- γ verändert der Rezeptorkomplex IFN γ R1/R2 seine Konformation und wird zusammen mit den Jak1/2-Kinasen phosphoryliert. Dies bewirkt die Anlagerung der Proteine Stat1 und ihre Phosphorylierung. Die phosphorylierten Proteine Stat1 lösen sich aus dem Komplex, bilden Dimere und gelangen als Komplex in den Zellkern. Hier binden sie sich an die ISRE-Promotoren und aktivieren die Expression der IFN- γ induzierbaren Gene [134].

1.6 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war es die Rolle von Rezeptoren der angeborenen Immunität in Podozyten zu untersuchen. Es ist bekannt, dass virale sowie bakterielle Infektionen nicht selten Schübe von Glomerulopathien und Proteinurie triggern können. Die Lupusnephritis, die IgA-Nephropathie und die renale Vaskulitis stellen Beispiele dar. Chronische virale Infektionen (z.B. Hepatitis C) sind auch in der Lage, eine *de novo* Glomerulonephritis auszulösen, dabei spielen die Bildung von Immunkomplexen und die Interferonproduktion eine wichtige Rolle. Eine systemische Interferonfreisetzung findet bei der Aktivierung der systemischen antiviralen Immunität statt. Bei einer Virusinfektion produzieren die meisten Zellen Typ I-Interferone. Die Rolle der lokal produzierten Typ I-Interferone bei der Entstehung von virusassoziierten Glomerulonephritiden ist immer noch unklar. Ob Podozyten bei der Verstärkung einer Entzündung beteiligt sind, ist ebenfalls unbekannt.

Unsere Hypothese ist, dass Podozyten nicht nur an der Filtrationsbarriere und bei der Strukturhaltung des glomerulären Gefäßkonvoluts eine große Rolle spielen, sondern dass sie auch eine wichtige Rolle bei der unspezifischen Immunabwehr spielen, indem sie virale Nukleinsäuren mittels spezifischer Rezeptoren erkennen, daraus folgend Zytokine und antivirale Typ-I Interferone produzieren und dadurch zur inflammatorischen Immunantwort bei der virusassoziierten Glomerulonephritis beitragen.

Zweites Kapitel:

Materialen und Methoden

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Geräte und Materialien

2100 Bioanalysator	Agilent Technologies, Waldbronn, D
BioRad Semi-Dry Blotting System	BioRad, München, Deutschland
ELISA-Reader Tecan, GENios Plus	Tecan, Crailsheim, Deutschland
ELISA-Washer	ELx50 BioTek, Bad Friedrichshall, D
FACS Calibur™	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Gel-Kammer (für PCR)	PeqLab Biotechnologie, Erlangen, D
Lichtmikroskop Leitz Diavert	Leica Microsystems, Solms, Deutschland
Lichtmikroskop Leitz DMRBE	Leica Microsystems, Solms, Deutschland
pH meter WTW	WTW GmbH, Weilheim, Deutschland
Photometer Ultrospec 1000	Amersham, Freiburg, Deutschland
RNA 6000 LapChip	Agilent Technologies, Waldbronn, D
Spektrophotometer Beckman DU®530	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Steril Card Hood Class II, Typ A/B3	The Baker Company, Sanford, USA
TaqMan ABI prism™ 7700 sequence detector	PE Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vortex Genie 2™	Bender&Hobein AG, Bruchsal, D
Waage Mettler PJ 3000	Mettler Toledo, Gießen, Deutschland
Wasserbad HI 1210	Leica Microsystems, Solms, Deutschland
Zellinkubator Type B5060 EC-CO ₂ (37° C)	Heraeus Sepatech, Osterode, Deutschland
Zellinkubator Hera Cell 150 (33° C)	Heraeus Sepatech, Osterode, Deutschland
Zentrifuge Heraeus, Minifuge T	VWR International, Darmstadt, D

Zentrifuge Heraeus, Sepatech Biofuge A	Heraeus Sepatech, Osterode, Deutschland
UNO-II-Cycler (Thermocycler)	Biometra, Göttingen, Deutschland
12-well-Platten	TPP [®] , Trasadingen, Schweiz
24-well-Platten	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
6-well-Platten	Costar Corning, Schiphol-Rijk, Holland
Einmal-Küvetten 1,5 ml Plastibrand [®]	Brand, Gießen, Deutschland
Eppendorfgefäße 1,5 ml	TPP [®] , Trasadingen, Schweiz
Falcons 15 ml und 50 ml	BD, Heidelberg, Deutschland
Kryobox Cryo 1°C Freezing cont	Nalgene [™] , Rochester, NY, USA
Kryovials	Alpha Laboratories, Eastleigh, UK
Multikanalpipette Eppendorf Research	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Nunc-Immuno [™] 96 Microwell [™] Plates	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Pipettenspitzen 1- 1000 µl Typ Gilson [®]	Peske, Aindling-Arnhofen, Deutschland
Pipettenspitzen epT.I.P.S. Standard	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipetten Pipetman [®] P	Gilson, Middleton, WI, USA
Pipettierhilfe Pipetus [®] -classic	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, D
Serologische Pipetten 5, 10, 25 ml	Falcon [®] /BD, Heidelberg, Deutschland
Zellkulturschalen 10 cm	TPP [®] , Trasadingen, Schweiz
Zellschaber 24 cm	TPP [®] , Trasadingen, Schweiz

2.2 Zellkultur

Collagen A	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dubelcco´s PBS (1x)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
Fötales bovines Serum (FBS Superior)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
IFN- γ <i>mouse recombinant</i>	Cell Sciences [®] , Canton, MA, USA
Kulturflaschen 25 cm ² und 75 cm ²	TPP [®] , Trasadingen, Schweiz
Penicillin/Streptomycin (PS) (100x)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
RPMI 1640-Medium	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin/EDTA-Lösung (1:250) (10x)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
Trypanblau	Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland

Die eingesetzten Podozyten sind konditioniert immortalisierte murine Zellen. Die verwendeten Zelllinien sind K5P5 und SVI [135, 136]. Beide Zelllinien zeigen unter speziellen Kulturbedingungen eine hohe Proliferationsrate, die Differenzierungsphase wird durch Temperaturerhöhung (von 33°C auf 37°C) und Entzug von IFN- γ im Kulturmedium induziert. Im Verlauf der Differenzierungsphase werden die Zellen mit Merkmalen genuiner Podozyten ausgeprägt. Konditioniert immortalisierte murine Podozyten behalten ein Differenzierungspotenzial ähnlich den Podozyten *in vivo*. Sie exprimieren viele *in vivo* beschriebene podozytenspezifische Proteine und reagieren auf mechanischen Stress [135]. Jedoch verfügen kultivierte Podozyten nicht über alle Merkmale der Podozyten *in vivo* [42].

Die verwendeten Kulturflaschen wurden zuerst mit Collagen A in einer 0,1 mg/ml Konzentration beschichtet. Dabei wurde das Kulturgefäß mit der Collagen A-Lösung für eine Stunde bei 37°C inkubiert, danach wird die restliche Collagen-A-Lösung von der Kulturflasche abgesaugt und mit PBS gewaschen.

Zur Proliferation wurden die Podozyten bei 33°C mit 5% CO₂ in RPMI 1640-Medium unter Zusatz von 10% FBS, 1% PS (100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin) und 10 U/ml

IFN- γ in T75 Kulturflaschen kultiviert. Das Medium wurde jeden zweiten Tag gewechselt. Die Zellen haben in der Proliferationsphase ein pflastersteinartiges Aussehen.

Bei 80-95% Konfluenz wurden die Zellen in einem Verhältnis von 1:10 passagiert. Zuerst wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen, danach sind sie für drei bis fünf Minuten mit 5 ml Trypsin/EDTA-Lösung bei Zimmertemperatur inkubiert. Die Ablösung der Podozyten ist dabei mikroskopisch kontrolliert worden. Die Kulturflasche wurde schließlich sorgfältig geschüttelt, um eine komplette Ablösung der Zellen zu erreichen. Die Inaktivierung von Trypsin erfolgte mit der Zugabe von 35 ml gebrauchsfertigem Medium. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml Falcon-Röhrchen pipettiert und fünf Minuten bei 2300 r.p.m. zentrifugiert. Der Überstand wurde nach der Zentrifugation abgesaugt, die Zellen wurden mit dem Medium resuspendiert und in dem oben genannten Verhältnis passagiert und weiter auf 33°C kultiviert oder in den 37°C Wärmeschrank zum Ausdifferenzieren gestellt.

Die Differenzierungsphase wird während des Wechsels auf 37°C mit 5% CO₂ und der Abwesenheit von IFN- γ eingeleitet. Die Podozyten werden wie bereits oben beschrieben passagiert und entweder in Kulturflaschen oder Platten für Stimulation weiter kultiviert. Die Ausdifferenzierungsphase dauert 10 Tage, dabei bilden die Zellen baumartige Fortsätze. Die Experimente der vorliegenden Arbeit fanden nach diesen zehn Tagen statt und es wurden die Zellklone der 7. bis 15. (K5P5) oder 26. (SVI) Passage verwendet.

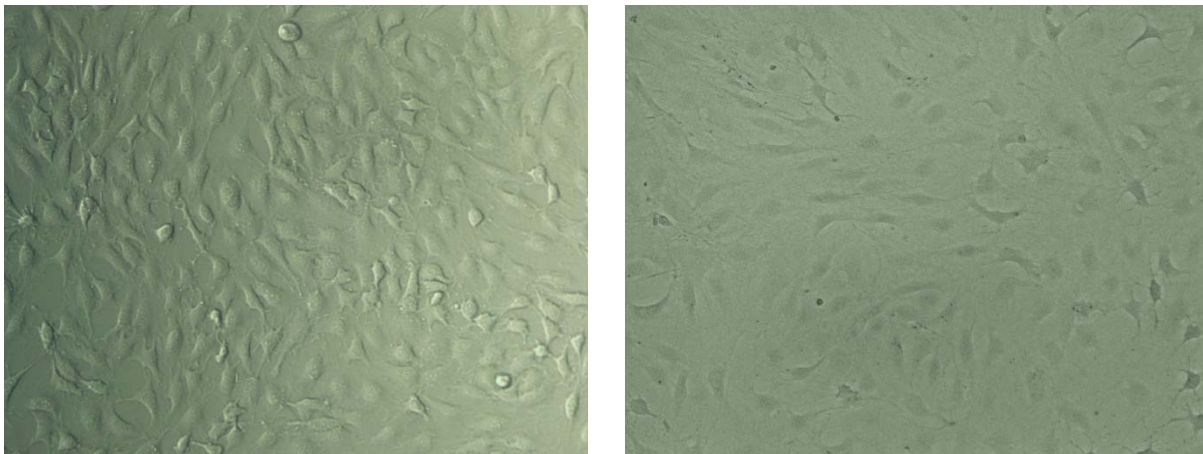


Abbildung 18. Lichtmikroskopische Darstellung der Podozyten in der Kultur. *Links*: Podozyten in der Proliferationsphase (33°C) mit dem typischen pflastersteinartigen Aussehen. *Rechts*: Ausdifferenzierte Podozyten (37°C) mit baumartigen Fortsätzen. Vergrößerung 20x.

Einfrieren und Auftauen der Podozyten

Die konfluierenden Zellen in der Proliferationsphase (33°C) wurden zunächst wie bei der Zellpassage mit PBS gewaschen, mit Trypsin/EDTA von der Kulturflasche abgelöst und zentrifugiert. Das hier verwendete Medium setzt sich aus RPMI 1640-Medium mit 10% FBS und 6% DMSO zusammen. Nach der Zentrifugation wurde das Pellet mit dem Medium resuspendiert. Je ein Milliliter der Suspension wurde in ein Kryoröhrchen gegeben und in einer Kryobox für 48 Stunden bei - 80°C gefroren. Anschließend wurde die Suspension im Flüssigstickstoff aufbewahrt.

Für das Auftauen der Zellen wurde zuerst eine mit Collagen A beschichtete Kulturflasche vorbereitet. Die Kryogefäße aus dem Flüssigstickstoff wurden innerhalb von zwei Minuten im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Die Zellen wurden nach dem Auftauen für fünf Minuten bei 2300 r.p.m. zentrifugiert, das Pellet schließlich resuspendiert und in die Kulturflasche gegeben. Das Medium enthielt ein RPMI 1640-Medium mit 10% FBS, 1% PS und 50 U/ml IFN- γ . Die IFN- γ Konzentration wurde innerhalb der ersten Woche nach dem Auftauen langsam auf 10 U/ml gesenkt. Die aufgetauten Podozyten wurden letztlich im Wärmeschrank bei 33°C zur Proliferation platziert.

Zellzählung

Die Podozyten wurden, wie bereits erwähnt, zum Aufsplittern vorbereitet. Nach der Zentrifugation wurde das Pellet mit 1 ml Medium resuspendiert, davon wurden 50 μ l mit 50 μ l PBS gemischt. Von dieser Mischung wurden wieder 50 μ l mit 50 μ l Trypanblau gemischt. Diese 100 μ l wurden in eine Zählkammer aufgetragen und die lebenden (hellen) Zellen wurden unter dem Lichtmikroskop abgezählt. Die Zellzahl pro Milliliter wurde mit folgender Formel berechnet: (Gezählte Zellen/Anzahl der ausgezählten Großquadrate) * Verdünnung * 10^4 = Zellzahl/ml.

Stimulation der Podozyten

3P-RNA (5'-PPP-GAAAAGGGGACACACACACACACACACAC-3')

Lipofectamine™ 2000	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Mouse Interferon-β	PBL Biomedical, Piscataway, NJ, USA
Non-CpG dsDNA (sense 5'-TACAGATCTACTAGTGATCTATGACTGATCTGTACATGATCTACA-3')	
Opti-MEM®	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Pam3CSK4 (Pam3Cys)	InvivoGen, Toulouse, Frankreich
Poly I:C	Invivogen, Toulouse, Frankreich
Polymyxin B	Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Rat monoclonal antibody against Mouse IFN-α	PBL, Piscataway, NJ, USA
Rat monoclonal antibody against Mouse IFN-β	PBL, Piscataway, NJ, USA
Recombinant murine Interferon-α	AbD Serotec, Martinsried, Deutschland
Recombinant murine Interferon-γ	Peppo Tech INC., London, UK
R848 Imidazoquinoline Compound	InvivoGen, Toulouse, Frankreich
Tumor necrosis factor alpha (TNF-α)	ImmunoTools GmbH, Friesoythe, D
Ultra Pure E. Coli LPS	InvivoGen, Toulouse, Frankreich

Die Stimmulationsversuche sind mit ausdifferenzierten Podozyten durchgeführt worden, also nach mindestens 10 Tagen im Wärmeschrank bei 37°C und unter Abwesenheit von IFN-γ. Es wurde ein RPMI-Medium mit 10% FBS benutzt. Bei allen Versuchen waren die Podozyten zu 90-95% konfluent. Je nach Experiment sind die Zellen in 6-well-Platten mit 2 ml Medium, 12-well-Platten mit 1 ml Medium oder in 24-well-Platten mit 0,5 ml Medium kultiviert. Anschließend sind die Überstände für ELISAs gesammelt oder die Zellen von der Platte für die RNA-Gewinnung abgekratzt worden. Um einer LPS-Kontamination entgegen zu wirken, wurden die Zellen eine halbe Stunde vor der Stimulation mit Polymyxin B inkubiert. Bei der

Transfektion mit Lipofectamin wurde die Ligand- und Lipofectaminmenge im Verhältnis von 1:1 gehalten. Zuerst wurde die Ligandenmenge (Eppendorfgesäß A) und die Lipofectaminmenge (Eppendorfgesäß B) jeweils in 25 µl Opti-MEM gegeben und hinterher gemischt. Dann wurde die Mischung vom Eppendorfgesäß B in das Eppendorfgesäß A gegeben und gemischt, einschließlich 20 Minuten inkubiert.

2.3 ELISA

Das *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) ist ein immunologisches Nachweisverfahren, das auf einer enzymatischen Farbreaktion basiert. Mit Hilfe dieses Verfahrens können zum Beispiel Proteine, Viren und auch niedermolekulare Verbindungen wie Hormone, Toxine und Pestizide nachgewiesen werden. Hierbei macht man sich die Eigenschaft spezifischer Antikörper zunutze, sich an den nachzuweisenden Stoff zu binden. Die Antikörper oder Antigene werden zuvor mit einem Enzym gekoppelt. Die durch das Enzym katalysierte Reaktion dient als Nachweis für das Vorhandensein des untersuchten Proteins. Die ELISAs dieser Arbeit wurden laut Herstellerprotokoll durchgeführt.

di-Natriumphosphat (Na_2HPO_4)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Fötales bovines Serum (FBS Superior)	Biochrom KG, Berlin, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumcarbonat (Na_2CO_3)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tween-20	Fluka, Sigma Aldrich, Deisenhofen, D

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

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

Interleukin 6 ELISA

IL-6 ELISA Set BD OptEIA™

BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland

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

Beschichtungspuffer: 8,4 g NaHCO₃, 3,56 g Na₂CO₃ gelöst in 1 l doppelt deionisiertem Wasser, pH 9,5

Waschpuffer: PBS + 0,05% Tween-20

Probenverdünner: PBS mit 10% FCS

Zuerst wurde eine 96-well-Platte mit 100 µl/well in Beschichtungspuffer gelöstem Bindeantikörper (Verhältnis 1:250) codiert, verschlossen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nächstfolgend wurde die Platte drei mal mit 30 µl/well Waschpuffer gewaschen und mit 200 µl/well Probenverdünner (*assay diluent*) geblockt. Nach einer Stunde Inkubation wurde die Platte nochmals dreimal gewaschen. Danach erfolgte die Auftragung von je 100 µl/well der Proben, des Standards und des Probenverdünners als Leerwert. Die Verdünnungsreihe des Standards ging von 1000 pg/ml bis 7,8 pg/ml. Die verschlossene Platte wurde dann zwei Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Platte fünfmal gewaschen. Anschließend wurden 100 µl/well Arbeits-Detektor-Reagenz pipettiert und nach einer Stunde Inkubationszeit wurde die Platte siebenmal gewaschen, mit je einer Minute Einwirkzeit zwischen den Waschschritten. Es wurden dann 100 µl/well Substratlösung gegeben und die Platte ohne Deckel für 30 Minuten im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Reaktion mit 50 µl/well Stopplösung gestoppt. Die Absorption wurde innerhalb von 15 Minuten mit Hilfe des ELISA-Lesegeräts bei 450 nm gemessen. Als Referenzwert galt die Absorption bei 620 nm. Der Proteingehalt in pg/ml wurde mittels der Standardkurve aus der Absorption berechnet.

Interleukin 1 β ELISA

IL-1 β ELISA Set BD OptEIA™

BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland

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

Beschichtungspuffer: 7,13 g NaHCO₃, 1,59 g Na₂CO₃ gelöst in 1 l doppelt deionisiertem Wasser, pH 9,5

Waschpuffer: PBS + 0,05% Tween-20

Probenverdünner: PBS mit 10% FCS

Die Durchführung der IL-1 β -ELISA erfolgte annähernd gleich zu dem Ablauf der IL-6-ELISA. Der einzige Unterschied bestand darin, dass bei der IL-1 β -ELISA die 96-well-Platte nach der Inkubation mit dem Arbeits-Detektor-Reagenz fünf Mal gewaschen wurde. Die Verdünnungsreihe des Standards ging von 2000 pg/ml bis 31,3 pg/ml.

Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) ELISA

Mouse MCP-1 ELISA Set BD OptEIA™

BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland

Enthält: *Bindeantikörper*: Anti-Maus MCP-1; *Standard*: rekombinantes Maus MCP-1, lyophilisiert; *Arbeits-Detektor-Reagenz*: Detektions-Antikörper Anti-Maus MCP-1 konjugiert mit *Horseradish-Peroxidase* im Verhältnis 1:250.

Beschichtungspuffer: 11,8 g Na₂HPO₄, 16,1 g NaH₂PO₄ gelöst in 1 l doppelt deionisiertem Wasser, pH 6,5

Waschpuffer: PBS + 0,05% Tween-20

Probenverdünner: PBS mit 10% FCS

Die Beschichtung der Platte mit 100 μ l/well in Beschichtungspuffer gelöstem Bindeantikörper (Verhältnis 1:250) erfolgte über Nacht bei 4°C. Die Platte wurde anschließend aspiriert und

dreimal mit dem Waschpuffer gewaschen. Danach wurde die Platte mit 200 µl/well Probenverdünner (*assay diluent*) geblockt. Nach einer Stunde Inkubation wurde die Platte nochmals dreimal gewaschen. Hinterher wurden je 100 µl/well der Proben, des Standards (Verdünnungsreihe 1000 pg/ml bis 7,8 pg/ml) und des *assay diluent* als Leerwert aufgetragen. Die Platte wurde verschlossen und zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation folgte ein fünfmaliges Waschen. Es wurden dann 100 µl/well Arbeits-Detektor-Reagenz aufgetragen und nach einer Stunde Inkubationszeit wurde die Platte siebenmal gewaschen. Danach wurden 100 µl/well Substratlösung pipettiert und die Platte ohne Deckel für 30 Minuten im Dunkeln inkubiert. Der Abbruch der Reaktion erfolgte nach der Inkubation mit 50 µl/well Stopplösung. Die Messung der Absorption und die Berechnung des Proteingehalts fanden in gleicher Art und Weise wie bei der IL-6 ELISA statt.

Interferon-γ induced protein 10 kDa (IP-10) ELISA

Mouse CXCL10/IP-10/CRG-2 DuoSet R&D Systems[®], Abingdon, UK

Bovines Serumalbumin, Fraction V (BSA) Roche, Mannheim, Deutschland

Enthält: *Bindeantikörper*: Ratte Anti-Mouse IP-10; *Standard*: rekombinantes Maus IP-10; *Arbeits-Detektor-Reagenz*: biotinierter Detektions-Antikörper Ziege Anti-Maus IP-10, *Horseradish-Peroxidase* markiertes Streptavidin.

PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄,
pH 7,2 - 7,4, 0,2 µm filtriert

Waschpuffer: PBS + 0,05% Tween-20

Probenverdünner: 1% BSA in PBS

Der Beschichtungspuffer wurde mit Bindeantikörper und PBS in einer 2,0 µg/ml Konzentration hergestellt. Die Platte wurde mit 100 µl/well des Beschichtungspuffers über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Platte aspiriert und dreimal mit 300 µl/well Waschpuffer gewaschen. Danach wurde die Platte mit 200 µl/well Probenverdünner geblockt und bei Raumtemperatur für mindestens eine Stunde inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Platte wieder dreimal gewaschen. Dann wurden je 100 µl/well

der Proben, des Standards (Verdünnungsreihe 4000 pg/ml bis 31,25 pg/ml) und des Probenverdünners als Leerwert aufgetragen. Nach einer zweistündigen Inkubation wurde die Platte nochmals dreimal gewaschen. Streptavidin-HRP wurde mit Probenverdünner im Verhältnis 1:200 gemischt und anschließend 100 µl/well der Mischung in die Platte pipettiert. Die verschlossene Platte wurde 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Dann wurde die Platte wieder aspiriert und dreimal gewaschen. Es wurden danach 100 µl/well Substratlösung gegeben und die Platte für 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wurde zuletzt mit 50 µl/well Stopplösung abgebrochen. Die Absorption wurde unverzüglich mittels ELISA-Lesegerät bei 450 nm bestimmt. Die Berechnung der IP-10 Konzentrationen erfolgte mittels der Standardkurve.

Interferon- α ELISA

Interferon- α ELISA Kit

PBL Biomedical Laboratories, Piscataway, NJ, USA

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

Da die 96-well-Platte vorbeschichtet war, wurden zunächst je 100 µl/well der Proben, des Standards (Verdünnungsreihe von 500 pg/ml bis 12,5 pg/ml) und des Verdünnungspuffers als Leerwert aufgetragen. Nach einer Stunde Inkubation wurde die Platte einmal mit Waschpuffer gewaschen und anschließend wurden 100 µl/well der Antikörper-Lösung pipettiert. Die verschlossene Platte wurde für 24 Stunden im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Platte dreimal gewaschen und 100 µl/well der HRP-Konjugat-Lösung gegeben. Nach einer Stunde Inkubation wurde sie viermal gewaschen und 100 µl TMB-Substratlösung/well pipettiert. Die Reaktion wurde nach 15 Minuten mit 100 µl/well Stopplösung abgebrochen. Die Absorption wurde bei 450 nm gemessen und die Interferonkonzentration wurde mit Hilfe der Standardkurve berechnet.

Interferon- β ELISA

Interferon- β ELISA Kit

PBL Biomedical Laboratories, Piscataway, NJ, USA

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

Je 100 μ l/well der Proben, des Standards (Verdünnungsreihe von 1000 pg/ml bis 15,6 pg/ml) und des Probenverdünners als Leerwert wurden auf die vorbeschichtete Platte pipettiert. Die verschlossene Platte wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurde dreimal mit Waschpuffer gewaschen und 100 μ l/well der Antikörperlösung aufgetragen. Die Platte wurde nach einer Stunde Inkubation nochmals dreimal gewaschen. Es folgte die Auftragung von 100 μ l/well HRP-Konjugat-Lösung mit anschließender einstündiger Inkubation und dreimaligem Waschen. Danach wurden 100 μ l/well TMB-Substratlösung aufgetragen. Nach 15 Minuten Inkubationszeit wurde die Reaktion mit Stopplösung beendet. Die Absorption wurde unmittelbar bei 450 nm gemessen.

Interferon- γ ELISA

Mouse IFN- γ ELISA Set BD OptEIA™

BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland

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

Beschichtungspuffer: 8,4 g NaHCO₃, 3,56 g Na₂CO₃ gelöst in 1 l doppelt deionisiertem Wasser, pH 9,5

Waschpuffer: PBS + 0,05% Tween-20

Probenverdünner: PBS mit 10% FCS

Die Beschichtung der 96-well-Platte erfolgte über Nacht bei 4°C mit 100 µl/well in Beschichtungspuffer gelöstem Bindeantikörper im Verhältnis 1:250. Die Platte wurde dann fünfmal mit Waschpuffer gewaschen und anschließend mit 200 µl/well Probenverdünner geblockt. Nach einer Stunde Inkubation wurde sie wiederum fünfmal gewaschen, anschließend folgte die Auftragung je 100 µl/well der Proben, des Standards (Verdünnungsreihe von 1000 pg/ml bis 7,8 pg/ml) und des Probenverdünners als Leerwert. Die verschlossene Platte wurde zwei Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation und fünfmaligem Waschen wurden 100 µl/well des Arbeits-Detektor-Reagenz pipettiert und die Platte wieder für eine Stunde inkubiert. Die Platte wurde dann aspiriert und zehnmal gewaschen, mit je einer Minute Einwirkzeit zwischen den Waschschrinen. Es wurden dann 100 µl/well Substratlösung aufgetragen. Nach 30 Minuten Inkubation im Dunkeln wurde die Farbreaktion mit 50 µl/well Stopplösung gestoppt. Die Absorption wurde innerhalb von 15 Minuten bei 450 nm mittels ELISA-Lesegerät bestimmt. Die Absorption bei 620 nm galt als Referenzwert.

2.4 RNA-Isolation und cDNA-Synthese

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

Hexanucleotide	Roche, Mannheim, Deutschland
Mops	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumacetat (CH ₃ COONa)	Merck, Darmstadt, Deutschland
RNA Sample Loading Buffer	Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
RNeasy Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Superscript II	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

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

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

Die RNA aus Zellkulturmaterial wurde mit dem RNeasy-Kit von Qiagen isoliert. Der Arbeitsplatz war RNasefrei. Während der gesamten Durchführung der Isolation wurden die Proben auf Eis gestellt. Alle verwendbaren Gefäße wurden vorher mit DEPC behandelt.

Zellyse

Es wurde zunächst ein Lysepuffer von RLT-Lyse-Puffer und β -Mercaptoethanol im Verhältnis 100:1 hergestellt. Nach Absaugung des Mediums und einmaligem Waschen mit PBS wurden 350 μ l/well des Lysepuffers gegeben. Jede Vertiefung wurde mit je einem Zellschaber kräftig abgekratzt. Die Zellen wurden zusätzlich durch mehrmaliges Pipettieren zum Platzen gebracht. Die lysierten Zellen wurden in ein frisches DEPC-Eppendorfreaktionsgefäß pipettiert und bei - 20°C eingefroren.

RNA-Isolation

Nach Auftauen der Proben auf Eis wurde 70% nicht vergällter Alkohol im Verhältnis 1:1 (350 μ l) dazugegeben. Die 700 μ l wurden auf die Filtriersäulen transferiert und für eine halbe Minute bei 10 000 r.p.m. zentrifugiert, damit die RNA auf der Membran hängenbleibt. Die

restliche Flüssigkeit im unteren Gefäß wurde entsorgt. Um Ethanol und Reststoffe auszuwaschen, wurden 350 µl RW1-Puffer und bei 10 000 r.p.m. 30 Sekunden zentrifugiert. Inzwischen wurde das DNase-Puffer-Gemisch mit dem DNase-Pulver und 550 µl RNase-freiem Wasser hergestellt. Für jede Probe wurden dann 10 µl der DNase mit 70 µl RDD-Puffer gemischt, anschließend mittig auf die Säule gegeben und 15 Minuten bei RT inkubiert. Nach dem DNase-Verdau wurde die Säule nochmals mit 350 µl RW1-Puffer gewaschen und zentrifugiert. Die Filtriersäulen wurden in neue Gefäße umgesetzt. Anschließend erfolgte ein Waschschrift mit 500 µl RPE-Puffer und Zentrifugation von 15 Sekunden. Die Säulen wurden dann erneut mit 500 µl RPE-Puffer gewaschen und zwei Minuten bei 10 000 r.p.m. zentrifugiert, um jegliche Ethanolreste zu entfernen, welche später die Elution behindern könnten. Nachdem der Überstand abgegossen wurde, wurden die Säulen zwei Minuten bei 13 000 r.p.m. trocken zentrifugiert. Danach wurden die Säulen in neue Eppendorfgefäße überführt, die RNA wurde mit 30 µl RNase-freiem Wasser durch zweiminütige Zentrifugation bei 10 000 r.p.m. eluiert. Die RNA wurde nach der Isolation bei - 80 °C gelagert.

Messen der optischen Dichte

Nach der RNA-Isolation wurde die Konzentration photometrisch bestimmt. Die Proben wurden im Verhältnis 1:50 mit RNase-freiem Wasser (2 µl Probe + 98 µl Wasser) verdünnt. Die 100 µl wurden in die Küvette pipettiert und die Werte für 260 nm, 280 nm und das Verhältnis abgelesen. Das Verhältnis OD_{260}/OD_{280} sollte zwischen 1,7 und 2,2 liegen. Niedrigere Werte deuten auf eine Proteinkontamination hin, höhere auf eine DNA-Kontamination.

Gel-Elektrophorese

Die Reinheit der isolierten RNA wurde mittels Gel-Elektrophorese kontrolliert. Es wurden 5 µl RNA-Ladepuffer mit 2 µl der Probe gemischt und zehn Minuten bei 37°C im Thermomixer gemischt. Anschließend wurde das Gemisch auf das Agarose-Gel aufgetragen und bei 130 V während 20 Minuten laufen gelassen. Die Banden wurden danach in der Dunkelkammer gemessen. Eine Kontamination wurde bei deutlichen Banden ausgeschlossen.

Berechnung der RNA-Konzentration

Für die Umschreibung in cDNA sind 2 µg RNA erforderlich. Die Konzentration der RNA wurde mit der folgenden Formel: $c \text{ (}\mu\text{g/ml)} = \text{Extinktion bei 260 nm} * \text{Verdünnungsfaktor} * 1 \text{ OD (für RNA 40 } \mu\text{g/ml)}$ ausgerechnet.

cDNA-Synthese

Das Volumen, in dem 2 µg RNA enthalten sind, ist zweimal (einmal für cDNA+ und einmal für cDNA-) in ein frisches Eppendorfgefäß aufgetragen und mit Wasser bis auf ein 30 µl Endvolumen vervollständigt worden. Der Mastermix enthielt je Probe 9 µl 5*Puffer, 1 µl 25 mM dNTPS, 2 µl 0,1M DTT, 1 µl 40 U/µl RNase Inhibitor RNasin, 0,5 µl 15 µg/ml *linear Acrylamide* und 0,5 µl *Hexanucleotide*. Außerdem enthielt die cDNA+ Mastermix 1 µl reverse Transkriptase (Superscript), die cDNA- Mastermix anstatt dessen 1 µl RNase freies Wasser. Schließlich wurden 15 µl Mastermix in jede Probe pipettiert. Die Proben wurden eine Stunde im Thermomixer bei 42 °C gemischt. Die cDNA wurde bei -20 °C gelagert oder direkt für eine PCR verwendet.

2.5 Real-time RT-PCR (TaqMan®)

Unter *real time* RT-PCR versteht man eine Vervielfältigungsmethode von cDNA Sequenzen, die zuvor durch reverse in vitro-Transkription der mRNA mittels des Enzyms Reverse Transkriptase synthetisiert wurden. Mit Hilfe der RT-PCR ist es möglich, kleinste Transkriptmengen in Geweben aufzudecken. Außerdem wird die Quantifizierung der gewonnenen DNA durch Fluoreszenz-Messungen ermöglicht. Dafür benötigt man zusätzlich zum sequenzspezifischen *Forward*- und *Reverse*-Primer eine sequenzspezifischen Sonde, die an ihrem 5' Ende mit einem Quencher (TAMRA) und am 3' Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (VIC, FAM oder TET) markiert ist. Der Doppelstrang wird zuerst erhitzt und dadurch aufgespalten. Der Primer und die Sonde lagern sich dann am komplementären Strang an. Die TaqPolymerase besitzt eine 5' → 3' Polymeraseaktivität und eine 5' → 3' Exonukleaseaktivität. Durch letztere ist es möglich, die spezifisch gebundene Sonde in der Elogationsphase zu hydrolysieren und den Farbstoff am 5'-Ende freizusetzen. Dessen

Fluoreszenz kann dann nach Anregung mit einer Wellenlänge von 488 nm bestimmt werden. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge des amplifizierten Produkts zu. Dabei ist der C_T -Wert („*Cycle Threshold*“) oder Schwellenwert-Zyklus ausschlaggebend. Das ist die Zykluszahl, bei der das Reporterfluoreszenzsignal erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt.

18S rRNA (pre-developed TaqMan Assay Reagents)	Applied Biosystems, Darmstadt
EDTA	Merck, Darmstadt, Deutschland
GAPDH (pre-developed TaqMan Assay Reagents)	Applied Biosystems, Darmstadt
TaqMan PCR-Master-Mix	Roche, Mannheim, Deutschland
(enthält AmpliTaq Gold [®] DNA Polymerase, AmpErase [®] UNG, dNTPs mit dUTP, passive Referenz, Puffer)	
Tris (Trihydroxymethylaminomethan)-HCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
<i>TE-Puffer</i> : 10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA	

Verwendete Primer (murin)

CCL5/Rantes Assay ID Mm01302428_m1 FAM 5'-ATCTTGCAGTCGTGTTTGTCACCTCGA-3'

DAI mDai_fwd: CAG GGA AGC ACC CCT CTT AT/ mDai_rev: GAATGAAGCTCCTGGGTCAG

IFN- β AssayID Mm00439546_s1 FAM 5'-TCCACGCTGCGTTCCTGCTGTGTGCTT-3'

IPS-1/Visa AssayID Mm00523168_m1 FAM 5'-AGTGACCAGGATCGACTGCGGGCTT-3'

CXCL10/ IP10 Assay ID Mm00445235_m1 FAM 5'-GACTCAAGGGATCCCTCTCGCAAGG-3'

Mx-1 AssayID Mm00487796_m1 FAM 5'-TGTACTGCTAAGTCCAAAATTAAAG-3'

MDA5 AssayID Mm00459183_m1 FAM 5'-GACACCAGAGAAAATCCATTTAAAG-3'

RIG-1 AssayID Mm00554529_m1 FAM 5'-CCAAACCAGAGGCCGAGGAAGAGGCA-3'

TLR3 Accession Number AF355152 FAM 5'-CACTTAAAGAGTTCTCCC-3'

TLR7 Accession Number AY035889 FAM 5' -CCAAGAAAATGATTTTAATAAC -3'

TLR9 m-TLR-9-FP1CAATCTGACCTCCCTTCGAGTACTT

m-TLR-9-RP1GCCACATTCTATACAGGGATTGG

Zu Beginn wurden die cDNA+ und die cDNA- Proben im Verhältnis 1:10 mit TE-Puffer gemischt. Der Mix für das Ziel-Gen enthielt je Probe 10 µl Taq-Mix, 1 µl des jeweiligen Primers (*Foward*-, *Reverse*-Primer und Sonde) und 7 µl Wasser. Dieser 18 µl Mix wurde dann zusammen mit 2,2 µl der cDNA RT+ in ein frisches Eppendorfgefäß pipettiert. 18S rRNA wurde als das Referenz-Gen (*Housekeeper*) benutzt. Dazu wurden je Probe 10 µl Taq-Mix, 1 µl 18s rRNA und 7 µl Wasser gemischt und je 20 µl davon plus 2,2 µl der cDNA RT+ in ein Eppendorfgefäß gegeben und gemischt. Danach wurde in jede Vertiefung der 96-well-Platte 20 µl des Ziel-Gen-Mixes und des *Housekeepers* jeweils in Duplikaten pipettiert. Für die cDNA RT- wurden zuerst 20 µl des rRNAMixes auf die Platte aufgetragen, danach 2,2 µl der cDNA RT- dazu gegeben (in Unikaten). Nachdem die Platte mit Folie gut verschlossen wurde, wurde sie in den TaqMan Abi Prism eingeführt. Die Dauer der gesamten *real time* RT-PCR beträgt 1 Stunde 48 Minuten. Die erste Inkubation erfolgte während zwei Minuten bei 50°C, danach 10 Minuten bei 95°C. Die DNA wurde anschließend während 40 Zyklen (15 Sekunden bei 95 °C und 1 Minute bei 60°C) vervielfältigt. Für die Auswertung war die Betrachtung der cDNA RT- von Bedeutung. Eine Kontamination wurde dann ausgeschlossen, wenn diese Werte mehr als fünf von der cDNA RT+ abwichen. Die Werte waren in diesem Fall verwendbar, danach wurde für jede Probe der *Houskeeper* von dem Wert des Ziel-Gens abgezogen und 2^x berechnet.

2.6 Viabilitätsassay

CellTiter 96[®]A Q_{ueous} One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) Promega, Mannheim

Das Prinzip des Proliferationsassays beruht darauf, dass reduzierte Produkte, wie NADH oder NADPH, im Stoffwechsel der lebensfähigen Zellen produziert werden. Diese reduzierten Stoffwechselprodukte sind wiederum durch Elektronenumtausch in der Lage, MTS in ein wasserhältiges, lösliches Formazanprodukt zu reduzieren. Abgestorbene Zellen verlieren

schnell diese Fähigkeit. Wird die Absorption bei 492 nm gemessen, ist die Menge an gefärbtem Formazanprodukt direkt proportional zu der lebendigen Zellzahl in der Zellkultur.

Die Zellen wurden zuerst wie oben beschrieben kultiviert. Die Podozyten wurden drei Tagen vor Durchführung des Viabilitätsassays aufgesplittert und in 96-well-Platten (10 000 Zellen/well) in RPMI-Medium mit 10% FBS und 1% PS kultiviert, zusätzlich wurde dieses Medium in Vertiefungen ohne Zellen als Leerwert aufgetragen. Die Stimulation mit den Liganden erfolgte nach Mediumwechseln jeweils 24 und 72 Stunden vor Durchführung des Viabilitätsassays. Nach Ablauf der Stimulationszeit wurden 10 µl/well *One Stop Solution* pipettiert und anschließend wurde die Absorption nach drei Stunden bei 492 nm mittels ELISA-Lesegerät bestimmt.

2.7 Permeabilität mittels Fluorescein-Albumin

Fluorescein-labeled Bovine Serum Albumin	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Millicell [®] Hanging Cell Culture Inserts	Millipore, Billerica, MA, USA
Schwarze 96-well-Platten	Nunc, Langenselbold, Deutschland

Zunächst wurde bei 37°C die Differenzierungsphase der Podozyten für mindestens 10 Tage eingeleitet. Die Zellen wurden dann 24 Stunden vor Stimulation in die Zellkulturinserts umgesetzt, wobei ihre Konfluenz unter dem Mikroskop kontrolliert wurde. Jede Vertiefung enthielt 500 µl Medium, zusätzlich 400 µl Medium ins Zellkulturinsert. Die Stimulation erfolgte mit den verschiedenen Liganden mit und ohne Transfektion mit Lipofectamine. Vier Stunden nach Stimulation wurden 40 µl (0,5 mg/ml) Fluorescein-Albumin in jedes Zellkulturinsert aufgetragen. Es wurde steril und im Dunkeln gearbeitet. Die Messungen wurden nach 6, 24, 48 und 72 Stunden durchgeführt. Dafür wurden 100 µl von jeder Vertiefung entnommen, das gleiche Volumen wurde mit einem frischen Medium ersetzt. Diese 100 µl wurden in eine schwarze 96-well-Platte aufgetragen, anschließend wurde die Fluoreszenzintensität mittels ELISA-Lesegerät bei 485 nm Erregung (*Excitation*) und 535 nm Emission gemessen.

2.8 Zellfärbung

Bovines Serum Albumin (BSA)	Roche, Mannheim, Deutschland
Dubelcco´s PBS (1x)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
Fischgelatine	Merck, Darmstadt, Deutschland
Fötales bovines Serum (FBS Superior)	Biochrom KG, Berlin, Deutschland
Mounting Medium with Dapi	Vector, Burlingame, CA, USA
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Sucrose	Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Triton X-100	Fluka, Sigma Aldrich, Deisenhofen, D

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

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

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

Die Podozyten wurden auf kleine Plättchen, die vor Umsetzung der Zellen in die Vertiefungen einer 12-well-Platte gelegt wurden, kultiviert. Sie wurden unter gleichen Bedingungen wie oben beschrieben gezüchtet. Waren die Zellen zu 90 – 95 % konfluent, wurden sie zunächst auf den Plättchen fixiert, indem nach Mediumabsaugung etwa ein Milliliter PFA in jedes Well gegeben wurde. Nach fünf Minuten Inkubation wurde das PFA abgesaugt und der Tritonpuffer während zehn Minuten aufgetragen. Nach der Tritonpufferentfernung wurde einmalig mit PBS abgespült und dreimal ebenfalls mit PBS für drei Minuten gewaschen. Nach Absaugung des dritten Waschganges wurden die fixierten Zellen auf den Plättchen mit PBS bedeckt. Die Plättchen wurden dann in der 12-well-Platte bei 4°C aufbewahrt, bis die eigentliche Zellfärbung durchgeführt wurde. Für die Zellfärbung wurde zuerst eine dunkle, feuchte Kammer aufgebaut. Die Plättchen wurden darin auf Parafilm gelegt und anschließend mit 150 µl Blockierlösung geblockt. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten wurde die Blockierlösung abpipettiert und 100 µl des verdünnten ersten Antikörpers auf die Plättchen aufgetragen und dann für eine Stunde inkubiert. Nach der Entfernung des ersten Antikörpers wurden die Plättchen dreimal für je

drei Minuten mit PBS gewaschen und anschließend 100 µl des verdünnten zweiten Antikörpers aufgetragen. Der zweite Antikörper wurde nach 45 Minuten entfernt. Anschließend wurden die Plättchen dreimal für je drei Minuten mit PBS und dreimal mit destilliertem Wasser gewaschen. Nachdem das Wasser abpipettiert wurde, wurde das Plättchen vorsichtig mit einem Taschentuch getrocknet. Zum Schluss wurde ein Tröpfchen Einbettmedium auf einen Objektträger aufgetragen und die Plättchen auf die Zellen- und Zellenseite mittig auf das Tröpfchen gelegt. Die Objektträger wurden lichtgeschützt in einer Objektträgermappe bei 4°C aufbewahrt. Die Mikroskopie erfolgte mindestens nach 24 Stunden.

2.9 Durchflusszytometrie

FACS-(*fluorescence activated cell sorter*) Geräte ermöglichen die Immunfluoreszenzanalyse von Zellsuspensionen mit gleichzeitiger Mehrfachfärbung mit fluorochrommarkierten monoklonalen Antikörpern und hohem Probendurchsatz. Bei der Analyse von Zellen werden innerhalb weniger Minuten Phänotypisierungen, Rezeptor/ Ligand-Wechselwirkungen und Funktionsanalysen (z.B. Radikalproduktion, Phagozytose) sowie mögliche Toxizität. Die Zellen werden mit den Antikörpern inkubiert, ungebundene Antikörper durch Abzentrifugieren des Überstandes im Proberöhrchen entfernt und die Zellen mit Puffer resuspendiert. Danach wird die Zellsuspension aus dem Proberöhrchen in das Durchflusszytometer gesaugt. Dabei werden die Zellen in einem Flüssigkeitsstrom vereinzelt und rasen in der Flow-Kammer durch einen Laserstrahl. Größe und Granularität der Zellen beeinflussen die Vorwärts- und Seitwärtsstreuung des Laserlichtes, die mit Photodetektoren gemessen werden, so dass Zellpopulationen sich dadurch einteilen lassen. Die Phänotypisierung mittels CD-spezifischen, monoklonalen Antikörpern ist getrennt für die verschiedenen Populationen möglich. Die Anwendung der Zweifarben- oder Mehrfachfluoreszenz setzt voraus, dass die verschiedenen Fluorochrome, mit denen die Antikörper direkt markiert wurden, verschiedene Emissionswellenlängen bei Anregung im Laserstrahl erzeugen und unterscheidbar bleiben [132].

In der vorgelegten Arbeit wurde die Durchflusszytometrie für den Nachweis der Apoptose von Podozyten nach Stimulation benutzt. Zu diesem Zweck wurden die Zellen mit Annexin und Propidium Jodid (PI) angefärbt. Der Plasmamembranverlust ist eines der frühesten

Kennzeichen von apoptotischen Zellen. Dabei wird das Zellmembran-Phospholipid Phosphatidylserin (PS) von der Innenseite auf die Außenseite der Plasmamembran verlegt. Annexin V ist ein Antikoagulans, das Ca^{2+} -abhängig hochaffin an PS bindet. PI ist in der Lage, die Zellmembran beschädigter Zellen zu passieren und sich im Zellkern an DNS zu binden. Die Doppelfärbung der Zellen mit Annexin V und PI ermöglicht die Abbildung verschiedener Phasen des Zelltodprozesses mittels Durchflusszytometrie.

Annexin V Binding Buffer	BD, Heidelberg, Deutschland
Annexin V-FITC	BD, Heidelberg, Deutschland
Dulbecco's PBS (1x)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
Propodium Jodid Staining-Solution	BD, Heidelberg, Deutschland

Die Zellen wurden zuerst mit den Liganden stimuliert. Nach 24 Stunden wurden sie mit Trypsin-EDTA von den Platten abgelöst, in ein 15 ml Falcongefäß pipettiert und anschließend für fünf Minuten bei 1200 r.p.m. zentrifugiert. Nach Absaugung des Überstandes wurde das Pellet in 300 μl PBS resuspendiert und in zwei Eppendorfgefäße zu je 150 μl aufgeteilt. Danach wurden die Zellen mit je 2 μl Annexin V und 2 μl Propodium Jodid angefärbt und für 30 Minuten im Dunkeln auf Eis inkubiert. Zur Kontrolle wurde das Medium nur mit Annexin oder nur mit Propodium Jodid angefärbt. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit 500 μl PBS gewaschen und für fünf Minuten bei 1300 r.p.m. zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und das Pellet mit 500 μl PBS resuspendiert. Es erfolgte noch ein zweiter Waschschrift mit PBS und Zentrifugation. Anschließend wurde das Pellet mit 400 μl Bindepuffer resuspendiert. Diese Suspension wurde in FACS-Röhrchen versetzt und lichtgeschützt auf Eis bis zur Messung aufbewahrt. Die FACS-Analyse erfolgte mit Hilfe des FACScalibur-Gerätes und entsprechender CellQuest Software von BD Pharmingen.

2.10 Statistische Auswertung

Die angegebenen Werte sind als Mittelwert \pm *standard error of the mean* (SEM) dargestellt. Die Fehlerbalken repräsentieren den *standard error of the mean* (SEM), welcher den Quotienten aus Standardabweichung und Quadratwurzel aus der Anzahl der Proben abbildet. Einzelne Gruppen wurden mit Hilfe von zweiseitig gepaartem Student's T-Test verglichen. Der Vergleich mehrerer Gruppen erfolgte mittels ANOVA (analysis of variance) mit anschließender Benferroni-Korrektur. Als statistisch signifikant wurde ein p-Wert von $< 0,05$ angenommen.

Drittes Kapitel:

Ergebnisse

3 Ergebnisse

3.1 Toll-like Rezeptor-Expression auf Podozyten

Bislang wurden 10 humane und 12 murine TLRs identifiziert (siehe 1.4.1.). Um die Expression dieser TLR in Podozyten näher zu untersuchen, wurden sie für drei Stunden mit LPS und Pam3Cys, Liganden für jeweils TLR4 und 1-2, in drei verschiedenen Konzentrationen stimuliert. Um ein Entzündungsmodell zu erzeugen wurden die Zellen zusätzlich mit je 1 $\mu\text{g/ml}$ TNF- α und IFN- γ stimuliert. Anschließend wurde die *real time* RT-PCR für TLR1-9 und 11 durchgeführt (Abbildung 19). Es zeigte sich eine basale Expression aller genannten TLRs mit Ausnahme von TLR8. Die basale Expression von TLR3 war bei beiden Modellen am stärksten. Die Expression von TLR1-2 war, wie erwartet, am stärksten nach Pam3Cys Stimulation. Die Expression von TLR5-9 und 11 wurde weder bei LPS noch bei Pam3Cys hochreguliert.

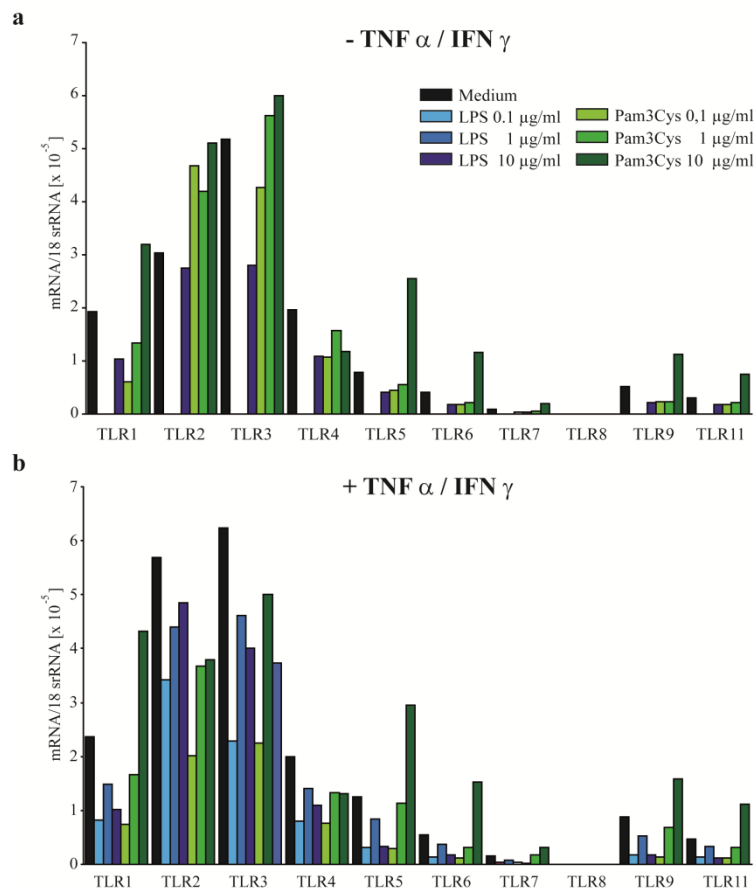


Abbildung 19. Toll-like Rezeptor-Expression auf Podozyten. **a** TLR3 wird basal genauso wie im Entzündungsmodell (**b**) am stärksten exprimiert. Die Stimulation mit Pam3Cys reguliert die Expression von TLR1-2 in beiden Modellen hoch. TLR5-7, 9 und 11 werden weder nach LPS- noch nach Pam3Cys-Stimulation hochreguliert.

3.2 Pathogenerkennungsrezeptoren in Podozyten

Die Aktivierung der Podozyten durch Nukleinsäuren wird vermutlich, wie bei dendritischen Zellen, durch Rezeptoren der RNA- und DNA-Erkennung vermittelt. Bezüglich der Expression von Toll-like Rezeptoren in Podozyten ist in der Literatur bis dato nur bekannt, dass sie in der Lage sind, TLR1-9 und 11 zu exprimieren und dass TLR4 bei membranoproliferativer Glomerulonephritis hochreguliert wird [137]. Es ist bekannt, dass während der antiviralen Immunantwort die Synthese von Pathogenerkennungsrezeptoren in dendritischen Zellen vom Typ-I Interferon stark induziert wird [138]. Bezogen auf diese Überlegung wurde unter basalen Bedingungen und nach Stimulation mit Interferon β die Expression von TLR3, 7 und 9 genau so wie die von zytosolischen Nukleinsäurerezeptoren gemessen. RIG-I und MDA5 stellen Moleküle der RNA-Erkennung mit Ihrem Adaptarmolekül IPS1, DAI Moleküle der DNA-Erkennung dar. Die Expression wurde mit Hilfe quantitativer *real-time* RT-PCR untersucht.

Für die Bestimmung der Expression von Pathogenerkennungsrezeptoren in Podozyten wurden die Zellen mit IFN β 1000 U/ml stimuliert. Die mRNA-Expression der Rezeptoren TLR3, TLR7, TLR9, RIG-1, MDA5, DAI und des Adaptormoleküls IPS-1 wurde anschließend nach drei, sechs und neun Stunden bestimmt (Abbildung 20).

Es zeigte sich, dass Podozyten Nukleinsäure-Rezeptoren unter basalen Bedingungen nur sehr schwach exprimieren. Jedoch steigt schon drei Stunden nach Stimulation mit Interferon β die Expression von TLR3, RIG-1, MDA5 und DAI stark an. TLR7 wird weder basal noch nach IFN- β Stimulation bedeutend exprimiert. TLR9 wird basal und nach IFN- β Stimulation sehr schwach exprimiert. Das mitochondriale Adaptermolekül IPS-1 wird basal und nach Zugabe von IFN- β stark exprimiert. Die Expression von TLR3 und MDA5 nach IFN- β Stimulation nimmt nach neun Stunden wieder langsam ab, bei DAI ist diese Tatsache umgekehrt.

Daraus folgend besitzen Podozyten vor allem nach IFN- β Stimulation auf Transkriptionsebene die Rezeptoren TLR3, RIG-1, MDA5 und DAI, sowie das Adaptarmolekül IPS-1. Jedoch fehlt bei diesen Zellen der TLR7.

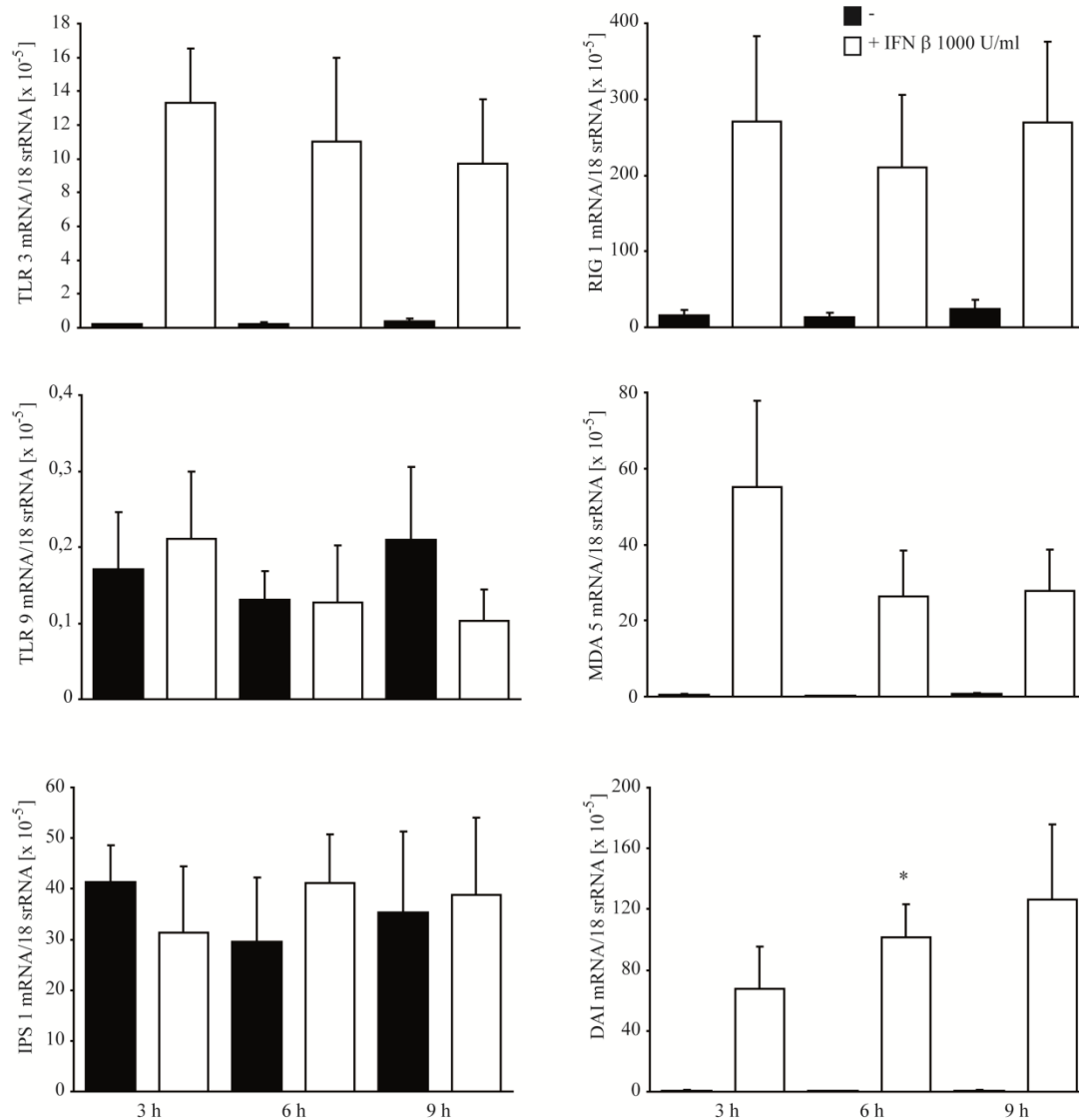


Abbildung 20. Podozyten exprimieren Rezeptoren der RNA- und DNA-Erkennung auf Transkriptionsebene. Die Expression von diesen Rezeptoren wird von Interferon β induziert. Die Podozyten wurden wie bereits beschrieben kultiviert und anschließend mit 1000 U/ml IFN- β stimuliert. Die mRNA wurde nach drei, sechs und neun Stunden gesammelt und nächstfolgend die Expression von Molekülen der RNA- (TLR3, RIG-1, MDA5), DNA-Erkennung (TLR9, DAI) und des Adaptermoleküls IPS1 mittels *real-time* RT-PCR bestimmt. Die Expression von TLR3, RIG-1, MDA5 und DAI nimmt nach IFN- β Zugabe schon nach drei Stunden stark zu. Bei TLR3 und MDA5 nimmt sie nach neun Stunden langsam ab, bei DAI im Gegensatz zu. Die Expression von TLR9 steigt nach IFN- β Stimulation nicht bedeutend. Das Adaptermolekül IPS1 wird schon basal sowie nach IFN- β Zugabe stark exprimiert. Die Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert zweier unabhängiger Experimente \pm SEM. * $p < 0.05$ vs. Medium.

3.3 Synthese proinflammatorischer Zytokine, Chemokine, Typ-I IFN und IFN induzierter Mx-Proteine durch Podozyten nach IFN- β Stimulation

Podozyten exprimieren Pathogenerkennungsrezeptoren für die RNA- und DNA-Erkennung vor allem nach IFN- β Stimulation. Wichtig zu wissen ist auch, ob Podozyten nach dieser Aktivierung in der Lage sind, andere entzündungsspezifische bzw. fördernde Proteine zu exprimieren.

Es wurde die Expression durch VGEC von je einem Zytokin (IP-10/CXCL10), einem Chemokin (CCL5/Rantes), einem Typ-I Interferon (IFN- β) und einem IFN induzierten Mx-Protein (Mx1) basal und nach IFN- β 1000 U/ml nach drei, sechs und neun Stunden mittels real time RT-PCR untersucht (Abbildung 21).

Die Expression von IP10 nach IFN- β Stimulation war nach drei Stunden am stärksten und nahm nach neun Stunden um mehr als die Hälfte wieder ab. Die Expression von CCL5/Rantes und Mx1 war sechs Stunden nach IFN- β Zugabe am bedeutendsten. Interferon β wurde schon basal exprimiert und nimmt nur minimal nach IFN- β Stimulation zu.

Die basale Produktion von IP10, CCL/Rantes und Mx1 ist bei Podozyten gleich null zu setzen. Die Expression dieser Entzündungsproteine nimmt aber nach Stimulation der Zellen mit IFN- β stark zu. Die basale Produktion von IFN- β in VGEC wird nicht vorzüglich durch IFN- β Zugabe weiter gesteigert.

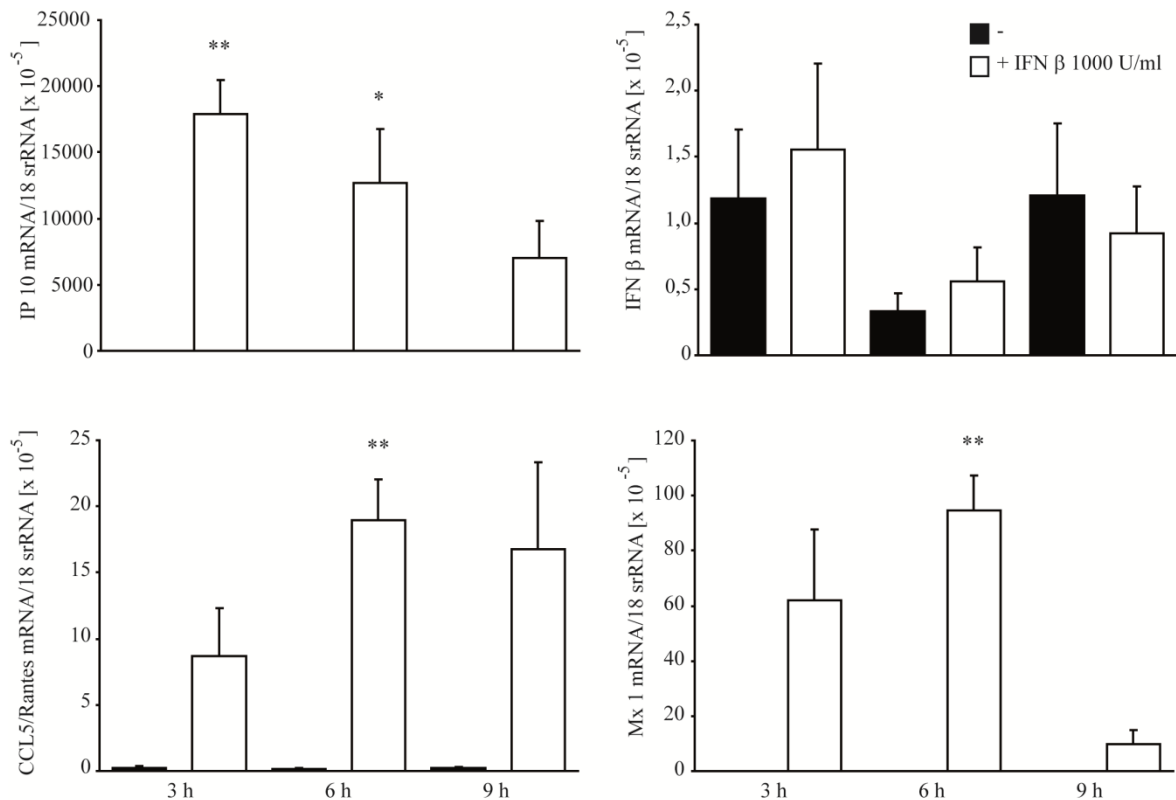


Abbildung 21. Podozyten exprimieren Zytokine, Chemokine, Typ-I Interferone und IFN induziertes Mx-Protein auf Transkriptionsebene. Die Podozyten wurden wie bereits beschrieben kultiviert und anschließend mit 1000 U/ml IFN- β stimuliert. Die mRNA wurde nach drei, sechs und neun Stunden gesammelt und die Expression von IP10, CCL5/Rantes, IFN β und Mx1 mittels *real time* RT-PCR bestimmt. IP10, CCL5/Rantes und Mx1 werden basal nicht exprimiert, ihre Expression nimmt aber nach Gabe von 1000 U/ml IFN- β stark zu. IFN- β wird als einziges Entzündungsprotein basal exprimiert. Die Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert zweier unabhängiger Experimente \pm SEM. * $p < 0.05$ vs. Medium, ** $p < 0.01$ vs. Medium.

3.4 Virale Nukleinsäuren stimulieren die Produktion von Typ-I Interferon in Podozyten

Die angeborene RNA- und DNA-Erkennung umfasst TLR-abhängige und TLR-unabhängige Signalkaskaden [139]. Es wurde berichtet, dass virale 5'-Triphosphate RNA (3P-RNA) und nicht-CpG-DNA (non-CpG DNA) in kultivierten dendritischen Zellen TLR-unabhängig die Produktion von Zytokinen triggern können [140, 141]. Interferon α und β werden nach Aktivierung dieser Pathogenerkennungsrezeptoren von dendritischen Zellen als Antwort auf eine virale Infektion synthetisiert.

Um die Produktion von Interferonen in Podozyten näher zu betrachten, wurden die Podozyten bis zur Ausdifferenzierung kultiviert und anschließend für 24 Stunden mit den verschiedenen Liganden in unterschiedlichen Konzentrationen stimuliert. Poly I:C ist eine synthetische Doppelstrang-RNA und Ligand für den TLR3 [142]. 3P-RNA ist der Ligand für den RIG-I

Rezeptor [140]. Der vor kurzem entdeckte DAI-Rezeptor wird vermutlich durch nicht-CpG-DNA aktiviert [143, 144]. Damit die viralen Nukleinsäuren ins intrazelluläre Zytosol gelangen und dort über die Rezeptoren erkannt werden konnten, wurden die Liganden vor der Stimulation mit kationischen Lipiden komplexiert (siehe 2.2). Da der CpG-DNA-spezifische Rezeptor (TLR9) unter normalen Bedingungen in renalen Parenchymzellen nicht exprimiert wird [145], wurden die Zellen als Negativkontrolle mit CpG-DNA stimuliert. Nach der Stimulation wurden die Zellüberstände gesammelt und der Gehalt an Typ-I Interferone (IFN α und IFN) und Typ-II Interferone (IFN- γ) mittels ELISA bestimmt.

Es zeigte sich, dass in Podozyten IFN- α im Gegenteil zu IFN- β nur minimal basal produziert wird (Abb. 22). Komplexe aus Poly I:C-RNA und kationischen Lipiden führen zu einer minimalen Steigerung der Produktion von IFN- α im Vergleich zu der Kontrollgruppe; die IFN- β Produktion nimmt dagegen stark zu. Werden die Zellen allein mit Poly I:C-RNA stimuliert, findet keine Interferonproduktion statt. Die Ausschüttung von IFN- α nach Stimulation mit 3P-RNA ist sogar kleiner als die basale Expression und aus diesem Grund von geringerer Bedeutung. Eine IFN- β Produktion findet nur bei Komplexierung von 3P-RNA mit einem kationischen Lipid statt. Die IFN- α Produktion nach Stimulation der Zellen mit Non-CpG-DNA ist bedauerlicherweise nicht eindeutig. Eine IFN- β Produktion gibt es auch hier erst nach Komplexierung der Non-CpG-DNA mit einem CL. Die Produktion von Interferon- γ wurde ebenfalls per ELISA bestimmt, da aber keines der verwendeten Stimulantien dessen Synthese induziert hat, wird hier auf den Graphen verzichtet.

Die vorgelegten Daten zeigen, dass Podozyten zur Produktion von großen Mengen Typ-I Interferonen (vor allem IFN- β) fähig sind, wenn diese durch virale RNA und DNA, die mit kationischen Lipiden komplexiert sind, angeregt werden. Sind die Nukleinsäuren nicht mit CL komplexiert, hat die Gabe der Stimulantien keinen wichtigen Effekt, ebenso unwichtig ist die Gabe vom kationischen Lipid alleine. Die Expression von Typ-II Interferon- γ wurde ebenfalls gemessen, da diese negativ war, werden die Daten hier nicht aufgeführt.

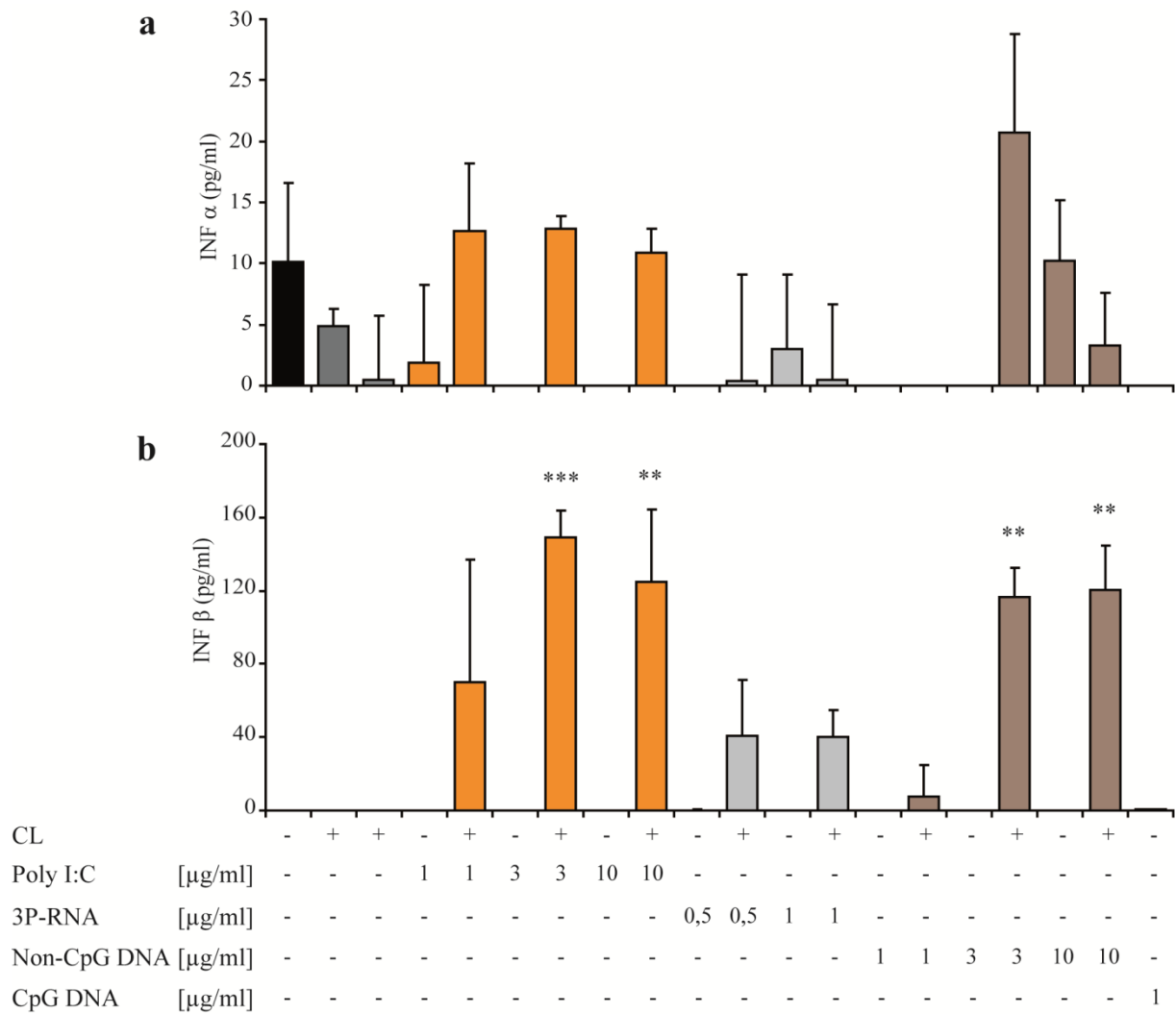


Abbildung 22. Produktion von Typ-I Interferonen durch viszeral glomeruläre Epithelzellen nach Stimulation mit synthetischer viraler RNA oder DNA. Murine Podozyten wurden in zunehmenden Konzentrationen mit Poly I:C-RNA, 3P-RNA oder Non-CpG-DNA stimuliert, jeweils alleine oder komplexiert mit kationischen Lipiden (CL, Lipofectamine®). Als Negativkontrolle wurde die Interferonproduktion nach CpG-Stimulation verwendet. Die Konzentrationen der Typ-I Interferone IFN- α (a) und - β (b) sowie des Typ-II Interferons IFN- γ (nicht im Diagramm gezeigt, da nicht nachweisbar) wurden im Zellüberstand mittels ELISA nach einer 24 Stunden Stimulation gemessen. Podozyten produzieren Typ-I Interferone, vor allem IFN- β , nach Stimulation mit komplexierter viraler RNA oder DNA. Die Daten zeigen den Mittelwert zweier unabhängiger Experimente \pm SEM. ** p < 0.01 vs CL, *** p < 0.001 vs CL.

3.5 Virale RNA und DNA induzieren die Expression von IL-6, IL-1 β und MCP-1 in Podozyten

Interleukine werden von verschiedenen Zellen des Immunsystems überwiegend nach Stimulation durch Interferone, Zytokine, Mikroorganismen, Antigene, Lektine oder Lipopolysaccharide gebildet und sezerniert. Sie wirken durch die Bindung an spezifische Rezeptoren auf der Oberfläche immunologisch aktiver Zellen. Auch Zellen, die nicht dem Immunsystem zugerechnet werden, verfügen über derartige Rezeptoren und werden durch Interleukinbindung beeinflusst. Interleukin 6 (IL-6) hat ein Molekulargewicht von 21,5-28 kDa und wird hauptsächlich von Makrophagen und T-Zellen produziert. IL-6 induziert die Synthese und Freisetzung von Akutphaseproteinen in Hepatocyten und wirkt dadurch proinflammatorisch. Interleukin-1 β (IL-1 β) hat ein Molekulargewicht von 17 kDa, wird vorwiegend von Makrophagen, Monozyten und Endothelzellen synthetisiert und beteiligt sich bei der B-, T- und NK-Zellaktivierung, außerdem bei der Induktion von Fieber über den Hypothalamus [134].

Das *monocyte chemotactic protein-1* (CCL2/MCP-1) gehört zu der Familie der chemotaktischen Cytokine (Chemokine) und zur Untergruppe der CC-Chemokine, weil es an den aminoterminalen Enden zweier direkt nebeneinander liegenden Cysteinresten sitzt. CCL/MCP1 hat ein Molekulargewicht von circa 13 kDa. CCL2/MCP1 wird bei Infektionen oder Entzündungen von aktivierten Monozyten und infizierten Endothelzellen produziert und in der Umgebung des Entzündungsortes ausgeschüttet. CCL2/MCP1 wirkt chemotaktisch auf Monozyten und neutrophile Granulozyten und stellt als inflammatorisches Chemokin ein Mediator der angeborenen Immunantwort dar [134].

Um die Produktion von diesen entzündungsfördernden Proteinen in Podozyten nach Stimulation mit viraler RNA und DNA zu untersuchen wurden die Zellen kultiviert. Um Gewähr zu leisten, dass die Nukleinsäuren ins Zytosol gelangen, wurden diese vor der Stimulation mit kationischen Lipiden komplexiert. Die ausdifferenzierten Podozyten wurden für 24 Stunden stimuliert und danach die Überstände gesammelt. Der Zellüberstand wurde schließlich mittels ELISA auf IL-6 und CCL2/MCP-1 untersucht.

Im ELISA zeigte sich, dass Podozyten zur Produktion von IL-6 und CCL2/MCP-1 (Abb. 23) nur nach Stimulation mit komplexierter 3P-RNA und Nicht-CpG-DNA fähig sind und zwar dosisabhängig. Weder Poly I:C-RNA alleine noch die mit CL komplexierte Poly I:C-RNA

bewirken eine bedeutende Expression von IL-6 oder CCL2/MCP-1. Die Expression von IL-1 β war nur nach Stimulation der Zellen mit komplexierter 3P-RNA von Bedeutung (Abb.24). Hier stieg diese dosisabhängig und nahm nach höherer Dosissteigerung wieder ab.

Podozyten induzieren die Expression von IL-6, IL-1 β und CCL2/MCP-1 nach Erkennung von viraler RNA und DNA durch PRR im Zytosol und können damit zur Verstärkung einer Entzündung beitragen.

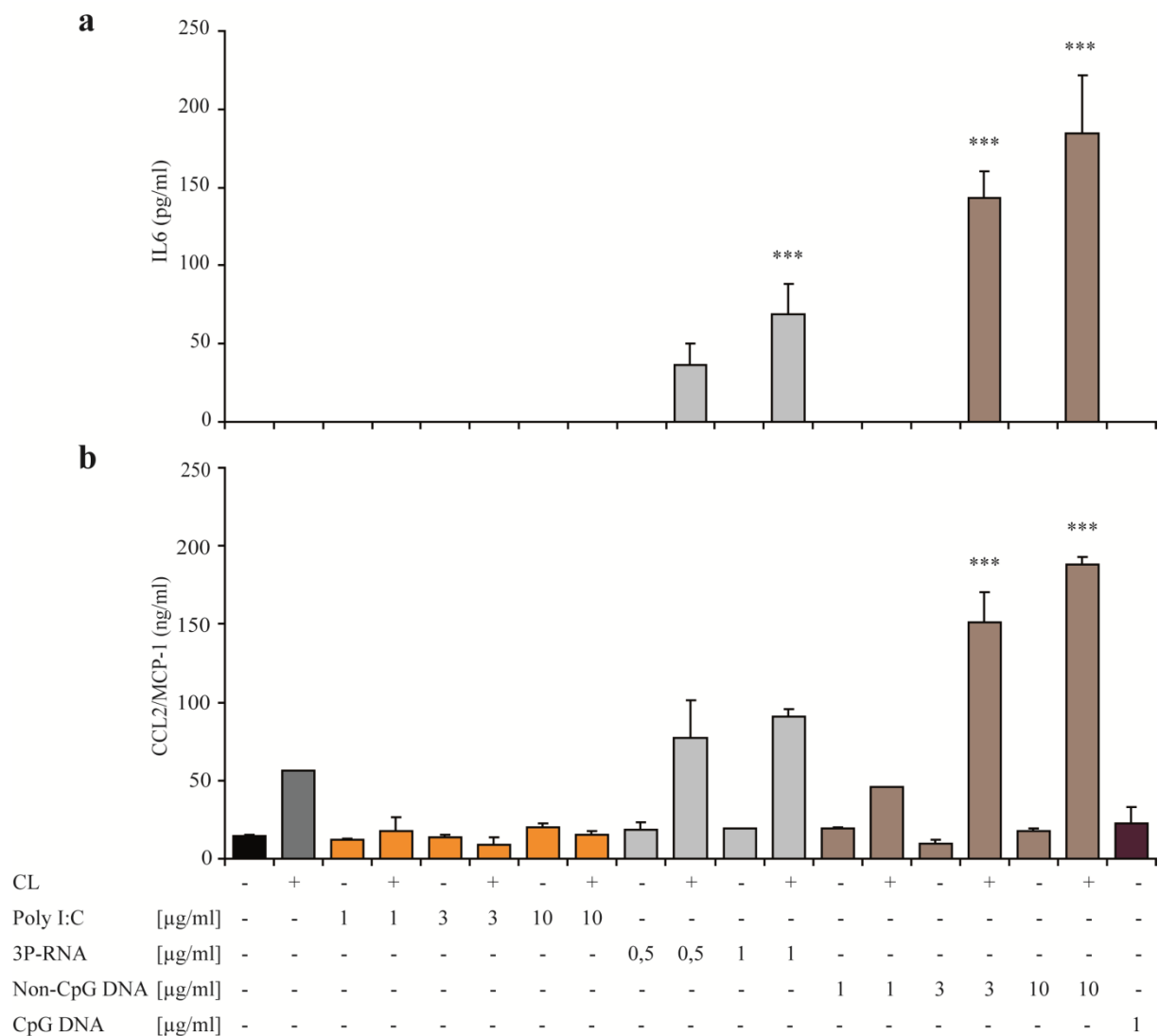


Abbildung 23. Podozyten produzieren nach Stimulation mit 3P-RNA und doppelsträngiger DNA proinflammatorische Interleukine und Chemokine. Die ausdifferenzierten Podozyten wurden in aufsteigender Konzentration mit Poly I:C-RNA, 3P-RNA oder Non-CpG DNA, jeweils alleine oder komplexiert mit kationischen Lipiden (CL, Lipofectamine[®]) für 24 Stunden in Kontakt gebracht. Als Kontrolle wurde die alleinige Exposition gegenüber CpG-DNA verwendet. Die Konzentrationen von IL-6 (**a**) und CCL2/MCP-1 (**b**) wurden im Zellüberstand mittels ELISA bestimmt. Sowohl IL-6 als auch CCL2/MCP-1 werden dosisabhängig nach Stimulation mit komplexierter 3P-RNA und Nicht-CpG-DNA produziert. Die Daten sind Mittelwerte \pm SEM von zwei unabhängigen Experimenten, die in Duplikaten analysiert wurden. *** $p < 0.001$ vs CL.

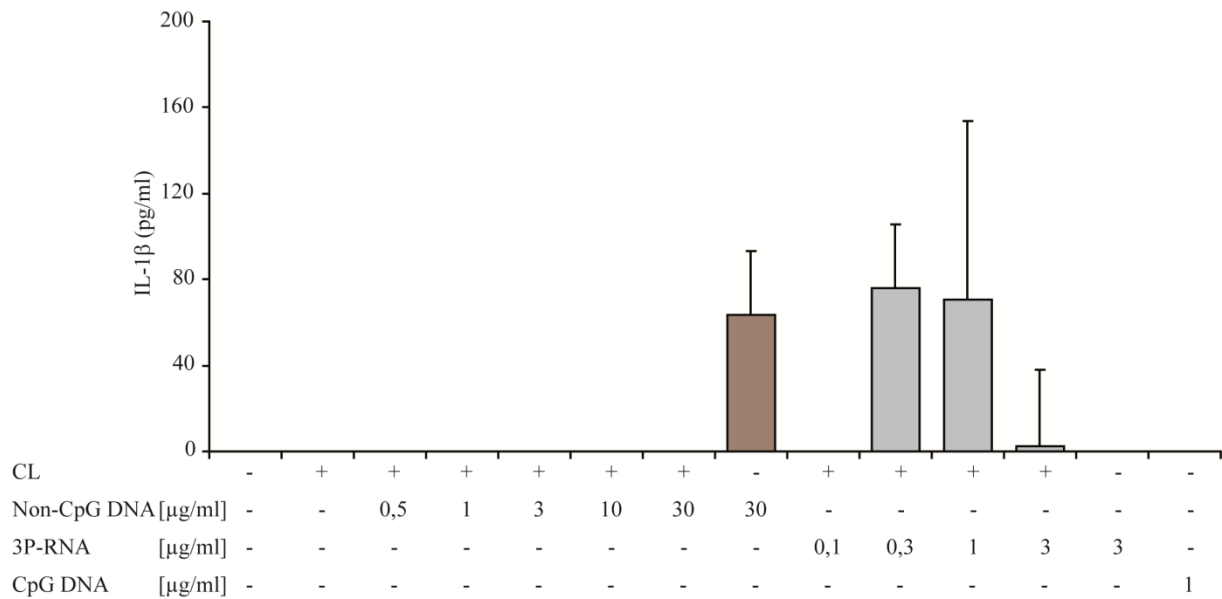


Abbildung 24. Podozyten synthetisieren proinflammatorisches Interleukin 1 β nach Stimulation mit 3P-RNA. Die ausdifferenzierten VGEC wurden in aufsteigender Konzentration entweder mit 3P-RNA oder Non-CpG DNA im Komplex mit kationischen Lipiden (CL, Lipofectamine[®]) während 24 Stunden stimuliert. Als Kontrolle wurde die alleinige Exposition gegenüber CpG-DNA verwendet. Im Zellüberstand wurde die Konzentration von IL-1 β mittels ELISA gemessen. Die Expression von IL-1 β in Podozyten findet lediglich dosisabhängig nach Stimulation mit komplexierter 3P-RNA statt. Die Daten zeigen Mittelwerte \pm SEM von zwei unabhängigen Experimenten, die in Duplikaten analysiert wurden.

3.6 Zytokinproduktion nach exogener Typ-I und -II Interferonen Exposition

Wie im Abschnitt 3.4. gezeigt wurde, sind Podozyten nach Stimulation mit komplexierten Stimulantien zur Produktion von Typ-I Interferonen fähig. Um festzustellen, ob Podozyten auch durch Typ-I (α und β) und -II (γ) Interferone stimuliert werden, wurden die Zellen mit verschiedenen Dosen Interferon- α , - β und - γ für 24 Stunden inkubiert. Die Proteinkonzentration im Zellüberstand wurde mittels ELISA bestimmt.

Es zeigte sich, dass auf Stimulation mit Typ-I Interferonen die Produktion von großen Mengen von IL-6 folgt. Die hohe Basisexpression von CCL2/MCP-1 nimmt nur minimal dosisabhängig nach IFN- β Stimulation ab, nicht aber nach Stimulation mit IFN- α (Abb.25). Die Stimulation der Podozyten mit Typ-II Interferonen (IFN- γ) bewirkt weder die Produktion von IL-6 noch die von CCL2/MCP-1.

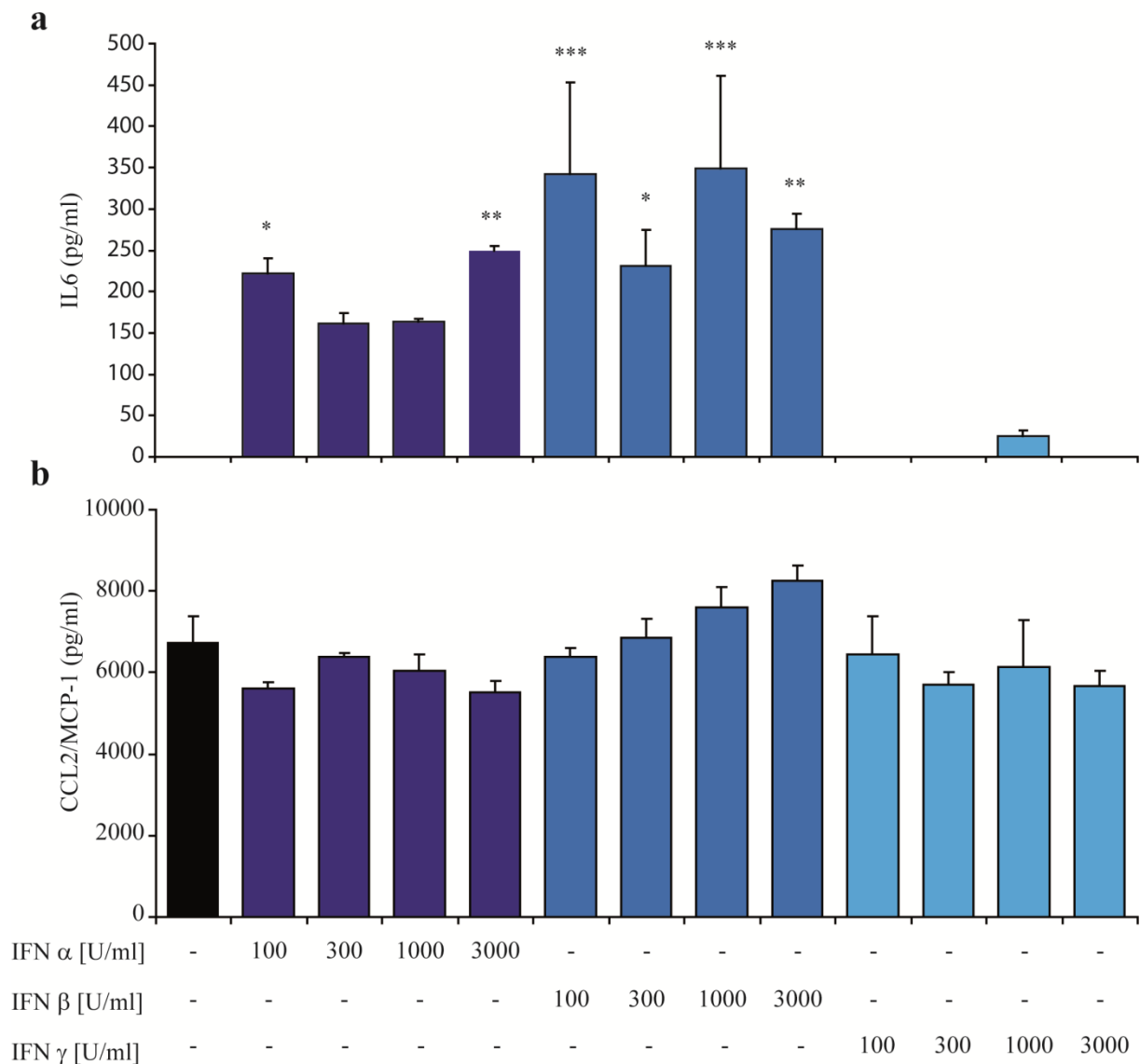


Abbildung 25. Typ-I Interferone induzieren die Produktion von IL-6 und CCL2/MCP1 in Podozyten. Die ausdifferenzierten Podozyten wurden 24 Stunden mit Interferon $-\alpha$, $-\beta$ und $-\gamma$ in den genannten Konzentrationen stimuliert. Die Proteinkonzentration im Zellüberstand wurde mittels IL-6- und CCL2/MCP1-ELISA laut Herstellerprotokoll bestimmt. Vor allem die Produktion von IL-6 in Podozyten wird nach Typ-I Interferon Zugabe gesteigert. Die Daten stellen den Mittelwert \pm SEM aus zwei unabhängigen Experimenten dar. * $p < 0.05$ vs Medium, ** $p < 0.01$ vs Medium, *** $p < 0.001$ vs Medium.

Virale RNA und DNA veranlassen Podozyten zur Produktion von Interleukin-6 (Abb. 23). Was passiert aber mit der Produktion von Interleukinen in durch Interferon vermitteltem entzündlichem Milieu? Verstärkt die Freisetzung von Interferonen die durch virale RNA und DNA ausgelöste Aktivierung von Podozyten? Um diese Frage zu beantworten, wurden die Podozyten mit je 1000 U/ml Interferon- α , $-\beta$ und $-\gamma$ während 24 Stunden vorstimuliert. Danach wurden die Podozyten mit komplexierter 3P-RNA und Nicht-CpG-DNA für weitere

24 Stunden stimuliert. Anschließend wurden die Zellüberstände gesammelt und der Interleukin-6-ELISA durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Produktion von IL-6 nach Vorstimulation mit Typ-I Interferonen (IFN- α und - β), nicht wie erwartet zunimmt, sondern sogar stark abnimmt (Abb. 26 und 27).

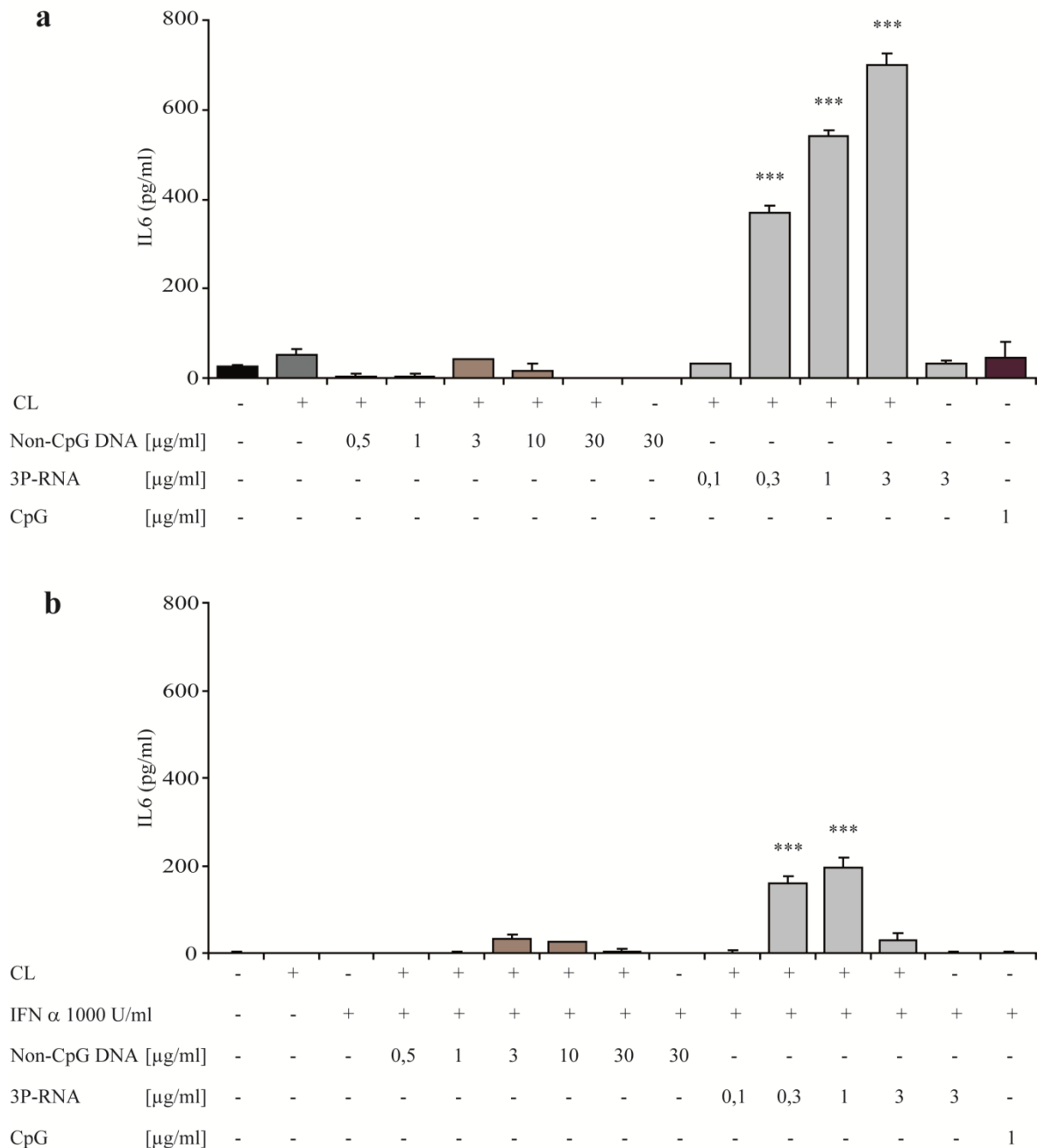


Abbildung 26. Die Vorstimulation mit Typ-I Interferonen erniedrigt die IL-6 Antwort auf Stimulation mit viraler RNA und Doppelstrang-DNA. Die Podozyten wurden mit 1000 U/ml Interferon- α (b), - β und - γ während 24 Stunden vorstimuliert. Danach wurden sie mit 3P-RNA und Nicht-CpG-DNA in den angegebenen Konzentrationen stimuliert. Die Bestimmung des IL-6 Gehalts im Zellüberstand fand nach weiteren 24 Stunden mittels ELISA statt. Die Daten entsprechen dem Mittelwert \pm SEM aus zwei unabhängigen Experimenten. *** $p < 0.001$ vs Medium.

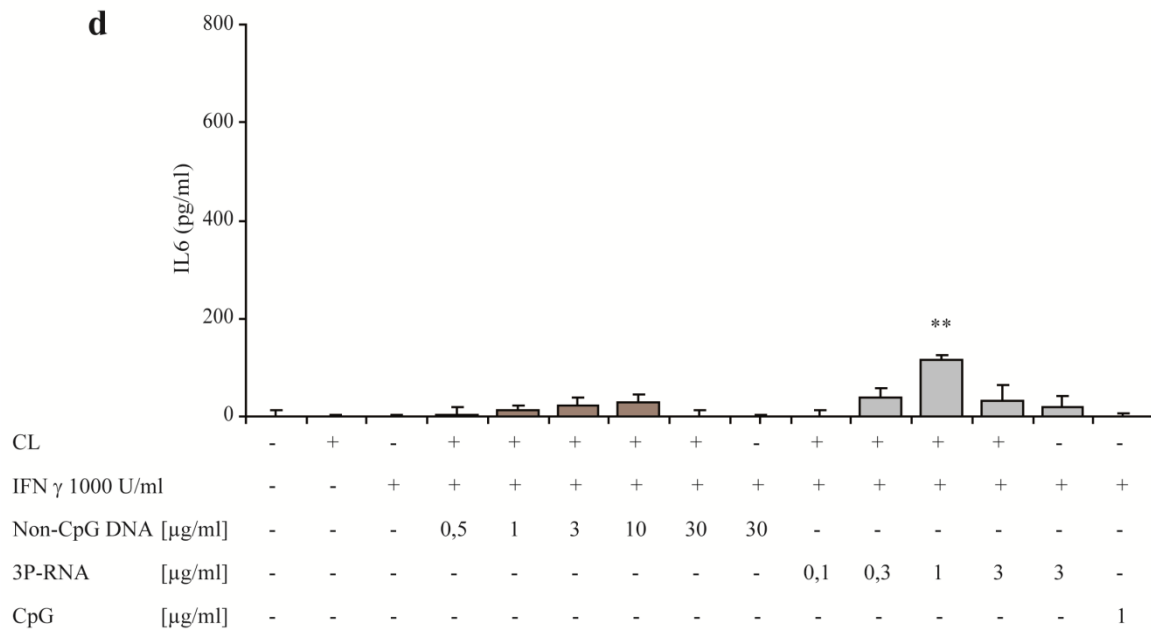
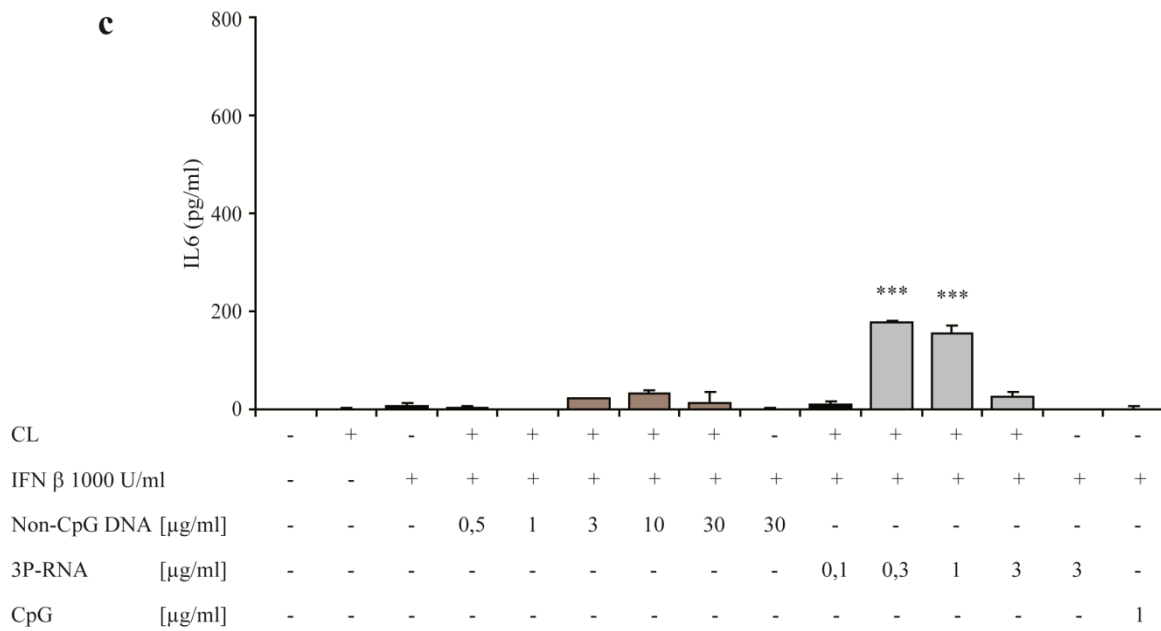


Abbildung 27. Die Vorstimulation mit Typ-I Interferonen erniedrigt die IL-6 Antwort auf Stimulation mit viraler RNA und Doppelstrang-DNA. Die Podozyten wurden mit 1000 U/ml Interferon $-\alpha$, $-\beta$ (**c**) und $-\gamma$ (**d**) während 24 Stunden vorstimuliert. Danach wurden sie mit 3P-RNA und Nicht-CpG-DNA in den angegebenen Konzentrationen stimuliert. Die Bestimmung des IL-6 Gehalts im Zellüberstand fand nach weiteren 24 Stunden mittels ELISA statt. Die Daten entsprechen dem Mittelwert \pm SEM aus zwei unabhängigen Experimenten. *** $p < 0.001$ vs Medium

3.7 Aufnahmemechanismus von viraler RNA und DNA in Podozyten

In dendritische Zellen und embryonalen Fibroblasten muss die doppelsträngige RNA oder DNA in den Intrazellulärraum gelangen, damit diese von zytosolischen Nukleinsäure-rezeptoren erkannt werden [140, 141, 143, 146, 147].

Die vorgelegten Ergebnisse zeigen bis jetzt, dass eine Komplexierung der Nukleinsäuren mit einem kationischen Lipid, um den Transport ins Zytosol zu erleichtern, für merkbare Wirkungen auf die Podozyten zuständig ist. Im folgenden Abschnitt werden die möglichen Membrantransportmechanismen näher untersucht.

Nukleinsäuren dringen über verschiedene Mechanismen in die Zelle hinein. Um diese Aufnahmemechanismen in Podozyten näher zu untersuchen, wurden die Zellen mit unterschiedlichen Inhibitoren des jeweils selektiven Aufnahmeweges prä-inkubiert. Die Podozyten wurden anschließend während 24 Stunden mit komplexierter Nicht-CpG-DNA oder 3P-RNA stimuliert. Nach der Inkubationszeit wurde mittels ELISA die Konzentration des Zytokins CXCL10/IP-10 im Zellüberstand bestimmt. Die Hemmung von endosomaler Ansäuerung und die Aktivierung von TLR3, TLR7 und TLR9 wurde durch Chloroquin erreicht (Abb.28). Cytocholasin D (Cyto) diente zur Verhinderung von Phagozytose, Chlorpromazin (CLP) blockierte die Clathrin-abhängige Endozytose und Methyl- β -Cyclodextrin (M β CD) verhinderte die Caveolae-vermittelte Endozytose (Abb. 29) [148-150].

In diesen Versuchen konnten wir zeigen, dass die endosomale Ansäuerung scheinbar keine Rolle spielt, da die Chemokinproduktion nicht von Chloroquin zu beeinflussen war. Die Produktion von CXCL10/IP-10 nach Stimulation der Podozyten mit komplexierter Nicht-CpG-DNA (Abb. 29a) war nicht signifikant erniedrigt, wenn zuvor mit Cytocholasin D, Chlorpromazin oder Methyl- β -Cyclodextrin präinkubiert worden war. Wurden die Zellen aber mit komplexierter 3P-RNA (Abb. 29b) nach der Präinkubation mit den Inhibitoren stimuliert, zeigte sich, dass die Chemokinproduktion dosisabhängig bei allen drei Inhibitoren der Endozytose abgenommen hat. Aus diesen Ergebnissen lässt sich also schließen, dass die Clathrin-vermittelte Endozytose eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung der Podozyten durch virale RNA spielt.

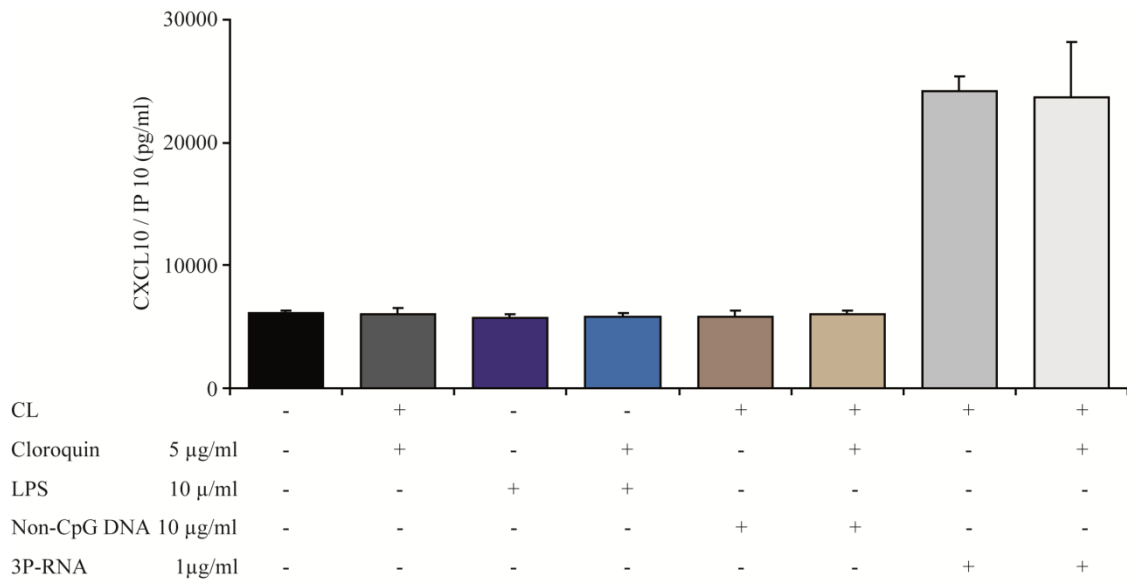


Abbildung 28. Die Chemokinproduktion lässt sich nicht von Chloroquin beeinflussen. Die Podozyten wurden erst nach der Ausdifferenzierung mit 5 µg/ml Chloroquin für zwei Stunden prä-inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Non-CpG DNA oder 3P-RNA im Komplex mit kationischen Lipiden (CL, Lipofectamine®) während 24 Stunden stimuliert und die Konzentration von CXCL10/IP-10 wurde im Zellüberstand mittels ELISA bestimmt. Die Stimulation mit LPS wurde als Negativkontrolle verwendet. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte zweier unabhängiger Experimente ± SEM.

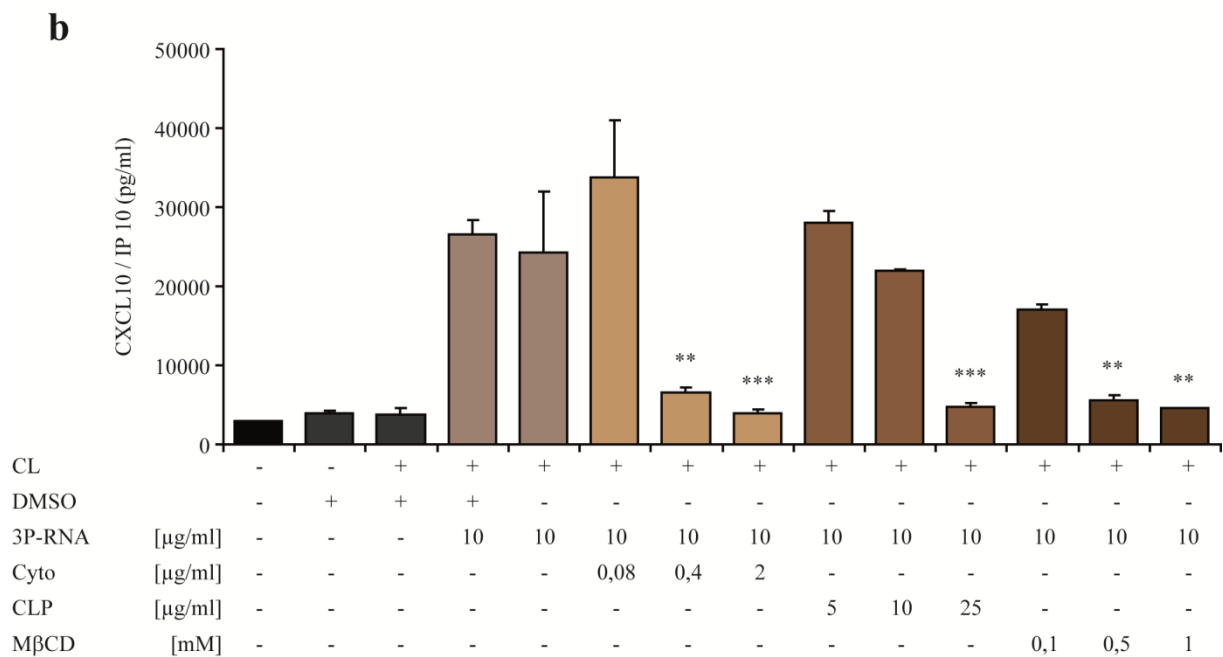
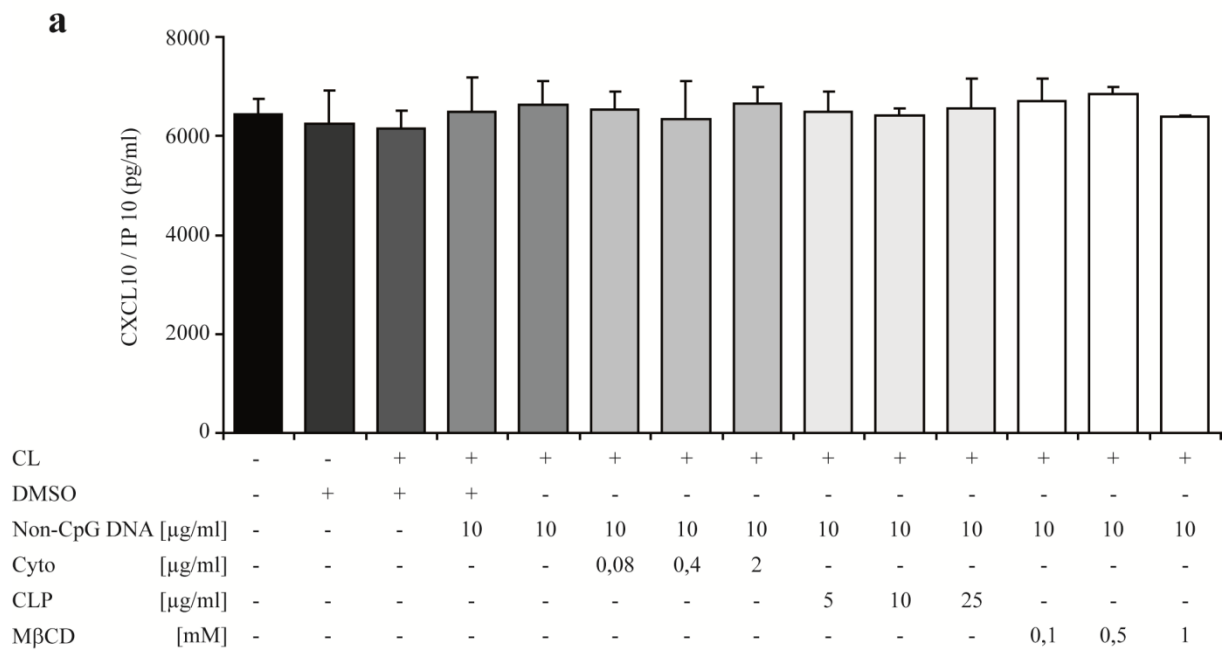


Abbildung 29. Cytocholasin D, Chlorpromazin und Methyl-β-Cyclodextrin blockieren die Produktion von CXCL10/IP-10 nach Stimulation mit viraler RNA. Ausdifferenzierte Podozyten wurden mit Nicht-CpG-DNA (a) oder 3P-RNA (b) im Komplex mit kationischen Lipiden (CL, Lipofectamine®) in Ab- bzw. Anwesenheit von Cytocholasin D, Chlorpromazin oder Methyl-β-Cyclodextrin stimuliert. Die Menge an CXCL10/IP-10 wurde nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden im Zellüberstand mittels ELISA gemessen. Die Daten zeigen jeweils den Mittelwert zweier unabhängiger Experimente ± SEM. ** p < 0.01 vs 3P-RNA 1 µg/ml, *** p < 0.001 vs 3P-RNA 1 µg/ml.

3.8 Signalerkennung von RNA und DNA in Podozyten unabhängig von MyD88

Bezüglich der intrazellulären Signalwegerkennung stellte sich die Frage, ob das Adapterprotein MyD88 für die Aktivierung von Podozyten durch Nicht-CpG DNA oder 3P-RNA zuständig ist. Die Podozyten wurden wie bereits beschrieben bis zur Ausdifferenzierung kultiviert und während 24 Stunden mit einem MyD88-Inhibitorpeptid prä-inkubiert.

Der *myeloid differentiation factor 88* (MyD88) ist ein Adaptermolekül, das eine entscheidende Rolle bei der Verbindung von Toll-like Rezeptoren und Interleukin-1-Rezeptoren (IL-1R) mit nachfolgenden Molekülen der Signalkaskade spielt. Dabei repräsentiert die Homodimerisierung von MyD88 den ausschlaggebenden Schritt für die Aktivierung der Interleukin-1-Rezeptor-assoziierten Kinase (IRAK). Das verwendete MyD88-Inhibitorpeptid enthält eine Aminosäuresequenz, die an eine Domäne von MyD88 bindet, so dass das Monomer an das Inhibitorpeptid gekoppelt ist und nicht mehr mit dem gegenüberliegenden Monomer dimerisieren kann [151]. In der Vergleichsgruppe wurde ein unwirksames Kontrollpeptid mit abgewandelter Primärstruktur angewendet.

Sowohl das MyD88-Inhibitorpeptid als auch das Kontrollpeptid wurden 24 Stunden vor der Ligandenstimulation in einer Konzentration von 100 µmol/l zu den Zellen gegeben. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen, ohne Mediumaustausch, mit 10 µg/ml Nicht-CpG DNA oder 1 µg/ml 3P-RNA, jeweils komplexiert mit kationischen Lipiden, stimuliert. Als Positivkontrolle galt die Stimulation der Zellen mit 3 µg/ml Pam3CSK4, welches als TLR2-Agonist MyD88 für den weiteren Signalweg erforderte. Der Zellüberstand wurde nach weiteren 24 Stunden gesammelt und anschließend die Konzentration des Zytokins CXCL10/IP-10 und des Chemokins CCL2/MCP-1 mittels ELISA bestimmt (Abb. 30).

In diesem Experiment wurde beobachtet, dass die Konzentration von synthetisierten CXCL10/IP-10 und CCL2/MCP-1 nach Stimulation mit komplexierter Nicht-CpG DNA oder 3P-RNA in der Kontroll- und Interventionsgruppe gleichermaßen hoch ist. Daraus lässt sich schließen, dass die Aktivierung der Podozyten nach Stimulation mit komplexierter Nicht-CpG DNA oder 3P-RNA nicht über das Adaptermolekül MyD88 erfolgt.

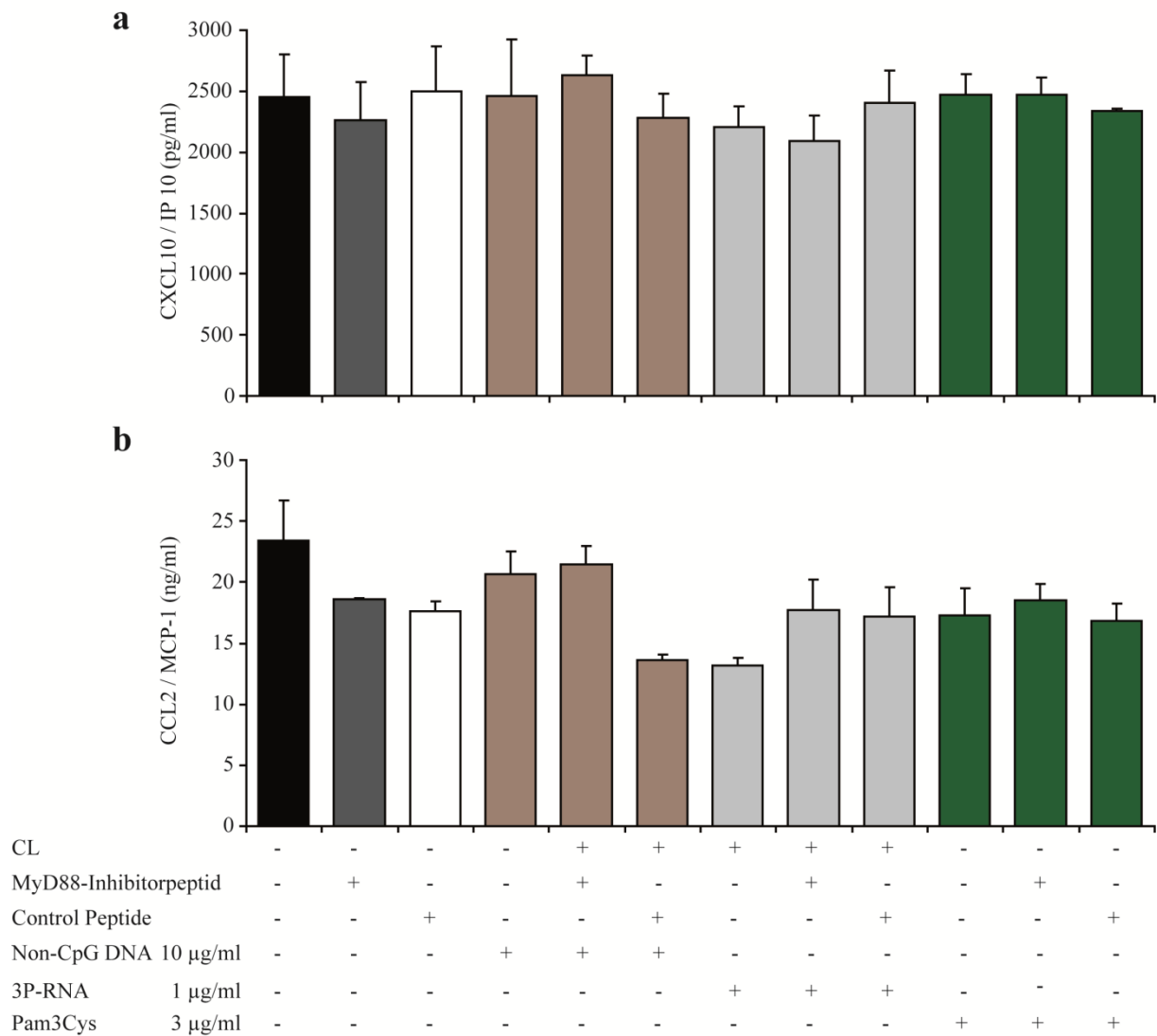


Abbildung 30. Die Aktivierung der Podozyten durch Nucleinsäuren ist unabhängig von MyD88. Die ausdifferenzierten Podozyten wurden zuerst während 24 Stunden entweder mit dem MyD88-Inhibitorpeptid oder dem unwirksamen Kontrollpeptid stimuliert. Anschließend wurden die VGEC mit 10 µg/ml Non-CpG DNA, 1 µg/ml 3P-RNA, jeweils im Komplex mit kationischen Lipiden (Lipofectamine®) oder 3 µg/ml Pam3CSK4 (Pam3Cys) für weitere 24 Stunden inkubiert. Die Konzentration von CXCL10/IP-10 und CCL2/MCP-1 im Zellüberstand wurde danach mit Hilfe des ELISAs gemessen. Die Daten stellen den Mittelwert zweier unabhängiger Experimente ± SEM dar.

3.9 Endogene Typ-I IFN stimulieren Podozyten weder autokrin noch parakrin

Podozyten produzieren nach Stimulation mit Nucleinsäuren Typ-I Interferone (siehe 3.4) und außerdem werden Podozyten nach Stimulation mit Typ-I Interferonen zur Produktion von großen Mengen IL-6 angeregt (siehe 3.6). Um zu untersuchen, ob die vom Podozyt selbst produzierten Typ-I Interferone eine autokrine bzw. parakrine Aktivierung verursachen

können, wurden Typ-I-Interferon-neutralisierende Antikörper eingesetzt. Diese Antikörper blockieren und erlöschen die Funktion von Typ-I Interferonen.

Die ausdifferenzierten Podozyten wurden gleichzeitig mit drei verschiedenen Dosen von den blockierenden Antikörpern und entweder 1 µg/ml 3P-RNA oder 3 µg/ml Nicht-CpG DNA komplexiert und mit kationischen Lipiden stimuliert. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurde der Zellüberstand gesammelt und mittels ELISA die Produktion von IL-6 (Abb. 31) bestimmt.

Podozyten exprimieren nach Exposition zu Nukleinsäure-Komplexen Interleukin 6 (Abb. 23a). In diesem Experiment zeigte sich aber, dass diese Ausschüttung von CXCL10/IP10 nicht durch die Zugabe von Typ-I-Interferon-neutralisierenden Antikörpern reduziert wird. Dies lässt annehmen, dass in Podozyten vermutlich keine autokrine oder parakrine Aktivierung durch die selbst produzierten Typ-I Interferone vorliegt, und damit keine Verstärkung im Sinne eines Rückkopplungsmechanismus denkbar ist.

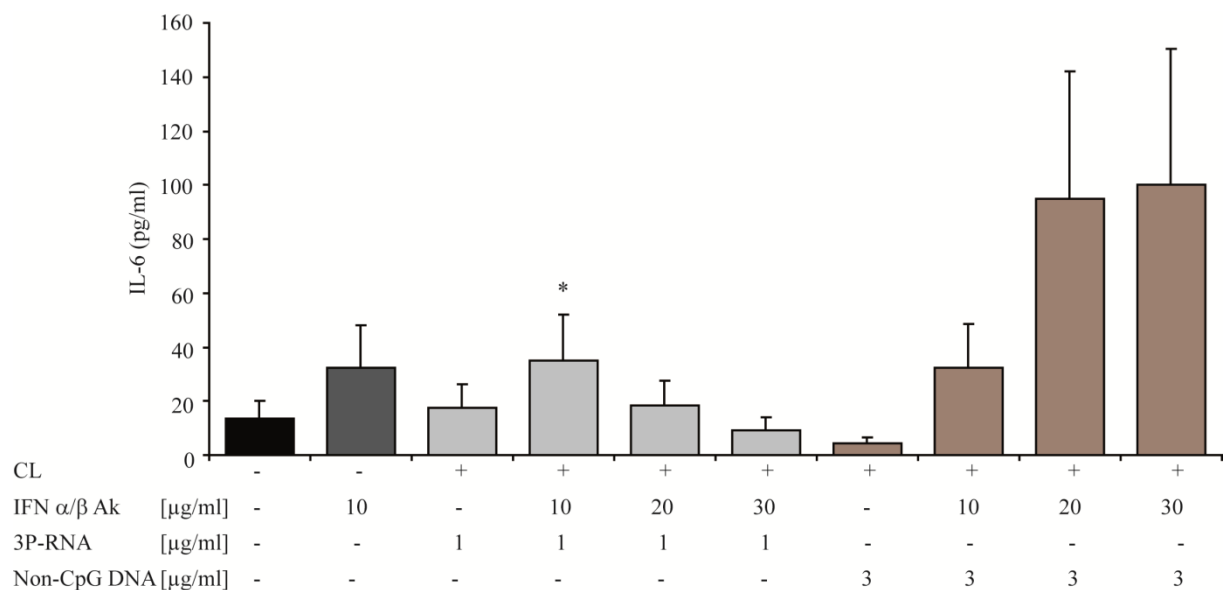


Abbildung 31 Endogene Typ-I Interferone stimulieren Podozyten weder autokrin noch parakrin. Die Podozyten wurden bis zur Ausdifferenzierung kultiviert, anschließend wurden sie gleichzeitig mit IFN- α und IFN- β -neutralisierenden Antikörpern und entweder mit 3P-RNA oder Nicht-CpG DNA im Komplex mit kationischen Lipiden (CL, Lipofectamine®) stimuliert. Der Zellüberstand wurde nach 24 Stunden Stimulation gesammelt und die Konzentration von CXCL10/IP10 mittels ELISA bestimmt. Die dargestellten Daten entstanden aus dem Mittelwert zweier unabhängiger Versuche \pm SEM. * $p < 0.05$ vs 3P-RNA 1 µg/ml.

3.10 Effekte der Aktivierung von TLRs und RLRs auf die Podozytenviabilität

Eine mögliche Antwort der Zelle auf eine bakterielle oder virale Infektion ist die Apoptose, womit die Erregerreplikation verhindert und die Ausbreitung der Infektion gebremst wird. In der reifen Niere sind Podozyten unfähig zur regenerativen Proliferation, um einen Podozytenverlust oder eine Zunahme der GBM-Fläche auszugleichen. Als Folge von dem strikten Block der Zellteilung können Podozyten bei einer Vielfalt von glomerulären Krankheiten ihren Zellzyklus einschalten und sogar eine Kernteilung erreichen, aber keine Zellteilung [42].

3.10.1 Die Podozytenviabilität nimmt nach Aktivierung von TLR 1/2, TLR 4 und TLR 7/8 im Entzündungsmodell ab

Um die Effekte der Aktivierung von TLRs auf die Podozytenviabilität (Abb. 32) näher zu untersuchen, wurden die Zellen wie bereits beschrieben kultiviert und stimuliert. Das CellTiter 96[®]A_{Queous} One Solution Cell Proliferation Assay wurde hier nach Herstellerprotokoll verwendet (siehe auch 2.6). Um ein Entzündungsmodell zu erzeugen, wurden die Podozyten zusätzlich mit je 1 µg/ml TNF- α und IFN- γ stimuliert. Als TLR-Liganden wurden Pam3CSK4 (Pam3Cys), Ligand für TLR 1/2, LPS als Ligand von TLR 4, R848, ein Imidazoquinolinegemischt mit starker antiviraler Aktivität, als Ligand für TLR 7/8 und Poly I:C Ligand für TLR 3 in verschiedenen Konzentrationen benutzt. Als negative Kontrolle wurde die Stimulation mit CpG-DNA eingesetzt.

Abbildung 32 zeigt, dass die Viabilität der Podozyten im Entzündungsmodell nach Stimulation mit Pam3CSK4, LPS und R848 stark zurückgeht. Diese wird dagegen in der negativen Kontrolle und nach Stimulation mit nicht komplexierten Poly I:C nicht verlangsamt.

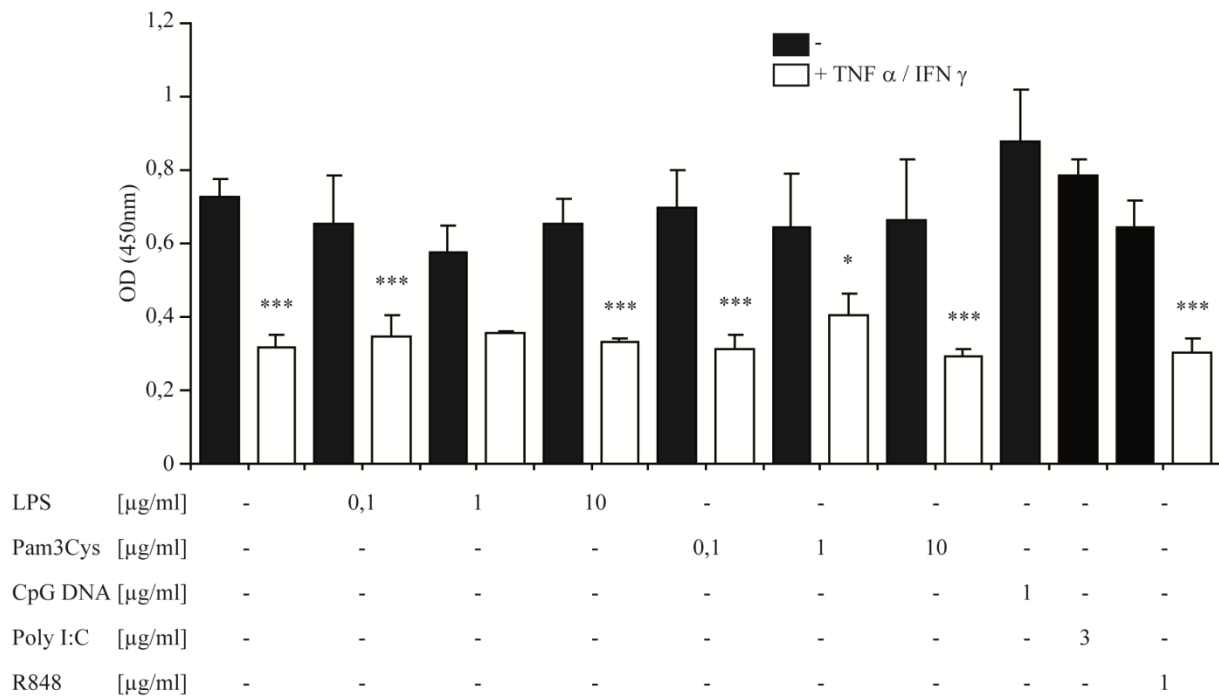


Abbildung 32. Aktivierung von TLR 1/2, 4 und 7/8 führt in Podozyten zur Abnahme der Viabilität. Die ausdifferenzierten VGEC wurden mit den angegebenen Konzentrationen der verschiedenen TLR-Liganden stimuliert. Die Anwendung mit je 1 μg/ml TNF-α und IFN-γ erzeugte ein Entzündungsmodell. Nach 24 Stunden wurde das CellTiter 96[®]A Q_{ueous} One Solution Cell Proliferation Assay zu den Zellen pipettiert, nach weiteren 3 Stunden wurde die optische Dichte bei 492 nm mittels ELISA-Lesegerät gemessen. Die Daten zeigen den Mittelwert zweier unabhängiger Experimente ± SEM. * p < 0,05 vs Pam3Cys 1 μg/ml. *** p < 0,001 vs Medium bzw. Ligand ohne TNF-α/ IFN-γ.

3.10.2 Die Aktivierung von RLRs hat keinen Einfluss auf die Podozytenviabilität

Bisher konnte gezeigt werden, dass Podozyten nach Aktivierung von RLRs proinflammatorische Zytokine sowie Typ-I Interferone produzieren. Die Effekte dieser Aktivierung auf die Zellviabilität sind bislang nicht bekannt.

Für das Viabilitäts-Assay wurden Podozyten in der Proliferationsphase (33°C) (Abb.33) und in der Ausdifferenzierungsphase (37°C) (Abb.34) verwendet (siehe auch 2.2). Die Podozyten wurden mit 3P-RNA oder Nicht-CpG DNA im Komplex mit kationischen Lipiden in den angegebenen Dosen stimuliert. Die Durchführung des CellTiter 96[®]A Q_{ueous} One Solution Cell Proliferation Assays erfolgte nach jeweils 24 und 72 Stunden. Die Stimulation von CpG-DNA diente als negative Kontrolle.

Es zeigte sich, dass die Stimulation der Zellen mit den Nukleinsäuren unabhängig von der Wirkungszeit der Liganden weder in der Proliferationsphase noch in der Ausdifferenzierungsphase einen Einfluss auf die Viabilität hat.

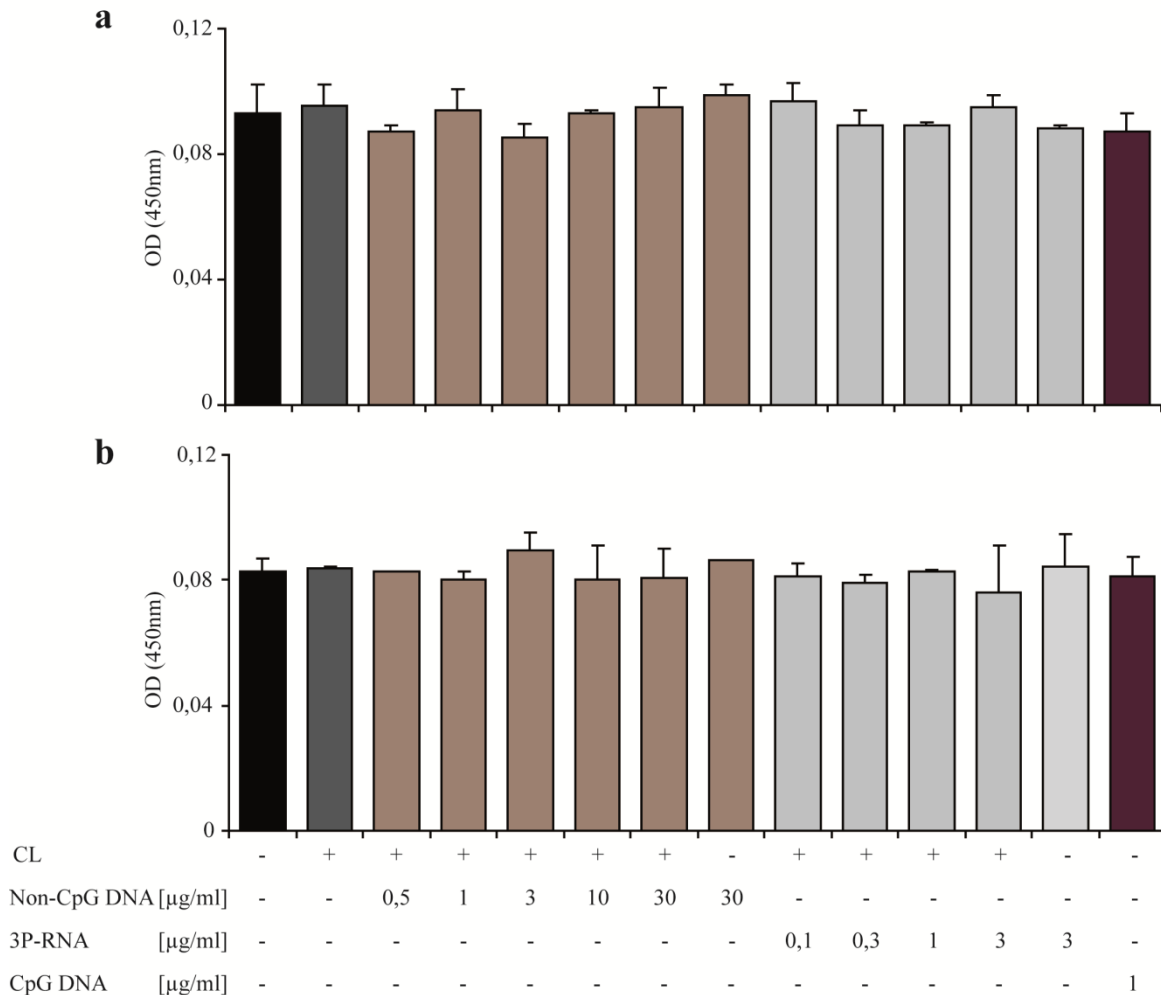


Abbildung 33. Die Aktivierung von RLRs hat keinen Einfluss auf die Podozytenviabilität in der Proliferationsphase. Die Podozyten wurden für 24 (**a**) und 72 (**b**) Stunden mit den genannten Konzentrationen Nicht-CpG DNA, 3P-RNA, komplexiert mit kationischen Lipiden (CL, Lipofectamine[®]) oder CpG-DNA stimuliert. Die Viabilität wurde nach 24 und 72 Stunden mit Anwendung des CellTiter 96[®]A Queous One Solution Cell Proliferation Assay nach Herstellerprotokoll bestimmt. Die Daten stellen jeweils den Mittelwert zweier unabhängiger Experimente ± SEM dar.

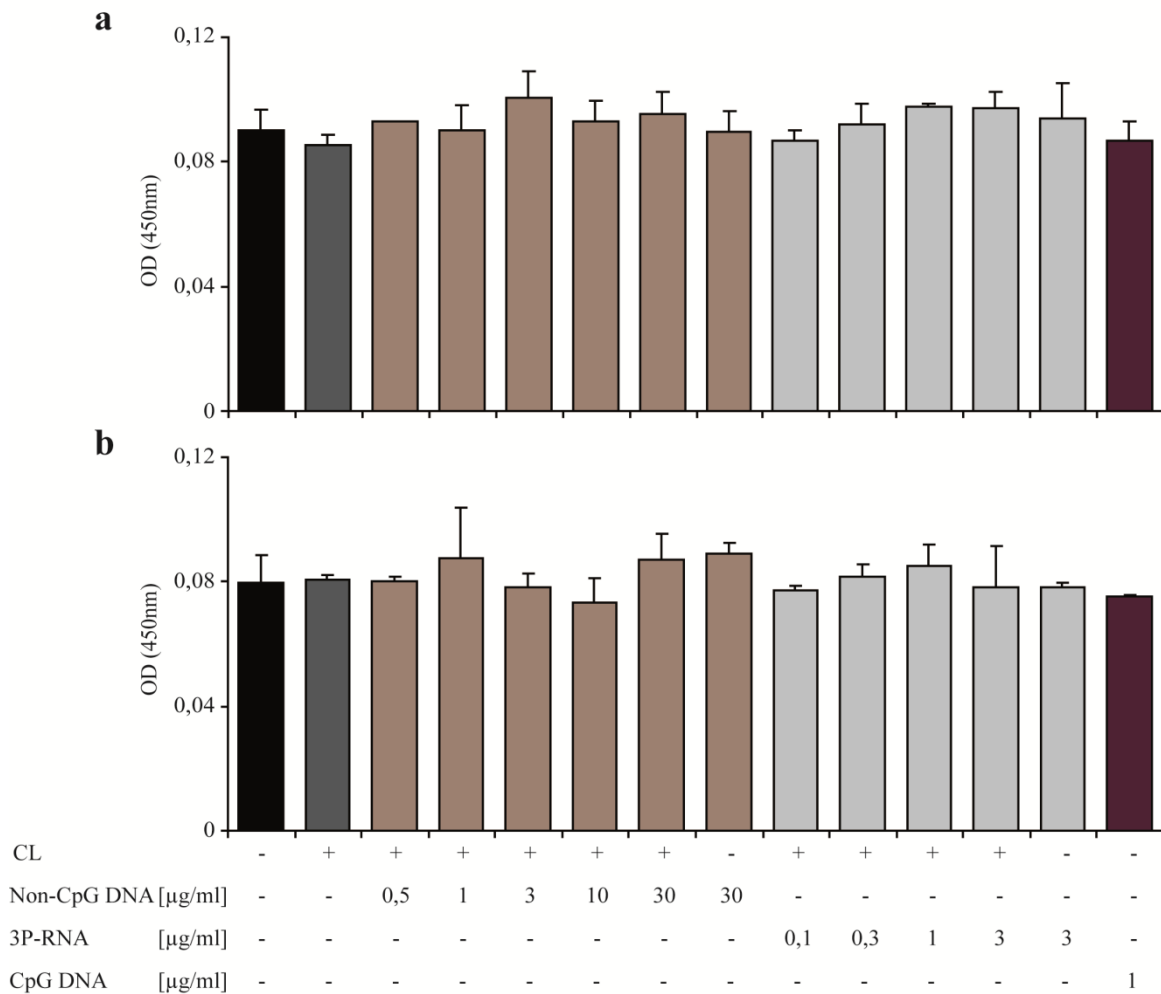


Abbildung 34. Die Aktivierung von RLRs hat keinen Einfluss auf die Viabilität von ausdifferenzierten Podozyten. Die VGEC wurden während 24 (a) und 72 (b) Stunden mit den genannten Konzentrationen Nicht-CpG DNA, 3P-RNA, komplexiert mit kationischen Lipiden (CL, Lipofectamine®) oder CpG DNA stimuliert. Die Viabilität wurde nach 24 und 72 Stunden mit Anwendung des CellTiter 96®A Queous One Solution Cell Proliferation Assay nach Herstellerprotokoll bestimmt. Die Daten stellen jeweils den Mittelwert zweier unabhängiger Experimente \pm SEM dar.

3.11 B7-1 / CD80 Expression in Podozyten nach TLR-Aktivierung

B7-1, auch CD80 genannt, ist ein Transmembranprotein, das normalerweise auf der Oberfläche von B-Zellen und anderen antigenpräsentierenden Zellen (APC) exprimiert wird [152-154]. In APC stellt Lipopolysaccharid, nach TLR4-Erkennung, der stärkste endogene Induktor von B7-1/CD80-Expression dar [155]. B7-1 in Podozyten wurde experimentell in genetischen, immun-vermittelten, medikamentös- und bakteriell-induzierten Nierenerkrankungen mit nephrotischen Syndrom aufgefunden. Außerdem korreliert die Expression von B7-1/CD80 in Podozyten mit dem Schweregrad der menschlichen

Lupusnephritis. Es wurde gezeigt, dass in Wildtyp- und SCID-Mäusen kleine Dosen von LPS die Synthese von B7-1 in Podozyten hochreguliert, was eine nephrotische Proteinurie verursacht. Im Gegenteil dazu waren B7-1/CD80-*knock-out*-Mäuse vor einem LPS-induzierten nephrotischen Syndrom geschützt, diese Tatsache lässt auf einen Zusammenhang zwischen Expression von B7-1/CD80 in Podozyten und Proteinurie schließen [156].

Um die Expression von B7-1/CD80 in Podozyten nach Stimulation mit TLR-Liganden näher zu untersuchen, wurden die Zellen, wie im Methodenteil bereits beschrieben, kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit Pam3CSK4, LPS und Poly I:C in verschiedenen Konzentrationen stimuliert. Nach 24 Stunden färbten wir die Zellen mit anti-mouse B7/CD80 und FITC goat anti-hamster IgG (1: 200 Verdünnung) und führten die Durchflusszytometrie durch.

Bei diesem Versuch zeigte sich, dass die Synthese von B7-1/CD80 in Podozyten nach Stimulation mit Pam3CSK4, Ligand für TLR1-2, LPS, Ligand für TLR4 und Poly I:C, Ligand für TLR3 signifikant hochreguliert wird. Bei einem nur geringfügigen Effekt, stellt sich die klinische Frage, ob diese Ergebnisse eine biologische Relevanz haben.

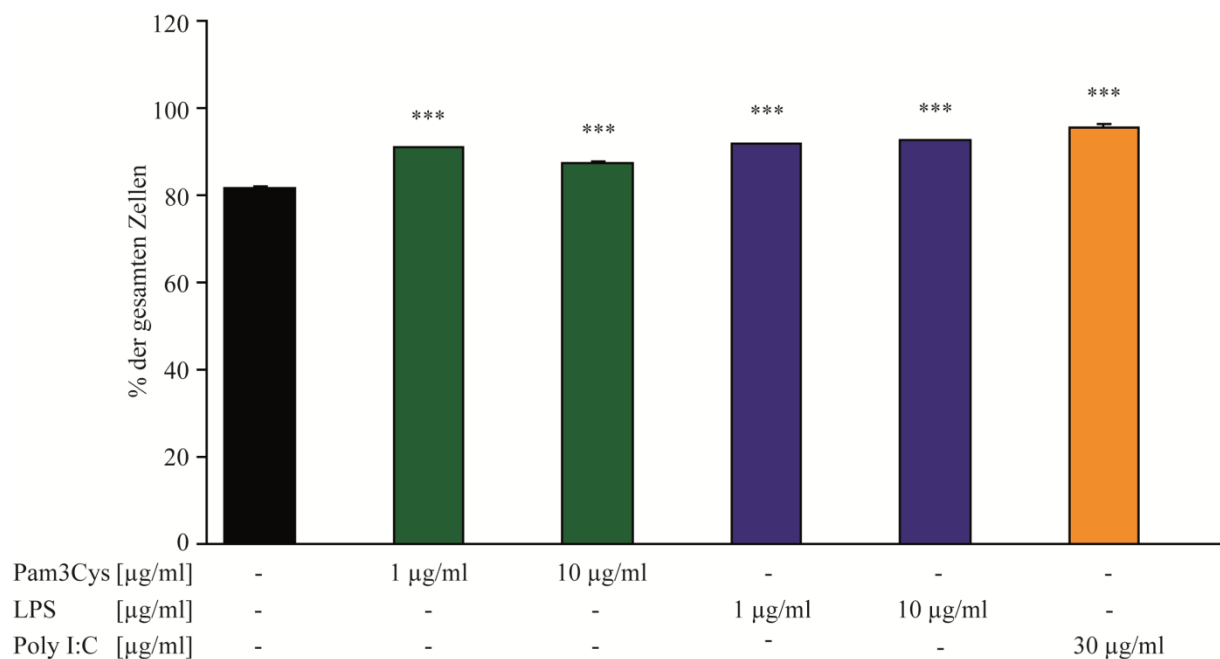


Abbildung 35. Die Synthese von B7-1/CD80 in Podozyten wird nach TLR-Aktivierung hochreguliert. Die ausdifferenzierten Podozyten wurden für 24 Stunden mit Pam3Cys, LPS oder Poly I:C in den angegebenen Konzentrationen stimuliert. Anschließend wurden die Zellen, wie bereits im Methodenteil beschrieben, für die Durchflusszytometrie vorbereitet und diese durchgeführt. Die FACS-Analyse erfolgte mit Hilfe des FACScalibur Gerätes und der CellQuestsoftware von BD Pharming. Die Daten stellen den Mittelwert zweier unabhängiger Experimenten \pm SEM dar. *** $p < 0,001$ vs Medium.

3.12 Albuminübertritt durch Podozyten nach Nukleinsäure-Stimulation

Die glomeruläre Filtrationsbarriere setzt sich aus den Fußfortsätzen der Podozyten, dem fenestrierten Kapillarendothel und der glomerulären Basalmembran zusammen. Die Hauptaufgabe dieser komplizierten Struktur stellt die Verhinderung eines Proteinverlustes mit dem Urin dar [3]. Es wurde in unserer Arbeitsgruppe gezeigt, dass die Proteinurie in nephritischen Mäusen durch eine systemische Applikation von Nukleinsäuren verstärkt wird [142, 157].

Wir überprüften mit einem *in-vitro* Permeabilitätsexperiment zunächst, ob die Aktivierung von Podozyten auch zu dieser Permeabilitätssteigerung beitragen könnte. Nachdem die Zellen bis zu der Differenzierungsphase kultiviert wurden, fand 24 Stunden vor der eigentlichen Stimulation die Umsetzung der Zellen auf die Zellkulturinserts (Porengröße 1µm) statt. Die Bildung einer Mono-Zellschicht wurde mikroskopisch kontrolliert, anschließend wurden die Zellen mit den verschiedenen Liganden mit oder ohne Transfektion mit Lipofectamine stimuliert. Vier Stunden nach der Stimulation wurde das Fluorescein-Albumin dazugegeben. Die Bestimmung der Fluorescein-Albumin-Konzentration, die hindurchgetreten war, erfolgte wie im Methodenteil beschrieben nach 6, 24, 48 und 72 Stunden (Abb. 36) mittels ELISA-Messgerät.

Es wurde zunächst festgestellt, dass in allen Gruppen die Durchlässigkeit von Podozyten für bovines Serumalbumin (BSA) zeitabhängig zugenommen hat. Die Zugabe von Lipofectamine[®] und die von Nicht-CpG-DNA im Komplex mit kationischen Lipiden haben die größte Bedeutung bei der Beeinträchtigung der Permeabilität. Die Stimulation mit LPS, CpG-DNA, 3P-RNA im Komplex mit CL, 3P-RNA und Nicht-CpG-DNA haben im Vergleich zum Medium die Permeabilität der Mono-Zellschicht nicht stärker beeinflusst.

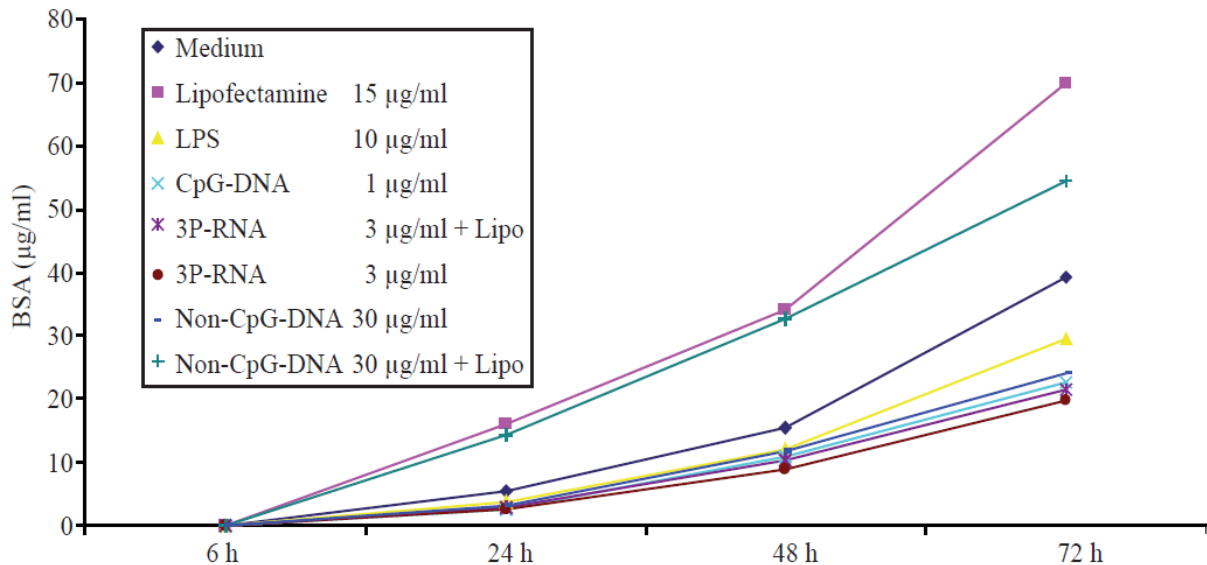


Abbildung 36. Die Nukleinsäure-Stimulation der Podozyten beeinträchtigt den Albumindurchtritt durch eine Mono-Zellschicht nicht. Ausdifferenzierte Podozyten wurden zunächst in Zellkulturinsets umgesetzt und weiterkultiviert, der Aufbau einer einschichtigen Lage wurde mikroskopisch kontrolliert. Vier Stunden nach der Stimulation wurde im Dunkeln Fluorescein-Albumin aufgetragen. Der Übertritt von Fluorescein-Albumin durch die Mono-Zellschicht der Podozyten hindurch wurde nach 6, 24, 48 und 72 Stunden mit Hilfe des ELISA-Messgerätes gemessen. Die Daten zeigen den Mittelwert dreier unabhängiger Experimenten \pm SEM.

3.13 Die Fußfortsätzeanzahl nimmt nach TLR 2 und 4 Aktivierung nicht ab

Die Podozytenarchitektur wird oft durch verschiedene Krankheiten verändert, was nicht selten eine Proteinurie zur Folge hat (siehe auch 1.2.3). Wir stellten uns die Frage, ob die Aktivierung von TLR 2 und TLR4 eine morphologische Veränderung bzw. eine Abnahme der Podozytenfußfortsätze verursachen könnte.

Die Kultivierung und Stimulierung der ausdifferenzierten Podozyten fand wie üblich statt. Die Zellen wurden anschließend mit Phalloidin, einer hochaffinen Probe für F-Aktin, und DAPI, einem Fluoreszenzfarbstoff zur Markierung von DNA im Zellkern, wie im Methodenteil bereits beschrieben, gefärbt. Nach dem Färben wurde mikroskopiert um die Fußfortsätze von 100 zufällig ausgewählten Zellen von jeder Gruppe auszuzählen. Die Ergebnisse wurden dann in einem Diagramm (Abb. 37) ausgewertet; auf der X-Achse ist die Fußfortsätzeanzahl dargestellt, auf der Y-Achse die Häufigkeit.

Es zeigte sich, dass die Zellen auf die Stimulation mit 10 µg/ml LPS mit einer minimalen Abnahme der Fußfortsätze im Vergleich zum Medium reagieren. Die Stimulation mit 10 µg/ml Pam3Cys4 zeigte keinen Einfluss auf die Fußfortsätzeanzahl.

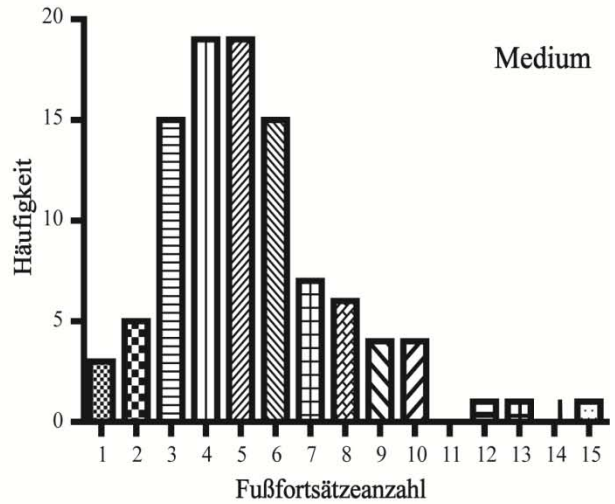
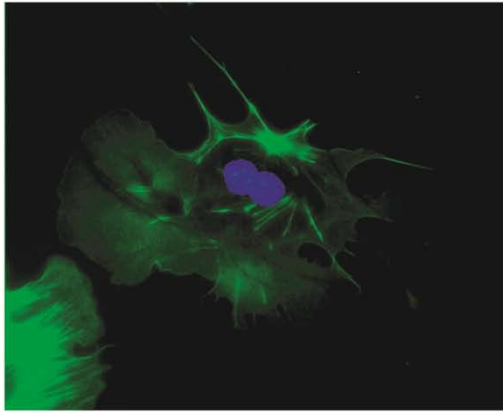
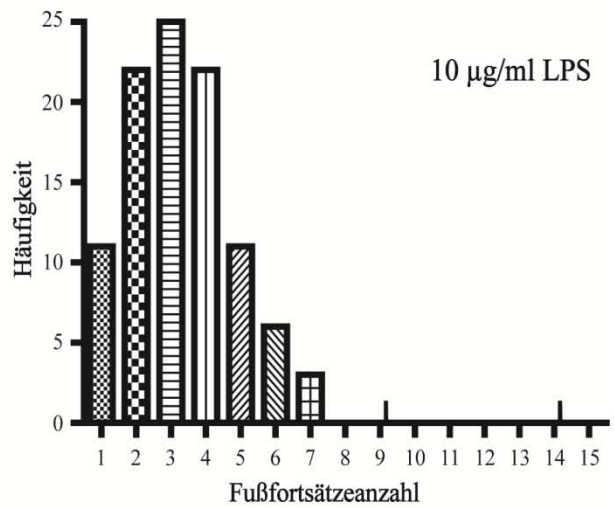
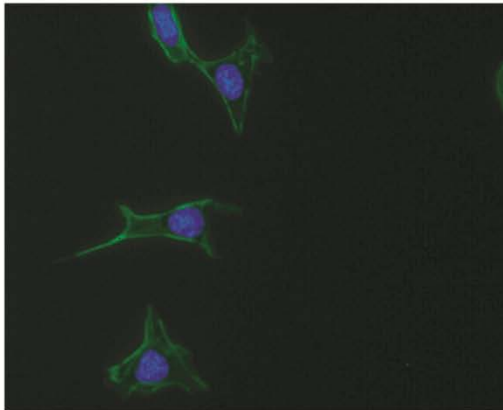
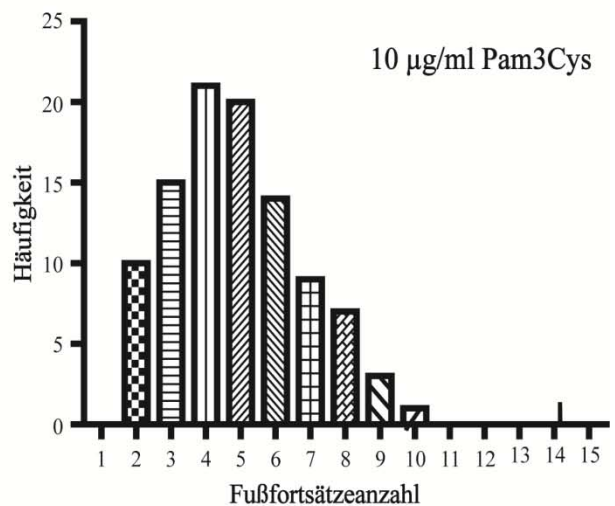
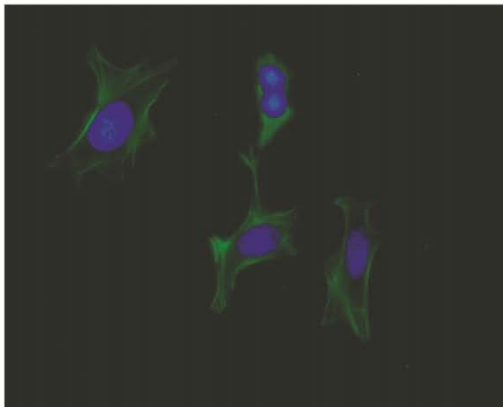
a**b****c**

Abbildung 37. Keine Abnahme der Fußfortsätzeanzahl nach Aktivierung von TLR 2 und 4. Die ausdifferenzierten Podozyten wurden entweder nicht stimuliert (**a**) oder mit 10 µg/ml LPS (**b**) oder Pam3Cys4 (**c**) stimuliert und anschließend mit Phalloidin und DAPI gefärbt. Mit Hilfe des Mikroskops wurden die Fußfortsätze von jeweils 100 Zellen jeder Gruppe gezählt. Nur die Stimulation mit 10 µg/ml LPS, Ligand für TLR4, zeigte einen minimalen Unterschied im Vergleich zum Medium. Vergrößerung 40x.

Viertes Kapitel:

Diskussion

4 Diskussion

Die Besonderheit der virus-assoziierten Glomerulonephritis liegt darin, dass sie einerseits *de novo* entstehen kann, andererseits aber auch eine virale Infektion eine vorbestehende Glomerulonephritis verstärken kann. Das Immunsystem bekämpft eine Virusverbreitung mit der Produktion von Typ-I Interferonen und Zytokinen sowie über apoptotischen Zelltod. Die Mechanismen der viralen Immunantwort bei typischen Immunzellen, wie dendritischen Zellen, sind bekannt, die der viralen Antigenerkennung bei der virus-assoziierten Glomerulonephritis sind allerdings noch weitestgehend unentdeckt.

Podozyten sind als wichtiger Bestandteil der glomerulären Filtrationsbarriere ständig den Molekülen des Primärharns ausgesetzt. Bei einer viralen Infektion sind es beispielsweise Nukleinsäuren, bei einer Systemerkrankung, wie dem Lupus erythematodes, Immunkomplexe. Sind diese Nukleinsäuren mit Proteinen oder Lipiden komplexiert, werden sie dadurch weder von RNAsen noch von DNAsen nicht mehr vollständig verdaut [158-160]. Solche Immunkomplexe können durch Ablagerung an den glomerulären Kapillaren oder im Mesangium eine Glomerulonephritis auslösen, dabei wird die glomeruläre Filtrationsbarriere in ihrer Funktion beeinträchtigt, was eine Proteinurie zur Folge hat [161-163].

Die Rolle von Podozyten bei der angeborenen Immunität ist wenig erforscht und es gibt bisher nur wenige Studien darüber. So haben Banas et al. gezeigt, dass Podozyten TLR4 exprimieren und dieser Rezeptor bei der membranproliferativen Glomerulonephritis am Tiermodell hochreguliert wird [137]. Weiterhin haben Motojima et al. gezeigt, dass Makromoleküle im Blutserum, wie beispielsweise Fibrinogen, die Expression von TLR2 und TLR4 in Podozyten anregen. Dies verursacht die Induktion von proinflammatorischen Zytokinen, wobei der Podozytenverlust und die Progression von glomerulärer Schädigung unterstützt wird [164]. Frühere Studien unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass eine systemische Applikation von Nukleinsäuren, wie beispielsweise poly I:C-RNA oder B-DNA, eine Verstärkung der Proteinurie nephritischer Mäuse zur Folge hat [142, 157]. Es stellte sich dann die Frage, ob glomeruläre Zellen wie Podozyten, Endothelzellen, Mesangialzellen oder auch Tubuluszellen, in der Lage sind, diese Nukleinsäuren zu erkennen und dadurch zu der inflammatorischen Immunantwort beizutragen.

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass Mesangialzellen, Endothelzellen und Tubuluszellen TLRs sowie RLRs exprimieren [165-168]. Diese Parenchymzellen der Niere produzieren Zytokine, Chemokine und Interferone nach Stimulation dieser Rezeptoren. Nur in Mesangialzellen konnte, ähnlich wie bei dendritischen Zellen, eine autokrin-parakrine Aktivierung durch ausgeschüttete Typ-I Interferone beobachtet werden. In Endothelzellen erfolgte die intrazelluläre Aufnahme der mit einem kationischen Lipid komplexierten dsRNA über die Clarithin-abhängige Endozytose. Dies bewirkte die Induktion von Adhäsionsmolekülen und erhöhte die Permeabilität für FITC-markiertes Albumin durch eine einlagige Schicht glomerulärer Endothelzellen [165-168]. In der vorliegenden Arbeit wurden diese Abläufe an Podozyten untersucht.

Unsere Hypothese war, dass Podozyten nicht nur für die Filtrationsbarriere und bei der Strukturhaltung des glomerulären Gefäßkonvoluts wichtig sind, sondern dass sie auch mit Hilfe von Pathogenerkennungsrezeptoren der angeborenen Immunität (TLRs und RLRs) virale Nukleinsäuren erkennen können, daraus folgend Zytokine und antivirale Typ-I Interferone produzieren und dadurch zur inflammatorischen Immunantwort bei der virus-assoziierten Glomerulonephritis beitragen. Hiermit würden Podozyten bei der Verstärkung der Entzündung sowie bei dem Verlust der Filtrationsbarriere mit resultierender Proteinurie beteiligt sein.

Mit unseren Daten können wir nicht nur zeigen, dass Podozyten Pathogenerkennungsrezeptoren, wie Toll-like Rezeptoren und RIG-like Rezeptoren, besitzen, sondern auch, dass sie nach Aktivierung dieser Rezeptoren Zytokine und Typ-I Interferone produzieren. Eine autokrin-parakrine Aktivierung durch Typ-I Interferone konnten wir hier ausschließen. Außerdem zeigen wir, dass die intrazelluläre Signalerkennung von Nukleinsäuren in Podozyten unabhängig von MyD88 erfolgt. Des Weiteren weisen unsere Daten darauf hin, dass die Viabilität durch Aktivierung dieser Rezeptoren nicht beeinträchtigt wird. Da die hier gezeigten Ergebnisse hauptsächlich durch Zelllinien gewonnen wurden, sind allerdings weitere Studien erforderlich, um die exakten Pathomechanismen der viral-getriggerten Glomerulonephritis bei Menschen besser zu verstehen.

4.1 Bedeutung der Pathogenerkennungsrezeptoren in Podozyten

Aufgrund der ständigen Exposition zu pathogenen und nicht pathogenen zirkulierenden Molekülen während des glomerulären Filtrationsprozesses benötigen Podozyten einen Erkennungsmechanismus um eine Reaktionsmöglichkeit in Gang zu setzen. Im Falle einer Immunantwort, wie in dieser Arbeit angenommen wird, müssen die Zellen mit bestimmten Rezeptoren ausgestattet sein, über die beispielsweise Immunzellen verfügen, um die Pathogenerkennung zu ermöglichen. Wichtige Vertreter dieser Pathogenerkennungsrezeptoren sind die Familien der Toll-like Rezeptoren (TLRs), die RIG-like Helikasen (RLRs) und die NOD-like Rezeptoren (NLRs). Bei einer Virusinfektion werden die virale RNA und DNA hauptsächlich von TLRs und RLRs erkannt, die Zellen werden dadurch aktiviert und produzieren Typ-I Interferone sowie proinflammatorische Zytokine [119]. Die Aktivierung der jeweiligen Rezeptoren hängt vom Infektionstyp ab, die Interferonproduktion bei lokalen Infektionen wird vorzugsweise mittels RIG-I Helikasen getriggert, bei systemischen Infektionen erfolgt sie dagegen über die Toll-like Rezeptoren der pDCs [169]. Außerdem ist bekannt, dass plasmazytische dendritische Zellen für die Erkennung viraler Doppelstrang-RNA das Toll-like-Rezeptor-System bevorzugen [170], während Nicht-Immunzellen eher den zytosolischen RIG-I-Signalweg auswählen [171]. Takeuchi et al. zeigten vor kurzem, dass diese beiden Systeme der Viruserkennung, Toll-like Rezeptoren und RIG-I Helikasen, zusammenarbeiten [172].

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen erstmals, dass Podozyten verschiedene Toll-Like Rezeptoren exprimieren. Ein Entzündungsmodell wurde mittels TNF- α und IFN- γ Stimulation erzeugt. Die höchste Expression erreichten im Gesunden- sowie im Entzündungsmodell die TLR-1, -2, -3 und -4. In sehr geringer Ausprägung konnten TLR-5, -6, -7, -9 und -11 nachgewiesen werden, während TLR-8 nicht nachweisbar war. Interessant ist hier die minimale Expression von TLR-7 und TLR-9, da bisher bekannt ist, dass intrinsische Zellen der Nieren, wie beispielsweise Mesangialzellen, Tubuluszellen, glomeruläre Endothelzellen und intrarenale Fibroblasten nicht in der Lage sind diese Rezeptoren zu exprimieren [120]. Da aber in unseren Experimenten Podozyten weder mit Einzelstrang-RNA, Ligand für TLR-7, stimuliert wurden, noch eine Antwort auf eine Stimulation mit CpG-DNA, Ligand für TLR-9, zeigten, gehen wir davon aus, dass diese minimale Expression nicht von funktioneller Bedeutung ist. Im Gegensatz dazu werden diese beiden Rezeptoren (TLR-7 und -9) von intrarenalen antigenpräsentierenden Zellen, wie dendritischen Zellen und Makrophagen

exprimiert [120]. Damit verbleibt die Erkennung von Einzelstrang-RNA aus Viren durch TLR-7 und CpG-DNA aus Viren und Bakterien durch TLR-9 in der Niere eine Domäne der antigenpräsentierenden Zellen, wie dendritischen Zellen und Makrophagen (Abb. 36). Darauffolgend ist TLR-3 der einzige restliche Toll-like Rezeptor über den die Nukleinsäureerkennung in intrinsischen Nierenzellen erfolgen könnte und somit auch die Aktivierung der entsprechenden Signalkaskade.

Die zytosolischen Rezeptoren RIG-I und MDA-5 stellen einen alternativen Erkennungsmechanismus für virale Doppelstrang-RNA dar [146]. Eine zentrale Rolle in der RIG-I-Helikasen-Signalkaskade übernimmt das mitochondriale Adaptorprotein IPS-1. Es wurde gezeigt, dass IPS-1-defiziente Mäuse nach Nukleinsäureerkennung durch RIG-I und MDA-5 unfähig zur Interferon- und Zytokinproduktion sind [173, 174]. Neben der Aufgabe von Mitochondrien im Metabolismus und Apoptose schlägt die mitochondriale Lage dieses Adaptorproteins eine neue wichtige Rolle dieses Zellorganells in der angeborenen Immunität [175]. In dieser Arbeit zeigen wir zum ersten Mal, dass Podozyten die zytosolischen Rezeptoren RIG-I und MDA-5 und deren mitochondriales Adaptormolekül IPS-1 exprimieren. Damit beweisen wir, dass Podozyten über beide Erkennungsmechanismen, TLR-System und RIG-Helikasen, für virale Nukleinsäuren verfügen.

Takeuchi und Akira zeigten, dass Interferone in dendritischen Zellen die Genexpression der RIG-like Helikasen stark induzieren [172]. Mit unseren Daten konnten wir zeigen, dass in Podozyten die Expression von den RNA-Erkennungsrezeptoren RIG-I und MDA5 sowie die vom Adaptorprotein IPS-1 im Wesentlichen nach Stimulation mit Interferon- β hochreguliert wird. Vorangehende Studien befassten sich mit der Induktion der RIG-I-Expression bei vielen entzündlichen Erkrankungen, wie beispielsweise viralen Infektionen, Leukämie, Harnblasenkarzinom [176] und Lupusnephritis [177]. Die Lupusnephritis stellt eine Komplikation des systemischen Lupus erythematoses dar, eine Autoimmunerkrankung bei der ein erhöhter Typ-I Interferonspiegel, der mit der Erkrankungsaktivität und dem Schweregrad korreliert, nachgewiesen wird [178].

Die RIG-like Helikasen sind zytosolische Rezeptoren, die für die Doppelstrang-RNA-Erkennung zuständig sind. RIG-I und MDA-5 haben sowohl gemeinsame als auch einzigartige Funktionen. Sie teilen eine begrenzte Homologie in ihrer Primärstruktur und leiten eine ähnliche Signalkaskade weiter [179]. Der Unterschied zwischen diesen Rezeptoren besteht in der Bekämpfung verschiedener Virengruppen. So ist RIG-I für die Immunabwehr

reagieren können [144]. Der zytosolische DNA-Rezeptor DAI (DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors) und andere bisher unbekannte DNA-Rezeptoren scheinen für die immunstimulatorischen Effekte von viraler dsDNA zuständig zu sein [141, 143, 183, 184]. Mit unseren Daten zeigen wir, dass Podozyten nach Zugabe von IFN- β in der Lage sind den DNA-Rezeptor DAI zu exprimieren. Da laut unserer Daten die Expression von TLR-9 in Podozyten extrem niedrig ist und es bekannt ist, dass weder TLR7 noch TLR9 in intrinsischen Nierenzellen exprimiert wird [120], stellen diese Rezeptoren einen alternativen Weg der DNA-Erkennung in Podozyten dar. Als Ligand für diese Rezeptoren haben wir Nicht-CpG-DNA (non-CpG-DNA) in unseren Experimenten verwendet.

4.2 Effekte der Nukleinsäureerkennung in Podozyten

Zytokin- und Interferonproduktion

Um die Effekte der Aktivierung von zytosolischen Rezeptoren in Podozyten zu untersuchen, haben wir die Nukleinsäuren vor Stimulation mit kationischen Lipiden komplexiert. Diese Komplexierung ist eine gängige Methode um die Nukleinsäuren ins Zytosol zu bringen, ähnlich dem Virusentritt im Rahmen einer Infektion. Die Stimulation der Podozyten mit den komplexierten Nukleinsäuren verursachte die Ausschüttung verschiedener proinflammatorischer Zytokine. Interleukin 6 und CCL2/MCP-1 wurden vor allem nach Stimulation mit 3P-RNA und Non-CpG-DNA relevant exprimiert. Diese beiden Zytokine wurden dagegen nach Stimulation mit Poly I:C im Vergleich zum Medium nicht stärker exprimiert. Das hochwirksame Interleukin 1 β wurde nur nach Stimulation mit 3P-RNA dosisabhängig ausgeschüttet.

Die Interferonproduktion ist neben der Zytokinausschüttung ein wichtiger Schritt der angeborenen Immunantwort gegen eine virale Infektion. Die Stimulation der Podozyten mit synthetischen Nukleinsäuren: Poly I:C, 3P-RNA und Nicht-CpG-DNA im Komplex mit kationischen Lipiden bewirkte die Synthese von Typ-I Interferone, nämlich Interferon α und Interferon β . Vor allem die Synthese von Interferon- β nach Stimulation mit allen drei Nukleinsäuren war vergleichend mit basalen Bedingungen am stärksten. Im Gegenteil dazu wurde das Typ-II Interferon- γ von den Podozyten unter diesen Bedingungen nicht produziert.

Dies könnte dadurch zu erklären sein, dass Typ-I und Typ-II Interferone in der Immunität unterschiedliche Funktionen besitzen [99].

Diese Zytokin- und Interferonproduktion der Podozyten könnte zu der inflammatorischen Antwort beitragen, daraufhin könnten andere Immunzellen, wie beispielsweise Leukozyten, in das entzündliche Gewebe wandern und rekrutiert werden. Es käme zu einer Verschlechterung der Entzündung, welche sich in einer klinisch manifesten virus-assoziierten Glomerulonephritis äußern könnte.

Aufnahmemechanismus in die Podozyten

Um eine Immunantwort durch zytosolische Nukleinsäurerezeptoren in Gang zu setzen, müssen die Nukleinsäuren sich erst im Zytosol befinden. Dies wird in dendritischen Zellen und embryonalen Fibroblasten durch die Komplexbildung der Nukleinsäuren mit kationischen Lipiden erreicht [140, 141, 143, 146, 147]. Dies entspricht natürlich nicht dem identischen Aufnahmemechanismus intakter Viren. Als experimentelle Strategie hat sich dieses Vorgehen jedoch außerordentlich bewährt, um die Rezeptorinteraktionen und Signaltransduktionswege der Nukleinsäureerkennung aufzuklären.

Wir haben vier Inhibitoren verschiedener bekannter Aufnahmewege verwendet, um den jeweiligen Transportmechanismus zu blockieren. Chloroquin, ein Hemmstoff der endosomalen Ansäuerung, schien weder für die Aufnahme von Nicht-CpG-DNA noch für die von 3P-RNA eine Bedeutung zu haben. Die anderen drei Inhibitoren sind: Cytocholasin D, ein Phagozytose-Hemmstoff, Chlorpromazin, ein Inhibitor der Clathrin-abhängige Endozytose und Methyl- β -Cyclodextrin, ein Hemmstoff der Caveolae-vermittelten Endozytose [148-150]. Diese zuletzt genannten Inhibitoren haben in unseren Experimenten keinen Effekt auf die Chemokinproduktion nach Stimulation mit Non-CpG-DNA im Komplex mit kationischen Lipiden gezeigt. Daraufhin schließen wir diese zugehörigen Aufnahmewege für den Transportmechanismus dieser synthetischen Nukleinsäure aus. Im Gegenteil dazu, wurde die Produktion von CXCL10/IP10 nach Stimulation mit 3P-RNA im Komplex mit kationischen Lipiden durch Cytocholasin D, Chlorpromazin und Methyl- β -Cyclodextrin dosisabhängig stark gehemmt. Der intrazelluläre Einschluss von 3P-RNA in Podozyten steht offenbar mit der Phagozytose, der Clathrin-abhängigen Endozytose und der Caveolae-vermittelten Endozytose im Zusammenhang. Die beiden letzten Transportmechanismen spielen auch eine

wichtige Rolle bei der Aufnahme von Doppelstrang-RNA in *Drosophila-melanogaster*-S2-Zellen [149] und bei der von Poly I:C-RNA in humanen embryonischen Nierenzellen HEK293 [148].

Auch das Adaptormolekül MyD88 zeigte keinen Effekt auf die Aktivierung von Podozyten durch Nicht-CpG-DNA oder 3P-RNA zu haben. Aus diesem Grund schließen wir aus, dass Toll-like Rezeptoren oder IL-1-Rezeptor für den Beitrag von Podozyten zu der entzündlichen Antwort zuständig sind.

Wir zeigen in der vorgelegten Arbeit, dass die Erkennung von Nukleinsäuren in Podozyten durch zytosolische Pathogenerkennungsrezeptoren erfolgt. Vorangehende Studien des Gen-Knockdowns der RIG-like Rezeptoren RIG-1 und MDA-5 und des DNA-Sensors DAI/ZBP1 unterstützen die Zuständigkeit dieses Signalweges in der Nukleinsäureerkennung [143, 170, 185].

4.3 Antwort der Podozyten auf Typ-I Interferone

Wir haben bisher beschrieben, dass Podozyten Pathogenerkennungsrezeptoren, nämlich TLRs und RLRs, exprimieren. Außerdem sind diese Zellen nach Aktivierung dieser Rezeptoren mit Nukleinsäuren zur Produktion von Zytokinen und Typ-I Interferonen fähig. Diese Tatsachen lassen uns an eine Beteiligung der Podozyten bei der inflammatorischen Antwort im Glomerulus denken. Die Interferone stellen eine Gruppe von Proteinen mit antiviraler Wirkung dar, die von Zellen als Antwort auf verschiedene Reize sezerniert werden [186]. Diese sezernierten autokrinen und parakrinen Proteine stimulieren intra- und interzelluläre Mediatoren, welches die Resistenz gegen virale Infektionen vermitteln, die angeborene und erworbene Immunantwort verstärkt und das Überleben und Sterben normaler und tumoröser Zellen moduliert [187].

Die Reaktion der Podozyten auf Interferone haben wir mit den folgenden Versuchen untersucht. Zuerst stimulierten wir die Podozyten mit Interferon- α , - β und - γ in verschiedenen Konzentrationen, anschließend wurde die Produktion von IL-6 und CCL2/MCP-1 bestimmt. Wir stellten fest, dass die Stimulation der Zellen mit Typ-I Interferonen (α und β) zur Produktion von großen Mengen IL-6 führt. Außerdem beobachteten wir eine minimale Zunahme der Produktion von CCL2/MCP-1 nach Stimulation mit IFN- β im Vergleich zu den

basalen Bedingungen, nach IFN- α -Stimulation war dies nicht der Fall. Die Stimulation der Zellen mit dem Typ-II Interferon- γ schien dagegen keine Auswirkungen auf die Zytokinproduktion zu haben. Der nächste Versuch bestand aus der Vorstimulation der Podozyten mit den drei Interferonen, der nachfolgenden Stimulation mit den viralen Nukleinsäuren, 3P-RNA und Nicht-CpG-DNA und der Bestimmung des IL-6. Hierbei zeigte sich eine Abnahme der Produktion des Zytokins. Anschließend haben wir die Expression von Rezeptoren der Nukleinsäureerkennung nach Interferonstimulation untersucht. Dafür verglichen wir die Expression von TLR3, TLR9, RIG-1, MDA5, DAI und das Adaptormolekül IPS1 unter basalen Bedingungen und nach Stimulation mit 1000 U/ml Interferon- β . Die Stimulation mit Interferon- β verursachte eine deutlich erhöhte Expression von den Nukleinsäurerezeptoren TLR3, RIG-1, MDA-5 und DAI. Die Expression von dem Adaptormolekül IPS1 war basal recht hoch und nahm nach Stimulation mit IFN- β nur langsam zu. Es zeigte sich außerdem, dass die Produktion von CXCL10/IP10, CCL5/Rantes und Mx-Protein (Mx1) durch die Stimulation der Zellen mit 1000 U/ml IFN- β stark induziert wird. Die Hochregulation von Nukleinsäurerezeptoren und proinflammatorischen Zytokinen nach Stimulation der Podozyten mit Interferon- β könnte daraufhin deuten, dass die Immunantwort im entzündlichen Gewebe durch Interferone verbessert und beschleunigt wird.

Obwohl nahezu alle Zellen Interferon- α und - β als Antwort auf virale und bakterielle Pathogene produzieren können, sind dendritische Zellen der Hauptproduzent von Interferonen. Sie können 1000-mal mehr IFN- α und - β als andere Zellen sezernieren [188, 189]. Diese Produktion von Typ-I Interferonen bewirkt parakrine und autokrine Effekte, dabei findet eine Verstärkung der Immunantwort im Sinne einer positiven Rückkopplung statt [99, 190-192]. Vorangehende Studien unserer Arbeitsgruppen zeigten, dass in Mesangialzellen ein solcher positiver Feedbackmechanismus für die autokrine und parakrine Aktivierung, nach Stimulation der Mesangialzellen mit Poly I:C-RNA und nachfolgender Typ-I Interferonproduktion, zuständig ist [165]. Wir haben dieses Phänomen nun auch bei Podozyten untersuchen wollen, dafür kamen Typ-I-Interferon-neutralisierende Antikörper zur Anwendung. Nach der Stimulation der Zellen mit 3P-RNA zeigte sich keine Auswirkung auf die Synthese von CXCL10/IP10. Bei den Podozyten, die mit Nicht-CpG-DNA stimuliert worden sind, zeigte sich sogar eine Zunahme der Synthese dieses Zytokins. Worauf dies zurückzuführen ist, bleibt vorerst unklar.

Wir konnten mit unseren Experimenten zeigen, dass Podozyten auf Typ-I Interferone mit einer Zytokinproduktion reagieren und die Stimulation der Podozyten mit Typ-I Interferonen zu einer starken Expression von Pathogenerkennungsrezeptoren und proinflammatorischen Zytokinen auf Transkriptionsebene führt. Einen positiven Rückkopplungsmechanismus dieser Zytokinausschüttung, wie es bei Mesangialzellen der Fall ist, konnten wir bei Podozyten nicht beobachten.

4.4 Effekte der Aktivierung von Pathogenerkennungsrezeptoren auf Albuminpermeabilität und Podozytenviabilität

Die molekulären Mechanismen, die zu Proteinurie und Podozyten- *Effacement* führen sind unklar [6]. Um diese Morphologieveränderungen der Podozytenfußfortsätze nach Aktivierung von TLR 2 und TLR4 zu untersuchen, haben wir die Zellen gefärbt und anschließend die sekundären Fußfortsätze mikroskopisch gezählt. Hierbei ließ sich kein wichtiger Unterschied zum Medium erkennen. Eine gesteigerte Durchlässigkeit für Albumin nach Nukleinsäurestimulation der Zellen wurde in unseren Experimenten nicht beobachtet. Hier muss darauf hingewiesen werden, dass die kultivierten Podozyten in der Abbildung 37 nicht den Monolayer, die im Permeabilitätsassay untersucht wurden, entsprechen. Eine komplette Differenzierung in sekundäre Fußfortsätzen mit Ausbildung der Schlitzmembran wird *in vitro* nicht erreicht [51]. Für immunologische Fragestellungen gehen wir jedoch von einer hinreichenden Vergleichbarkeit mit *in vivo* Bedingungen aus [135].

Podozyten sind im ausdifferenzierten Stadium unfähig zur Proliferation. Um die Effekte der Aktivierung von Pathogenerkennungsrezeptoren, nämlich TLRs und RLRs, auf die Zellviabilität näher zu untersuchen, wurden Podozyten in der Proliferationsphase (kultiviert bei 33°C) untersucht, als negative Kontrolle wurden Zellen in der Ausdifferenzierungsphase (37°C) verwendet. Bei der Aktivierung der TLR konnten wir feststellen, dass die Viabilität der Zellen nur im Entzündungsmodell, also mit Zugabe von je 1µg/ml TNF-α und IFN-γ, beeinträchtigt wurde. Ob dieses Phänomen auf die tatsächliche Stimulation mit den Liganden zurückzuführen ist, oder ob die Proliferation unabhängig von der Ligandenstimulation allein durch die Zugabe von TNF-α und IFN-γ beeinträchtigt wird, bleibt für uns bisher unklar. Frühere Studien unserer Arbeitsgruppe belegen eine Zunahme der Proliferation von Mesangialzellen nach Stimulation mit B-DNA und 3P-RNA[193]. Im Gegenteil dazu konnten wir bei Podozyten keinen Effekt auf die Zellviabilität nach Aktivierung von RLRs feststellen.

Fünftes Kapitel: Zusammenfassung

5 Zusammenfassung

Eine Glomerulonephritis kann durch eine virale Infektion verschlechtert werden, sie kann aber auch erst durch diese entstehen. Die Erkennung der viralen Bestandteile erfolgt über Pathogenerkennungsrezeptoren, wie beispielweise Toll-like Rezeptoren und RIG-like Rezeptoren. Die Hypothese der vorliegenden experimentellen Arbeit war, dass die nierenspezifischen Podozyten Pathogenerkennungsrezeptoren besitzen, die pathogen-assoziierte molekulare Muster erkennen und daraus Zytokine und antivirale Typ-I Interferone produzieren. Hierbei könnten Podozyten zu der Entstehung bzw. Verschlechterung einer virusassoziierten Glomerulonephritis beitragen.

Murine Podozyten exprimieren, mit Ausnahme des Toll-like Rezeptors 8, alle bis dato bekannten Toll-like Rezeptoren (TLR-1 bis -11) in verschiedener Ausprägung. Sie exprimieren außerdem die zytosolische Rezeptoren RIG-1, MDA-5, DAI sowie deren Adaptermolekül IPS-1. Die Aktivierung dieser Rezeptoren verursacht die Produktion von Zytokinen und Typ-I Interferonen. Um die intrazelluläre Aufnahme der Nukleinsäuren zu gewährleisten, wurden diese mit kationischen Lipiden komplexiert. Dieser Vorgang wurde durch Cytochalasin D, Chlorpromazin und Methyl- β -Cyclodextrin unterbrochen. Daraufhin ergeben sich die Phagozytose, die Clathrin-abhängige Endozytose und die Caveolae-vermittelte Endozytose als mögliche Transportmechanismen. Das Adaptorprotein MyD88 zeigte bei Podozyten keine Bedeutung für die Nukleinsäureaufnahme in die Zelle zu besitzen. Die Stimulation von Podozyten mit Typ-I Interferonen veranlasste die Produktion von großen Mengen an Interleukin-6 und führte zu einer starken Expression von Pathogenerkennungsrezeptoren sowie proinflammatorischen Zytokinen auf Transkriptionsebene. Eine autokrin-parakrine Aktivierung der Podozyten durch ausgeschüttete Typ-I Interferone konnten wir ausschließen. Weder die Durchlässigkeit für Albumin noch die Viabilität der Zellen wurde durch die Aktivierung von Pathogenerkennungsrezeptoren beeinflusst.

Eine Funktionseinschränkung der Podozyten nach Stimulation der TLRs oder RLRs im Sinne eines direkten Einflusses auf die Permeabilität oder die Fußfortsatzzahl fand sich nicht, jedoch zeigten Podozyten eine vermehrte Zytokinproduktion, was zur glomerulären Entzündung bei viraler Glomerulonephritis beitragen könnte.

Sechstes Kapitel:
Literaturverzeichnis

6 Literaturverzeichnis

1. H. Renz-Polster, S.K., J. Braun, *Basislehrbuch Innere Medizin*. 3. Auflage ed. 2004, München: Urban&Fischer.
2. Smoyer, W.E. and P. Mundel, *Regulation of podocyte structure during the development of nephrotic syndrome*. J Mol Med, 1998. **76**(3-4): p. 172-83.
3. Haraldsson, B., J. Nystrom, and W.M. Deen, *Properties of the glomerular barrier and mechanisms of proteinuria*. Physiol Rev, 2008. **88**(2): p. 451-87.
4. Goldberg, S., et al., *Glomerular filtration is normal in the absence of both agrin and perlecan-heparan sulfate from the glomerular basement membrane*. Nephrol Dial Transplant, 2009. **24**(7): p. 2044-51.
5. Harvey, S.J., et al., *Disruption of glomerular basement membrane charge through podocyte-specific mutation of agrin does not alter glomerular permselectivity*. Am J Pathol, 2007. **171**(1): p. 139-52.
6. Patrakka, J. and K. Tryggvason, *New insights into the role of podocytes in proteinuria*. Nat Rev Nephrol, 2009. **5**(8): p. 463-8.
7. Patrakka, J. and K. Tryggvason, *Molecular make-up of the glomerular filtration barrier*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **396**(1): p. 164-9.
8. Eremina, V., et al., *VEGF inhibition and renal thrombotic microangiopathy*. N Engl J Med, 2008. **358**(11): p. 1129-36.
9. Eremina, V., et al., *Glomerular-specific alterations of VEGF-A expression lead to distinct congenital and acquired renal diseases*. J Clin Invest, 2003. **111**(5): p. 707-16.
10. Simionescu M, S.N., *Ultrastructure of the microvascular wall: functional correlations*, in *Handbook of Physiology. The Cardiovascular System. Microcirculation*. 1984: Bethesda, MD: Am. Physiol. Soc. p. 41-101.
11. Kriz W, K.B., *Structural organization of the mammalian kidney*, in *The Kidney Physiology and Pathophysiology*, G.G. Seldin GW, Editor. 1992, Raven Press: New York. p. 707-777.
12. Miner, J.H., *Renal basement membrane components*. Kidney Int, 1999. **56**(6): p. 2016-24.
13. Hudson, B.G., et al., *Alport's Syndrome, Goodpasture's Syndrome, and Type IV Collagen*. New England Journal of Medicine, 2003. **348**(25): p. 2543-2556.
14. Noakes, P.G., et al., *The renal glomerulus of mice lacking α -laminin/laminin beta 2: nephrosis despite molecular compensation by laminin beta 1*. Nat Genet, 1995. **10**(4): p. 400-6.
15. Zenker, M., et al., *Human laminin beta2 deficiency causes congenital nephrosis with mesangial sclerosis and distinct eye abnormalities*. Hum Mol Genet, 2004. **13**(21): p. 2625-32.
16. Jarad, G., et al., *Proteinuria precedes podocyte abnormalities in $\text{Lamb2}^{-/-}$ mice, implicating the glomerular basement membrane as an albumin barrier*. J Clin Invest, 2006. **116**(8): p. 2272-9.

17. Kanwar, Y.S., A. Linker, and M.G. Farquhar, *Increased permeability of the glomerular basement membrane to ferritin after removal of glycosaminoglycans (heparan sulfate) by enzyme digestion*. J Cell Biol, 1980. **86**(2): p. 688-93.
18. Kriz, W., *Progressive renal failure--inability of podocytes to replicate and the consequences for development of glomerulosclerosis*. Nephrol Dial Transplant, 1996. **11**(9): p. 1738-42.
19. Mundel, P. and W. Kriz, *Structure and function of podocytes: an update*. Anat Embryol (Berl), 1995. **192**(5): p. 385-97.
20. Kriz W, *Biologie des Podozyten*. Der Nephrologe, 2006: p. 144-152.
21. Asanuma, K. and P. Mundel, *The role of podocytes in glomerular pathobiology*. Clin Exp Nephrol, 2003. **7**(4): p. 255-9.
22. Eddy, A.A. and H.W. Schnaper, *The nephrotic syndrome: from the simple to the complex*. Semin Nephrol, 1998. **18**(3): p. 304-16.
23. Somlo, S. and P. Mundel, *Getting a foothold in nephrotic syndrome*. Nat Genet, 2000. **24**(4): p. 333-5.
24. Whiteside, C.I., et al., *Podocytic cytoskeletal disaggregation and basement-membrane detachment in puromycin aminonucleoside nephrosis*. Am J Pathol, 1993. **142**(5): p. 1641-53.
25. Shirato, I., et al., *Cytoskeletal changes in podocytes associated with foot process effacement in Masugi nephritis*. Am J Pathol, 1996. **148**(4): p. 1283-96.
26. Smoyer, W.E., et al., *Podocyte alpha-actinin induction precedes foot process effacement in experimental nephrotic syndrome*. Am J Physiol, 1997. **273**(1 Pt 2): p. F150-7.
27. Mundel, P., et al., *Rearrangements of the cytoskeleton and cell contacts induce process formation during differentiation of conditionally immortalized mouse podocyte cell lines*. Exp Cell Res, 1997. **236**(1): p. 248-58.
28. Kerjaschki, D., *Caught flat-footed: podocyte damage and the molecular bases of focal glomerulosclerosis*. J Clin Invest, 2001. **108**(11): p. 1583-7.
29. Kerjaschki, D., D.J. Sharkey, and M.G. Farquhar, *Identification and characterization of podocalyxin--the major sialoprotein of the renal glomerular epithelial cell*. J Cell Biol, 1984. **98**(4): p. 1591-6.
30. Matsui, K., et al., *Podoplanin, a novel 43-kDa membrane protein, controls the shape of podocytes*. Nephrol Dial Transplant, 1999. **14 Suppl 1**: p. 9-11.
31. Shankland, S.J., *The podocyte's response to injury: role in proteinuria and glomerulosclerosis*. Kidney Int, 2006. **69**(12): p. 2131-47.
32. Drenckhahn, D. and R.P. Franke, *Ultrastructural organization of contractile and cytoskeletal proteins in glomerular podocytes of chicken, rat, and man*. Lab Invest, 1988. **59**(5): p. 673-82.
33. Kobayashi, N., et al., *Nonuniform microtubular polarity established by CHO1/MKLP1 motor protein is necessary for process formation of podocytes*. J Cell Biol, 1998. **143**(7): p. 1961-70.
34. Kerjaschki, D., et al., *A beta 1-integrin receptor for fibronectin in human kidney glomeruli*. Am J Pathol, 1989. **134**(2): p. 481-9.

35. Raats, C.J., et al., *Expression of agrin, dystroglycan, and utrophin in normal renal tissue and in experimental glomerulopathies*. Am J Pathol, 2000. **156**(5): p. 1749-65.
36. Regele, H.M., et al., *Glomerular expression of dystroglycans is reduced in minimal change nephrosis but not in focal segmental glomerulosclerosis*. J Am Soc Nephrol, 2000. **11**(3): p. 403-12.
37. Kreidberg, J.A., et al., *Alpha 3 beta 1 integrin has a crucial role in kidney and lung organogenesis*. Development, 1996. **122**(11): p. 3537-47.
38. Ichimura, K., H. Kurihara, and T. Sakai, *Actin filament organization of foot processes in rat podocytes*. J Histochem Cytochem, 2003. **51**(12): p. 1589-600.
39. Djinovic-Carugo, K., et al., *Structure of the alpha-actinin rod: molecular basis for cross-linking of actin filaments*. Cell, 1999. **98**(4): p. 537-46.
40. Beggs, A.H., et al., *Cloning and characterization of two human skeletal muscle alpha-actinin genes located on chromosomes 1 and 11*. J Biol Chem, 1992. **267**(13): p. 9281-8.
41. Blanchard, A., V. Ohanian, and D. Critchley, *The structure and function of alpha-actinin*. J Muscle Res Cell Motil, 1989. **10**(4): p. 280-9.
42. Pavenstadt, H., W. Kriz, and M. Kretzler, *Cell biology of the glomerular podocyte*. Physiol Rev, 2003. **83**(1): p. 253-307.
43. Otey, C.A. and O. Carpen, *Alpha-actinin revisited: a fresh look at an old player*. Cell Motil Cytoskeleton, 2004. **58**(2): p. 104-11.
44. Mundel, P., et al., *Synaptopodin: an actin-associated protein in telencephalic dendrites and renal podocytes*. J Cell Biol, 1997. **139**(1): p. 193-204.
45. Asanuma, K., et al., *Synaptopodin regulates the actin-bundling activity of alpha-actinin in an isoform-specific manner*. J Clin Invest, 2005. **115**(5): p. 1188-98.
46. Rodewald, R. and M.J. Karnovsky, *Porous substructure of the glomerular slit diaphragm in the rat and mouse*. J Cell Biol, 1974. **60**(2): p. 423-33.
47. Schnabel, E., J.M. Anderson, and M.G. Farquhar, *The tight junction protein ZO-1 is concentrated along slit diaphragms of the glomerular epithelium*. J Cell Biol, 1990. **111**(3): p. 1255-63.
48. Keon, B.H., et al., *Symplekin, a novel type of tight junction plaque protein*. J Cell Biol, 1996. **134**(4): p. 1003-18.
49. Saitou, M., et al., *Mammalian occludin in epithelial cells: its expression and subcellular distribution*. Eur J Cell Biol, 1997. **73**(3): p. 222-31.
50. Itoh, M., et al., *The 220-kD protein colocalizing with cadherins in non-epithelial cells is identical to ZO-1, a tight junction-associated protein in epithelial cells: cDNA cloning and immunoelectron microscopy*. J Cell Biol, 1993. **121**(3): p. 491-502.
51. Reiser, J., et al., *The glomerular slit diaphragm is a modified adherens junction*. J Am Soc Nephrol, 2000. **11**(1): p. 1-8.
52. Yonemura, S., et al., *Cell-to-cell adherens junction formation and actin filament organization: similarities and differences between non-polarized fibroblasts and polarized epithelial cells*. J Cell Sci, 1995. **108** (Pt 1): p. 127-42.

53. Itoh, M., et al., *Involvement of ZO-1 in cadherin-based cell adhesion through its direct binding to alpha catenin and actin filaments*. J Cell Biol, 1997. **138**(1): p. 181-92.
54. Kestila, M., et al., *Positionally cloned gene for a novel glomerular protein--nephrin--is mutated in congenital nephrotic syndrome*. Mol Cell, 1998. **1**(4): p. 575-82.
55. Boute, N., et al., *NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome*. Nat Genet, 2000. **24**(4): p. 349-54.
56. Inoue, T., et al., *FAT is a component of glomerular slit diaphragms*. Kidney Int, 2001. **59**(3): p. 1003-12.
57. Radice, G.L., et al., *Precocious mammary gland development in P-cadherin-deficient mice*. J Cell Biol, 1997. **139**(4): p. 1025-32.
58. Tryggvason, K., J. Patrakka, and J. Wartiovaara, *Hereditary proteinuria syndromes and mechanisms of proteinuria*. N Engl J Med, 2006. **354**(13): p. 1387-401.
59. Tryggvason, K., *Unraveling the mechanisms of glomerular ultrafiltration: nephrin, a key component of the slit diaphragm*. J Am Soc Nephrol, 1999. **10**(11): p. 2440-5.
60. Shih, N.Y., et al., *Congenital nephrotic syndrome in mice lacking CD2-associated protein*. Science, 1999. **286**(5438): p. 312-5.
61. Verma, R., et al., *Nephrin ectodomain engagement results in Src kinase activation, nephrin phosphorylation, Nck recruitment, and actin polymerization*. J Clin Invest, 2006. **116**(5): p. 1346-59.
62. Jones, N., et al., *Nck adaptor proteins link nephrin to the actin cytoskeleton of kidney podocytes*. Nature, 2006. **440**(7085): p. 818-23.
63. Lehtonen, S., F. Zhao, and E. Lehtonen, *CD2-associated protein directly interacts with the actin cytoskeleton*. Am J Physiol Renal Physiol, 2002. **283**(4): p. F734-43.
64. Garg, P., et al., *Neph1 cooperates with nephrin to transduce a signal that induces actin polymerization*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(24): p. 8698-712.
65. Donoviel, D.B., et al., *Proteinuria and perinatal lethality in mice lacking NEPH1, a novel protein with homology to NEPHRIN*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(14): p. 4829-36.
66. Sellin, L., et al., *NEPH1 defines a novel family of podocin interacting proteins*. FASEB J, 2003. **17**(1): p. 115-7.
67. Schwarz, K., et al., *Podocin, a raft-associated component of the glomerular slit diaphragm, interacts with CD2AP and nephrin*. J Clin Invest, 2001. **108**(11): p. 1621-9.
68. Mundel, P. and J. Reiser, *Proteinuria: an enzymatic disease of the podocyte?* Kidney Int, 2010. **77**(7): p. 571-80.
69. Orth, S.R. and E. Ritz, *The nephrotic syndrome*. N Engl J Med, 1998. **338**(17): p. 1202-11.
70. Kriz, W., *Podocyte is the major culprit accounting for the progression of chronic renal disease*. Microsc Res Tech, 2002. **57**(4): p. 189-95.
71. Herold, G., *Innere Medizin*. 2007, Köln.

72. Farquhar, M.G., R.L. Vernier, and R.A. Good, *An electron microscope study of the glomerulus in nephrosis, glomerulonephritis, and lupus erythematosus*. J Exp Med, 1957. **106**(5): p. 649-60.
73. Kaplan, J.M., et al., *Mutations in ACTN4, encoding alpha-actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis*. Nat Genet, 2000. **24**(3): p. 251-6.
74. Tryggvason, K. and J. Wartiovaara, *Molecular basis of glomerular permselectivity*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2001. **10**(4): p. 543-9.
75. Nagata, M., Y. Yamaguchi, and K. Ito, *Loss of mitotic activity and the expression of vimentin in glomerular epithelial cells of developing human kidneys*. Anat Embryol (Berl), 1993. **187**(3): p. 275-9.
76. Nagata, M., et al., *Mitosis and the presence of binucleate cells among glomerular podocytes in diseased human kidneys*. Nephron, 1995. **70**(1): p. 68-71.
77. Kriz, W., et al., *The role of podocytes in the development of glomerular sclerosis*. Kidney Int Suppl, 1994. **45**: p. S64-72.
78. Rennke, H.G., *How does glomerular epithelial cell injury contribute to progressive glomerular damage?* Kidney Int Suppl, 1994. **45**: p. S58-63.
79. Wiggins, R.C., *The spectrum of podocytopathies: a unifying view of glomerular diseases*. Kidney Int, 2007. **71**(12): p. 1205-14.
80. Reiser, J., et al., *Novel concepts in understanding and management of glomerular proteinuria*. Nephrol Dial Transplant, 2002. **17**(6): p. 951-5.
81. Barisoni, L. and P. Mundel, *Podocyte biology and the emerging understanding of podocyte diseases*. Am J Nephrol, 2003. **23**(5): p. 353-60.
82. Reiser, J., et al., *Podocyte migration during nephrotic syndrome requires a coordinated interplay between cathepsin L and alpha3 integrin*. J Biol Chem, 2004. **279**(33): p. 34827-32.
83. Böcker W, D.H., Heitz P, *Pathologie*. 3. Auflage ed. 2004: Urban & Fischer.
84. Tan, E.M., et al., *The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum, 1982. **25**(11): p. 1271-7.
85. Weening, J.J., et al., *The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited*. J Am Soc Nephrol, 2004. **15**(2): p. 241-50.
86. Cameron, J.S., *Lupus nephritis*. J Am Soc Nephrol, 1999. **10**(2): p. 413-24.
87. Pavenstädt, H. *Lupus Nephritis*. [cited 2010 9.November]; Available from: <http://medd.klinikum.uni-muenster.de/standards/nephrologie/Lupusnephritis%20korr%20EB%2007.04.04.pdf>.
88. Schiffer, M., *Pathogenese der fokal segmentalen Glomerulosklerose: eine Morphe, viele Erkrankungen*. Der Nephrologe, 2006: p. 153-162.
89. Winn, M.P., *Approach to the evaluation of heritable diseases and update on familial focal segmental glomerulosclerosis*. Nephrol Dial Transplant, 2003. **18 Suppl 6**: p. vi14-20.
90. Choi, H.J., et al., *Familial focal segmental glomerulosclerosis associated with an ACTN4 mutation and paternal germline mosaicism*. Am J Kidney Dis, 2008. **51**(5): p. 834-8.

91. Deegens, J.K., E.J. Steenbergen, and J.F. Wetzels, *Review on diagnosis and treatment of focal segmental glomerulosclerosis*. Neth J Med, 2008. **66**(1): p. 3-12.
92. Schrijvers, B.F., A.S. De Vriese, and A. Flyvbjerg, *From hyperglycemia to diabetic kidney disease: the role of metabolic, hemodynamic, intracellular factors and growth factors/cytokines*. Endocr Rev, 2004. **25**(6): p. 971-1010.
93. Welsh, G.I. and R.J. Coward, *Podocytes, glucose and insulin*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2010. **19**(4): p. 379-84.
94. Thomas, C., *Histopathologie*. 14. Auflage ed. 2006, Stuttgart, Germany: Schattauer. 410.
95. Huttunen, N.P., *Congenital nephrotic syndrome of Finnish type. Study of 75 patients*. Arch Dis Child, 1976. **51**(5): p. 344-8.
96. Glasscock, R.J., *Immune complex-induced glomerular injury in viral diseases: an overview*. Kidney Int Suppl, 1991. **35**: p. S5-7.
97. Lai, A.S. and K.N. Lai, *Viral nephropathy*. Nat Clin Pract Nephrol, 2006. **2**(5): p. 254-62.
98. di Belgiojoso, G.B., F. Ferrario, and N. Landriani, *Virus-related glomerular diseases: histological and clinical aspects*. J Nephrol, 2002. **15**(5): p. 469-79.
99. Theofilopoulos, A.N., et al., *Type I interferons (alpha/beta) in immunity and autoimmunity*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 307-36.
100. WHO. *Hepatitis B*. August 2008 [cited 2010 11.November]; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/index.html>.
101. Lai, F.M., et al., *Primary glomerulonephritis with detectable glomerular hepatitis B virus antigens*. Am J Surg Pathol, 1994. **18**(2): p. 175-86.
102. Lai, K., *Hepatitis B associated renal disease*. Rheumatology and the Kidney, 2001: p. 377-396.
103. Levy, M. and N. Chen, *Worldwide perspective of hepatitis B-associated glomerulonephritis in the 80s*. Kidney Int Suppl, 1991. **35**: p. S24-33.
104. Ozdamar, S.O., S. Gucer, and K. Tinaztepe, *Hepatitis-B virus associated nephropathies: a clinicopathological study in 14 children*. Pediatr Nephrol, 2003. **18**(1): p. 23-8.
105. Lai, K.N., et al., *Membranous nephropathy related to hepatitis B virus in adults*. N Engl J Med, 1991. **324**(21): p. 1457-63.
106. Appel, G., *Viral infections and the kidney: HIV, hepatitis B, and hepatitis C*. Cleve Clin J Med, 2007. **74**(5): p. 353-60.
107. Poland, G.A. and R.M. Jacobson, *Clinical practice: prevention of hepatitis B with the hepatitis B vaccine*. N Engl J Med, 2004. **351**(27): p. 2832-8.
108. Johnson RJ, G.D., Yamabe H, et al., *Membranoproliferative glomerulonephritis associated with hepatitis C virus infection*. N Engl J Med, 1993: p. 328:465-470.
109. Pawlotsky, J.M., et al., *Immunological disorders in C virus chronic active hepatitis: a prospective case-control study*. Hepatology, 1994. **19**(4): p. 841-8.
110. Kayali, Z., et al., *Hepatitis C, cryoglobulinemia, and cirrhosis: a meta-analysis*. Hepatology, 2002. **36**(4 Pt 1): p. 978-85.

111. D'Amico, G., *Renal involvement in hepatitis C infection: cryoglobulinemic glomerulonephritis*. *Kidney Int*, 1998. **54**(2): p. 650-71.
112. Tarantino, A., et al., *Long-term predictors of survival in essential mixed cryoglobulinemic glomerulonephritis*. *Kidney Int*, 1995. **47**(2): p. 618-23.
113. Merson, M.H., *The HIV-AIDS pandemic at 25--the global response*. *N Engl J Med*, 2006. **354**(23): p. 2414-7.
114. Sepkowitz, K.A., *One disease, two epidemics--AIDS at 25*. *N Engl J Med*, 2006. **354**(23): p. 2411-4.
115. Bourgoignie, J.J., *Renal complications of human immunodeficiency virus type 1*. *Kidney Int*, 1990. **37**(6): p. 1571-84.
116. Kimmel, P.L., et al., *HIV-associated immune-mediated renal disease*. *Kidney Int*, 1993. **44**(6): p. 1327-40.
117. Eustace, J.A., et al., *Cohort study of the treatment of severe HIV-associated nephropathy with corticosteroids*. *Kidney Int*, 2000. **58**(3): p. 1253-60.
118. Vollmar A, D.T., Zündorf I, *Immunologie. Grundlagen und Wirkstoffe*. 2005: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.
119. Creagh, E.M. and L.A. O'Neill, *TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that cooperate in innate immunity*. *Trends Immunol*, 2006. **27**(8): p. 352-7.
120. Anders, H.J., *Innate pathogen recognition in the kidney: toll-like receptors, NOD-like receptors, and RIG-like helicases*. *Kidney Int*, 2007. **72**(9): p. 1051-6.
121. Horn, F., *Biochemie des Menschen*. 2003: Thieme.
122. Anderson, K.V. and C. Nusslein-Volhard, *Information for the dorsal--ventral pattern of the Drosophila embryo is stored as maternal mRNA*. *Nature*, 1984. **311**(5983): p. 223-7.
123. Lemaitre, B., et al., *The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults*. *Cell*, 1996. **86**(6): p. 973-83.
124. Rock, F.L., et al., *A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(2): p. 588-93.
125. Albiger, B., et al., *Role of the innate immune system in host defence against bacterial infections: focus on the Toll-like receptors*. *J Intern Med*, 2007. **261**(6): p. 511-28.
126. Kawai, T. and S. Akira, *TLR signaling*. *Cell Death Differ*, 2006. **13**(5): p. 816-25.
127. Akira, S., *TLR signaling*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2006. **311**: p. 1-16.
128. Yoneyama, M. and T. Fujita, *Function of RIG-I-like receptors in antiviral innate immunity*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(21): p. 15315-8.
129. Andrejeva, J., et al., *The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN-beta promoter*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(49): p. 17264-9.
130. Yoneyama, M., et al., *The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses*. *Nat Immunol*, 2004. **5**(7): p. 730-7.

131. Kawai, T. and S. Akira, *Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling*. Ann N Y Acad Sci, 2008. **1143**: p. 1-20.
132. Schütt, C. and B. Bröker, *Grundwissen Immunologie*. 2009, Spektrum, Akad. Verl. : Heidelberg.
133. Isaacs, A. and J. Lindenmann, *Virus interference. I. The interferon*. Proc R Soc Lond B Biol Sci, 1957. **147**(927): p. 258-67.
134. Modrow, S., et al., *Molekulare Virologie*. 2010, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.
135. Shankland, S.J., et al., *Podocytes in culture: past, present, and future*. Kidney Int, 2007. **72**(1): p. 26-36.
136. Schiwiek, D., et al., *Stable expression of nephrin and localization to cell-cell contacts in novel murine podocyte cell lines*. Kidney Int, 2004. **66**(1): p. 91-101.
137. Banas, M.C., et al., *TLR4 links podocytes with the innate immune system to mediate glomerular injury*. J Am Soc Nephrol, 2008. **19**(4): p. 704-13.
138. Takeda, K. and S. Akira, *Toll-like receptors in innate immunity*. Int Immunol, 2005. **17**(1): p. 1-14.
139. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi, *Pathogen recognition and innate immunity*. Cell, 2006. **124**(4): p. 783-801.
140. Hornung, V., et al., *5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I*. Science, 2006. **314**(5801): p. 994-7.
141. Stetson, D.B. and R. Medzhitov, *Recognition of cytosolic DNA activates an IRF3-dependent innate immune response*. Immunity, 2006. **24**(1): p. 93-103.
142. Patole, P.S., et al., *Viral double-stranded RNA aggravates lupus nephritis through Toll-like receptor 3 on glomerular mesangial cells and antigen-presenting cells*. J Am Soc Nephrol, 2005. **16**(5): p. 1326-38.
143. Takaoka, A., et al., *DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response*. Nature, 2007. **448**(7152): p. 501-5.
144. Suzuki, K., et al., *Activation of target-tissue immune-recognition molecules by double-stranded polynucleotides*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(5): p. 2285-90.
145. Pawar, R.D., et al., *Bacterial lipopeptide triggers massive albuminuria in murine lupus nephritis by activating Toll-like receptor 2 at the glomerular filtration barrier*. Immunology, 2009. **128**(1 Suppl): p. e206-21.
146. Kato, H., et al., *Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses*. Nature, 2006. **441**(7089): p. 101-5.
147. Pichlmair, A., et al., *RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates*. Science, 2006. **314**(5801): p. 997-1001.
148. Itoh, K., et al., *The clathrin-mediated endocytic pathway participates in dsRNA-induced IFN-beta production*. J Immunol, 2008. **181**(8): p. 5522-9.
149. Saleh, M.C., et al., *The endocytic pathway mediates cell entry of dsRNA to induce RNAi silencing*. Nat Cell Biol, 2006. **8**(8): p. 793-802.

150. Okamoto, Y., et al., *Cholesterol oxidation switches the internalization pathway of endothelin receptor type A from caveolae to clathrin-coated pits in Chinese hamster ovary cells.* J Biol Chem, 2000. **275**(9): p. 6439-46.
151. Loiarro, M., et al., *Peptide-mediated interference of TIR domain dimerization in MyD88 inhibits interleukin-1-dependent activation of NF- κ B.* J Biol Chem, 2005. **280**(16): p. 15809-14.
152. Abbas, A.K. and A.H. Sharpe, *T-cell stimulation: an abundance of B7s.* Nat Med, 1999. **5**(12): p. 1345-6.
153. Henry, J., M.M. Miller, and P. Pontarotti, *Structure and evolution of the extended B7 family.* Immunol Today, 1999. **20**(6): p. 285-8.
154. Chambers, C.A. and J.P. Allison, *Costimulatory regulation of T cell function.* Curr Opin Cell Biol, 1999. **11**(2): p. 203-10.
155. Beutler, B. and E.T. Rietschel, *Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin.* Nat Rev Immunol, 2003. **3**(2): p. 169-76.
156. Reiser, J., et al., *Induction of B7-1 in podocytes is associated with nephrotic syndrome.* J Clin Invest, 2004. **113**(10): p. 1390-7.
157. Allam, R., et al., *Viral 5'-triphosphate RNA and non-CpG DNA aggravate autoimmunity and lupus nephritis via distinct TLR-independent immune responses.* Eur J Immunol, 2008. **38**(12): p. 3487-98.
158. Lau, C.M., et al., *RNA-associated autoantigens activate B cells by combined B cell antigen receptor/Toll-like receptor 7 engagement.* J Exp Med, 2005. **202**(9): p. 1171-7.
159. Savarese, E., et al., *U1 small nuclear ribonucleoprotein immune complexes induce type I interferon in plasmacytoid dendritic cells through TLR7.* Blood, 2006. **107**(8): p. 3229-34.
160. Yasuda, K., et al., *Murine dendritic cell type I IFN production induced by human IgG-RNA immune complexes is IFN regulatory factor (IRF)5 and IRF7 dependent and is required for IL-6 production.* J Immunol, 2007. **178**(11): p. 6876-85.
161. Gomez-Guerrero, C., et al., *Soluble IgA and IgG aggregates are catabolized by cultured rat mesangial cells and induce production of TNF-alpha and IL-6, and proliferation.* J Immunol, 1994. **153**(11): p. 5247-55.
162. Lai, F.M., et al., *Hepatitis B virus-related nephropathy and lupus nephritis: morphologic similarities of two clinical entities.* Mod Pathol, 2000. **13**(2): p. 166-72.
163. Sansonno, D., et al., *Hepatitis C virus RNA and core protein in kidney glomerular and tubular structures isolated with laser capture microdissection.* Clin Exp Immunol, 2005. **140**(3): p. 498-506.
164. Motojima, M., et al., *Fibrinogen that appears in Bowman's space of proteinuric kidneys in vivo activates podocyte Toll-like receptors 2 and 4 in vitro.* Nephron Exp Nephrol, 2010. **114**(2): p. e39-47.
165. Flur, K., et al., *Viral RNA induces type I interferon-dependent cytokine release and cell death in mesangial cells via melanoma-differentiation-associated gene-5: Implications for viral infection-associated glomerulonephritis.* Am J Pathol, 2009. **175**(5): p. 2014-22.

166. Ribeiro, A., et al., *Activation of innate immune defense mechanisms contributes to polyomavirus BK-associated nephropathy*. *Kidney Int*, 2012. **81**(1): p. 100-11.
167. Hagele, H., et al., *Double-stranded RNA activates type I interferon secretion in glomerular endothelial cells via retinoic acid-inducible gene (RIG)-I*. *Nephrol Dial Transplant*, 2009. **24**(11): p. 3312-8.
168. Hagele, H., et al., *Double-stranded DNA activates glomerular endothelial cells and enhances albumin permeability via a toll-like receptor-independent cytosolic DNA recognition pathway*. *Am J Pathol*, 2009. **175**(5): p. 1896-904.
169. Takeuchi, O. and S. Akira, *Recognition of viruses by innate immunity*. *Immunol Rev*, 2007. **220**: p. 214-24.
170. Kato, H., et al., *Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response*. *Immunity*, 2005. **23**(1): p. 19-28.
171. Hoebe, K., et al., *Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling*. *Nature*, 2003. **424**(6950): p. 743-8.
172. Takeuchi, O. and S. Akira, *MDA5/RIG-I and virus recognition*. *Curr Opin Immunol*, 2008. **20**(1): p. 17-22.
173. Kumar, H., et al., *Essential role of IPS-1 in innate immune responses against RNA viruses*. *J Exp Med*, 2006. **203**(7): p. 1795-803.
174. Sun, Q., et al., *The specific and essential role of MAVS in antiviral innate immune responses*. *Immunity*, 2006. **24**(5): p. 633-42.
175. Seth, R.B., et al., *Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3*. *Cell*, 2005. **122**(5): p. 669-82.
176. Imaizumi, T., et al., *Interferon-gamma induces retinoic acid-inducible gene-I in endothelial cells*. *Endothelium*, 2004. **11**(3-4): p. 169-73.
177. Suzuki, K., et al., *Expression of retinoic acid-inducible gene-I in lupus nephritis*. *Nephrol Dial Transplant*, 2007. **22**(8): p. 2407-9.
178. Ronnblom, L., M.L. Eloranta, and G.V. Alm, *The type I interferon system in systemic lupus erythematosus*. *Arthritis Rheum*, 2006. **54**(2): p. 408-20.
179. Yoneyama, M., et al., *Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity*. *J Immunol*, 2005. **175**(5): p. 2851-8.
180. Loo, Y.M., et al., *Distinct RIG-I and MDA5 signaling by RNA viruses in innate immunity*. *J Virol*, 2008. **82**(1): p. 335-45.
181. Gitlin, L., et al., *Essential role of mda-5 in type I IFN responses to polyriboinosinic:polyribocytidylic acid and encephalomyocarditis picornavirus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(22): p. 8459-64.
182. Hemmi, H., et al., *A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA*. *Nature*, 2000. **408**(6813): p. 740-5.
183. Ishii, K.J., et al., *A Toll-like receptor-independent antiviral response induced by double-stranded B-form DNA*. *Nat Immunol*, 2006. **7**(1): p. 40-8.

184. Chi, H. and R.A. Flavell, *Immunology: sensing the enemy within*. Nature, 2007. **448**(7152): p. 423-4.
185. Wang, Z., et al., *Regulation of innate immune responses by DAI (DLM-1/ZBP1) and other DNA-sensing molecules*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(14): p. 5477-82.
186. Pestka, S., C.D. Krause, and M.R. Walter, *Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors*. Immunol Rev, 2004. **202**: p. 8-32.
187. Borden, E.C., et al., *Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine*. Nat Rev Drug Discov, 2007. **6**(12): p. 975-90.
188. Colonna, M., A. Krug, and M. Cella, *Interferon-producing cells: on the front line in immune responses against pathogens*. Curr Opin Immunol, 2002. **14**(3): p. 373-9.
189. Coccia, E.M., et al., *Viral infection and Toll-like receptor agonists induce a differential expression of type I and lambda interferons in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells*. Eur J Immunol, 2004. **34**(3): p. 796-805.
190. Honda, K., et al., *Selective contribution of IFN-alpha/beta signaling to the maturation of dendritic cells induced by double-stranded RNA or viral infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(19): p. 10872-7.
191. Honda, K., A. Takaoka, and T. Taniguchi, *Type I interferon [corrected] gene induction by the interferon regulatory factor family of transcription factors*. Immunity, 2006. **25**(3): p. 349-60.
192. Prakash, A., et al., *Tissue-specific positive feedback requirements for production of type I interferon following virus infection*. J Biol Chem, 2005. **280**(19): p. 18651-7.
193. Allam, R., et al., *Viral RNA and DNA trigger common antiviral responses in mesangial cells*. J Am Soc Nephrol, 2009. **20**(9): p. 1986-96.

Siebtes Kapitel:
Abkürzungsverzeichnis

7 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
AIDS	<i>Acquired immune deficiency syndrome</i>
AJ	Adherens Junction
Ak	Antikörper
APC	Antigenpräsentierende Zellen
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , bovines Serumalbumin
CARD	<i>Caspase recruitment domain</i>
CCL5	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 5</i>
CD2AP	CD2-assoziertes Protein
CL	Kationisches Lipid
CLP	Chlorpromazin
CNSF	Kongenitales Nephrotisches Syndrom vom Finnischen Typ
CXCL10	<i>C-X-C motif chemokine 10</i>
Cyto	Cytocholasin D
d	Tag
DAI	<i>DNA-dependent activator of IFN regulatory factors</i>
DAPI	4', 6 - Diamidin -2- phenylindol
DEPC	Diethyl-Pyrocarbonat
DM	Diabetes Mellitus
DMS	Diffuse Mesangialsklerose
DMSO	Dimethylsulfoxid
DN	Diabetische Nephropathie
dsRNA	Doppelstrang RNA
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>

FACS	<i>Fluorescence activated cell sorter</i>
FBS	Fötales bovines Serum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FSGS	Fokal segmentale Glomerulosklerose
g	Gramm
GBM	glomeruläre Basalmembran
GECs	glomeruläre Endothelzellen
GN	Glomerulonephritis/ Glomerulopathie
HBV	Hepatitis B-Virus
HCV	Hepatitis C-Virus
HTN	Hypertensive Nephropathie
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IL-1R	Interleukin-1-Rezeptoren
IP-10	<i>Interferon-γ induced protein 10 kDa</i>
IPS1	<i>Interferon-β promoter stimulator-1</i>
IRAK	Interleukin-1-Rezeptor-assoziierte Kinase
ISG	<i>Interferon stimulated genes</i>
ISRE	<i>Interferon stimulated regulatory elements</i>
kD	Kilodalton
l	Liter
LGP 2	<i>laboratory of genetics and physiology 2</i>
LN	Lupusnephritis
LPS	Lipopolisaccharide
LRR	<i>Leucin-rich repeats</i>
MCGN/MCD	Minimal change-Glomerulonephritis

MCP-1	<i>monocyte chemotactic protein-1</i>
MDA5	<i>melanoma differentiation-associated gene 5</i>
mg	Milligramm
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MPGN	Membranoproliferative Glomerulonephritis
MyD88	Myeloid differentiation factor 88
M β CD	Methyl- β -Cyclodextrin
NK	Natürliche Killerzellen
NLRs	NOD-like Rezeptoren
nm	Nanometer
NOD	<i>nucleotide-oligomerization domain</i>
OD	Optische Dichte
P/S	Penicillin/Streptomycin
Pam3Cys	<i>Synthetic bacterial lipoprotein - TLR2/TLR1 Ligand</i>
PAMP	<i>pathogen associated molecular pattern</i> , pathogen-assoziierte molekulare Muster
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> , Phosphat-gepuff. Kochsalz
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Ketten-Reaktion
pDC	plasmozytische dendritische Zellen
PF	Podozyten-Fußfortsatz
PI	Propodium Jodit
Poly I:C	<i>Polyinosine-polycytidylic acid</i>
PRR	<i>pattern recognition receptors</i>
PS	Phosphatidylserin
r.p.m.	<i>Revolutions per Minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RANTES	<i>Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted</i>
RIG-1	<i>Retinoic acid-inducible gene I</i> , Retinsäure-induziertes Gen I

RLRs	RIG-like Rezeptoren
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
SCID	Severe Combined Immunodeficiency
SLE	Sytemischer Lupus Erythematodes
SM	Schlitzmembran
ssRNA	Einzelstrang RNA
Stat	<i>Signal transducers and activators of transcription</i>
TEM	Transmissions-Elektronen-Mikroskop
TJ	Tight Junction
TLRs	Toll-like Rezeptoren
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VGEC	Viszeral glomeruläre Epithelzellen
ZO-1	Zonula occludens 1

Achtes Kapitel:

Danksagung

8 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Hans-Joachim Anders für die Überlassung dieses interessanten Themas und die Aufnahme in seine freundliche Arbeitsgruppe. Vielen Dank für die Einführung in die wissenschaftliche Arbeit.

Auch Herrn Prof. Dr. med. Stefan Endres gilt mein Dank für die Aufnahme in das DFG „Graduiertenkolleg 1202“ und die finanzielle Unterstützung.

Bei Herrn Prof. Dr. med. Karlhans Endlich möchte ich mich für die Zusendung von Podozyten und Bereitstellung von Protokollen für die Zellkultur bedanken. Ilka Edenhofer danke ich herzlich für die Einführung in die Podozyten-Zellkultur und die hilfreiche Unterstützung dabei.

Ein außerordentlicher Dank gilt für die gesamte Arbeitsgruppe, für die Zusammenarbeit, die fachliche Diskussionen, die Hilfsbereitschaft sowie die Ratschläge. Meinen Kollegen und Freunden Holger Hägele, Alejandro Avila Ferrufino, Heni Eka Susanti, Allam Ramajaneyulu, Onkar Kulkarni, Katharina Flür, Martin Schwarz, Peter Kurktschiev, Patricia Lemnitzer, Mi Ryu, Melanie Fleischhacker und Sufyan Sayyed möchte ich ganz herzlich für die sehr angenehme Zeit und das Lachen im Labor danken. Für die labortechnische Einarbeitung danke ich besonders Stephanie Pfeiffer. Bei Maciej Lech bedanke ich mich für die Hilfe bei der Bearbeitung von Graphen. Ebenfalls gilt mein Dank allen Mitarbeitern der Klinischen Biochemie.

Lisa Sanner, Julia Roider, Katharina Miesen und Felix Köbler verdanke ich die geduldige und bestimmt nicht einfache Korrektur dieser Arbeit.

Bei meinen liebevollen Eltern, Nelly López Núñez und José Castrezana Sánchez, und meinen Brüdern Bruno und Joselito bedanke ich mich für das immer Dasein auch wenn sie weit weg sind, für die dauerhafte Unterstützung und das Aufbauen in schwierigen Momenten.

Zuletzt gilt mein Dank meinen Freunden und der restlichen Familie, für die Liebe, welche ich von euch bekommen habe und die ganze Unterstützung in den verschiedenen Phasen meines Lebens.