

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR INNERE MEDIZIN II
PROF. DR. MED. L. MAIER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Die simultane Inkubation mit exogenen und endogenen
Toll-like Rezeptor-Liganden bedingt eine Aggravierung des Schädigungsmusters

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Felix Bourier

2014

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR INNERE MEDIZIN II
PROF. DR. MED. L. MAIER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Die simultane Inkubation mit exogenen und endogenen
Toll-like Rezeptor-Liganden bedingt eine Aggravierung des Schädigungsmusters

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Felix Bourier

2014

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Bernhard Banas

2. Berichterstatter: PD Dr. Stefan Farkas

Tag der mündlichen Prüfung: 24.07.2014

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1	Angeborene Immunität und Toll-like Rezeptor-System(TLR)	2
1.1.1	Struktur der Toll-like Rezeptoren und ihre Liganden.....	3
1.1.2	Signalwege nach TLR-Aktivierung	4
1.1.2.1	MyD88-abhängiger Signalweg	5
1.1.2.2	MyD88-unabhängiger Signalweg	6
1.1.3	Beispiele klinischer Bedeutung	7
1.2	Ischämie/Reperfusionsschaden im Rahmen der Nierentransplantation	8
1.2.1	Direkte Zellschädigung durch Hypoxie und radikale Sauerstoffspezies.....	9
1.2.2	Schädigung im Rahmen von endothelialer Dysfunktion und Mediatoren.....	10
1.2.3	Schädigungsmechanismen der angeborenen Immunität	11
1.3	Wissenschaftliches Thema der Arbeit und Zielsetzung.....	13
2.	Material & Methoden	15
2.1	Material.....	15
2.1.1	Zellkultur	15
2.1.1.1	Zelllinien.....	15
2.1.1.2	Zellkulturmedien und Zusatzstoffe.....	15
2.1.1.3	Exogene und endogene TLR-Liganden	16
2.1.2	Chemikalien & Kits	17
2.1.3	Puffer & Lösungen	20
2.1.4	Verbrauchsmaterial.....	24
2.1.5	Geräte.....	25
2.1.6	Software	26
2.2	Methoden	27

2.2.1	Zellbiologische Methoden	27
2.2.1.1	Kultur, Splitten und Aussaat der Zellen	27
2.2.1.2	Kryokonservierung und Auftauen der Zellen	28
2.2.1.3	siRNA-Transfektion	29
2.2.2	Inkubation von Zellen mit TLR-Liganden	29
2.2.3	Messenger RNA-Analyse	35
2.2.3.1	Isolation von RNA aus Zellen	35
2.2.3.2	Reverse Transkription.....	37
2.2.3.3	Quantitative Polymerasekettenreaktion	38
2.2.4	Proteinbiochemische Analysen.....	40
2.2.4.1	Enzyme-linked Immunosorbent Assay.....	40
2.2.4.2	Western Blot	42
2.2.4.2.1	Isolation und Bestimmung von Gesamtprotein aus Zellen.....	43
2.2.4.2.2	Sodium-Dodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese	44
2.2.4.2.3	Blotting	45
2.2.4.2.4	Immundetektion	45
2.3	Statistische Analyse	47
3.	Ergebnisse.....	48
3.1	Analyse der mRNA-Expression nach Podozyten-Inkubation	49
3.1.1	TLR-Expressionsmuster nach separater und simultaner Inkubation mit exogenen Liganden.....	49
3.1.2	Induktion nukleärer Transkriptionsfaktoren nach separater und simultaner Inkubation mit exogenen und endogenen TLR-Liganden.....	50
3.1.3	Proinflammatorisches Zyto- und Chemokin-Expressionsmuster nach separater und simultaner Inkubation mit exogenen und endogenen TLR-Liganden	51
3.2	Analyse der mRNA- und Protein-Expression der IMCD-Zelllinie	52

3.2.1	Chemokin mRNA- und Protein-Expression in Abhängigkeit von Konzentration exogener und endogener Stimulanzen und Inkubationsdauer	52
3.2.2	Proinflammatorische mRNA- und Protein-Expression nach separater und simultaner Inkubation mit exogenen und endogenen TLR-Liganden	53
3.2.3	Auswirkung TLR-spezifischer siRNA auf die Chemokin-Expression.....	55
3.3	Analyse der mRNA- und Protein-Expression der WEHI-Zelllinie	57
3.3.1	Molekularbiologischer Nachweis der TLR4- und TNF α -Expression	57
3.3.2	Chemokin mRNA-Expression in Abhängigkeit von Konzentration exogener und endogener Stimulanzen und Inkubationsdauer	58
3.3.3	Proinflammatorische mRNA- und Protein-Expression nach separater und simultaner Inkubation mit exogenen und endogenen TLR-Liganden	59
4.	Diskussion.....	61
4.1	Potenziertes proinflammatorisches Effekt nach simultaner exogener und endogener TLR-Aktivierung	61
4.2	Reduktion der Zyto- und Chemokinexpression durch TLR2/4-spezifischen Gen-Knockdown.....	64
4.3	Transplantationsmedizinische Bedeutung der Resultate	64
5.	Zusammenfassung	66
	Literaturverzeichnis	IV
	Abbildungsverzeichnis.....	XI
	Tabellenverzeichnis	XIII
	Abkürzungsverzeichnis.....	XIV
	Danksagung.....	XVII
	Erklärung.....	XVIII
	Lebenslauf.....	XIX

1. Einleitung

Die Prävalenz chronischer Niereninsuffizienz steigt global an, bei einer jährlichen Inzidenz von 17.500 liegt die Anzahl dialysepflichtiger Patienten in Deutschland bei rund 70.000. Zu den bedeutendsten ätiologischen Faktoren in der Pathogenese chronischer Niereninsuffizienz zählen der Diabetes mellitus Typ 1/2, die arterielle Hypertonie sowie die Glomerulonephritiden. [1] [2] [3]

Das wichtigste Nierenersatzverfahren für an terminaler Niereninsuffizienz erkrankten Patienten stellt neben der Dialyse die Nierentransplantation dar. Erstmals langfristig erfolgreich gelang diese dem Operateur Joseph Murray im Jahr 1954 zwischen zwei monozygotischen Zwillingen, wofür er 1990 mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet wurde. Im Jahr 1962 gelang die erste erfolgreiche Transplantation einer Niere zwischen genetisch nicht identischen Individuen, die dazu erforderliche Etablierung einer immunsuppressiven Therapie bedeutete einen entscheidenden Fortschritt auf dem Gebiet der Organtransplantation. Heutzutage ist die Niere das mit Abstand am häufigsten transplantierte Organ, 2.055-mal wurde dieser Eingriff in Deutschland im Jahr 2011 durchgeführt. Patienten profitieren dabei u.a. durch eine signifikante Reduktion des relativen Sterberisikos [4]. Funktion und Überleben des Transplantats werden einerseits durch nicht-immunologische Faktoren wie Spenderalter, Ischämiezeit, arterielle Hypertonie, Hyperlipidämie und Infektionskrankheiten beeinflusst [5]. Andererseits wurden immunologische Faktoren wie Anzahl der HLA-Mismatches, präformierte Antikörper und donorspezifische Antikörper identifiziert. Bei der Klassifikation der Abstoßung nach Banff werden zelluläre, T-Zell-vermittelte und humorale, Antikörper-vermittelte Rejektion unterschieden [6].

1.1 Angeborene Immunität und Toll-like Rezeptor-System (TLR)

Die angeborene und die adaptive Immunität bilden die beiden grundlegenden Mechanismen der menschlichen Immunabwehr. Sie umfassen verschiedene Komponenten, die der Unterscheidung zwischen körpereigenen und körperfremden Strukturen dienen. Dabei sind die Bestandteile des angeborenen Immunsystems im Genom codiert und umfassen anatomische und physiologische Barrieren wie Epithelien, Komplementsystem, antimikrobielle Enzyme und mukoziliäre Clearance. Auf zellulärer Ebene leisten Makrophagen, Granulozyten und natürliche Killerzellen eine erste Abwehr gegen eindringende Mikroorganismen, darüber hinaus fungieren sie als Aktivatoren der adaptiven Immunität, die durch Immunglobuline, T- und B-Lymphozyten vermittelt wird. Während die adaptive Immunität lange Zeit im Fokus transplantationsimmunologischer Forschung lag, belegen neue Studien die bedeutende, lange Zeit unterschätzte Rolle der angeborenen Immunität in der Pathogenese der Transplantatabstoßung. [7]

Ein wichtiges Element der angeborenen Immunität ist das Toll-like Rezeptor (TLR)-System. Die TLR sind eine Klasse der *Pattern Recognition Receptors* und dienen der Erkennung von *Pathogen Associated Molecular Patterns* (PAMP), also molekularer Struktur motive, die spezifischer Bestandteil bakterieller, viraler oder parasitärer Pathogene sind. Die Tatsache, dass TLR im Genom codierter Bestandteil der Immunabwehr von Vertebraten wie auch Arthropoden sind, lässt darauf schließen, dass es sich bei diesem Erkennungs-System der angeborenen Immunität um ein evolutionsbiologisch sehr altes, phylogenetisch konserviertes handelt. Schon lange vor der Entstehung des adaptiven Immunsystems diente es der Unterscheidung zwischen selbst und nicht-selbst. [8] [9]

1.1.1 Struktur der Toll-like Rezeptoren und ihre Liganden

TLR sind Transmembranproteine, deren gemeinsames Strukturmerkmal die *leucin rich repeat*- Sequenz der extrazellulären Domäne und die dem Interleukin-1-Rezeptor ähnliche intrazelluläre Toll/IL-1R-Domäne ist. Aktuell sind über zehn humane und murine TLR identifiziert (in Wirbeltieren meist etwa zehn bis zwölf TLR, im Seeigel über 200) [10], TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 und TLR6 sind in die Zellmembran, TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 in die Membran intrazellulärer Vesikel integriert. Zellmembranständige TLR erkennen PAMPs mikrobieller Zellwände, intrazellulär lokalisierte TLR erkennen insbesondere Nukleinsäure-Motive phagozytierter und lysierter Mikroorganismen. [11] [12] [13]

Neben exogenen Liganden existieren ebenfalls endogene Liganden, die das TLR-System aktivieren. Endogenen Liganden wie Fibrinogen und *Heat Shock Protein* (HSP) 60 und 70 werden im Rahmen gewebsschädigender Prozesse freigesetzt (Tab. 1).

TLR	Endogene Liganden	Exogene Liganden
TLR1		Triacetylierte Lipopeptide, PAM3 [14]
TLR2	HSP 60 [15], HSP 70 [16] [17], Hyaluronsäure [18]	PAM3 [14] [19], LPS, Glykolipide [20], Zymosan [21], MALP2 [19]
TLR3	mRNA [22]	RNA [23]
TLR4	Fibrinogen [24], HSP 60 [15], HSP 70 [16] [17], Hyaluronsäure [18], S-100 [25], Surfactant [26]	Lipoteichonsäure [27], Lipopolysaccharid (LPS) [28]
TLR5		Flagellin [29]
TLR6		Zymosan [30]
TLR7	siRNA [31]	Guanosinanaloga, Imidazoquinolin [32] [33]
TLR8	siRNA [31]	Imidazoquinolin [32] [33]
TLR9		CpG-DNA-Motiv [34] [35]

Tabelle 1: Spezifität exogener und endogener TLR-Liganden

1.1.2 Signalwege nach TLR-Aktivierung

Die Bindung exogener oder endogener Liganden an die *Leucine-rich Repeat* (LRR)-Domäne bewirkt durch Dimerisierung und Konformationsänderung der Rezeptoren eine Aktivierung der TLR. Es sind fünf Adapterproteine identifiziert, die daraufhin von der zytoplasmatischen Toll/IL-1R-Domäne ausgehend die intrazelluläre Signalkaskade initiieren: *toll-interleukin 1 receptor domain containing adaptor protein* (TIRAP), *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β* (TRIF), *TRIF-related adaptor molecule* (TRAM), *sterile alpha- and armadillo-motif-containing protein* (SARM) sowie *Myeloid*

differentiation primary response gene (88) (MyD88), welches der TLR-Familie mit Ausnahme von TLR3 als gemeinsames zentrales Adapterprotein dient. Diese Adapterproteine aktivieren ihrerseits eine Kaskade von Proteinkinasen, die durch Aktivierung der Transkriptionsfaktoren *nuclear factor kappa B* (NF κ B), *activator protein 1* (AP-1) sowie *interferon regulatory transcription factor 3* (IRF3) die Expression pro-inflammatorischer Zyto- und Chemokine wie Tumornekrosefaktor α und *Chemokine (C-X-C motif) ligand 2* (CXCL2) bewirkt [36] [37] [38] [39]. Es ist ein MyD88-abhängiger von einem MyD88-unabhängigen Signalweg zu unterscheiden.

1.1.2.1 MyD88-abhängiger Signalweg

Nach TLR-Aktivierung assoziiert MyD88 mit der zytoplasmatischen Toll/IL-1R-Domäne, woraufhin die IL-1R assoziierte Kinase 4 (IRAK4) durch Interaktion der zytotoxischen Domänen an den Rezeptorkomplex gebunden wird. Durch Phosphorylierung und Aktivierung von IRAK1 vermittelt IRAK4 die Bindung von TNF-Rezeptor-assoziiertem Faktor 6 (TRAF6) an den membranständigen Rezeptorkomplex. Dies wiederum ermöglicht die Rekrutierung der *transforming-growth-factor- β* -aktivierten Kinase 1 (TAK1) und TAK1-bindenden-Proteine 1-3 (TAB 1-3). TAK1, TAB1-3 und TRAF6 dissoziieren darauf vom Rezeptorkomplex in das Zytoplasma, wodurch TAK1 aktiviert wird. TAK1 aktiviert darauf den I κ B-Kinase-Komplex (IKK), der aus der regulatorischen Untereinheit IKK γ und den katalytischen Untereinheiten IKK α und IKK β besteht. IKK α und IKK β phosphorylieren sodann I κ B α , den Inhibitor des Transkriptionsfaktors NF κ B. Nach Phosphorylierung und Degradation des Inhibitors kann der aus der p50- und p65-Untereinheit bestehende Transkriptionsfaktor aus dem Zytoplasma in den Nucleus translozieren und die Transkription pro-inflammatorischer Zytokine bewirken. Zusätzlich

zur IKK-vermittelten Aktivierung von NF κ B wurde TAK1 als Aktivator der mitogen-aktivierten Protein Kinase Kinase (MAPKK) 3 und MAPKK 6 identifiziert, die wiederum die Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 vermitteln. [12] [40]

1.1.2.2 MyD88-unabhängiger Signalweg

Mehrere Studien lassen auf die Existenz eines von MyD88 unabhängigen Signalwegs schließen. In Makrophagen und Dendritischen Zellen, die aus MyD88 Knock-Out Mäusen isoliert wurden, konnte nach Inkubation mit TLR2-, TLR5-, TLR7- und TLR9-Liganden keine pro-inflammatorische Zytokinexpression nachgewiesen werden [41] [42] [43].

Dennoch zeigte sich in MyD88 Knock-Out Mäusen eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B sowie von MAP Kinasen nach Inkubation mit dem TLR4-Liganden Lipopolysaccharid (LPS), das Maximum der TLR-Aktivierung trat dabei in MyD88 Knock-Out Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen zeitlich verspätet auf. [44]

Darüber hinaus zeigte sich nach der Inkubation von Makrophagen mit LPS eine von MyD88 unabhängige Induktion von *interferon regulatory transcription factor 3* (IRF3) sowie Interferon β (IFN β) [41]. Die Induktion von IRF3 sowie IFN β war in TRIF-defizienten Mäusen signifikant reduziert, in MyD88- und TRIF-doppelt defizienten Mäusen war keine Induktion von NF κ B nachweisbar. [38] [45]

Der von MyD88 unabhängige TRIF-Signalweg wird dabei über das zusätzliche Adapterprotein TRAM vermittelt, da TRIF nicht direkt an TLR4 binden kann [46]. TLR3 nutzt neben TLR4 ebenfalls den TRIF-Signalweg [38].

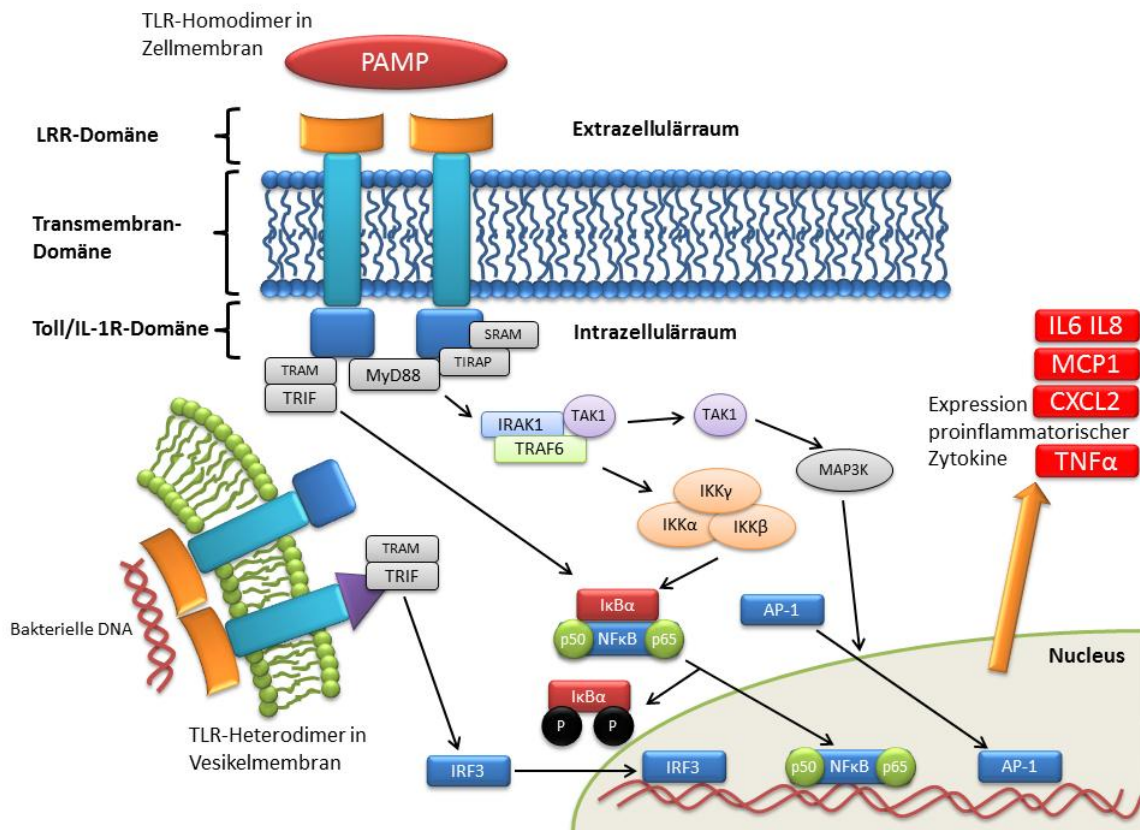


Abbildung 1: Struktur und Signalweg der Toll-like-Rezeptoren. Eigene Abbildung nach [40] [11] [12]

1.1.3 Beispiele klinischer Bedeutung

Das TLR-System ist für eine Vielzahl klinisch-immunologischer Phänomene von Bedeutung. So gehen angeborene Defekte der TLR-Signaltransduktion mit einem schweren Immundefizit gegen mikrobielle Antigene einher, was bei den betroffenen Patienten im Auftreten schwerer bakterieller Infektionen resultiert. [47] [48]. TLR-Mutationen begünstigen vor allem auch die Infektion mit gram-negativen, uropathogenen Bakterien [49] [50]. TLR7 und TLR8 stehen im Verdacht, an der Pathogenese gegen Nukleinsäuresequenzen gerichtete Autoimmunerkrankungen wie dem Lupus erythematodes oder dem Sjögren Syndrom beteiligt zu sein [51] [52]. In verschiedenen Bereichen der Medizin wird versucht, die TLR therapeutisch zu beeinflussen:

Resiquimod® (Spirig Pharma AG), ein Arzneistoff aus der Gruppe der Immunmodulatoren und Ligand von TLR7 und TLR8, wird in klinischen Studien zur Behandlung des Basalioms und der aktinischen Keratose eingesetzt [53]. Eritoran, ein synthetischer Lipid A-Antagonist, der die Bindung von Lipid-A, der aktiven Komponente des LPS, an TLR4 blockiert wird aktuell auf seinen möglichen Nutzen in der Therapie der Sepsis untersucht [54].

Monophosphoryllipid A, ein dem LPS verwandter, modifizierter TLR4-Ligand, wird dem für präterminale Nierenpatienten- und Hämodialysepatienten geeigneten Hepatitis B-Impfstoff Fendrix® (GlaxoSmithKline Biologicals) als Adjuvans zugesetzt. Die durch TLR-Aktivierung gesteigerte Immunogenität dieses neuen Impfstoffes bewirkt im Vergleich zum konventionellen, für diese Patientengruppe zugelassenen Impfstoff Enerix B® (GlaxoSmithKline Biologicals) eine um 42% erhöhte Seroprotektionsrate [55].

1.2 Ischämie/Reperfusionsschaden im Rahmen der Nierentransplantation

Der im Rahmen der Nierentransplantation auftretende Ischämie/Reperfusion (I/R)-Schaden ist ein multifaktoriell bedingtes, initial teils antigen-unabhängiges inflammato-immunologisches Phänomen, das aktuell weltweit Gegenstand transplantationsimmunologischer Forschung ist (Abbildung 2). Das Ausmaß des I/R-Ereignisses scheint sowohl verantwortlich zu sein für eine verzögerte Transplantatfunktion, wie die kurz- und langfristige negative Beeinflussung der Transplantatfunktion und des Langzeittransplantatüberlebens [56]. Während der exakte I/R-Pathomechanismus noch nicht vollständig aufgeklärt ist, sind doch bedeutende chemische, zelluläre und immunologische Effektoren des I/R-Schaden identifiziert und im Folgenden exemplarisch dargestellt (Abb. 2).

1.2.1 Direkte Zellschädigung durch Hypoxie und radikale Sauerstoffspezies

Die durch mangelnde Perfusion bedingte Hypoxie reduziert die Leistungsfähigkeit des aeroben Metabolismus und folglich die zur Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase notwendige Verfügbarkeit zellulärer Energiespeicher wie Adenosintriphosphat (ATP). Dadurch wird die Aktivität der von ATP-Hydrolyse abhängigen Na/K-ATPase herabgesetzt und das zelluläre Membranpotential destabilisiert. Dem chemischen Konzentrations- und elektrischen Ladungsgradienten folgend diffundieren Natrium-, Chlorid- und Kalzium-Ionen in den Intrazellulärraum, ein osmotischer Wassereinstrom folgt nach intrazellulär. Diese elektrochemischen und osmotischen Veränderungen gehen mit irreversiblen Schädigungen der zellulären und mitochondrialen Membranintegrität, Verlust der zellulären Kompartimentalisierung und Karyopyknose einher. [57] [58]

Unter katabolen Bedingungen und ausbleibender Re-Phosphorylierung von Adenosinmonophosphat (AMP) zu ATP wird AMP zu Adenosin und Hypoxanthin degradiert. Hypoxanthin akkumuliert und wird durch die Xanthinoxidase unter Reduktion molekularen Sauerstoffs zu Xanthin oxidiert, dies geschieht unter Freisetzung hochtoxischer Sauerstoffspezies wie Hydroxylradikale, Wasserstoffperoxid und Superoxide. Durch den Ischämie-bedingten Substratmangel sind die physiologischen antioxidativen enzymatischen (Katalasen, Peroxidasen, Dismutasen) und nicht-enzymatischen (Tocopherole, Carotine, Glutathion) Schutzsysteme erschöpft. Die Bildung toxischer Sauerstoffradikale wird insbesondere während der Phase der Reperfusion, in der molekularer Sauerstoff nach Ischämie wieder verfügbar ist, induziert. Freie Sauerstoffradikale besitzen ein hohes Oxidationspotential, durch Lipidoxidation zellulärer Membranen, irreparable Oxidation verschiedener Enzyme, des Zytoskeletts und

Beschädigung der DNA verursachen sie einen strukturellen und funktionellen Zellschaden [57].

1.2.2 Schädigung im Rahmen von endothelialer Dysfunktion und Mediatoren

Der mit einem renalen I/R-Ereignis einhergehenden endothelialen Dysfunktion scheint eine entscheidende pathomechanische Bedeutung zuzukommen. Hierbei führt insbesondere die unproportionierte Freisetzung vasodilatierender und vasokonstriktiver Transmitter zu einer Störung der Organmikrozirkulation. Die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO), einem hochpotenten Vasodilatator, wird durch das Enzym NO-Synthetase aus Arginin katalysiert. Eine gesteigerte NO-Freisetzung wurde im *in vivo* Tiermodell als Ursache einer gestörten Zirkulation und pathomechanische Komponente des I/R-Schadens identifiziert. [59] [60]

Chatterjee *et al.* (2002) bestätigten diese Erkenntnis durch die Beobachtung, dass die Inhibition des während eines I/R-Ereignisses in der Niere induzierten NO-Synthetase-Isoenzym das I/R-Schädigungsmuster signifikant reduziert [61].

Endothelin und Angiotensin II sind insbesondere in der ischämischen Phase exprimierte Vasokonstriktoren, deren Aktivität im *in vivo* Tiermodell mit einem tubulären Schädigungsmuster korreliert. Im experimentellen Modell reduziert die Gabe von Endothelin- oder Angiotensin II-Rezeptor-Antagonisten diese Schädigung signifikant. [62] [63] [64]

Das endotheliale Zytoskelett und Zell-Zell-Kontakte sind strukturelle Manifestationsorte eines I/R-Schadens: Aktin-Mikrofilamente, zentrale Bausteine des endothelialen Zytoskeletts, depolymerisieren und fragmentieren. Die Zerstörung des Zytoskeletts geht

mit Induktion von Apoptose, Verlust der zellulären Polarität, Auflösung interzellulärer Endotheladhäsion und damit erhöhter vaskulärer Permeabilität einher. [65] [66] [67] [68]

1.2.3 Schädigungsmechanismen der angeborenen Immunität

Während radikale Sauerstoffspezies und Endothelaktivierung lange Zeit als zentrale pathophysiologische Elemente des I/R-Schadens betrachtet wurden, verdeutlichen neueste Studien die immunologische Dimension eines solchen Ereignisses. Komponenten des angeborenen Immunsystems – Granulozyten, Makrophagen, das Komplement- und TLR-System – konnten als Vermittler des I/R-Schadens identifiziert werden.

Die vom Endothel exprimierten interzellulären Adhäsionsmoleküle P-Selectin, E-Selectin, ICAM-1 und VCAM-1 vermitteln die Aktivierung, Adhäsion und Diapedese von Granulozyten. Aktivierte Granulozyten tragen durch Sezernierung von Sauerstoffradikalen, Proteasen, plättchenaktivierendem Faktor und Leukotrienen zu weiterer Aktivierung der Immunität und Gewebeschädigung bei. [69] [70] [71]

Eine Aktivierung des Komplement-Systems trägt ebenfalls zur Entstehung des I/R-Schadens bei. Das Komplement-System besteht aus über 30 Plasmaproteinen, die durch Stimuli wie I/R kaskadenartig reagieren, an deren Ende die Bildung von Effektorproteinen, wie z.B. der Membran-attackierende Komplex (MAC) steht. Diesen Effektorproteinen kommen verschiedene immunologische Funktionen zu, das Fragment C3b opsoniert Antigene, die Fragmente C3a und C5a induzieren eine lokale Inflammation und der MAC lysiert Zellen durch Membranperforation. [72] [73]

Während der exakte Pathomechanismus der Komplement-Aktivierung im Rahmen eines I/R-Ereignisses noch unverstanden ist, konnte im *in vivo* Tiermodell die schädigende

Wirkung des Fragments C5a und des MAC gezeigt werden. Letzterer ist vor allem in der Reperfusionphase wesentlich an der Schädigung des renalen Tubulusepithels beteiligt und durch den MAC geschädigte Zellen führen zu einer signifikant erhöhten Apoptose- und Nekrose-Rate im Tubulusepithel [74]. Das Fragment C5a interagiert mit auf Tubulusepithel und Granulozyten exprimierten C5a-Rezeptoren und bewirkt so die Expression proinflammatorischer Chemokine, wie z.B. TNF α sowie die Infiltration und Degranulation von Granulozyten [75].

Aktuelle *in vitro* und *in vivo* Studien zeigen, dass das TLR-System als bedeutender Vermittler der angeborenen Immunität an der Pathogenese des renalen I/R-Schadens beteiligt ist. TLR2 und TLR4 werden dabei von Zellen des angeborenen Immunsystems, aber auch von Nicht-Immunzellen wie insbesondere Tubulusepithelzellen konstitutiv exprimiert. [76] [77] [78]

Im Rahmen von I/R und Inflammation zeigt sich eine signifikante Hochregulation von TLR2 und vor allem TLR4 sowie eine Freisetzung endogener TLR-Liganden (Tab. 1) wie HSP70 und Fibrinogen. Dabei wird die TLR-Aktivierung mit einem charakteristischen proinflammatorischen Zytokinexpressionsprofil beantwortet. Es konnte gezeigt werden, dass die Reaktion des angeborenen Immunsystems im I/R-Ereignis im Wesentlichen durch TLR vermittelt wird. Nach einem I/R-Ereignis sind im TLR-negativen Mausmodell inflammatorische Zytokinexpression (insb. CCL2, TNF α), granulozytäre Infiltration und histopathologische tubuloepitheliale Schädigung im Vergleich zum Wildtyp-Modell signifikant reduziert [79].

Eine von Hoffmann *et al.* veröffentlichte Studie belegt anhand klinischer Biopsien und eines *in vivo* Tiermodells die, über die bis dato für das I/R-Ereignis bekannte

hinausgehende, Bedeutung des TLR2 in der frühen akuten Transplantatabstoßungsreaktion. Dabei korrelierte eine gesteigerte TLR2-Expression I/R-unabhängig mit dem Schweregrad der akuten Transplantatabstoßung und dem Kreatininlevel [80].

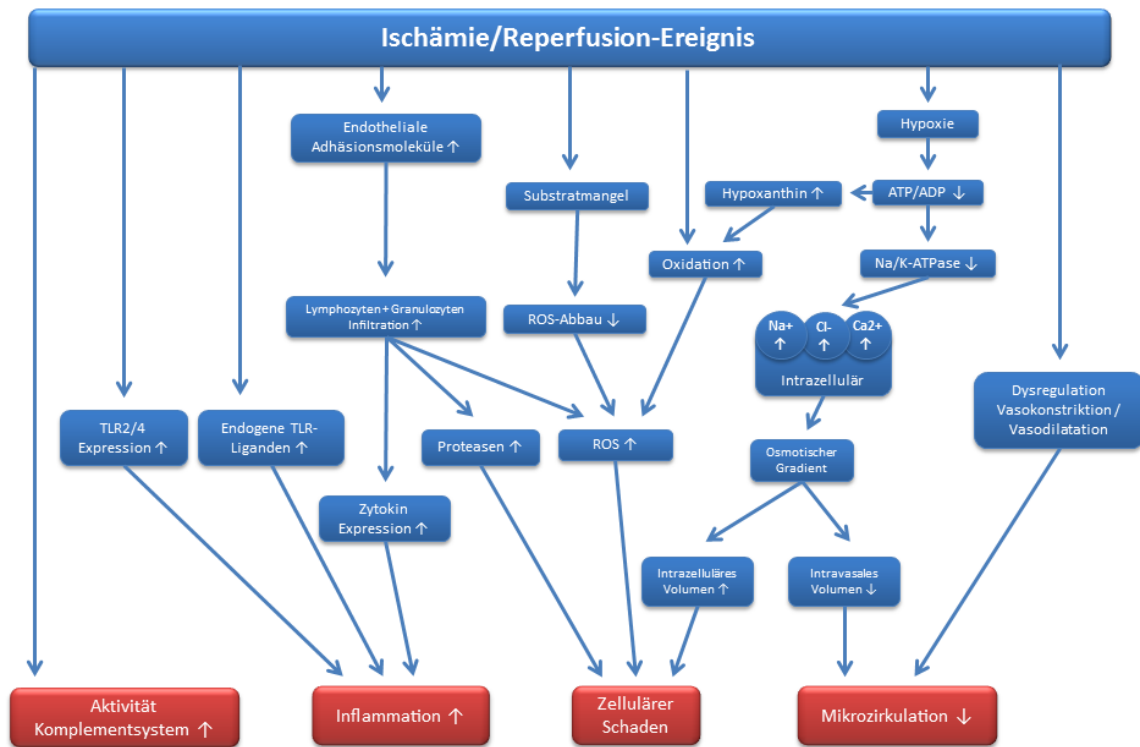


Abbildung 2: Transplantatschädigende Effekte des I/R-Ereignis. Eigene Abbildung nach [57] [59] [65] [69] [72] [78]

1.3 Wissenschaftliches Thema der Arbeit und Zielsetzung

Wie im Gliederungspunkt 1.1.1 ausgeführt, werden TLR als Rezeptoren der angeborenen Immunität einerseits durch Bindung exogener Liganden aktiviert und vermitteln die erkannte mikrobielle Bedrohung an weitere Instanzen des Immunsystems. Andererseits binden TLR ebenso endogene, durch gewebsschädigende Prozesse freigesetzte Liganden. In diesem Zusammenhang wurden sie als bedeutende pathomechanische Komponenten des im Rahmen einer Nierentransplantation unvermeidbar auftretenden I/R-Ereignisses

identifiziert. Durch die Induktion eines proinflammatorischen Zyto- und Chemokinprofils scheinen die TLR damit auch wesentlich an der Genese der akuten Transplantatabstoßung, die mit kurz- und langfristiger Reduktion der Transplantatfunktion einhergeht, beteiligt zu sein.

Vor diesem Hintergrund ergibt sich das wissenschaftliche Thema dieser Dissertation: Während bisher ausschließlich die immunologische Reaktion entweder rein endogener oder rein exogener TLR-Aktivierung untersucht wurde, befasst sich diese Arbeit mit dem inflammatorischen Effekt einer sequenziellen sowie simultanen Inkubation der TLR mit endogenen und exogenen Liganden. Diese gleichzeitige exogene und endogene TLR-Aktivierung entspricht einem klinischen Szenario, in welchem es zur mikrobiellen Infektion bei Zustand nach Transplantation bzw. I/R-Ereignis kommt.

Es wurden verschiedene Zelllinien unterschiedlicher Nierenkompartimente (Podozyten, Sammelrohr-Zellen (IMCD) und eine Makrophagen-Zelllinie (WEHI)) separat, sequenziell und simultan mit endogenen und exogenen TLR-Aktivatoren inkubiert. Als Stellvertreter der proinflammatorischen Zyto- und Chemokinexpression wurden TNF α und CCL2 (*Chemokine (C-C motif) ligand 2*) untersucht. Der Effekt der TLR-Aktivierung auf Rezeptor-, Zyto- und Chemokin- mRNA (*messenger RNA*)-Transkription wurde mittels Echtzeit-quantitativer Polymerasekettenreaktion (RT qPCR), die letztendlich resultierende Protein-Expression durch *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) und Western Blot verifiziert. Die TLR-Spezifität der beobachteten Expression wurde durch Inhibition des TLR-Systems mittels *short interfering RNA* (siRNA) verifiziert.

2. Material & Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zellkultur

2.1.1.1 Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung
IMCD	IMCD-3, aus Sammelrohr der inneren Medulla von Mäusen isoliert; epitheliales, adhärentes Wachstum; bezogen von ATCC/LGC Standards, Wesel, Deutschland
Podozyten	Aus dem Glomerulum von transgenen 2Kb-tsA58 Mäusen isolierte Podozyten-Zelllinie, epitheliales, adhärentes Wachstum; bezogen von ImmortoMouse: Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA
WEHI	WEHI-274.1; aus Blut von Mäusen isolierte, nicht-phagozytische Monozyten-Zelllinie; Wachstum in Suspension, bezogen von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

2.1.1.2 Zellkulturmedien und Zusatzstoffe

Reagenz	Hersteller
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Gibco®-Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland
DMEM/Nutrient Mixture F-12 Ham	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Gibco®-Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland
Fetal Calf Serum (FCS)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
Glutamax	Gibco®-Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland

Hydroxyethylpiperazinylethansulfonsäure (HEPES)	Gibco®-Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland
Interferon γ	Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland
L-Glutamin	Gibco®-Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natrium-Bicarbonat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
PBS-Trockensubstanz	Merck Millipore Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
Phosphate buffered saline (PBS)-Lösung	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland
Pyruvat	Gibco®-Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640	Gibco®-Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland
Trypsin/EDTA	Gibco®-Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Gibco®-Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland

2.1.1.3 Exogene und endogene TLR-Liganden

Stimulanz	Hersteller
Fibrinogen	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
LPS	Peptotech Inc., Rocky Hills, USA

MALP2	Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach, Deutschland
PAM3	EMC microcollections GmbH, Tübingen, Deutschland
Zymosan	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

2.1.2 Chemikalien & Kits

Kit/Reagenz	Hersteller
10% Sodiumdodecylsulfat (SDS)-Lösung	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
10x TRIS/Glycin/SDS Lauf-Puffer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
30% Acrylamid Rotiphorese Gel	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
4% Kupfersulfatpentahydrat-Lösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
AllStars Negative Control siRNA	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Aqua destillata steril	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Bicinchoninsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
BSA (Bovines Serum Albumin)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
BSA Protein Standard	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Desoxyribonukleosidtriphosphat	New England Biolabs GmbH, Frankfurt

(dNTP) Solution Mix	am Main, Deutschland
FlexiTube siRNA Premix	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Kochsalz (NaCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Konzentrierte (96%) Schwefelsäure	Merck Millipore KGaA, Darmstadt, Deutschland
Konzentrierte Salzsäure (HCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Lämmli Sample Puffer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
LumiGLO Reagent	Cell Signaling Technology Inc., Danvers, USA
Methanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Milchpulver	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
M-MLV Reverse Transcriptase	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (M-MLV RT) 5x Puffer	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Mouse CCL2 (JE, MCP-1) ELISA Development Kit	PromoKine (PromoCell) GmbH, Heidelberg, Deutschland
Mouse TNFα ELISA Development Kit	PromoKine (PromoCell) GmbH, Heidelberg, Deutschland
Natriumdeoxycholat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Natriumhydrogenphosphat	Merck Millipore KGaA, Darmstadt, Deutschland

NP-40	Merck Millipore KGaA, Darmstadt, Deutschland
Oligo(dT) 15 Primer	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
peqGOLD Total RNA Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Precision Plus Protein Dual Color Standard	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Premixed 10x TRIS/Glycin Puffer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Protease Inhibitor Cocktail (PIC)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
QuantiTect SYBR Green PCR Kit	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
RNase-Free DNase Set	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
RNasin RNase Inhibitor	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Tetramethylbenzidin (TMB)-Substrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Trishydroxymethylaminomethan (TRIS)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tween-20 (ELISA)	Merck Millipore KGaA, Darmstadt, Deutschland
Tween-20 (Western Blot)	VWR International GmbH, Ismaning, Deutschland
Wasserstoffperoxid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Zitronensäure-Monohydrat	Merck Millipore KGaA, Darmstadt, Deutschland

2.1.3 Puffer & Lösungen

0,1 M Zitronensäure (ELISA):

10,51 g Zitronensäure-Monohydrat

ad 500 ml destilliertes Wasser

0,2 M Natriumhydrogenphosphat (ELISA):

17,8 g Natriumhydrogenphosphat

ad 500 ml destilliertes Wasser

1 M Schwefelsäure (ELISA):

26,6 ml konzentrierte Schwefelsäure

473,4 ml destilliertes Wasser

TMB-Puffer (ELISA):

24,3 ml 0,1 M Zitronensäure

25,7 ml 0,2 M Natriumhydrogenphosphat

50 ml destilliertes Wasser

Substrat-Lösung (ELISA):

10 ml TMB-Puffer

1 mg TMB Substrat

3 µl Wasserstoffperoxid

Stop-Lösung (ELISA):

1 M Schwefelsäure

1xPBS (ELISA):

9,55 g PBS-Trockensubstanz

ad 1000 ml steriles Wasser

Wasch-Puffer (ELISA):

500 µl 0,05% Tween-20

1 l 1xPBS

Block-Puffer (ELISA):

0,5 g BSA

50 ml 1xPBS

Diluent (ELISA):

5 ml Block-Puffer

45 ml 1xPBS

25 µl 0,05% Tween-20

5 M NaCl-Lösung (Gesamtprotein-Isolation):

14,61 g NaCl

ad 50 ml destilliertes Wasser

1 M HEPES-Lösung (Gesamtprotein-Isolation):

9,305 g HEPES

Einstellung pH=7,9 durch Titration von HCl

mit destilliertem Wasser auf Endvolumen von 50 ml aufgefüllt

Radioimmunoprecipitation assay (Ripa)-Puffer (Gesamtprotein-Isolation):

2 ml 1 M HEPES-Lösung

3 ml 5 M NaCl-Lösung

0,4 ml NP-40

1 ml 10% SDS

1 g Natriumdeoxycholat

93,6 ml destilliertes Wasser

10% APS-Lösung (Western Blot):

2 g APS

ad 20 ml destilliertes Wasser

0,5 M TRIS/HCl-Puffer (Western Blot):

60,57 g TRIS

ad 1000 ml destilliertes Wasser

Einstellung pH=6,8 durch Titration von HCl

1 M TRIS/HCl-Puffer (Western Blot):

121,14 g TRIS

ad 1000 ml destilliertes Wasser

Einstellung pH=6,8 durch Titration von HCl

1,5 M TRIS/HCl-Puffer (Western Blot):

181,71 g TRIS

ad 1000 ml destilliertes Wasser

Einstellung pH=8,8 durch Titration von HCl

Lämmli-Puffer (Western Blot):

950 µl Lämmli Sample Puffer

50 µl β-Mercaptoethanol

1x TRIS/Glycin/SDS Lauf-Puffer (Western Blot):

100 ml 10x TRIS/Glycin/SDS Lauf-Puffer

900 ml destilliertes Wasser

Blotting-Puffer (Western Blot):

200 ml Methanol

100 ml Premixed 10x TRIS/Glycin Puffer

700 ml destilliertes Wasser

10x TRIS-buffered saline (TBS) (Western Blot):

24,2 g TRIS

80 g NaCl

ad 1000 ml destilliertes Wasser

Einstellung pH=7,6 durch Titration von HCl

1x TBS (Western Blot):

100 ml 10x TBS

900 ml destilliertes Wasser

0,1% TBST (Western Blot):

1 ml Tween-20

ad 1000 ml 1x TBS

Blocking-Puffer:

50 g Milchpulver

ad 1000 ml 0,1% TBST

Stripping Lösung (Western Blot):

50 ml 10% SDS-Lösung

15,6 ml 1 M TRIS/HCl

1,8 ml β -Mercaptoethanol

182,6 ml destilliertes Wasser

2.1.4 Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller
50 ml Falcon Tube	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
ELISA 96 Well Nunc Mikrotiterplatte	eBioscience, Frankfurt, Deutschland
Eppendorf Cups (1,5 ml + 2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Film Western Blot (High performance Chemiluminescence Film)	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Nitrocellulose-Membran	Schleicher & Schuell BioScience GmbH, Dassel, Deutschland
Pipettenspitzen	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
TaqMan Platte 384 Well	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Zellkulturflasche T25	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturplatte 6 Well	SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Zellschaber	FAUST Laborbedarf AG, Schaffhausen, Deutschland
Zentrifugenröhrchen (15 ml)	SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht, Deutschland

2.1.5 Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Automatische Pipette	pipetus®-akku	Hirschmann Laborgeräte GmbH und Co. KG, Eberstadt, Deutschland
Brutschrank	Hera Cell Inkubator	Thermo Scientific, Bonn, Deutschland
Gelelektrophorese-Kammer	Mini-Protean-Elektrophoresekammer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Heizblock	Eppendorf Thermomixer Comfort	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Horizontalschüttler	IKA Basic	IKA-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland
Microplate Reader	SpectraMax Microplate Reader	Molecular Devices, Sunnyvale, USA
Photometer	NanoDrop ND-1000	Thermo Scientific, Bonn, Deutschland
RT qPCR	ABI Prism 7900HT Sequence Detection System	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Sterilbank Zellkultur	HERA safe	Thermo Scientific, Bonn, Deutschland
Vortexer	MELB 1719	Merck Eurolab GmbH, Nürnberg, Deutschland
Wasserbad	LAUDA Aqualine	LAUDA DR. R. WOBSE GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen

Western Blot Kammer	Tank Blotting System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Western Blot Kassette	Mini Gel Holder Cassette	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Zentrifugen	HERAEUS Biofuge fresco und HERAEUS Megafuge 1.0	Thermo Scientific, Bonn, Deutschland

2.1.6 Software

Software	Hersteller
Microsoft Office Excel 2010	Microsoft Corporation, Redmond, USA
SDS Software Suite	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland

2.2 Methoden

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit angewandten Methoden zu Zellkultivierung, TLR-Stimulation, mRNA-Analyse sowie proteinbiochemischen Bestimmungen dargestellt.

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Kultur, Splitten und Aussaat der Zellen

Zellkulturmedien:

Podozyten:

500 ml RPMI 1640 + Glutamax

5 ml Penicillin/Streptomycin

5 ml L-Glutamin 2mM

5 ml HEPES

5 ml Natrium-Bikarbonat

5 ml Pyruvat

50 ml FCS

2 µl murines Interferon γ

IMCD:

500 ml DMEM/Nutrient Mixture F-12 Ham

50 ml FCS

5 ml Penicillin/Streptomycin

WEHI:

500 ml DMEM

50 ml FCS

500 µl β-Mercaptoethanol

5 ml Penicillin/Streptomycin

Die IMCD- und WEHI-Zelllinien wurden in T25 Zellkulturflaschen bei einer Temperatur von 37°C, die Podozyten-Zelllinie in Kollagen I-beschichteten T25 Zellkulturflaschen bei einer Temperatur von 33°C im Brutschrank inkubiert. Die CO₂-Konzentration lag für alle Zelllinien bei 5%. Das Zellkulturmedium wurde im Rhythmus von 2 Tagen erneuert. Bei einer Konfluenz von 75% wurden die Podozyten und IMCD-Zellen gesplittet: Dazu wurde in der Sterilbank, nachdem das Kulturmedium mit einer Glaspipette abgesaugt worden ist, 4 ml Trypsin in die Zellkulturflasche pipettiert und die Flasche vorsichtig geschwenkt und beklopft. Nach Ablösen der Zellen vom Flaschenboden wurden 10 ml Zellkulturmedium in die Flasche zugegeben und Zellsuspension in ein 50 ml Falcon Tube überführt. Dieses wurde 5 Minuten bei 1200 Umdrehungen pro Minute (rpm) zentrifugiert; falls der Überstand im Falcon Tube nach dem Zentrifugieren noch nicht zellfrei war, wurde dieser Vorgang wiederholt. Danach wurde der Überstand in der Sterilbank mit einer Glaspipette abgesaugt und das Zellpellet in der Spitze des Falcon Tubes mit 10 ml Zellkulturmedium durch Auf- und Absaugen mit einer Pipette gelöst. Für ein Splittverhältnis von 1:20 wurden 0,5 ml Zellsuspension in eine mit 10 ml vorbereitete neue Zellkulturflasche ausgesät und diese nach leichtem Schwenken im Brutschrank weiter inkubiert. Die in Suspension schnell wachsende WEHI-Zelllinie wurde täglich gesplittet, dazu wurden 2 ml Zellsuspension in eine mit 18 ml Medium befüllte T25 Zellkulturflasche überführt.

2.2.1.2 Kryokonservierung und Auftauen der Zellen

Zur Herstellung des Kryokonservierungsmediums wurden 40 ml FCS mit 5 ml DMSO gemischt und auf Eis gelagert. Die sich in Kultur befindenden, einzufrierenden Zellen wurden gesplittet (siehe 2.2.1.1 Kultur, Splitten und Aussaat der Zellen), das dabei nach

Zentrifugation erhaltene Zellpellet wurde aus dem 50 ml Falcon Tube in einer Pipette mit 4 ml kaltem Kryokonservierungsmedium aufgenommen und in zwei 2 ml Eppendorf Cups aufgeteilt. Über Nacht wurden diese im Gefrierschrank bei einer Temperatur von -80°C vorgefroren und am nächsten Tag im Flüssigstickstofftank eingelagert.

Zum Auftauen von Zellen wurde 10 ml entsprechendes Zellkulturmedium in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen vorgelegt und die in 2 ml Eppendorf Cups kryokonservierten Zellen bei einer Temperatur von 37°C im Wasserbad aufgetaut. Nach dem Auftauen wurde die Zellsuspension in das Zentrifugenröhrchen pipettiert und dieses mit 1200 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 4 ml frischem Zellkulturmedium mit einer Pipette resuspendiert. Die Zellsuspension wurde dann in eine mit 10 ml Medium (Podozyten und IMCD-Zellen) bzw. 20 ml Medium (WEHI-Zellen) vorbereitete Zellkulturflasche gegeben und im Brutschrank inkubiert.

2.2.1.3 siRNA-Transfektion

Die siRNA-Transfektion wurde von einem anderen Mitarbeiter der nephrologischen Arbeitsgruppe mit FlexiTube siRNA Premix (Qiagen) den Vorgaben des Herstellers entsprechend durchgeführt.

2.2.2 Inkubation von Zellen mit TLR-Liganden

Zur Inkubation mit exogenen und endogenen TLR-Liganden wurden die Zellen der unterschiedlichen Zellreihen zunächst in 6 Well Platten bzw. T25 Zellkulturflaschen ausgesät: Dazu wurde in jede Vertiefung der 6 Well Platte 3 ml Zellkulturmedium vorgelegt und 120 μl Zellsuspension bzw. in jede T25 Zellkulturflasche 5 ml Zellkulturmedium und 200 μl Zellsuspension pipettiert (siehe 2.1.1.1 Aussaat, Kultur und Splitten der Zellen). Die adhären Zellen wurden nach der Aussaat in 6 Well Platten bzw. T25 Zellkulturflaschen im Brutschrank inkubiert, nach 48 Stunden erfolgte ein FCS-

freier Mediumwechsel. Nach weiteren 24 Stunden wurden die adhärennten Zellreihen jeweils separat, sequenziell und simultan mit endogenen und exogenen TLR-Inkubationsmedien inkubiert. Die Inkubation der WEHI-Zelllinie erfolgte unmittelbar nach der Aussaat in FCS-freiem Stimulationsmedium. Vor dem Stimulationsprozess wurden die Zellen zweifach mit PBS-Lösung gewaschen. Zur Herstellung der Inkubationsmedien wurden Stammlösungen der TLR-Liganden in die Zellkulturmedien pipettiert. Verwendete TLR-Liganden und deren Kombinationen, Liganden-Konzentrationen der Inkubationsmedien und Inkubationsdauer sind für alle untersuchten Zellreihen in den Tabellen 2-4 dargestellt. Zu definierten Zeitpunkten nach Beginn der Inkubation wurden Zellen geerntet und für die mRNA-Expressions-Analyse (RT qPCR) und die Gesamt-Protein-Analyse (Western Blot) aufbereitet, sowie Überstände für die Protein-Expressions-Analyse (ELISA) gesichert. Diese Zeitpunkte sind ebenfalls in den folgenden Tabellen 2-4 hinterlegt.

Podozyten-Zelllinie		
TLR-Ligand	Konzentration des Inkubationsmediums	Dauer der Inkubation in Stunden
basal	Standard-Podozyten-Medium	8
Fibrinogen	10 µg/ml	8
LPS	100 ng/ml	8
PAM3	0,5 µg/ml	8
MALP2	1 µg/ml	8
LPS + MALP2	100 ng/ml + 1 µg/ml	8
Fibrinogen + LPS	10 µg/ml + 100 ng/ml	8
Fibrinogen + MALP2	10 µg/ml + 1 µg/ml	8
Fibrinogen + LPS + MALP2	10 µg/ml + 100 ng/ml + 1 µg/ml	8

basal	Standard-Podozyten-Medium	24
Fibrinogen	10 µg/ml	24
PAM3	0,5 µg/ml	24
LPS	100 ng/ml	24
Zymosan	5 µg/ml	24
PAM3 + LPS	0,5 µg/ml + 100 ng/ml	24
PAM3 + Zymosan	0,5 µg/ml + 5 µg/ml	24
LPS + Zymosan	100 ng/ml + 5 µg/ml	24
LPS + MALP2	100 ng/ml + 1 µg/ml	24
PAM3 + LPS + Zymosan	0,5 µg/ml + 100 ng/ml + 5 µg/ml	24
Fibrinogen + LPS	10 µg/ml + 100 ng/ml	24
Fibrinogen + MALP2	10 µg/ml + 1 µg/ml	24
Fibrinogen + LPS + MALP2	10 µg/ml + 100 ng/ml + 1 µg/ml	24

Tabelle 2: Inkubationsmuster der Podozyten-Zelllinie

IMCD-Zelllinie		
TLR-Ligand	Konzentration des Inkubationsmediums	Dauer der Inkubation in Stunden
basal	Standard-IMCD-Medium	2
Fibrinogen	10 µg/ml	2
LPS	100 ng/ml	2
Fibrinogen + LPS	10 µg/ml + 100 ng/ml	2
Fibrinogen + LPS	10 µg/ml + 100 ng/ml	2 + 2 (sequenziell)

LPS + Fibrinogen	100 ng/ml + 10 µg/ml	2 + 2 (sequenziell)
basal	Standard-IMCD-Medium	4
Fibrinogen	1 µg/ml	4
Fibrinogen	10 µg/ml	4
Fibrinogen	100 µg/ml	4
LPS	1 ng/ml	4
LPS	10 ng/ml	4
LPS	100 ng/ml	4
Fibrinogen + LPS	10 µg/ml + 100 ng/ml	4
Fibrinogen + LPS	10 µg/ml + 100 ng/ml	4 + 4 (sequenziell)
LPS + Fibrinogen	100 ng/ml + 10 µg/ml	4 + 4 (sequenziell)
basal	Standard-IMCD-Medium	8
Fibrinogen	1 µg/ml	8
Fibrinogen	10 µg/ml	8
Fibrinogen	100 µg/ml	8
LPS	1 ng/ml	8
LPS	10 ng/ml	8
LPS	100 ng/ml	8
Fibrinogen + LPS	10 µg/ml + 100 ng/ml	8
Fibrinogen + LPS	10 µg/ml + 100 ng/ml	8 + 8 (sequenziell)
LPS + Fibrinogen	100 ng/ml + 10 µg/ml	8 + 8 (sequenziell)
basal	Standard-IMCD-Medium	12
Fibrinogen	10 µg/ml	12
LPS	100 ng/ml	12
Fibrinogen + LPS	10 µg/ml + 100 ng/ml	12

Fibrinogen + LPS	10 µg/ml + 100 ng/ml	12 + 12 (sequenziell)
LPS + Fibrinogen	100 ng/ml + 10 µg/ml	12 + 12 (sequenziell)
basal	Standard-IMCD-Medium	24
Fibrinogen	10 µg/ml	24
LPS	100 ng/ml	24
Fibrinogen + LPS	10 µg/ml + 100 ng/ml	24
basal	Standard-IMCD-Medium	48
Fibrinogen	1 µg/ml	48
Fibrinogen	10 µg/ml	48
Fibrinogen	100 µg/ml	48
LPS	1 ng/ml	48
LPS	10 ng/ml	48
LPS	100 ng/ml	48
Fibrinogen + LPS	10 µg/ml + 100 ng/ml	48

Tabelle 3: Inkubationsmuster der IMCD-Zelllinie

WEHI-Zelllinie		
TLR-Ligand	Konzentration des Inkubationsmediums	Dauer der Inkubation in Stunden
Fibrinogen	10 µg/ml	2
LPS	100 ng/ml	2
Fibrinogen + LPS	10 µg/ml + 100 ng/ml	2
Fibrinogen + LPS	10 µg/ml + 100 ng/ml	2 + 2 (sequenziell)
LPS + Fibrinogen	100 ng/ml + 10 µg/ml	2 + 2 (sequenziell)
basal	Standard-WEHI-Medium	4

Fibrinogen	1 µg/ml	4
Fibrinogen	10 µg/ml	4
Fibrinogen	100 µg/ml	4
LPS	1 ng/ml	4
LPS	10 ng/ml	4
LPS	100 ng/ml	4
Fibrinogen + LPS	10 µg/ml + 100 ng/ml	4
Fibrinogen + LPS	10 µg/ml + 100 ng/ml	4 + 4 (sequenziell)
LPS + Fibrinogen	100 ng/ml + 10 µg/ml	4 + 4 (sequenziell)
basal	Standard-WEHI-Medium	8
Fibrinogen	1 µg/ml	8
Fibrinogen	10 µg/ml	8
Fibrinogen	100 µg/ml	8
LPS	1 ng/ml	8
LPS	10 ng/ml	8
LPS	100 ng/ml	8
Fibrinogen + LPS	10 µg/ml + 100 ng/ml	8
Fibrinogen + LPS	10 µg/ml + 100 ng/ml	8 + 8 (sequenziell)
LPS + Fibrinogen	100 ng/ml + 10 µg/ml	8 + 8 (sequenziell)
basal	Standard-WEHI-Medium	12
Fibrinogen	10 µg/ml	12
LPS	100 ng/ml	12
Fibrinogen + LPS	10 µg/ml + 100 ng/ml	12
Fibrinogen + LPS	10 µg/ml + 100 ng/ml	12 + 12 (sequenziell)
LPS + Fibrinogen	100 ng/ml + 10 µg/ml	12 + 12 (sequenziell)

basal	Standard-WEHI-Medium	24
Fibrinogen	10 µg/ml	24
LPS	100 ng/ml	24
Fibrinogen + LPS	10 µg/ml + 100 ng/ml	24
basal	Standard-WEHI-Medium	48
Fibrinogen	1 µg/ml	48
Fibrinogen	10 µg/ml	48
Fibrinogen	100 µg/ml	48
LPS	1 ng/ml	48
LPS	10 ng/ml	48
LPS	100 ng/ml	48
Fibrinogen + LPS	10 µg/ml + 100 ng/ml	48

Tabelle 4: Inkubationsmuster der WEHI-Zelllinie

2.2.3 Messenger RNA-Analyse

Um die Aktivierung proinflammatorischer Gene zu analysieren, wurde deren transkribierte mRNA quantifiziert. Dazu wurde zunächst die Gesamt-RNA aus nach Inkubation lysierten Zellen isoliert. Die enthaltene mRNA wurde mittels Reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben und diese schließlich für die RT qPCR Analyse herangezogen.

2.2.3.1 Isolation von RNA aus Zellen

Nach den in den Tabellen 2-4 angegebenen Inkubationsdauern wurden die Zellen in der Sterilbank zweifach mit PBS-Lösung gewaschen und mit TRK Lyse Puffer des peqGOLD Total RNA Kit (Qiagen) lysiert (6 Well Platten: 3ml PBS-Lösung, 350 µl TRK Lyse Puffer; T25 Zellkulturflaschen: 5 ml PBS-Lösung, 590 µl TRK Lyse Puffer). Nach Behandlung mit TRK Lyse Puffer noch anhaftende Zellverbände wurden mechanisch mit

einem Zellschaber entfernt und suspendiert. Das Zellysat wurde mit einer Pipette aufgenommen und in Einheiten von je 350 μ l in 1,5 ml Eppendorf Cups überführt.

Aus den 1,5 ml Eppendorf Cups wurden jeweils 350 μ l Lysat auf eine DNA Removing Säule des peqGOLD Total RNA Kit geladen, die in ein 2,0 ml Sammeltube des Kits gesteckt wurde. DNA Removing Säule und Sammeltube wurden bei Raumtemperatur 1 Minute bei 11000 rpm zentrifugiert. Der durch diesen Schritt weitestgehend Desoxyribonukleinsäure (DNA)-freie Säulendurchfluss wurde mit identischem Volumen (350 μ l) 70% Ethanol versetzt und durch Auf- und Abziehen sorgfältig mit einer Pipette durchmischt. Darauf wurde der Säulendurchfluss auf eine in ein Sammeltube gesteckte PerfectBind RNA Säule des peqGOLD Total RNA Kit pipettiert und 1 Minute bei 10000 rpm zentrifugiert. Die RNA der Probe war nun in der PerfectBind RNA Säule gebunden, der Säulendurchfluss wurde verworfen. Es wurden 500 μ l RNA Wasch Puffer 1 des peqGOLD Total RNA Kit auf die PerfectBind RNA Säule gegeben und 15 Sekunden bei 10000 rpm zentrifugiert, danach wurde die PerfectBind RNA Säule auf ein neues Sammeltube gesteckt. Um eventuell noch vorhandene genomische DNA vor der Reversen Transkription und RT qPCR zu eliminieren, wurde ein DNase Verdau durch Anwendung des RNase-Free DNase Set durchgeführt: 80 μ l DNase-Mix, gemischt aus 70 μ l DNase-Puffer und 10 μ l DNase 1, wurden in die Mitte der PerfectBind RNA Säule pipettiert. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden 400 μ l RNA Wasch Puffer 1 zugegeben und weitere 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die PerfectBind RNA Säule 5 Minuten bei 8000 rpm zentrifugiert und der Säulendurchfluss verworfen. Nach dem DNase Verdau wurden 600 μ l RNA Wasch Puffer 2 auf die Säule pipettiert, der Säulendurchfluss nach 15 Sekunden Zentrifugation bei 10000 rpm verworfen. Dieser letzte Waschschrift wurde einmal wiederholt. Zum vollständigen

Trocknen der PerfectBind RNA Säule wurde die Probe 1 Minute bei 11000 rpm zentrifugiert.

Um die im PerfectBind RNA Säule gebundene RNA zu eluieren, wurde die Probe in ein 1,5 ml Eppendorf Cup gesteckt und darauf 24 μ l RNase-freies Wasser des peqGOLD Total RNA Kit pipettiert. Die Probe wurde 1 Minute bei 8000 rpm zentrifugiert, die in der PerfectBind RNA Säule gebundene RNA so im Säulendurchfluss ausgewaschen. Dessen optische Dichte wurde anschließend im Photometer (NanoDrop ND 1000) bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm bestimmt, um das für die folgende Reverse Transkription (2.2.4 Reverse Transkription) einzusetzende RNA-Probe-Volumen als reziproken Wert der gemessenen RNA-Konzentration zu berechnen.

2.2.3.2 Reverse Transkription

Um die aus den stimulierten Zellen isolierte mRNA mittels PCR zu quantifizieren, wurden die RNA-Proben zunächst durch Reverse Transkription in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Dazu wurden je Probe 1 μ g RNA, 1 μ l Oligo (dT) 15 Primer und 8 μ l RNase-freies Wasser in ein auf Eis gestelltes 1,5 ml Eppendorf Cup pipettiert. Die eingesetzten Desoxythymidin-Primer binden spezifisch an den terminalen Polyadenin-Schwanz der mRNA. Um die RNA-Sekundärstruktur aufzuschmelzen, wurden die Proben für 3 Minuten mit 70°C im Heizblock inkubiert. In jede Probe wurden 1 μ l dNTP Mix, 4 μ l M-MLV 5x Puffer, 1 μ l RNasin RNase Inhibitor, 1 μ l M-MLV Reverse Transkriptase und 3 μ l RNase-freies Wasser pipettiert. Zur Reversen Transkription wurden die Proben für 60 Minuten bei 37°C im Heizblock inkubiert, dann wurde die Reaktion in einem auf 95°C eingestellten Heizblock gestoppt. Nach Zugabe von 130 μ l RNase-freiem Wasser wurden die cDNA-Proben bei -20°C gelagert.

2.2.3.3 Quantitative Polymerasekettenreaktion

Mit Hilfe der klassischen PCR ist es möglich, ausgewählte DNA-Sequenzen zyklisch zu amplifizieren. Im ersten Schritt eines jeden PCR-Zyklus wird die Temperatur zunächst auf 95°C erhöht, um die doppelsträngige DNA in DNA-Einzelstränge zu trennen (Denaturierung). Nach Absinken der Temperatur binden im zweiten Schritt für die zu amplifizierende DNA-Sequenz spezifisch designte, in der Regel 18-30 Basenpaar lange Oligonukleotide (Primer), komplementär an den *sense-* (*forward* Primer) und *antisense-* (*reverse* Primer) DNA-Strang (*annealing*/Primerhybridisierung). Die an die DNA gebundenen Primer dienen im Folgenden dritten Schritt als Ausgangspunkte für die Synthese neuer DNA-Stränge durch die DNA-Polymerase (Extension), deren Aktivitätsoptimum bei 72°C liegt. Da die DNA-Polymerase stets von Doppelstrang-DNA (Primer) ausgehend in 3'-5'-Richtung synthetisiert, entsteht ab dem zweiten PCR-Zyklus die gewünschte DNA-Zielsequenz, die an ihrem 3'- und 5'- Ende durch *forward* und *reverse* Primer begrenzt ist und in den folgenden PCR-Zyklen exponentiell amplifiziert wird.

Die RT qPCR ermöglicht durch Einsatz eines Fluoreszenzfarbstoffes (hier SYBR Green I), der Doppelstrang-DNA interkaliert, die quantitative Bestimmung einer amplifizierten DNA-Sequenz. Die Menge an doppelsträngigem DNA-Produkt korreliert dabei mit dem gemessenen Fluoreszenzsignal des Farbstoffes und lässt auf die ursprünglich eingesetzte Ausgangsmenge an cDNA rückschließen. Am Ende der RT qPCR wird eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, anhand derer die Länge der entstandenen DNA-Sequenzen und die Spezifität abgeleitet werden kann. Dazu wird die Temperatur kontinuierlich von 50°C auf 95°C erhöht. Für jede doppelsträngige DNA-Sequenz existiert in Abhängigkeit der Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungen eine spezifische Schmelztemperatur, bei welcher sie in zwei Einzelstränge denaturiert und damit der

interkalierende Fluoreszenzfarbstoff inaktiviert wird. Anhand der Konfiguration der Schmelzkurven können so verschiedene PCR-Amplifikate unterschieden werden.

Die eingesetzten Primer (Tab. 5) wurden den Vorgaben des Herstellers entsprechend gelöst und ein Primer Mix mit einer *forward* Primer- und *reverse* Primer- Konzentration von je 0,001 $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$ erstellt. Für die RT qPCR wurden je Reaktion 1 μl des Primer Mixes, 5 μl cDNA, 4 μl Wasser und 10 μl SYBR Green PCR Master Mix aus dem QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Life Technologies) in eine Vertiefung einer 384 Well Platte pipettiert. Die RT qPCR wurde mit dem ABI Prism 7900HT Sequence Detection System und der SDS Software Suite nach dem in Abbildung 3 schematisch dargestellten Protokoll durchgeführt. Als *Housekeeping*-Gen der mRNA-Analysen wurde Cyclophilin verwendet, das in allen Zellreihen konstitutiv und nicht-reguliert exprimiert wird.

Primer (Maus)	Forward-Sequenz (5'-3')	Reverse-Sequenz (5'-3')
AP-1	TAACAGTGGGTGCCAACTCA	CGCAACCAGTCAAGTTCTCA
CCL2	AGCACCAGCCAACTCTCACT	CGTAACTGCATCTGGCTGA
CCL5	ATATGGCTCGGACACCACTC	TCCTTCGAGTGACAAACACG
Cyclophilin	TGATCCAGGGTGGAGACTTC	ATTGGTGTCTTTGCCTGCAT
NFκB	CACCTAGCTGCCAAAGAAGG	GCAGGCTATTGCTCATCACA
TLR1	CTGCCCTGGTATGTGAGGAT	CTTCACCCAGGCAGAATCAT
TLR2	CTCCCACTTCAGGCTCTTTG	TTATCTTGCGCAGTTTGCAG
TLR4	GGCAGCAGGTGGAATTGTAT	AGGATTCGAGGCTTTTCCAT
TLR6	ACACAATCGGTTGCAAACA	GGAAAGTCAGCTTCGTCAGG
TNFα	ATGAGCACAGAAAGCATGATC	TACAGGCTTGTCACCTCGAATT

Tabelle 5: Primer

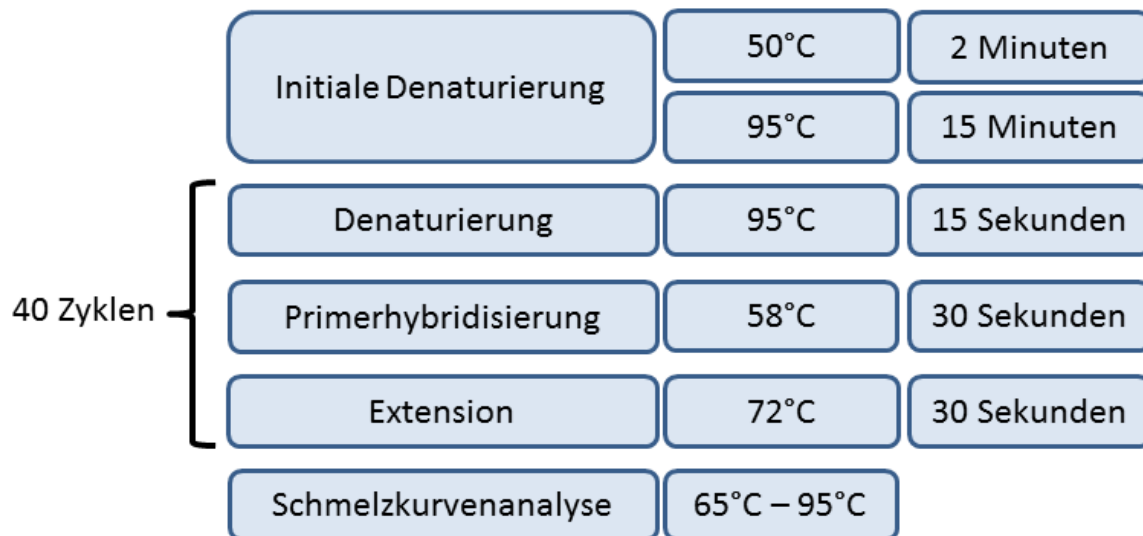


Abbildung 3: RT qPCR Protokoll

2.2.4 Proteinbiochemische Analysen

Zusätzlich zur Bestimmung der mRNA-Induktion stimulierter Zellen wurde die daraus resultierende Proteinexpression mittels ELISA und Western Blot analysiert.

2.2.4.1 Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Die proinflammatorische Zytokinexpression der stimulierten Zellen wurde auf Proteinebene mittels ELISA, einem enzymatischen Immunadsorptionsverfahren, quantifiziert. Dazu werden die nachzuweisenden Proteine (hier CCL2 und TNF α) in einem ersten Schritt durch einen Erstantikörper (*Capture*-Antikörper (Ak)) in einer Mikrotiterplatte gebunden. In einem zweiten Schritt bindet ein mit einem Enzym gekoppelter Sekundärantikörper an das Fc-Fragment des Erstantikörpers. Im dritten Schritt wird ein Substrat zugegeben, dessen Umsetzung durch das Enzym katalysiert wird. Diese Reaktion geht mit einem Farbumschlag der Probe einher, die Konzentration des Reaktionsprodukts kann nach dem Lambert-Beerschen Gesetz photometrisch bestimmt werden. Im Vergleich mit einer Standardreihe bekannter Konzentrationen kann so auf die Konzentration des nachzuweisenden Proteins rückgeschlossen werden. In dieser Arbeit wurde anstatt eines enzymgekoppelten Detektionsantikörpers ein ungekoppelter,

biotinylierter Detektionsantikörper eingesetzt, an dessen Biotin-Rest in einem weiteren Schritt ein Avidin-Enzym-Konjugat gebunden wurde. Dieses Vorgehen ist in Abbildung 4 schematisch dargestellt.

In der praktischen Durchführung wurden das Mouse CCL2(JE, MCP-1) ELISA Development Kit und das Mouse TNF α ELISA Development Kit von PromoKine verwendet. Die Kits beinhalten Meerrettichperoxidase (HRP) als den Farbumschlag katalysierendes Enzym und verfügen über einen Proteinnachweisbarkeitsbereich von 63-4000 pg/ml (CCL2) bzw. 16-2000 pg/ml (TNF α). 50 μ l der Capture-Ak-Stammlösung (100 μ g/ml) wurden mit 9950 μ l PBS-Lösung auf eine Konzentration von 0,5 μ g/ml verdünnt. Je 100 μ l der verdünnten Capture-Ak-Lösung wurden in die Vertiefungen einer 96 Well Mikrotiterplatte pipettiert, die Mikrotiterplatte versiegelt und mindestens 12 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Wells vierfach mit Wasch-Puffer gespült. Nachdem je Well 300 μ l Block-Puffer hinzu pipettiert und die Platte 1 Stunde bei 37°C inkubiert wurde, wurde der Waschvorgang wiederholt. Nach Abtrocknen der Platten wurden die Proben als Doppelwerte sowie drei Standardreihen (2 ng/ml, 1 ng/ml, 0,5 ng/ml, 0,25 ng/ml, 0,125 ng/ml, 0,063 ng/ml, 0,03 ng/ml, 0,016 ng/ml) in die Wells pipettiert. Nach einem weiteren Waschvorgang wurden 100 μ l Detektions-Ak-Lösung (0,5 μ g/ml) in die Wells pipettiert und 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Detektions-Ak-Lösung wurde aus 50 μ l der Detektions-Ak-Stammlösung (100 μ g/ml) und 9950 μ l PBS-Lösung erstellt. Im nächsten Schritt wurden 100 μ l Avidin-HRP-Konjugat-Lösung in die Wells hinzu pipettiert und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, danach wurde ein weiterer Waschvorgang durchgeführt. Die Avidin-HRP-Konjugat-Lösung wurde mit 5,5 μ l Avidin-HRP-Stammlösung und 11 ml Diluent angesetzt. Es wurden je 100 μ l Substrat-Lösung in die Wells gegeben, nach 15-minütiger, lichtgeschützter Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Enzymreaktion durch Zugabe

von 100 µl Stop-Lösung je Well inhibiert. Im Anschluss wurde die 96 Well Mikrotiterplatte im ELISA Microplate Reader ausgewertet.

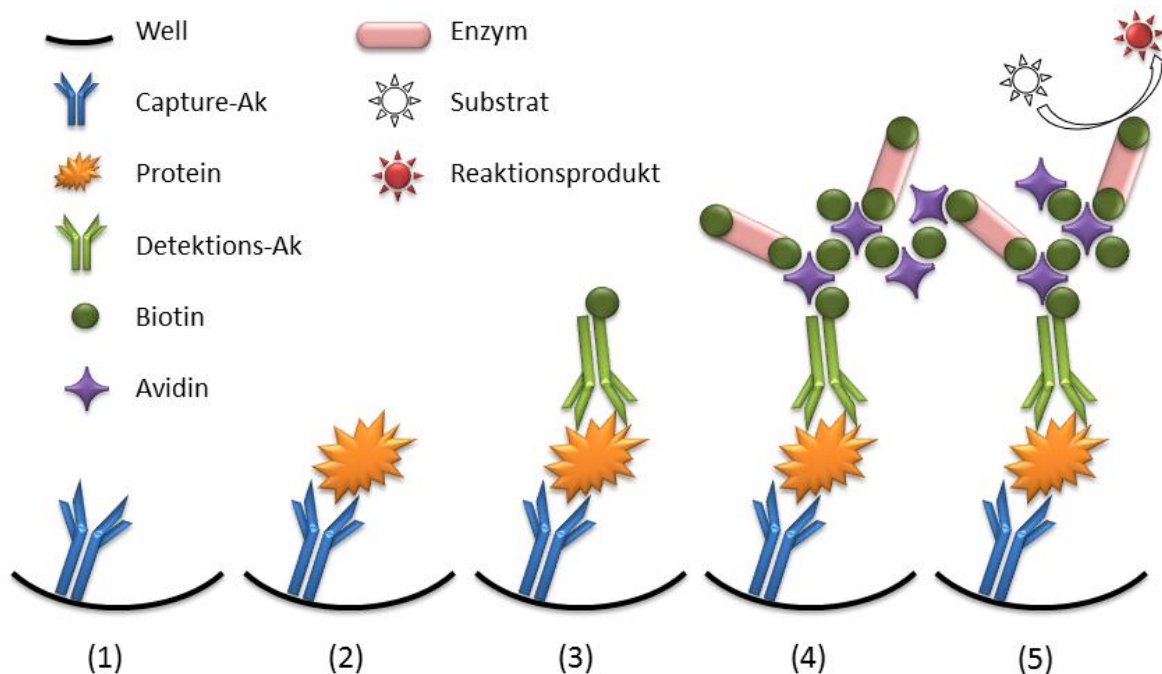


Abbildung 4: Schematische Darstellung ELISA; (1) Capture-Ak in Reaktionsgefäß gebunden, (2) Protein aus Probe bindet an Capture-Ak, (3) Detektions-Ak bindet an Protein, (4) Avidin-Biotin-Enzym-Konjugat komplexiert biotinylierten Detektions-Ak, (5) Zugabe von Substrat, enzymatische Katalyse und Farbumschlag

2.2.4.2 Western Blot

Im Rahmen des Western Blot wird zunächst das zu analysierende Proteingemisch in Abhängigkeit von elektrischen Ladungszahlen und Proteingrößen per Gel-Elektrophorese in Proteinbanden aufgetrennt. Durch ein senkrecht zur Ebene des Elektrophorese-Gels wirkendes elektrisches Feld werden die aufgetrennten Proteine auf eine Trägermembran übertragen. Die an die Membran gebundenen Proteine sind dann antikörperbasierten, immunologischen Nachweismethoden zugänglich. In dieser Arbeit wurden dazu Primärantikörper gegen die nachzuweisenden Proteine (TLR4, TNF α , β -Actin) eingesetzt. Ein Sekundärantikörper, der gegen das Fc-Fragment des Primärantikörpers gerichtet war, war mit dem Enzym HRP gekoppelt, welches zugegebenes Substrat zu einem chemilumineszenten Reaktionsprodukt umgesetzt hat. Die mit der Proteinmenge

korrelierende Chemolumineszenz wurde mit einem Entwicklerfilm detektiert. Dieses immunologische Nachweisverfahren ist schematisch in Abbildung 5 dargestellt.

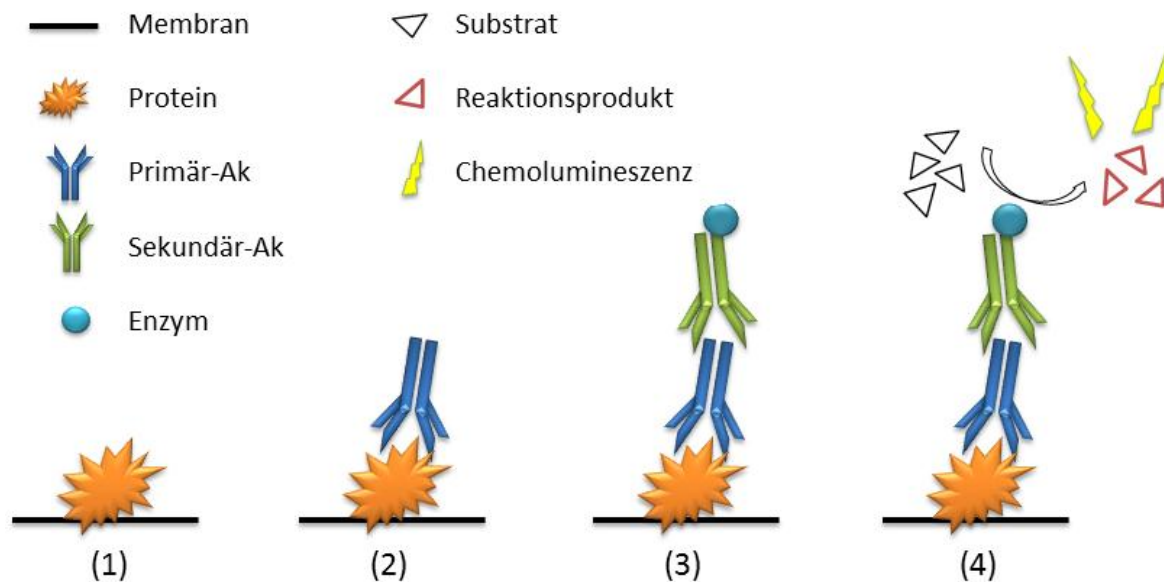


Abbildung 5: Schematische Darstellung Western Blot; (1) Protein bindet an Nitrocellulose-Membran, (2) Primärantikörper bindet Protein, (3) enzymgekoppelter Sekundärantikörper bindet Fc-Fragment des Primärantikörpers, (4) chemilumineszentes Reaktionsprodukt

2.2.4.2.1 Isolation und Bestimmung von Gesamtprotein aus Zellen

Zur Proteinisolation aus der WEHI-Suspensionskultur wurde die Zellsuspension aus einer T25 Zellkulturflasche in ein 50 ml Falcon Tube überführt und 3 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 5 ml PBS gelöst und erneut zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet in 400 µl Ripa-Puffer und 16 µl PIC gelöst. Unter gelegentlichem Vortexen wurde das Lysat 30 Minuten auf Eis gelagert. Zur Analyse der Western Blots müssen die eingesetzten Proteinmengen bekannt sein. Deshalb wurde der Proteingehalt des Lysats durch die Methode nach Pierce bestimmt. Dieses Verfahren beruht auf der Komplexbildung von Cu^{2+} -Ionen mit Peptidbindungen der Proteine in alkalischem Milieu (Biuret-Reaktion). Im Komplex werden Cu^{2+} -Ionen zu Cu^{1+} -Ionen reduziert, welche mit Bicinchoninsäure einen violetten Farbkomplex bilden und deren Konzentration photometrisch bei einer Wellenlänge $\lambda=560$ nm bestimmt werden kann. In der praktischen Durchführung wurden dazu 200 µl eines aus 5 ml

Bicinchoninsäure und 100 µl Kupfersulfatpentahydrat-Lösung angesetzten Reaktionsgemisches in die Wells einer Mikrotiterplatte pipettiert und jeweils 10 µl der Proteinproben bzw. BSA Protein-Standardreihe zugesetzt. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C wurde die Mikrotiterplatte im Microplate Reader ausgewertet und der Proteingehalt der Proben bestimmt.

2.2.4.2.2 Natrium-Dodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Herstellung eines 12% Trenngels wurden 2,5 ml 1,5 M TRIS/HCl-Puffer, 0,1 ml 10% SDS-Lösung, 3,3 ml destilliertes Wasser, 4 ml 30% Acrylamid, 5 µl TEMED und 100 µl 10% APS-Lösung gemischt. In Vorversuchen erwies sich ein 12% Trenngel als am besten für die SDS-PAGE von WEHI-Proteinisolat geeignet. Zur Herstellung des Sammelgels, in welches Taschen zur Aufnahme der Proteinproben geformt wurden, wurden 1,25 ml 0,5 M TRIS/HCl-Puffer, 50 µl 10 % SDS-Lösung, 2,8 ml destilliertes Wasser, 850 µl 30% Acrylamid, 10 µl TEMED und 100 µl 10% APS-Lösung gemischt. Das Sammelgel wurde dem Trenngel nach dem Gießen aufgelagert.

Zu jedem Volumen einer Proteinprobe wurde dasselbe Volumen Lämmli-Puffer pipettiert und 5 Minuten bei 95°C inkubiert (Protein-Denaturierung). Nach kurzem Abzentrifugieren wurden die Proben sowie Precision Plus Protein Dual Color Standard in die Taschen des Sammelgels pipettiert (Tab. 6).

Tasche Nr.	Probe	Volumen [μ l]
1	Protein Dual Color Standard	15
2	Protein WEHI 5 μ g	3
3	Protein WEHI 15 μ g	8,98
4	Protein WEHI 30 μ g	17,96
5	Protein Dual Color Standard	15
6	Protein Dual Color Standard	15

Tabelle 6: Gelauftragung Western Blot

Die Auftrennung der Proteine erfolgte nach Zugabe von 1x TRIS/Glycin/SDS Lauf-Puffer in der Gelelektrophorese-Kammer bei einer eingestellten Spannung $U = 100V$.

2.2.4.2.3 Blotting

Elektrophorese-Gel und Nitrocellulose-Membran wurden beidseits zwischen mit Blotting-Puffer getränktes Blotting Saugpapier und mit Blotting-Puffer getränkten Schaumstoff in die Western Blot Kassette gelegt. Die aufgetrennten Proteine wurden für eine Zeitdauer von 2 Stunden mit einer Stromstärke von $I = 50mA$ in der mit Blotting-Puffer gefüllten Western Blot Kammer auf die Nitrocellulose-Membran elektrogeblottet.

2.2.4.2.4 Immundetektion

Nach dem Proteintransfer wurde die Nitrocellulose-Membran zweimal je 5 Minuten mit 1x TBS gewaschen und 90 Minuten bei Raumtemperatur im Horizontalschüttler mit Blocking-Puffer inkubiert. Die im Blocking-Puffer enthaltenen Milchpulver-Proteine enthalten keine für die bei der Immundetektion eingesetzten Antikörper erkennbare Epitope und blockieren so freie Bindungsstellen der Membran. Nach dem Blocken wurde die Membran viermal je 10 Minuten mit TBST gewaschen. Die Primärantikörper wurden mit TBST und 1% Milchpulver auf die in Tabelle 7 angegebenen Konzentration verdünnt,

je auf eine Membran pipettiert und mindestens 12 Stunden bei 4°C im Horizontalschüttler inkubiert. Danach wurde viermal 10 Minuten mit TBST gewaschen, der Sekundärantikörper (Tab. 7) auf die Membran gegeben und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde viermal 10 Minuten mit TBST und einmal mit 1x TBS gewaschen. Die Detektion der Proteine auf einem aufgelegten Film erfolgte mittels luminolhaltiger LumiGLO Entwicklerlösung.

	Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Primär	Monoclonal Antibody to CD284/TLR4	1 : 200	Acris Antibodies GmbH, Herford, Deutschland
	Polyclonal TNF Rabbit anti-Mouse Antibody	1 : 1000	LifeSpan Biosciences Inc., Seattle, USA
	Actin (I-19): sc-1616	1 : 1000	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Deutschland
Sekundär	Goat Anti-Rabbit IgG-HRP	1 : 1000	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Deutschland

Tabelle 7: Antikörper Western Blot

Durch Stripping ist es möglich, vorhandene Primär- und Sekundärantikörper von der Nitrocellulose-Membran zu entfernen und den Western Blot nacheinander mit weiteren, gegen andere Proteine gerichteten Antikörpern zu entwickeln. In dieser Arbeit wurden die mit TLR4- und TNF α -Antikörpern entwickelten Western Blots ein zweites Mal mit gegen β -Actin gerichteten Antikörpern entwickelt, um die korrekte Auftragung der Proteinproben zu verifizieren. Dazu wurden die Nitrocellulose-Membranen nach der Entwicklung des ersten Blots in mit Stripping-Lösung gefüllten 50 ml Falcon Tubes für 30 Minuten bei 60°C im Wasserbad inkubiert. Danach wurden die Membranen dreimal für 5 Minuten mit

TBST gewaschen und die Western Blots mit β -Actin-Antikörper (Tab. 7) erneut durchgeführt.

2.3 Statistische Analyse

Die statistischen Analysen wurden mit Microsoft Excel 2010 durchgeführt. Die statistische Signifikanz wurde bei nachgewiesener Normalverteilung mittels *Student's* t-Test ermittelt. Nicht-normalverteilte Daten wurden mit nicht-parametrischen Tests auf statistische Signifikanz überprüft. Alle Ergebnisse sind als arithmetischer Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben.

3. Ergebnisse

Im Folgenden werden die aus der TLR-Aktivierung resultierenden Effekte für jede der untersuchten Zellreihen dargestellt. Nichtstimulierte Zellen, die als Kontrollgruppe in ligandenfreiem Medium bei identischen Bedingungen koinkubiert wurden, sind als Basalwerte angegeben. Die Ergebnisse der mRNA-Analysen sind als Vielfachwerte und normalisiert in Bezug auf das *Housekeeping* Gen Cyclophilin angegeben. Sofern nicht anders angegeben, entsprechen die Konzentrationen der TLR-Liganden den Standardwerten von 100 ng/ml LPS, 1 µg/ml MALP2, 0,5 µg/ml PAM3 5 µg/ml Zymosan und 10 µg/ml Fibrinogen. Die in den Abbildungen eingezeichneten Fehlerbalken sind als positive und negative Standardabweichung aufgetragen.

3.1 Analyse der mRNA-Expression nach Podozyten-Inkubation

3.1.1 TLR-Expressionsmuster nach separater und simultaner Inkubation mit exogenen Liganden

Podozytäre Zellen wurden **separat** und mit Kombinationen der exogenen Liganden LPS, PAM3 und Zymosan stimuliert. Die daraus **resultierende mRNA-Transkription** der TLR2- und TLR4-Gene ist in den Abbildungen 6 und 7 dargestellt. Zu keinem Zeitpunkt fand sich eine signifikante Veränderung der TLR1- und TLR6-Genexpression (Daten nicht gezeigt).

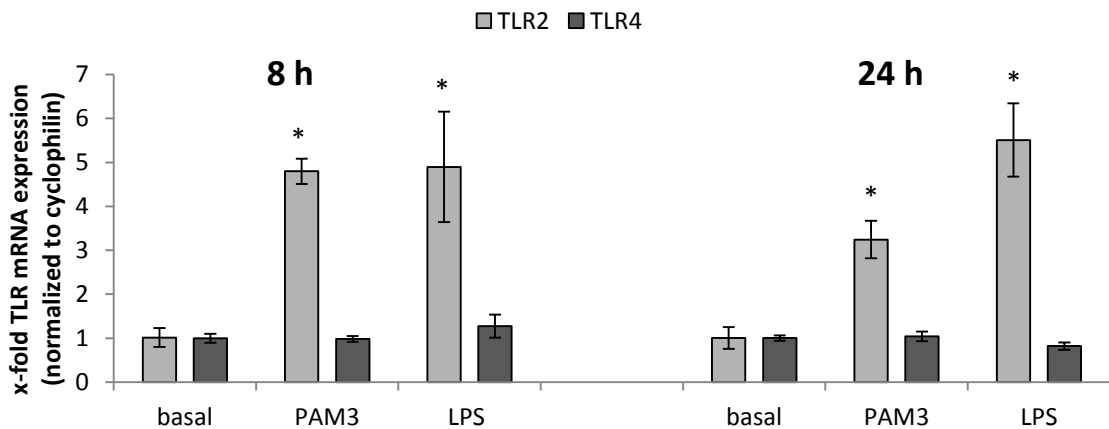


Abbildung 6: Vergleich der TLR2- und TLR4-mRNA-Expression - basal und nach separater Inkubation mit den exogenen TLR-Liganden LPS und Pam3 nach einer Inkubationsdauer von 8 sowie 24 Stunden. Signifikante Unterschiede (* p<0,05) zur basalen Expression sind gekennzeichnet

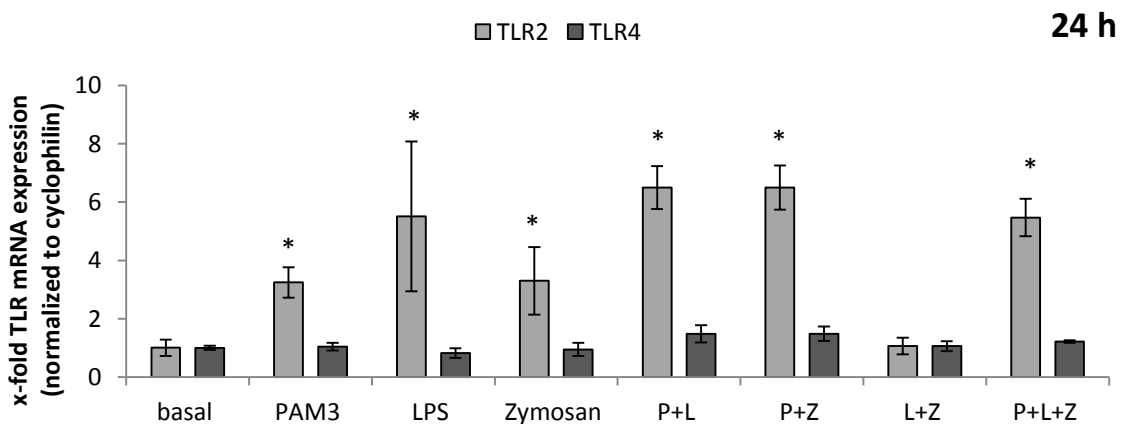


Abbildung 7: Vergleich der TLR2- und TLR4-mRNA-Expression - basal und nach simultaner Inkubation mit den exogenen TLR-Liganden LPS (L), PAM3 (P) und Zymosan (Z) bei einer Inkubationsdauer von 8 sowie 24 Stunden. Signifikante Unterschiede (* p<0,05) zur basalen Expression sind gekennzeichnet

3.1.2 Induktion nukleärer Transkriptionsfaktoren nach separater und simultaner Inkubation mit exogenen und endogenen TLR-Liganden

Die aus separater und simultaner Inkubation der podozytären Zellreihe resultierende Aktivierung der nukleären Transkriptionsfaktoren AP-1 und NFκB ist in Abbildung 8 und 9 dargestellt.

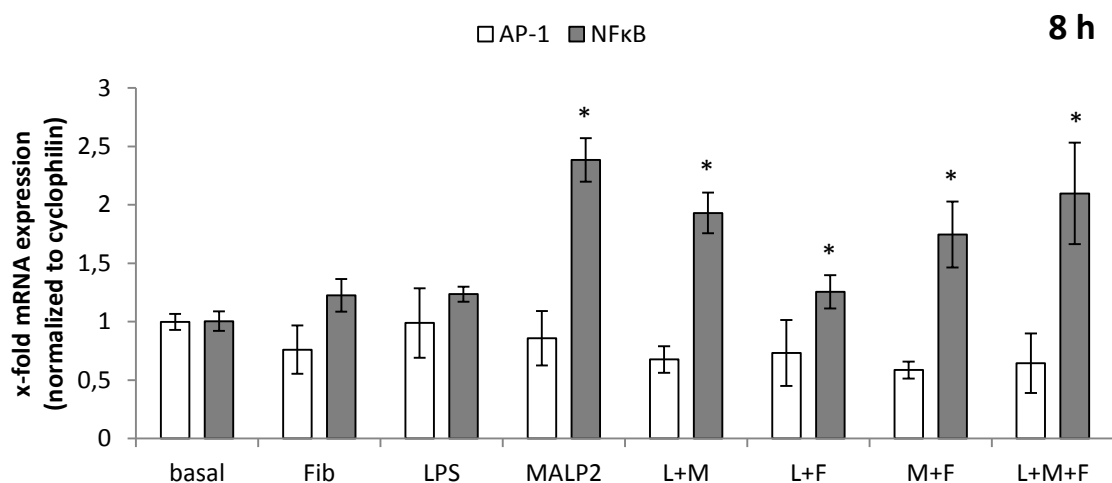


Abbildung 8: m-RNA-Expression der proinflammatorischen Transkriptionsfaktoren AP-1 und NFκB nach separater und simultaner Inkubation mit exogenen und endogenen TLR-Aktivatoren nach einer Inkubationsdauer von 8 Stunden. Signifikante Unterschiede (* $p < 0,05$) zur basalen Expression sind gekennzeichnet. LPS (L), MALP2 (M), Fibrinogen (F)

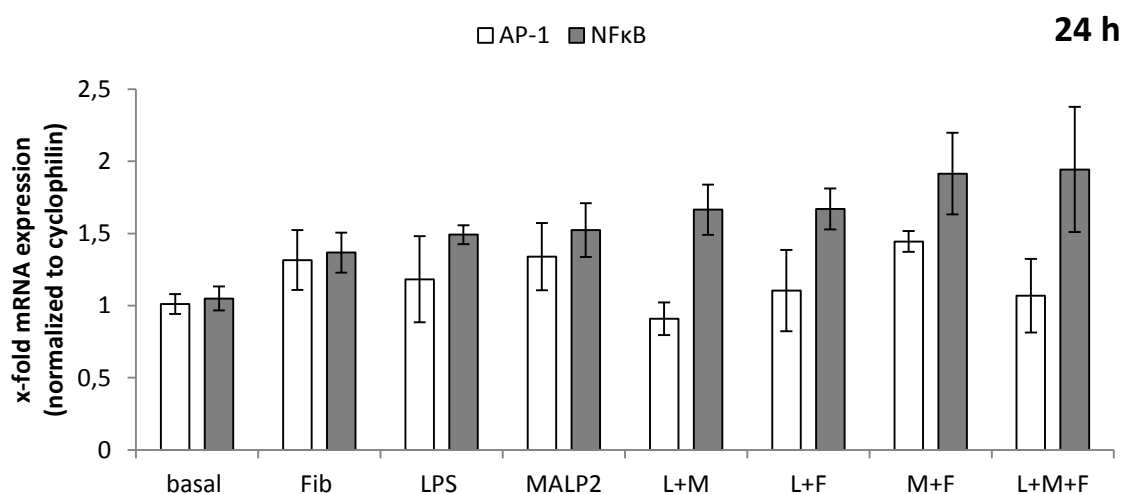


Abbildung 9: m-RNA-Expression der proinflammatorischen Transkriptionsfaktoren AP-1 und NFκB nach separater und simultaner Inkubation mit exogenen und endogenen TLR-Aktivatoren nach einer Inkubationsdauer von 24 Stunden. LPS (L), MALP2 (M), Fibrinogen (F)

3.1.3 Proinflammatorisches Zyto- und Chemokin-Expressionsmuster nach separater und simultaner Inkubation mit exogenen und endogenen TLR-Liganden

In Abbildung 10 und 11 ist die aus separater und **simultaner Inkubation** mit exogenen und endogenen TLR-Liganden resultierende **TNF α -** und **CCL2- mRNA-Expression** dargestellt.

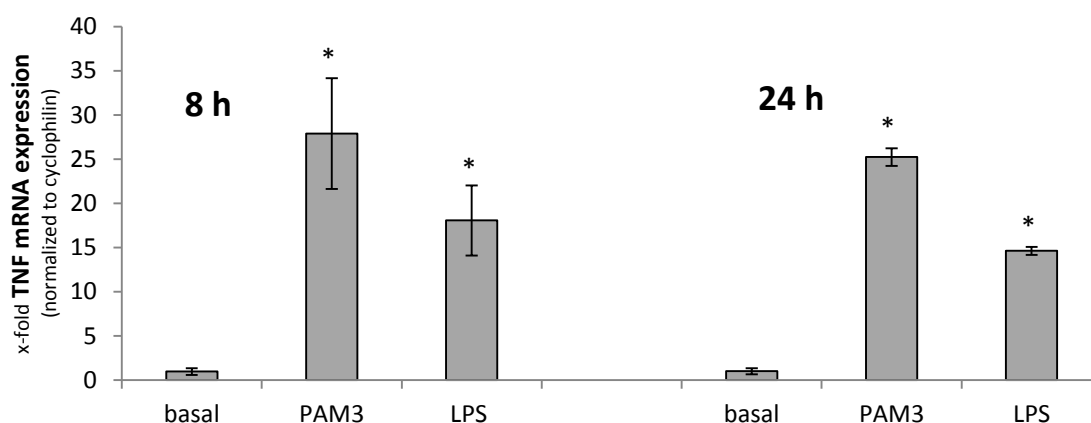


Abbildung 10: TNF α mRNA-Expression nach Inkubation mit LPS und PAM3 nach einer Inkubationsdauer von 8 und 24 Stunden. Signifikante Unterschiede (* $p < 0,05$) zur basalen Expression sind gekennzeichnet

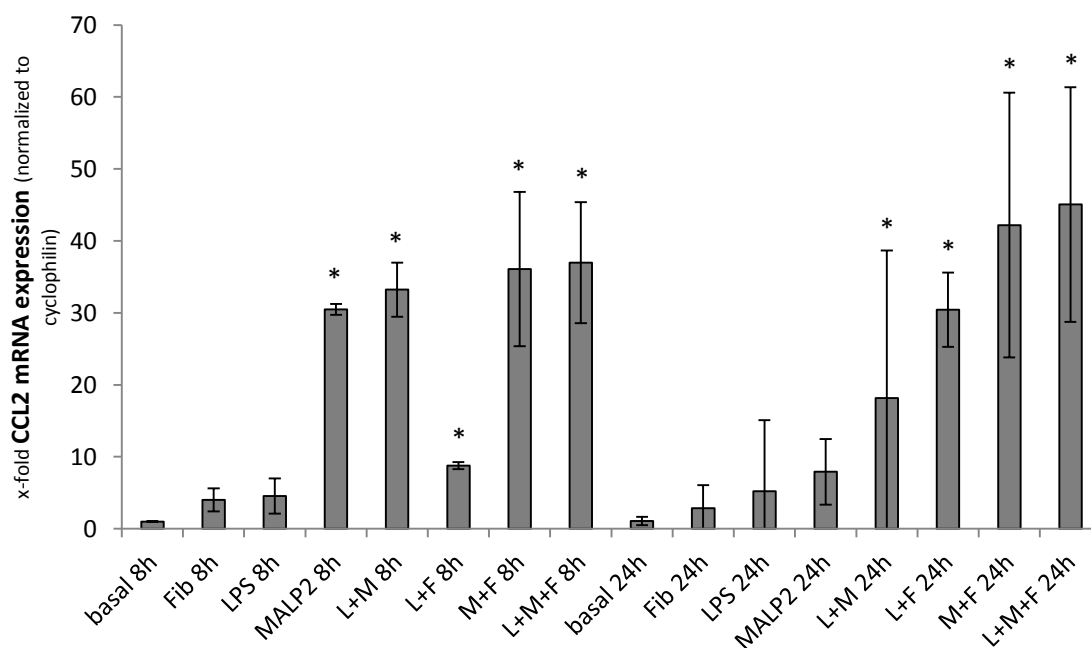


Abbildung 11: CCL2 mRNA-Expression nach separater und simultaner Inkubation mit LPS (L), MALP2 (M) und Fibrinogen (F) nach einer Inkubationsdauer von 8 und 24 Stunden. Signifikante Unterschiede (* $p < 0,05$) zur Expression nach separater Inkubation mit LPS oder Fibrinogen sind gekennzeichnet. LPS (L), MALP2 (M), Fibrinogen (F)

3.2 Analyse der mRNA- und Protein-Expression der IMCD-Zelllinie

3.2.1 Chemokin mRNA- und Protein-Expression in Abhängigkeit von Konzentration exogener und endogener Stimulanzen und Inkubationsdauer

In den Abbildungen 12 und 13 ist die mRNA- und Protein-Expression von CCL2 in Abhängigkeit von **variieren Inkubationsdauern und TLR-Ligandenkonzentrationen** dargestellt.

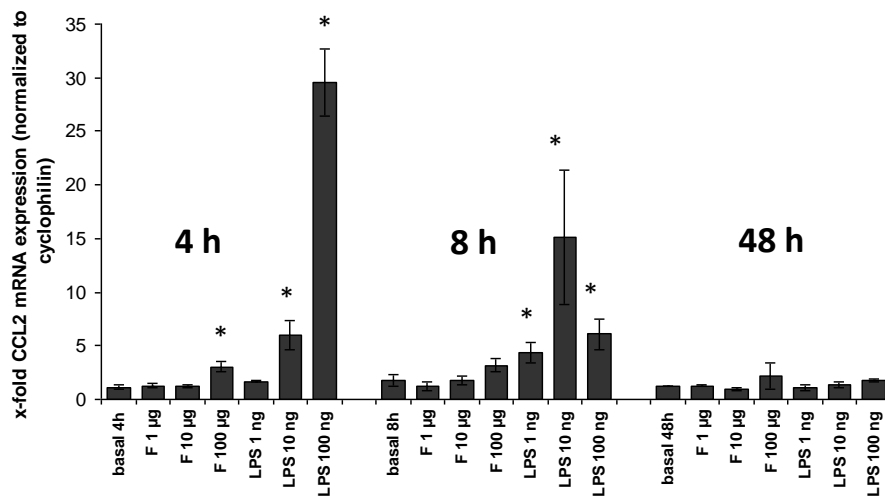


Abbildung 12: Vergleich der CCL2 mRNA-Expression nach separater Inkubation mit LPS und Fibrinogen (F) in unterschiedlichen Konzentrationen nach einer Inkubationsdauer von 4, 8 und 48 Stunden. Signifikante Unterschiede (* p<0,05) zur basalen Expression sind gekennzeichnet

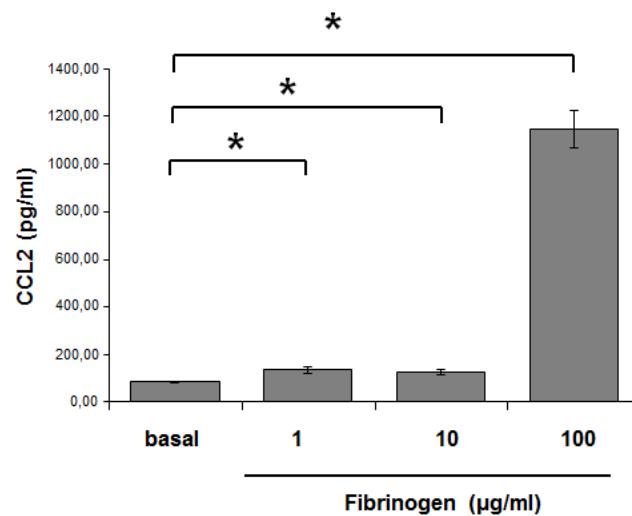


Abbildung 13: CCL2 Protein-Expression nach 8-stündiger Inkubation mit Fibrinogen. Signifikante Unterschiede (* p<0,05) sind gekennzeichnet

3.2.2 Proinflammatorische mRNA- und Protein-Expression nach separater und simultaner Inkubation mit exogenen und endogenen TLR-Liganden

In den Abbildungen 14, 15 und 16 ist die aus **separater, sequenzieller und simultaner exogener und endogener TLR-Aktivierung** resultierende **mRNA- und Protein-Expression** dargestellt.

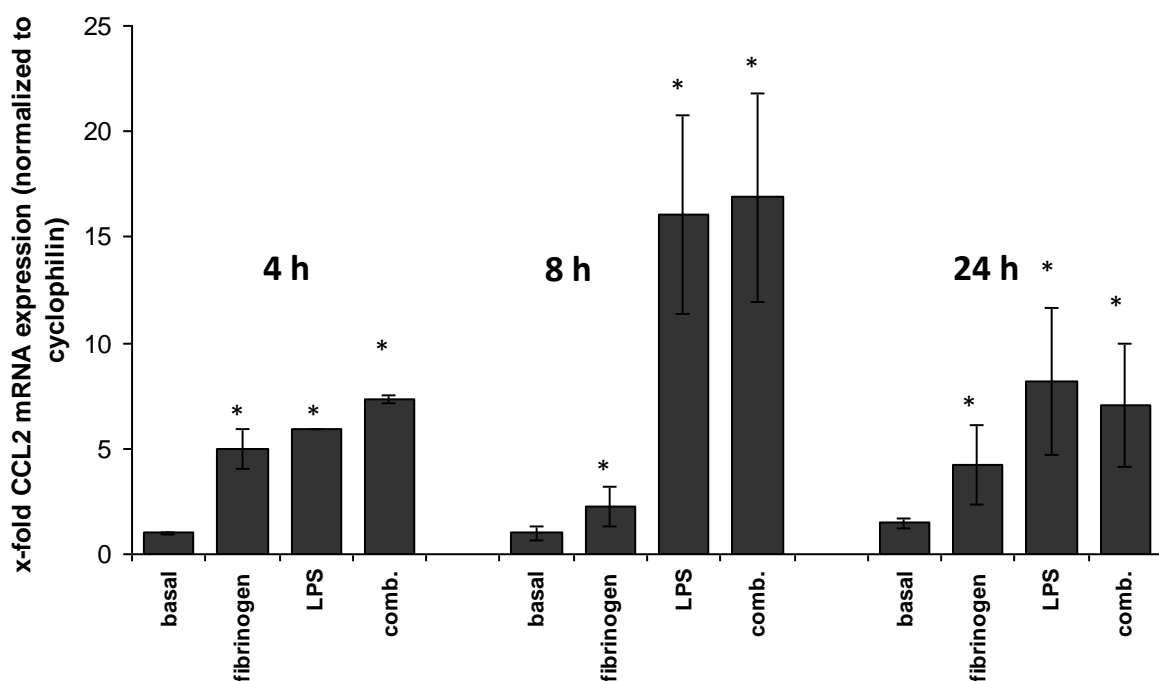


Abbildung 14: CCL2 mRNA-Expression nach separater und simultaner (comb.) Inkubation mit LPS und Fibrinogen nach einer Inkubationsdauer von 4, 8 und 24 Stunden. Signifikante Unterschiede (* $p < 0,05$) zur basalen Expression sind gekennzeichnet

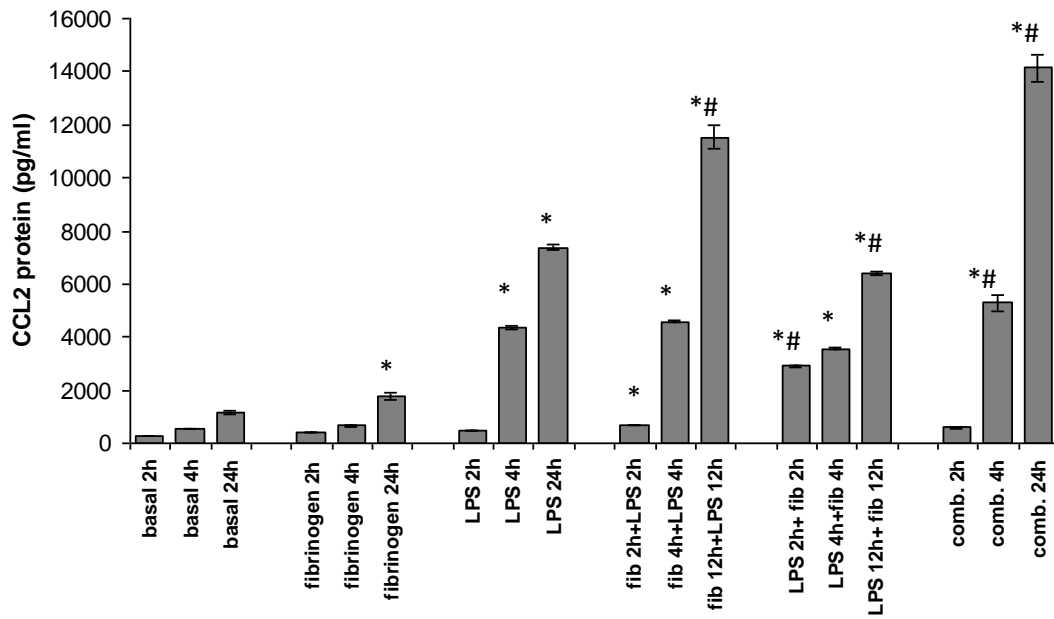


Abbildung 15: CCL2 Protein-Expression nach separater, sequenzieller und simultaner (comb.) Inkubation mit LPS und Fibrinogen (fib) nach Inkubationsdauern von 2, 4, 12 und 24 Stunden. Signifikante Unterschiede zur basalen Expression (* $p < 0,05$) und zur Expression nach separater Inkubation (# $p < 0,05$) sind gekennzeichnet

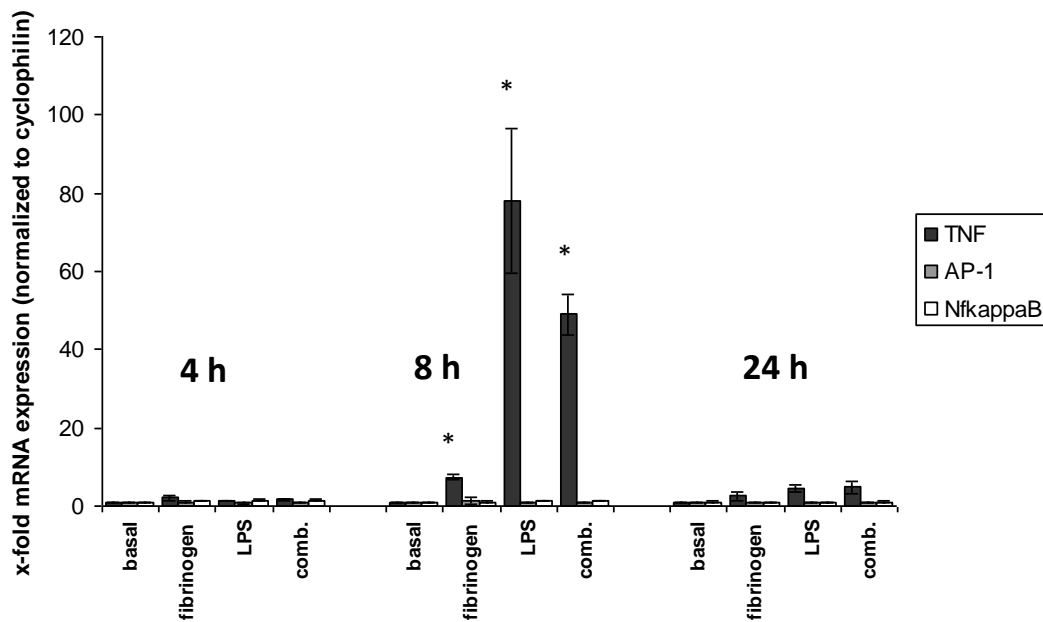


Abbildung 16: mRNA-Expression der Transkriptionsfaktoren AP-1 und NfκB sowie von TNFα nach separater und simultaner (comb.) Inkubation nach einer Inkubationsdauer von 4, 8 und 24 Stunden. Signifikante Unterschiede zur basalen Expression (* $p < 0,05$) sind gekennzeichnet

3.2.3 Auswirkung TLR-spezifischer siRNA auf die Chemokin-Expression

Der Effekt TLR-spezifischer siRNA auf TLR-Expression sowie CCL2 mRNA- und Protein-Expression ist in den Abbildungen 17 - 20 dargestellt.

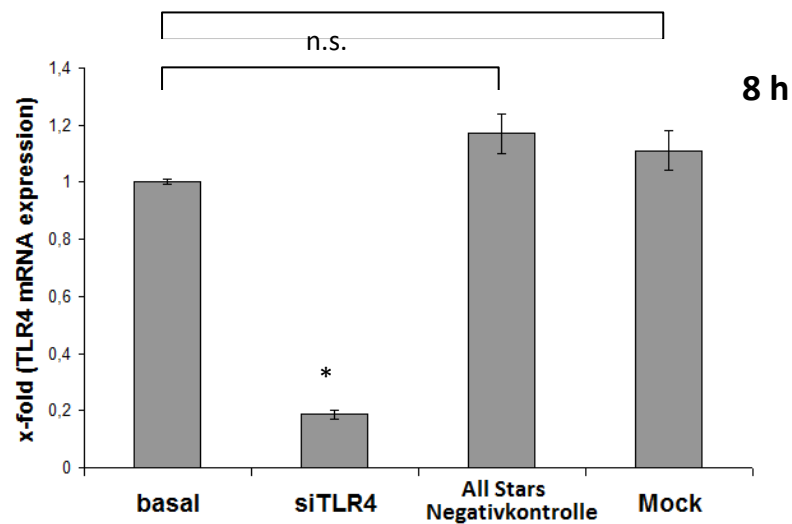


Abbildung 17: TLR4 mRNA-Expression nach Transfektion mit TLR4-spezifischer siRNA sowie Mock-Reagenz und All Stars Negativkontrolle. Signifikante Reduktion (* $p < 0,05$) der TLR4 mRNA-Expression nach TLR4-spezifischer siRNA-Transfektion

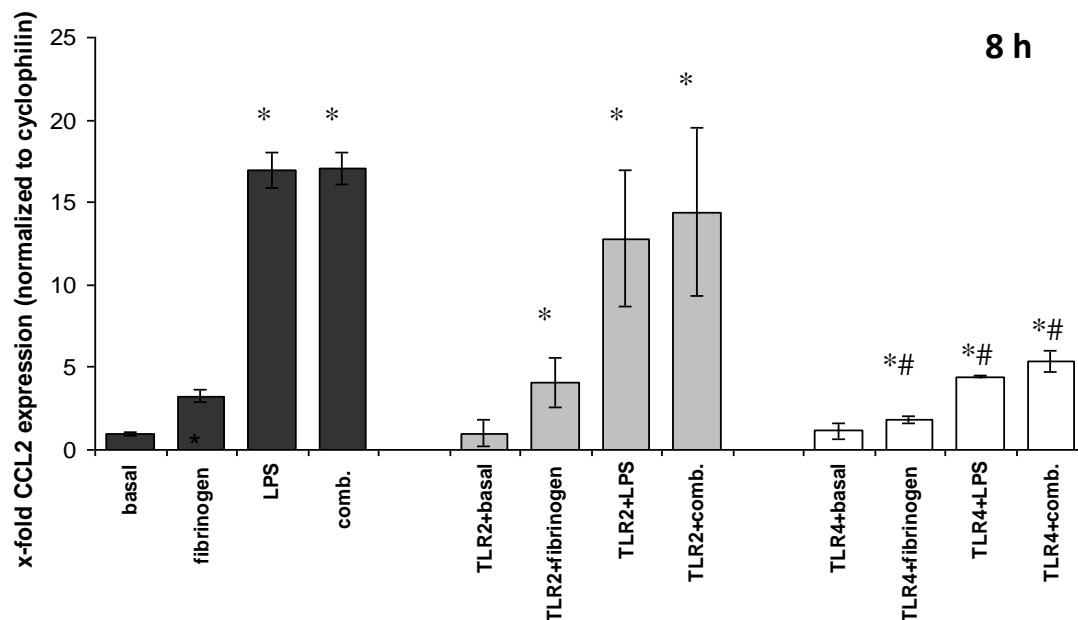


Abbildung 18: CCL2 mRNA-Expression nach separater und simultaner (comb.) exogener und endogener 8-stündiger Inkubation sowie TLR2- und TLR4- siRNA-Transfektion. Signifikante Unterschiede (* $p < 0,05$) zum Basalwert sowie signifikante Unterschiede (# $p < 0,05$) zur CCL2 Expression ohne TLR2- und TLR4-Gen-Knockdown sind gekennzeichnet

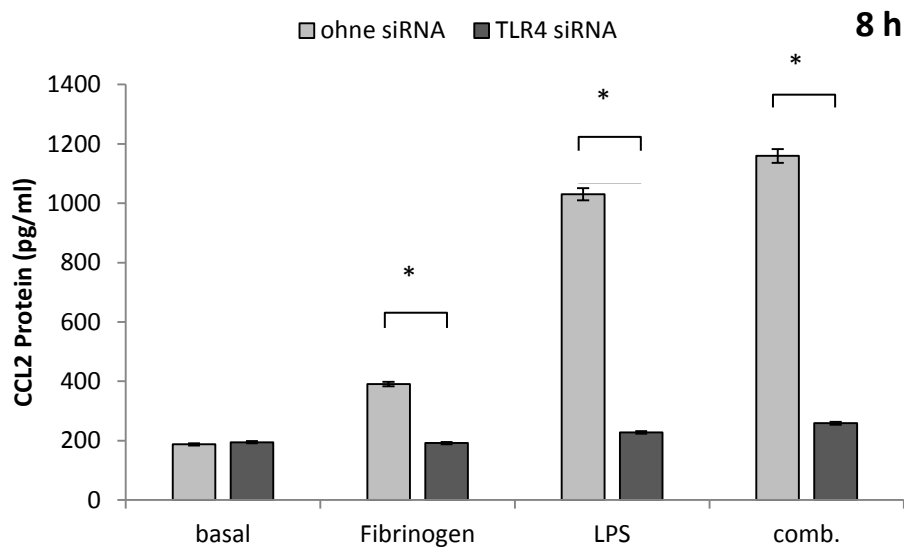


Abbildung 19: Vergleich der CCL2 Protein-Expression nach 8-stündiger Inkubation zwischen TLR4 siRNA-transfizierten und unbehandelten Zellen. Signifikante Reduktion (* $p < 0,05$) der CCL2 Protein-Expression ist gekennzeichnet

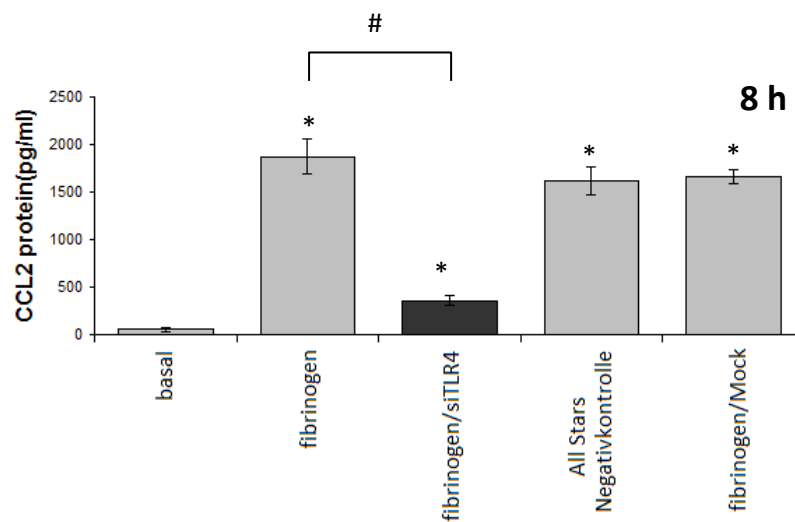


Abbildung 20: Auswirkung der TLR4-Transfektion auf die CCL2 Protein-Expression nach 8-stündiger Inkubation mit Fibrinogen. Signifikante Unterschiede zur basalen Expression (* $p < 0,05$) und signifikante Reduktion (# $p < 0,05$) der CCL2 Protein-Expression nach TLR4-spezifischer siRNA-Transfektion und Inkubation mit Fibrinogen sind gekennzeichnet

3.3 Analyse der mRNA- und Protein-Expression der WEHI-Zelllinie

3.3.1 Molekularbiologischer Nachweis der TLR4- und TNF α -Expression

Durch eine **Western Blot Analyse** konnte die Expression des **TLR4** sowie von **TNF α** für die WEHI-Zelllinie qualitativ **nachgewiesen** werden (Abb. 21).

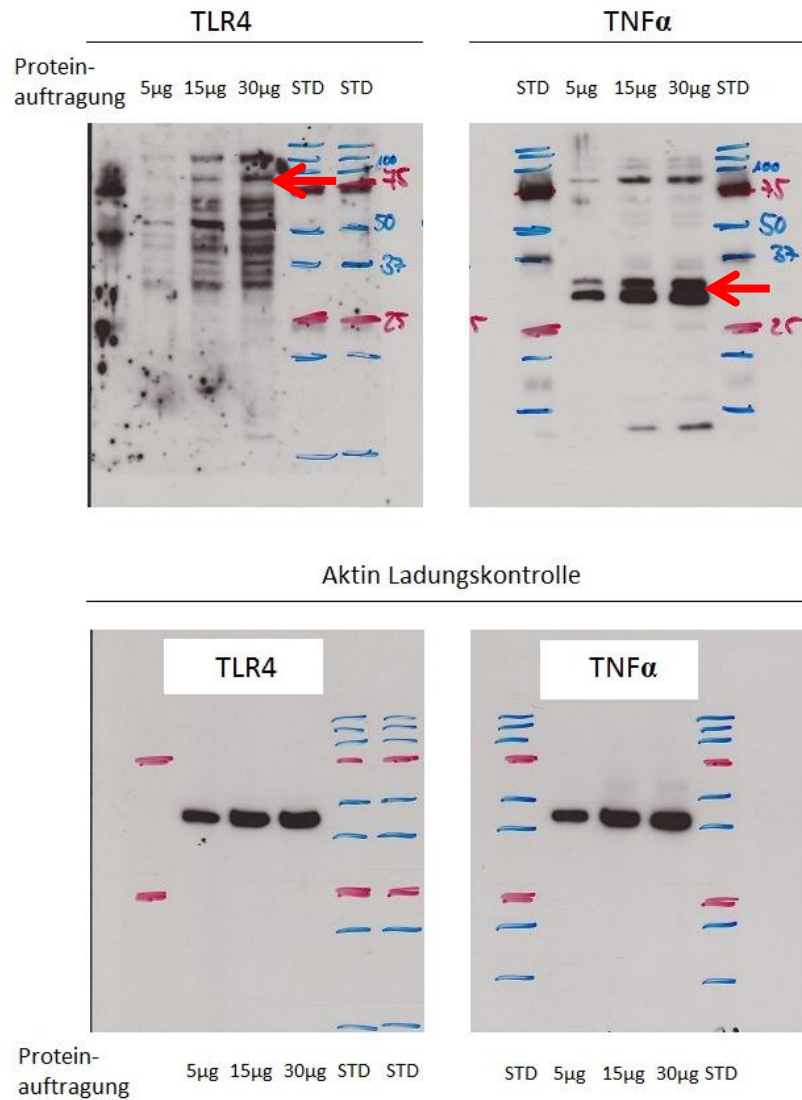


Abbildung 21: TLR4- und TNF α - Western Blot der nicht-stimulierten WEHI-Zelllinie. Markierung der proteinspezifischen Bande durch roten Pfeil, Aktinnachweis zur Ladungskontrolle

3.3.2 Chemokin mRNA-Expression in Abhängigkeit von Konzentration exogener und endogener Stimulanzen und Inkubationsdauer

In den Abbildung 22 ist die **CCL2 mRNA-Expression** in Abhängigkeit von **Inkubationsdauer und TLR-Ligandenkonzentration** dargestellt.

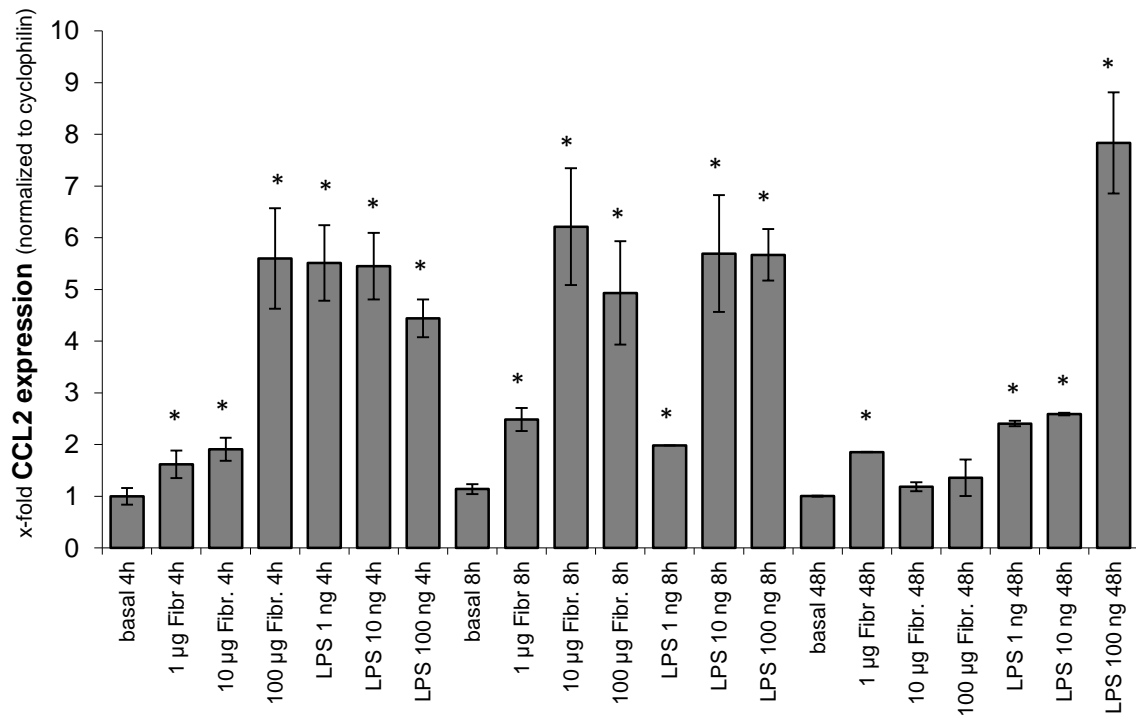


Abbildung 22: Vergleich der CCL2 mRNA-Expression nach separater Inkubation mit LPS und Fibrinogen (Fibr.) in unterschiedlichen Konzentrationen nach einer Inkubationsdauer von 4, 8 und 48 Stunden. Signifikante Unterschiede (* $p < 0,05$) zur basalen Expression sind gekennzeichnet

3.3.3 Proinflammatorische mRNA- und Protein-Expression nach separater und simultaner Inkubation mit exogenen und endogenen TLR-Liganden

In den Abbildungen 23 - 25 ist die aus separater und simultaner exogener und endogener TLR-Aktivierung resultierende mRNA- und Protein-Expression der WEHI-Zelllinie dargestellt.

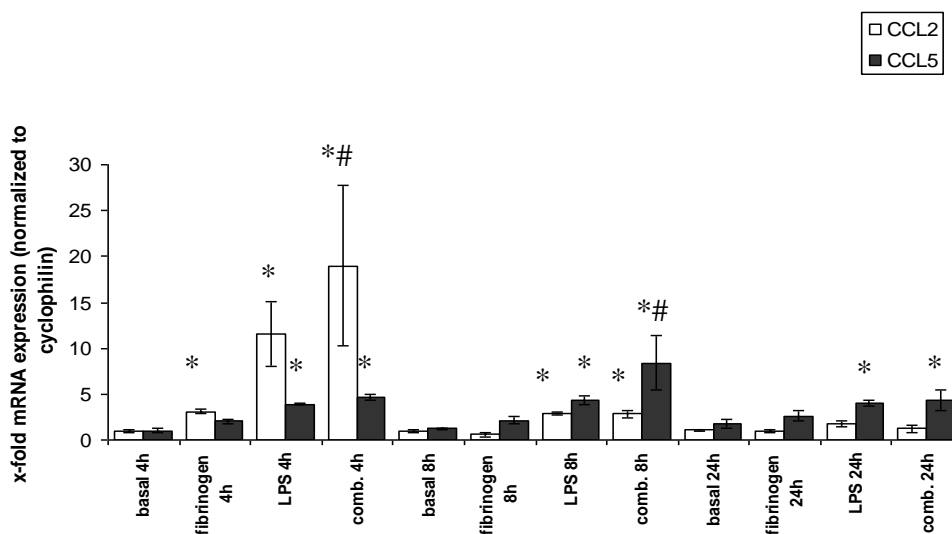


Abbildung 23: CCL2 und CCL5 mRNA-Expression nach separater und simultaner Inkubation mit LPS und Fibrinogen nach Inkubationsdauern von 4, 8 und 24 Stunden. Signifikante Unterschiede zur basalen Expression (* $p < 0,05$) und zur Expression nach separater Inkubation (# $p < 0,05$) sind gekennzeichnet

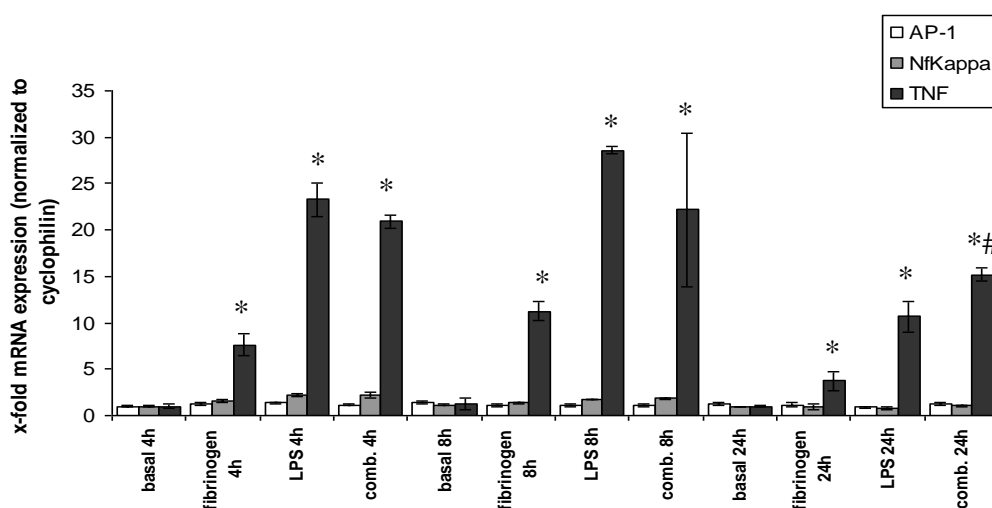


Abbildung 24: mRNA-Expression der Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF κ B sowie Expression von TNF α nach separater und simultaner Inkubation mit LPS und Fibrinogen nach Inkubationsdauern von 4, 8 und 24 Stunden. Signifikante Unterschiede zur basalen Expression (* $p < 0,05$) und zur Expression nach separater Inkubation (# $p < 0,05$) sind gekennzeichnet

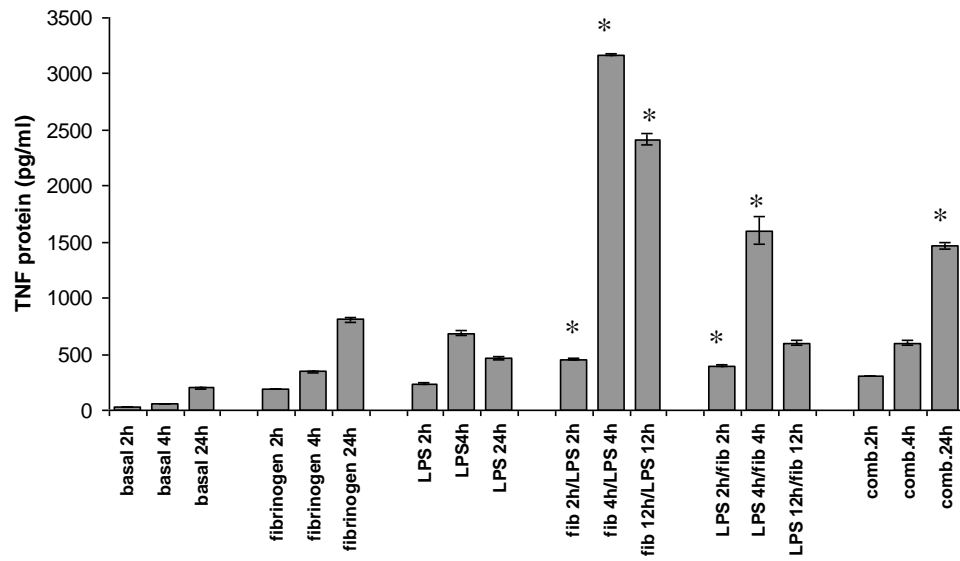


Abbildung 25: TNF α Protein-Expression nach separater, sequenzieller und simultaner (comb.) Inkubation mit LPS und Fibrinogen (fib) nach Inkubationsdauern von 2, 4, 12 und 24 Stunden. Signifikante Unterschiede zur Expression nach separater Inkubation (* $p < 0,05$) sind gekennzeichnet

4. Diskussion

4.1 Potenzierter proinflammatorischer Effekt nach simultaner exogener und endogener TLR-Aktivierung

Während bisherige Studien ausschließlich den inflammatorischen Effekt einer separaten exogenen oder separaten endogenen TLR-Aktivierung erforschten [81] [79], untersuchte diese Arbeit die Auswirkungen einer simultanen TLR-Stimulation durch eine Kombination exogener und endogener Liganden. Insbesondere anhand von TNF α und CCL2, die bedeutende Repräsentanten der proinflammatorischen Zytokin- bzw Chemokin-Familie darstellen, wurde der inflammatorische Effekt dieser TLR-Stimulation quantifiziert. Die *in vitro* Experimente dazu wurden mit einer podozytären, einer renales Sammelrohr (IMCD) und einer infiltrierende Makrophagen (WEHI) repräsentierenden Zelllinie durchgeführt.

Die Fähigkeit podozytärer Zellen, TLR zu exprimieren, wurde bereits von Banas *et al.* nachgewiesen [82]. Damit übereinstimmend konnte diese Arbeit die Expression von TLR1, TLR2, TLR4 sowie TLR6 in der untersuchten podozytären Zelllinie zeigen. Aus separater Inkubation mit exogenen Liganden resultierte eine verfünffachte TLR2 mRNA-Expression, die durch simultane Inkubation mit weiteren exogenen Liganden nochmals geringfügig gesteigert werden konnte. LPS erwies sich dabei als effektivster exogener TLR-Aktivator dieser podozytären Zellreihe. Im Gegensatz dazu wurde die TLR1-, TLR4- und TLR6-Expression durch die exogene TLR-Aktivierung nicht signifikant erhöht.

Die Podozyten reagierten mit einer über dreißigfachen CCL2 Chemokinexpression nach kombinierter Inkubation mit exogenen und endogenen TLR-Liganden. Das im zeitlichen Verlauf betrachtete inflammatorische Expressionsprofil der Podozyten lässt darauf schließen, dass die kombinierte im Vergleich zur separaten TLR-Aktivierung nicht nur eine stärkere sondern auch eine länger andauernde Inflammation bewirkt (Abb. 11). Die Analyse der der Zytokin- und Chemokin-Expression vorausgehenden Induktion nukleärer

Transkriptionsfaktoren zeigte eine Verdopplung der NF κ B mRNA-Expression sowohl nach separater als auch nach simultaner TLR-Aktivierung. Ein Effekt auf die Induktion von AP-1 konnte in diesem experimentellen Ansatz nicht nachgewiesen werden.

Hinsichtlich der gesehenen Chemokin mRNA-Expression nach separater exogener und endogener Inkubation zeigte die IMCD-Zelllinie eine den Podozyten ähnliche Kinetik mit einem maximalen Effekt nach vierstündiger und achtstündiger Inkubation und einer Reduktion der Expression nahezu auf das Ausgangsniveau nach 48 Stunden (Abb. 12, Abb. 16). Eine hohe LPS-Konzentration (100 ng/ml) scheint ein frühes Maximum aber post-maximal auch eine vorzeitige Reduktion der CCL2 mRNA-Expression auf den Ausgangswert zu bewirken. Die Quantifizierung der CCL2 Chemokin-Proteinexpression (Abb. 15) zeigt, dass dieses Maximum dem Maximum der mRNA-Synthese mit zeitlicher Verzögerung nachfolgt. Auch auf Proteinebene konnte der die Chemokinfreisetzung verstärkende Effekt einer simultanen Inkubation mit exogenen und endogenen TLR-Liganden bestätigt werden.

Auch in der WEHI-Zelllinie, die im Gegensatz zu Podozyten und IMCD-Zellen keinen ortsständigen, renalen Zelltyp sondern infiltrierende Makrophagen repräsentiert, führte die kombinierte exogene und endogene TLR-Aktivierung zu einer gesteigerten inflammatorischen Antwort. Am deutlichsten zeigte sich dieser Effekt mit einer fast zwanzigfach gesteigerten CCL2 mRNA-Expression nach vierstündiger Inkubation mit LPS und Fibrinogen, die alleinige Inkubation mit Fibrinogen resultierte in einer dreifachen, die alleinige Inkubation mit LPS in einer zwölffachen Expression. Auch für CCL5 konnte eine verstärkte Expression nach kombinierter Inkubation nachgewiesen werden. Sowohl die separat exogene also auch die exogen/endogen kombinierte Inkubation resultierten in einer über zwanzigfach gesteigerten TNF α mRNA-Expression der WEHI-Zelllinie nach 4 und 8 Stunden. Nach einer 24 Stunden dauernden Inkubation führte die kombinierte TLR-

Aktivierung zu einer fünfzehnfach, die allein exogene TLR-Aktivierung zu einer zehnfach gesteigerten TNF α mRNA-Expression. Wie bei der untersuchten podozytären und IMCD-Zelllinie ist die inflammatorische mRNA-Expression also zu Beginn der Inkubation maximal induziert, um zu späteren Zeitpunkten wieder ab zu fallen. Die Analyse der Proteinexpression bestätigt den potenzierenden Effekt der exogenen/endogenen Koinkubation der WEHI-Zellen. Insbesondere die endogen-exogen sequenzielle Inkubation (4 Stunden Fibrinogen + 4 Stunden LPS) führt zu einer hohen TNF α -Sekretion in den Überstand (Abb. 25).

Durch die Western Blot Analyse konnte mit einem zusätzlichen molekularbiologischen Nachweisverfahren die Expression von TLR4 und TNF α für die WEHI-Zelllinie nachgewiesen werden. Die Aktinkontrolle nach Stripping bestätigte die quantitativ gleich eingesetzte Proteinmenge der analysierten Proben.

Eine LPS-Kontamination des im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Fibrinogens konnte durch eine Polymyxin B- Koinkubation ausgeschlossen werden. Polymyxin B antagonisiert Lipid A und damit den endotoxisch aktiven Bestandteil von LPS. Die Polymyxin B-Koinkubation führte zu keiner signifikanten Reduktion der proinflammatorischen Zytokin-Expression nach Inkubation mit Fibrinogen, der Effekte von LPS aber wurde durch Polymyxin B signifikant supprimiert.

Durch diese Arbeit wurde erstmals für renale und renal infiltrierende Zelllinien nachgewiesen, dass die exogen/endogen kombinierte TLR-Aktivierung die proinflammatorische Zytokin- und Chemokin-Expression im Vergleich zu separat exogener oder endogener TLR-Aktivierung um ein Vielfaches gesteigert wird.

4.2 Reduktion der Zyto- und Chemokinexpression durch TLR2/4-spezifischen Gen-Knockdown

Durch Inkubationsexperimente mit TLR2- und TLR4- genspezifischem Knockdown konnte verifiziert werden, dass die proinflammatorische Chemokin-Expression nach exogener und endogener Inkubation überwiegend und über das TLR4-System erfolgt.

Das TLR4 mRNA-Expressionslevel konnte durch TLR4-spezifische siRNA-Transfektion auf 20% des Ausgangswertes reduziert werden, wohingegen der Einsatz einer nichtbindenden siRNA (AllStarNegativ) oder der alleinige Einsatz der Transfektreagenz (Mock) keinen signifikanten Effekt hatte. Nach Inkubation zeigten TLR4 siRNA-transfizierte IMCD-Zellen eine signifikant reduzierte CCL2 mRNA-Expression gegenüber nicht mit TLR4-spezifischer siRNA transfizierten Zellen. Die alleinige Verwendung der Transfektreagenz (Mock) oder andere Kontrollgruppen zeigten diesen Effekt nicht. Die CCL2 mRNA-Expression nach Vorbehandlung mit TLR4-spezifischer siRNA war im Vergleich zur CCL2 mRNA-Expression der basalen Kontrollgruppe noch anhaltend signifikant erhöht, allerdings in einem weitaus geringeren Niveau, wie nach Behandlung mit TLR2-spezifischer siRNA. Dies kann auf die nicht vollständige Suppression der TLR4-mRNA und damit der nachfolgenden Protein-Expression zurückgeführt werden. Auch durch Analyse der Proteinexpression nach TLR4 siRNA-Transfektion konnte die signifikante Reduktion der CCL2-Expression bestätigt werden. In Übereinstimmung mit der Literatur deutet die nach TLR2 und TLR4 Gen-Knockdown verbleibende CCL2-Expression (Abb. 18) darauf hin, dass der inflammatorische Effekt von Fibrinogen und LPS vor allem über TLR4 vermittelt wird. [24] [28]

4.3 Transplantationsmedizinische Bedeutung der Resultate

Nierentransplantierte Patienten erkranken signifikant häufiger an Harnwegsinfekten, dabei korreliert das Auftreten von Harnwegsinfekten signifikant mit der Häufigkeit von

Abstoßungsreaktionen sowie einer reduzierten Langzeitfunktion des Transplantats [83] [84]. Das TLR-System wurde kürzlich als bedeutende pathomechanische Komponente der renalen Transplantatabstoßung identifiziert. [80] [85]

Die in dieser Arbeit gewonnene Erkenntnis, dass die kombinierte exogene/endogene TLR-Aktivierung die inflammatorische Antwort renaler und infiltrierender Zelllinien um ein Vielfaches verstärkt, bietet eine mögliche immunpathologische Mit-Erklärung für das häufigere Auftreten von Abstoßungsreaktionen sowie die Verschlechterung der Langzeittransplantatfunktion bei Patienten, die an Harnwegsinfekten, insbesondere jedoch die an einer Transplantatpyelonephritis erkranken. Die klinische Koinzidenz von Nierentransplantation und Harnwegsinfekt geht dabei mit einer Freisetzung exogener und endogener TLR-Aktivatoren einher [86] [87]. Die durch kombinierte TLR-Stimulation massiv gesteigerte Ausschüttung proinflammatorischer Mediatoren führt zu zusätzlicher Expression von TLR sowie Infiltration von Makrophagen und Lymphozyten. Der inflammatorische Prozess wird dabei von sowohl durch renal ortsständige als auch infiltrierende Zellen exprimierte Zytokine und Chemokine verstärkt und aufrechterhalten. [77]

Die erkannte transplantationsmedizinische Bedeutung macht das TLR-System zu einem möglichen pharmakotherapeutischen Ziel. Im Rahmen der Lebertransplantation wurde gezeigt, dass eine Vorbehandlung des Spenders mit Methylprednisolon sowohl mit geringerer Expression von TNF α und CCL2 als auch verringertem Ausmaß des I/R Ereignisses und geringerer Inzidenz akuter Abstoßungsreaktionen einhergeht [88]. Die gezielte pharmakologische Blockade des TLR-Systems könnte im Vergleich zur Cortison-Therapie einen spezifischeren, nebenwirkungsärmeren und effektiven Ansatz zur Reduktion von I/R Schaden sowie Inflammation im Rahmen der Nierentransplantation darstellen und die Inzidenz akuter Abstoßungsreaktionen senken.

5. Zusammenfassung

Die angeborene und die adaptive Immunität bilden die beiden grundlegenden Mechanismen der menschlichen Immunabwehr. Sie umfassen verschiedene Komponenten, die der Unterscheidung zwischen körpereigenen und körperfremden Strukturen dienen. Ein wichtiges Element der angeborenen Immunität ist das TLR-System. Die TLR erkennen einerseits exogene molekulare Struktur motive, die spezifischer Bestandteil bakterieller, viraler oder parasitärer Pathogene sind. Andererseits erkennen die TLR endogene Substanzen, die z.B. im Rahmen gewebsschädigender Prozesse freigesetzt werden. Dazu zählt insbesondere der I/R-Schaden, der unvermeidbar im Zusammenhang mit Nierentransplantationen auftritt. Aktivierte TLR lösen eine intrazelluläre Signalkaskade aus, die die Expression eines proinflammatorischen Zytokin- und Chemokinprofils bewirkt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden eine podozytäre und eine IMCD-Zelllinie, die ortsständige renale Zellen, sowie eine WEHI-Zelllinie, die infiltrierende Makrophagen repräsentiert, separat und kombiniert mit exogenen und endogenen TLR-Liganden stimuliert. Nach der Inkubation wurde das Ausmaß der resultierenden Expression von $\text{TNF}\alpha$ und CCL2, Repräsentanten der proinflammatorischen Zytokine und Chemokine, analysiert. Dazu wurde einerseits die Expression von $\text{TNF}\alpha$ und CCL2 auf mRNA-Ebene mittels RT qPCR quantifiziert. Andererseits wurde die letztendlich der mRNA-Synthese nachfolgende Proteinexpression von $\text{TNF}\alpha$ und CCL2 mittels ELISA und Western Blot Analyse dargestellt. Für beide untersuchten renalen Zelllinien als auch für die infiltrierende Zelllinie konnte gezeigt werden, dass die kombinierte Inkubation mit exogen/endogenen TLR-Liganden im Vergleich zu einer separaten Inkubation mit exogenen oder endogenen

TLR-Liganden zu einer Vervielfachung der proinflammatorischen Zytokin- und Chemokinantwort führt. Durch Gen-Knockdown mittels TLR4-spezifischer siRNA konnte bestätigt werden, dass die aus kombinierter Inkubation erfolgende proinflammatorische Reaktion spezifisch über den TLR-Signalweg erfolgt.

Patienten, die nach Nierentransplantation an Harnwegsinfekten erkranken, sind häufiger von Abstoßungsreaktionen sowie auch einer Verschlechterung der Langzeittransplantatfunktion betroffen. Die Resultate dieser Arbeit könnten darauf hinweisen, dass ein simultan exogen und endogen aktiviertes TLR-System hierbei möglicherweise von Bedeutung sein kann. Die pharmakologische Blockade des TLR-Systems könnte dazu genutzt werden, I/R Schaden sowie Inflammation im Rahmen der Nierentransplantation zu reduzieren.

Literaturverzeichnis

1. Walter, A., *Qualitätssicherung der Dialysebehandlung in Deutschland*. Der Nephrologe, 2012: p. 1-4.
2. Frei, U. and H. Schober-Halstenberg, *Nierenersatztherapie in Deutschland*. Bericht über dialysebehandlung und nierentransplantation in Deutschland, 2004. **2005**: p. 1995-2004.
3. Frei, U. and H. Schober-Halstenberg, *Nierenersatztherapie in Deutschland. Bericht über Dialysebehandlung und Nierentransplantation in Deutschland 2005/2006*. Bericht der QuaSi-Niere. Qualitätssicherung in der Nierenersatztherapie GmbH, Berlin, 2006.
4. Wolfe, R.A., et al., *Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant*. New England Journal of Medicine, 1999. **341**(23): p. 1725-1730.
5. Massy, Z.A., et al., *Chronic renal allograft rejection: immunologic and nonimmunologic risk factors*. Kidney international, 1996. **49**(2): p. 518-524.
6. Mengel, M., et al., *Banff 2011 Meeting Report: New Concepts in Antibody-Mediated Rejection*. American Journal of Transplantation, 2012.
7. He, H., J.R. Stone, and D.L. Perkins, *Analysis of robust innate immune response after transplantation in the absence of adaptive immunity1*. Transplantation, 2002. **73**(6): p. 853-861.
8. Lemaitre, B., et al., *The Dorsoventral Regulatory Gene Cassette *spätzle*/Toll/cactus Controls the Potent Antifungal Response in Drosophila Adults*. Cell, 1996. **86**(6): p. 973-983.
9. De Arras, L., et al., *An evolutionarily conserved innate immunity protein interaction network*. Journal of Biological Chemistry, 2013. **288**(3): p. 1967-1978.
10. Kanzler, H., et al., *Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists*. Nat. Med. 13, 2007. 13(5): p. 552-559.
11. Kawai, T. and S. Akira, *Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity*. Immunity, 2011. **34**(5): p. 637-650.
12. Takeda, K. and S. Akira, *Toll-like receptors in innate immunity*. International immunology, 2005. **17**(1): p. 1-14.

13. Takeda, K. and S. Akira, *Toll-like receptors*. Current Protocols in Immunology, 2007: p. 14.12. 1-14.12. 13.
14. Takeuchi, O., et al., *Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins*. The Journal of Immunology, 2002. **169**(1): p. 10-14.
15. Vabulas, R.M., et al., *Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(33): p. 31332-31339.
16. Vabulas, R.M., et al., *HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway*. Science Signalling, 2002. **277**(17): p. 15107.
17. Asea, A., et al., *Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70. Role of Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4*. Science Signalling, 2002. **277**(17): p. 15028.
18. Tesar, B., et al., *The role of hyaluronan degradation products as innate alloimmune agonists*. American journal of transplantation, 2006. **6**(11): p. 2622-2635.
19. Barrenschee, M., D. Lex, and S. Uhlig, *Effects of the TLR2 agonists MALP-2 and Pam3Cys in isolated mouse lungs*. PloS one, 2010. **5**(11): p. e13889.
20. Werts, C., et al., *Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism*. Nature immunology, 2001. **2**(4): p. 346-352.
21. Sato, M., et al., *Direct binding of Toll-like receptor 2 to zymosan, and zymosan-induced NF- κ B activation and TNF- α secretion are down-regulated by lung collectin surfactant protein A*. The Journal of Immunology, 2003. **171**(1): p. 417-425.
22. Karikó, K., et al., *mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(13): p. 12542-12550.
23. Alexopoulou, L., et al., *Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-like receptor 3*. Nature, 2001. **413**(6857): p. 732-738.
24. Smiley, S.T., J.A. King, and W.W. Hancock, *Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll-like receptor 4*. The Journal of Immunology, 2001. **167**(5): p. 2887-2894.
25. Vogl, T., et al., *Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock*. Nature medicine, 2007. **13**(9): p. 1042-1049.

26. Guillot, L., et al., *Cutting edge: the immunostimulatory activity of the lung surfactant protein-A involves Toll-like receptor 4*. The Journal of Immunology, 2002. **168**(12): p. 5989-5992.
27. Takeuchi, O., et al., *TLR6: A novel member of an expanding toll-like receptor family*. Gene, 1999. **231**(1): p. 59-65.
28. Hoshino, K., et al., *Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product*. The Journal of Immunology, 1999. **162**(7): p. 3749-3752.
29. Means, T.K., et al., *The Toll-like receptor 5 stimulus bacterial flagellin induces maturation and chemokine production in human dendritic cells*. The Journal of Immunology, 2003. **170**(10): p. 5165-5175.
30. Ozinsky, A., et al., *The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2000. **97**(25): p. 13766-13771.
31. Sioud, M., *Innate sensing of self and non-self RNAs by Toll-like receptors*. Trends in molecular medicine, 2006. **12**(4): p. 167-176.
32. Lee, J., et al., *Molecular basis for the immunostimulatory activity of guanine nucleoside analogs: activation of Toll-like receptor 7*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003. **100**(11): p. 6646-6651.
33. Hattermann, K., et al., *The Toll-like receptor 7/8-ligand resiquimod (R-848) primes human neutrophils for leukotriene B4, prostaglandin E2 and platelet-activating factor biosynthesis*. The FASEB Journal, 2007. **21**(7): p. 1575-1585.
34. Hemmi, H. and S. Akira, *A novel Toll-like receptor that recognizes bacterial DNA*. Microbial DNA and Host Immunity, 2002: p. 39-47.
35. Anders, H.-J., et al., *Bacterial CpG-DNA aggravates immune complex glomerulonephritis: role of TLR9-mediated expression of chemokines and chemokine receptors*. Journal of the American Society of Nephrology, 2003. **14**(2): p. 317-326.
36. Yamamoto, M., et al., *TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway*. Nature immunology, 2003. **4**(11): p. 1144-1150.
37. Yamamoto, M., et al., *Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4*. Nature, 2002. **420**(6913): p. 324-329.
38. Yamamoto, M., et al., *Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway*. Science Signalling, 2003. **301**(5633): p. 640.

39. Medzhitov, R., et al., *MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways*. Molecular cell, 1998. **2**(2): p. 253-258.
40. Kawai, T. and S. Akira, *TLR signaling*. Cell Death & Differentiation, 2006. **13**(5): p. 816-825.
41. Kawai, T., et al., *Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes*. The Journal of Immunology, 2001. **167**(10): p. 5887-5894.
42. Häcker, H., et al., *Immune Cell Activation by Bacterial CpG-DNA through Myeloid Differentiation Marker 88 and Tumor Necrosis Factor Receptor–Associated Factor (Traf) 6*. The Journal of experimental medicine, 2000. **192**(4): p. 595-600.
43. Schnare, M., et al., *Recognition of CpG DNA is mediated by signaling pathways dependent on the adaptor protein MyD88*. Current biology, 2000. **10**(18): p. 1139-1142.
44. Kawai, T., et al., *Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin*. Immunity, 1999. **11**(1): p. 115-122.
45. Hoebe, K., et al., *Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling*. Nature, 2003. **424**(6950): p. 743-748.
46. Oshiumi, H., et al., *TIR-containing adapter molecule (TICAM)-2, a bridging adapter recruiting to Toll-like receptor 4 TICAM-1 that induces interferon- β* . Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(50): p. 49751-49762.
47. Day, N., et al., *Interleukin receptor–associated kinase (IRAK-4) deficiency associated with bacterial infections and failure to sustain antibody responses*. The Journal of pediatrics, 2004. **144**(4): p. 524-526.
48. Chapel, H., et al., *Shigella sonnei Meningitis Due to Interleukin-1 Receptor–Associated Kinase–4 Deficiency: First Association with a Primary Immune Deficiency*. Clinical infectious diseases, 2005. **40**(9): p. 1227-1231.
49. Hawn, T.R., et al., *Toll-like receptor polymorphisms and susceptibility to urinary tract infections in adult women*. PLoS One, 2009. **4**(6): p. e5990.
50. Zhang, D., et al., *A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria*. Science Signalling, 2004. **303**(5663): p. 1522.
51. Lövgren, T., et al., *Induction of interferon- α by immune complexes or liposomes containing systemic lupus erythematosus autoantigen–and Sjögren's syndrome autoantigen–associated RNA*. Arthritis & Rheumatism, 2006. **54**(6): p. 1917-1927.

52. Vollmer, J., et al., *Immune stimulation mediated by autoantigen binding sites within small nuclear RNAs involves Toll-like receptors 7 and 8*. The Journal of experimental medicine, 2005. **202**(11): p. 1575-1585.
53. Szeimies, R.M., et al., *A phase II dose-ranging study of topical resiquimod to treat actinic keratosis*. British Journal of Dermatology, 2008. **159**(1): p. 205-210.
54. Opal, S.M., et al., *Effect of Eritoran, an Antagonist of MD2-TLR4, on Mortality in Patients With Severe Sepsis*The ACCESS Randomized TrialEritoran for the Treatment of Severe Sepsis. JAMA, 2013. **309**(11): p. 1154-1162.
55. Tong, N.K.C., et al., *Immunogenicity and safety of an adjuvanted hepatitis B vaccine in pre-hemodialysis and hemodialysis patients*. Kidney international, 2005. **68**(5): p. 2298-2303.
56. Koo, D.D., et al., *Ischemia/reperfusion injury in human kidney transplantation: an immunohistochemical analysis of changes after reperfusion*. The American journal of pathology, 1998. **153**(2): p. 557-566.
57. Grace, P., *Ischaemia-reperfusion injury*. British Journal of Surgery, 2005. **81**(5): p. 637-647.
58. Harriman, J., et al., *Endoplasmic reticulum Ca (2+) signaling and calpains mediate renal cell death*. Cell death and differentiation, 2002. **9**(7): p. 734.
59. Guan, Z., et al., *Renal endothelial dysfunction and impaired autoregulation after ischemia-reperfusion injury result from excess nitric oxide*. American Journal of Physiology-Renal Physiology, 2006. **291**(3): p. F619-F628.
60. Weight, S., P. Furness, and M. Nicholson, *Nitric oxide generation is increased in experimental renal warm ischaemia-reperfusion injury*. British journal of surgery, 2003. **85**(12): p. 1663-1668.
61. Chatterjee, P.K., et al., *Inhibition of inducible nitric oxide synthase reduces renal ischemia/reperfusion injury*. Kidney international, 2002. **61**(3): p. 862-871.
62. Wilhelm, S.M., et al., *Endothelin up-regulation and localization following renal ischemia and reperfusion*. Kidney international, 1999. **55**(3): p. 1011-1018.
63. Herrero, I., et al., *Prevention of cold ischaemia-reperfusion injury by an endothelin receptor antagonist in experimental renal transplantation*. Nephrology Dialysis Transplantation, 1999. **14**(4): p. 872-880.
64. Jerkić, M., et al., *Relative roles of endothelin-1 and angiotensin II in experimental post-ischaemic acute renal failure*. Nephrology Dialysis Transplantation, 2004. **19**(1): p. 83-94.

65. Leemreis, J.R., et al., *Digital image analysis of cytoskeletal F-actin disintegration in renal microvascular endothelium following ischemia/reperfusion*. Cytometry Part A, 2006. **69**(9): p. 973-978.
66. Genesca, M., A. Sola, and G. Hotter, *Actin cytoskeleton derangement induces apoptosis in renal ischemia/reperfusion*. Apoptosis, 2006. **11**(4): p. 563-571.
67. Kwon, O., et al., *Backleak, tight junctions, and cell-cell adhesion in postischemic injury to the renal allograft*. Journal of Clinical Investigation, 1998. **101**(10): p. 2054.
68. Sutton, T.A., et al., *Injury of the renal microvascular endothelium alters barrier function after ischemia*. American Journal of Physiology-Renal Physiology, 2003. **285**(2): p. F191-F198.
69. Kelly, K., et al., *Antibody to intercellular adhesion molecule 1 protects the kidney against ischemic injury*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1994. **91**(2): p. 812-816.
70. Takada, M., et al., *The cytokine-adhesion molecule cascade in ischemia/reperfusion injury of the rat kidney. Inhibition by a soluble P-selectin ligand*. Journal of Clinical Investigation, 1997. **99**(11): p. 2682.
71. Linas, S.L., et al., *Ischemia increases neutrophil retention and worsens acute renal failure: role of oxygen metabolites and ICAM 1*. Kidney international, 1995. **48**(5): p. 1584-1591.
72. Ricklin, D., et al., *Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis*. Nature immunology, 2010. **11**(9): p. 785-797.
73. Peng, Q., et al., *C3a and C5a Promote Renal Ischemia-Reperfusion Injury*. Journal of the American Society of Nephrology, 2012. **23**(9): p. 1474-1485.
74. Turnberg, D., et al., *CD59a deficiency exacerbates ischemia-reperfusion injury in mice*. The American journal of pathology, 2004. **165**(3): p. 825-832.
75. de Vries, B., et al., *Complement factor C5a mediates renal ischemia-reperfusion injury independent from neutrophils*. The Journal of Immunology, 2003. **170**(7): p. 3883-3889.
76. Anders, H.-J., B. Banas, and D. Schlöndorff, *Signaling danger: toll-like receptors and their potential roles in kidney disease*. Journal of the American Society of Nephrology, 2004. **15**(4): p. 854-867.
77. Wolfs, T.G., et al., *In vivo expression of Toll-like receptor 2 and 4 by renal epithelial cells: IFN- γ and TNF- α mediated up-regulation during inflammation*. The Journal of Immunology, 2002. **168**(3): p. 1286-1293.

78. Krüger, B., et al., *Donor Toll-like receptor 4 contributes to ischemia and reperfusion injury following human kidney transplantation*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009. **106**(9): p. 3390-3395.
79. Wu, H., et al., *TLR4 activation mediates kidney ischemia/reperfusion injury*. Journal of Clinical Investigation, 2007. **117**(10): p. 2847.
80. Hoffmann, U., et al., *Impact of Toll-like receptor 2 expression in renal allograft rejection*. Nephrology Dialysis Transplantation, 2011. **26**(3): p. 1080-1087.
81. Vandewalle, A., *Toll-like receptors and renal bacterial infections*. Chang Gung Med J, 2008. **31**(6): p. 525-537.
82. Banas, M.C., et al., *TLR4 links podocytes with the innate immune system to mediate glomerular injury*. Journal of the American Society of Nephrology, 2008. **19**(4): p. 704-713.
83. Muller, V., et al., *Do urinary tract infections trigger chronic kidney transplant rejection in man?* The Journal of urology, 1998. **159**(6): p. 1826-1829.
84. John, U. and M.J. Kemper, *Urinary tract infections in children after renal transplantation*. Pediatric Nephrology, 2009. **24**(6): p. 1129-1136.
85. Kruger, B., et al., *A comprehensive genotype-phenotype interaction of different Toll-like receptor variations in a renal transplant cohort*. Clinical Science, 2010. **119**: p. 535-544.
86. Svanborg, C., et al., *Toll-like receptor signaling and chemokine receptor expression influence the severity of urinary tract infection*. Journal of Infectious Diseases, 2001. **183**(Supplement 1): p. S61-S65.
87. Pulskens, W.P., et al., *Toll-like receptor-4 coordinates the innate immune response of the kidney to renal ischemia/reperfusion injury*. PLoS One, 2008. **3**(10): p. e3596.
88. Ulrich, F., K. Kotsch, and J. Pratschke, *Methylprednisolone Therapy in Deceased Donors Reduces Inflammation in the Donor Liver and Improves Outcome After Liver Transplantation*. Annals of Surgery, 2009. **250**(3): p. 503.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktur und Signalweg der Toll-like-Rezeptoren.....	7
Abbildung 2: Transplantatschädigende Effekte des I/R-Ereignis.....	13
Abbildung 3: RT qPCR Protokoll.....	40
Abbildung 4: Schematische Darstellung ELISA	42
Abbildung 5: Schematische Darstellung Western Blot	43
Abbildung 6: Vergleich der TLR2- und TLR4-mRNA-Expression - basal und nach separater Inkubation mit den exogenen TLR-Liganden LPS und Pam3 nach einer Inkubationsdauer von 8 sowie 24 Stunden	49
Abbildung 7: Vergleich der TLR2- und TLR4-mRNA-Expression - basal und nach simultaner Inkubation mit den exogenen TLR-Liganden LPS, PAM3 und Zymosan bei einer Inkubationsdauer von 8 sowie 24 Stunden	49
Abbildung 8: m-RNA-Expression der proinflammatorischen Transkriptionsfaktoren AP-1 und NFκB nach separater und simultaner Inkubation mit exogenen und endogenen TLR-Aktivatoren nach einer Inkubationsdauer von 8 Stunden .	50
Abbildung 9: m-RNA-Expression der proinflammatorischen Transkriptionsfaktoren AP-1 und NFκB nach separater und simultaner Inkubation mit exogenen und endogenen TLR-Aktivatoren nach einer Inkubationsdauer von 24 Stunden.....	50
Abbildung 10: TNFα mRNA-Expression nach Inkubation mit LPS und PAM3 nach einer Inkubationsdauer von 8 und 24 Stunden	51
Abbildung 11: CCL2 mRNA-Expression nach separater und simultaner Inkubation mit LPS, MALP2 und Fibrinogen nach einer Inkubationsdauer von 8 und 24 Stunden.....	51
Abbildung 12: Vergleich der CCL2 mRNA-Expression nach separater Inkubation mit LPS und Fibrinogen in unterschiedlichen Konzentrationen nach einer Inkubationsdauer von 4, 8 und 48 Stunden.	52
Abbildung 13: CCL2 Protein-Expression nach 8-stündiger Inkubation mit Fibrinogen.....	52
Abbildung 14: CCL2 mRNA-Expression nach separater und simultaner Inkubation mit LPS und Fibrinogen nach einer Inkubationsdauer von 4, 8 und 24 Stunden.....	53

Abbildung 15: CCL2 Protein-Expression nach separater, sequenzieller und simultaner (comb.) Inkubation mit LPS und Fibrinogen nach Inkubationsdauern von 2, 4, 12 und 24 Stunden.....	54
Abbildung 16: mRNA-Expression der Transkriptionsfaktoren AP-1 und NFκB sowie von TNFα nach separater und simultaner Inkubation nach einer Inkubationsdauer von 4, 8 und 24 Stunden.....	54
Abbildung 17: TLR4 mRNA-Expression nach Transfektion mit TLR4-spezifischer siRNA sowie Mock-Reagenz und All Stars Negativkontrolle.....	55
Abbildung 18: CCL2 mRNA-Expression nach separater und simultaner exogener und endogener 8-stündiger Inkubation sowie TLR2- und TLR4- siRNA-Transfektion	55
Abbildung 19: Vergleich der CCL2 Protein-Expression nach 8-stündiger Inkubation zwischen TLR4 siRNA-transfizierten und unbehandelten Zellen	56
Abbildung 20: Auswirkung der TLR4-Transfektion auf die CCL2 Protein-Expression nach 8-stündiger Inkubation mit Fibrinogen.....	56
Abbildung 21: TLR4- und TNFα- Western Blot der nicht-stimulierten WEHI-Zelllinie. Markierung der proteinspezifischen Bande durch roten Pfeil, Aktinnachweis zur Ladungskontrolle.....	57
Abbildung 22: Vergleich der CCL2 mRNA-Expression nach separater Inkubation mit LPS und Fibrinogen in unterschiedlichen Konzentrationen nach einer Inkubationsdauer von 4, 8 und 48 Stunden.....	58
Abbildung 23: CCL2 und CCL5 mRNA-Expression nach separater und simultaner Inkubation mit LPS und Fibrinogen nach Inkubationsdauern von 4, 8 und 24 Stunden.....	59
Abbildung 24: mRNA-Expression der Transkriptionsfaktoren AP-1 und NFκB sowie Expression von TNFα nach separater und simultaner Inkubation mit LPS und Fibrinogen nach Inkubationsdauern von 4, 8 und 24 Stunden.....	59
Abbildung 25: TNFα Protein-Expression nach separater, sequenzieller und simultaner Inkubation mit LPS und Fibrinogen nach Inkubationsdauern von 2, 4, 12 und 24 Stunden.....	60

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Spezifität exogener und endogener TLR-Liganden.....	4
Tabelle 2: Inkubationsmuster der Podozyten-Zelllinie.....	31
Tabelle 3: Inkubationsmuster der IMCD-Zelllinie	33
Tabelle 4: Inkubationsmuster der WEHI-Zelllinie	35
Tabelle 5: Primer.....	39
Tabelle 6: Gelauftragung Western Blot	45
Tabelle 7: Antikörper Western Blot.....	46

Abkürzungsverzeichnis

Ak	Antikörper
AP-1	Aktivator Protein 1
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serum Albumin
CCL2	Chemokin (C-C Motiv) Ligand 2
cDNA	komplementäre DNA
CXCL2	Chemokin (C-X-C Motiv) Ligand 2
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
HEPES	Hydroxyethylpiperazinylethansulfonsäure
HRP	Meerrettichperoxidase
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
HCl	Salzsäure
HSP	<i>Heat Shock Protein</i>
IFN β	Interferon β
I/R	Ischämie/Reperfusion
IRF3	<i>interferon regulatory transcription factor 3</i>

IKK	I κ B-Kinase-Komplex
IKK γ	I κ B-Kinase-Komplex γ
IRAK4	IL-1R assoziierte Kinase 4
IRF3	<i>interferon regulatory transcription factor 3</i>
LRR	<i>Leucine-rich Repeat</i>
MAC	Membran-attackierender Komplex
MAPKK	mitogen-aktivierte Protein Kinase Kinase
M-MLV RT	<i>Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response gene (88)</i>
NaCl	Kochsalz
NF κ B	<i>nuclear factor kappa B</i>
NO	Nitritoxid
PAMP	<i>Pathogen Associated Molecular Pattern</i>
PIC	Protease Inhibitor Cocktail
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
Ripa	Radioimmunoprecipitation assay
RT qPCR	Echtzeit-quantitative Polymerasekettenreaktion
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SARM	sterile alpha- and armadillo-motif-containing protein

SDS	Sodium-Dodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
siRNA	<i>short interfering RNA</i>
TAB1-3	TAK1-bindendes-Protein 1-3
TAK1	<i>transforming-growth-factor-β-aktivierte Kinase 1</i>
TBS	TRIS-buffered saline
TLR	Toll-like-Rezeptor
TIRAP	<i>toll-interleukin 1 receptor domain containing adaptor protein</i>
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TRAF6	TNF-Rezeptor-assoziierter Faktor 6
TRAM	<i>TRIF-related adaptor molecule</i>
TRIF	<i>TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β</i>
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Banas und meinem Betreuer Herrn Dr. med. Bergler, die mich mit exzellenter wissenschaftlicher und fachlicher Unterstützung während der Durchführung dieser Arbeit begleitet haben.

Dem ärztlichen Direktor der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin II, Herrn Prof. Dr. med. Riegger, danke ich herzlich für die Möglichkeit, die Arbeit an seinem Institut durchführen zu dürfen.

Ich danke der nephrologischen Arbeitsgruppe, insbesondere Frau Alexandra Wilhelm und Frau Stefanie Ellmann für die hilfreiche praktische Unterstützung und die gute Arbeitsatmosphäre.

Erklärung

Die Dissertation wurde von Herrn Prof. Dr. med. B. Banas und Herrn Dr. med. T. Bergler angeregt und überwacht.

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Lebenslauf**1. Persönliche Angaben**

Name	Felix Bourier
Geburtsdatum	04.12.1985
Geburtsort	Regensburg

2. Schulbildung

1996 - 2005	Albrecht-Altendorfer-Gymnasium Regensburg
-------------	---

3. Wehrdienst

2005 – 2006	Sanitäter im 6./ Sanitätsregiment Feldkirchen
-------------	---

4. Medizinstudium

10/2006	Beginn Studium der Humanmedizin an Universität Regensburg
09/2008	1. Ärztliche Prüfung
12/2012	2. Ärztliche Prüfung

5. Stipendien

seit 10/2006	Stipendiat der Bayerischen Begabtenförderung
seit 09/2007	Stipendiat der Studienstiftung des deutschen Volkes