

Aus dem Zentrum für Molekulare Medizin der Universität zu Köln
und der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin II der Universität zu Köln
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med Th. Benzing

Die Rolle des podozytären MyD88-abhängigen Toll-like Rezeptorsignalweges in der Glomerulonephritis

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Thomas Henning Schömig
aus Würzburg

promoviert am 07. April 2025

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln
2025

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink

1. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. med. P. Brinkkötter
2. Gutachter: Professor Dr. med. Dr. nat. med. M. A. Alejandre Alcázar

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich keine Unterstützungsleistungen erhalten.

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden und in meiner Erst-Autorenschaft ¹²⁶ publizierten Experimente sind nach entsprechender Anleitung durch Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Sebastian Brähler und Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Paul Brinkkötter durchgeführt worden.

Explizit unterstützt wurde ich gemäß der Publikation bei den folgenden Experimenten bzw. Auswertungen: die Auswertung der bulkRNA-Sequenzierungsdaten sind von mir mit Unterstützung durch Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Sebastian Brähler, Herrn Dr. med. Paul Diefenhardt und Herrn Dr. Giuliano Crispantu durchgeführt. Die STED-mikroskopischen Aufnahmen wurden technisch durch Herrn Dr. David Unnersjö-Jess angefertigt, die Auswertung der Aufnahmen erfolgte durch mich. Ebenfalls erfolgte die Behandlung und Euthanasie der Versuchstiere durch die im entsprechenden Tierversuchsantrag aufgeführten Personen, die entnommenen Proben wurden nach entsprechender Anleitung durch mich verwertet.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 20.11.2024

Unterschrift:

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt:

Meinem Doktorvater, Herrn Univ.-Prof. Dr. Paul Brinkkötter, für die großartige Unterstützung und die Möglichkeit, in seiner AG promovieren zu dürfen mit den vielfältigen wissenschaftlichen Freiräumen, die mir dabei gewährt wurden. Zudem danke ich Herrn Univ.-Prof. Dr. Thomas Benzing, dass ich diese Arbeit in den Räumlichkeiten des ZMMK und im „Nephrolab“ durchführen durfte.

Insbesondere Herrn Priv.-Doz. Dr. Sebastian Brähler, der mir mit außergewöhnlichem Engagement und auch viel Geduld beigebracht hat, was molekularbiologische Forschung ist, von den Grundlagen bis hin zu komplexen Fragestellungen. Hierbei stand er mir mit seinem beeindruckenden immunologischen Wissen stets zur Seite und war trotz vielfältiger Verpflichtungen jederzeit für Fragen und Diskussionen erreichbar und wurde über die Zeit für mich mehr als ein Betreuer.

Der gesamten AG Brinkkötter/Brähler für die sowohl wissenschaftlich, aber insbesondere auch zwischenmenschlich unvergessliche Zeit im ZMMK. Hierunter möchte ich explizit auch Herrn. Dr. Paul Diefenhardt danken, der mich in den späteren Zügen im Laboralltag und bei der Projektumsetzung viel unterstützt hat.

Zuletzt möchte ich mich bei allen Koautoren der Publikation bedanken, ohne die eine Realisierung des Projekts nicht möglich gewesen wäre.

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	6
1. ZUSAMMENFASSUNG	8
2. EINLEITUNG	10
2.1 Chronische Nierenerkrankung	10
2.1.1. Klinische Relevanz	10
2.1.2. Physiologie der Niere	11
2.1.3. Glomerulärer Filtrationsapparat	12
2.1.4. Podozyten	13
2.2 Glomerulonephritis	14
2.2.1. Immunkomplex-vermittelte GN	15
2.2.1.1 Lupusnephritis	15
2.2.1.2 IgA Nephropathie	16
2.2.1.3 Infekt-assoziierte GN	16
2.2.2. ANCA-assoziierte GN	17
2.2.3. Anti-GBM GN	17
2.2.4. Monoklonale Ig GN	17
2.2.5. C3-assoziierte GN	18
2.2.6. Therapie der Glomerulonephritis	18
2.3 Immunsystem	18
2.3.1. Angeborenes Immunsystem	19
2.3.2. Toll-Like-Rezeptorsignalweg	19
2.3.3. NF- κ B-Signalweg	21
2.3.4. Typ-I-Interferon vermittelter Signalweg	22
2.3.5. Adaptives Immunsystem	23
2.3.6. Reaktion der Podozyten auf inflammatorische Stimuli	24
2.4 Glomeruläre Forschung in der renalen Immunologie	25
2.4.1. Mausmodell der Glomerulonephritis	25
2.4.2. Präparation glomerulärer Zellen	26
2.4.3. BulkRNA Sequenzierung	27
2.5 Fragestellung und Ziel der Arbeit	27
3. PUBLIKATION	30

4.	DISKUSSION	47
4.1	Diskussion der Ergebnisse	47
4.1.1.	Anpassungsmechanismen der Podozyten auf das entzündliche Milieu im Rahmen einer experimentellen Glomerulonephritis	47
4.1.2.	Einfluss des podozytenspezifischen Knockout des zentralen Adaptorproteins MYD88 auf den Krankheitsverlauf der experimentellen Glomerulonephritis	50
4.1.3.	Kompensationsmechanismen der Podozyten auf den Mangel an MYD88-abhängigen Signalwegen	51
4.1.4.	Translation der Ergebnisse auf die humane Glomerulonephritis	52
4.2	Limitationen	53
4.3	Schlussfolgerung	55
5.	LITERATURVERZEICHNIS	57
6.	ANHANG	68
6.1	Abbildungsverzeichnis	68
6.2	Koautorenschaft	68

Abkürzungsverzeichnis

AAV	ANCA-assoziierte Vaskulitis
ANCA	Anti-neutrophil
anti-GBM-GN	Anti-glomeruläre Basalmembran-Glomerulonephritis
APC	Antigen präsentierende Zelle (antigen presenting cell)
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid
cGAS	cyclic GMP-AMP synthase
CKD	Chronische Niereninsuffizienz (chronic kidney disease)
CXCL	chemokine (C-X-C motif) ligand
DAMP	Damage-associated molecular patterns
EGPA	Eosinophile granulomatöse mit Polyangiitis
ESRD	Terminales Nierenversagen (End-stage renal disease)
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FSGS	Fokal-segmentale Glomerulosklerose
GBM	Glomeruläre Basalmembran
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GN	Glomerulonephritis
GPA	Granulomatose mit Polyangiitis
IFN	Interferon
IFN-I	Typ-I Interferon
Ig	Immunglobulin
IKK	I κ B-Kinase
IRF3	Interferon regulatory factor 3
ISG	Interferon-stimulierte Gene
I κ B	Inhibitor von κ B
KO	Knock-out
LN	Lupusnephritis
MHC	major histocompatibility complex
MPA	Mikroskopische Polyangiitis
MyD88	Myeloid differentiation primary response 88
Myd88 ^{pk0}	Podozytenspezifischer Knockout des Myd88-Gens
NEMO	NF- κ B essential modulator
NF- κ B	Nuclear factor- κ B
NTN	Nephrotoxische Nephritis
NTS	Nephrotoxisches Serum

PAMP	Pathogen-associated molecular patterns
PCA	Principal Component Analysis
pKO	Podozytenspezifischer Knockout
RAC1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RNA	Ribonucleic acid
SLE	Systemischer Lupus erythematosus
SM	Schlitzmembran
STED	Stimulated emission depletion-Mikroskopie
STING	Stimulator von Interferongen
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha

1. Zusammenfassung

Podozyten sind hochspezialisierte, enddifferenzierte Zellen, die eine entscheidende Rolle an Aufbau und Funktion des glomerulären Filtrationsapparates tragen. Ihre Schädigung oder der Verlust führt zu einer Proteinurie und langfristig zur Entwicklung eines Nierenversagens. Bei der Glomerulonephritis (GN) sind Podozyten durch Zytokine und die Infiltration von Immunzellen einem entzündlichen Umfeld ausgesetzt.

In Vorarbeiten durch Brähler et al. wurde gezeigt, dass die podozytenspezifische Blockade des NF- κ B-Signalwegs den Verlauf einer experimentellen GN im Mausmodell abmildern und die Sekretion proinflammatorischer Zytokine reduzieren kann. Dem NF- κ B-Signalweg vorgeschaltet sind die Toll-like Rezeptoren (TLR), welche in Immunzellen und Gewebszellen zur Erkennung von schadens- und pathogenassoziierten Mustern in der Zellmembran liegen. Die Signalübermittlung erfolgt über das Adaptorprotein MYD88 zu mehreren proinflammatorischen Signalwegen, einschließlich des NF- κ B-Signalweg.

In dieser Promotionsarbeit wurde die Rolle des MYD88-abhängigen TLR-Signalweges in Podozyten untersucht. Dafür wurde das Modell der nephrotoxischen Nephritis verwendet, zunächst um eine Transkriptomanalyse von isolierten Podozyten vor und nach Induktion der GN durchzuführen. Diese ergab eine deutliche Regulation von Genen, die mit dem Aktinzytoskelett und der Zelladhäsion assoziiert sind, was die deutlichen strukturellen Veränderungen der Podozyten in der Erkrankung widerspiegelt. Diese mögliche zytoskelettalen Umstrukturierungen zeigen sich auch in der Analyse des Filtrationsapparates mittels STED-Mikroskopie, welche eine deutliche Reduzierung der Abdeckung der Kapillaren durch die Schlitzmembran unter GN ergab. Zudem wurde eine deutliche Aktivierung proinflammatorischer Signalwege, einschließlich verschiedener TLR, beobachtet. Daraufhin wurde durch Kreuzung ein Mausmodell mit einem podozytenspezifischem *Myd88*-Knockout etabliert und im Krankheitsmodell untersucht. Wie erwartet ergaben sich keine Auffälligkeiten in der basalen Phänotypisierung des Mausmodells. Interessanterweise zeigten sich jedoch auch im Verlauf der experimentellen GN keine relevanten Unterschiede zur Kontrollgruppe, weder in funktionellen noch in histopathologischen Untersuchungen. Auch auf Ebene der infiltrierenden Immunzellen oder mittels STED-Mikroskopie analysierten Schlitzmembranstruktur waren keine wesentlichen Unterschiede feststellbar. Um mögliche kompensatorische Mechanismen zu identifizieren, wurde eine weitere Transkriptomanalyse durchgeführt, nun mit *Myd88*-defizienten Podozyten nach Induktion einer GN. Diese ergaben Hinweise auf mögliche kompensatorische Mechanismen, unter anderem über Typ-I-Interferonsignalweg sowie MYD88-unabhängige TLR-Signalwege.

Zusammenfassend ist dies die erste Studie, die spezifisch die Rolle des MYD88-abhängigen TLR-Signalwegs in Podozyten untersucht. Zudem bieten die Transkriptomanalysen von isolierten Podozyten unter GN einen neuartigen Datensatz, der Einblicke in die

transkriptionellen Regulationsprozesse im erkrankten Podozyten liefert. Die Tatsache, dass ein Knockout von *Myd88* keinen entscheidenden Einfluss auf den Krankheitsprozess hat, wirft die wichtige Frage auf welche alternativen Signalwege im Podozyten ablaufen, was in zukünftigen Forschungsarbeiten validiert werden muss.

2. Einleitung

2.1 Chronische Nierenerkrankung

2.1.1. Klinische Relevanz

Die chronische Niereninsuffizienz (chronic kidney disease, CKD) gehört zu den häufigsten Todesursachen weltweit. 2017 starben 1,2 Millionen Menschen an einer CKD, und die WHO erwartet einen weiteren Anstieg der Mortalität bis 2030 auf bis zu 14 Todesfälle/100.000 Menschen ¹⁹. In Ländern mit einer älteren Bevölkerung leiden bereits über 10% der Bevölkerung an einer CKD, jedoch variiert die Prävalenz stark zwischen unterschiedlichen Ländern und gesellschaftlichen Schichten. Insgesamt resultiert daraus eine große, zunehmende Belastung der Gesundheitssysteme und verleiht der Forschung an der Pathogenese mit dem langfristigen Ziel der Entwicklung neuer Behandlungskonzepten eine hohe Relevanz ¹⁵.

Definitionsgemäß handelt es sich bei der CKD um eine Einschränkung der glomerulären Filtrationsrate auf unter $60\text{ml}/\text{min}/1.73\text{m}^2$, unabhängig der zugrunde liegenden Ursache, welche länger als drei Monate besteht. Dadurch wird es vom akuten Nierenversagen abgegrenzt, welche durch eine rasche Verschlechterung der glomerulären Filtrationsrate definiert ist ⁷⁷.

Die Ursachen der CKD sind vielfältig. Zu den häufigsten Ursachen gehört neben den metabolisch assoziierten Erkrankungen wie Diabetes und arterielle Hypertonie die Gruppe der Glomerulonephritiden, wobei die Häufigkeit je nach Alter, zwischen verschiedenen ethnischen Gruppen und Ländern stark unterscheiden ¹⁹.

Das klinische Bild einer CKD variiert stark. Häufig sind Patienten primär asymptomatisch und die Diagnose einer CKD ist in solchen Fällen häufig ein Zufallsbefund im Routinelabor. Eine Einschränkung der Nierenfunktion kann ebenso durch periphere Ödeme, kardiale oder kognitive Symptome auffallen und somit zu einer deutlichen Einschränkung der Lebensqualität führen ¹⁴⁶.

Im klinischen Kontext erfordert die CKD eine individuelle und häufig aufwendige Behandlung. Diese besteht aufgrund der begrenzten Möglichkeiten jedoch meist nur aus dem Management der Komplikationen und dem Eindämmen der Risikofaktoren eines Krankheitsfortschreitens. Bei einem Fortschreiten bis zum terminalen Nierenversagen kann die CKD hin zur Dialysepflichtigkeit führen. In Deutschland sind insgesamt circa 90.000 Menschen dialysepflichtig, wobei aufgrund der Zunahme der Hauptrisikofaktoren ein Anstieg der Prävalenz in Deutschland bis 2040 um ca. 20% erwartet wird. Die Dialyse stellt eine hohe sozioökonomische Belastung dar. In Deutschland liegen die jährlichen Versorgungskosten von dialysepflichtigen Patienten bei ca. 55000€ ⁵⁶. Zu den häufigsten Ursachen einer

Dialysepflichtigkeit gehören gemäß der Umfrage des QuaSi-Nieren-Bericht von 2005 nach dem Diabetes mellitus auch die sogenannten Glomerulonephritiden (siehe Abb. 1) ⁴⁶.

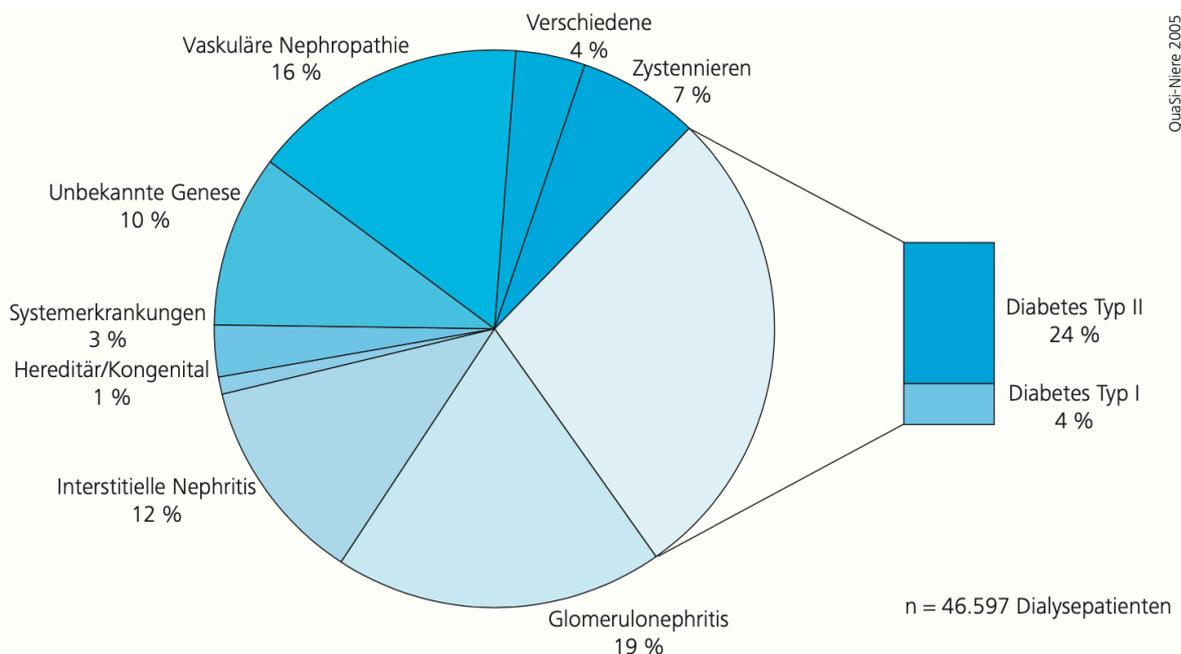


Abb. 1: Diagnoseverteilung der Quasi-Nieren-Studie bei dialysepflichtigen Patienten (2005) ⁴⁶

2.1.2. Physiologie der Niere

Bei den Nieren handelt es sich um ein paarig angelegtes Organ des Retroperitoneums mit vielfältigen Aufgaben in der Homöostase des Körpers. Zu den wichtigsten physiologischen Aufgaben gehört neben der Filtration des Harns die Regulation des Säure-Basen-Haushalts, des Wasser- und Elektrolythaushalts sowie die Blutdruckeinstellung und die Steuerung der Blutneubildung durch die Bildung von Erythropoetin.

Humane Nieren beinhalten ungefähr eine Millionen Nephronen, welche jeweils aus einem Nierenkörperchen (Glomerulus) und dem anschließenden Tubulussystem bestehen, welche den Harn dann bis in das Nierenbecken leiten. In den Glomeruli findet die initiale Harnbildung statt. Insgesamt werden dort täglich ungefähr 180l – nahezu proteinfreier – Primärharn aus dem Blutplasma filtriert, welcher dann im Verlauf des Tubulussystems durch die Rückresorption von freiem Wasser auf durchschnittlich 1,5 l konzentriert wird und dann über das Sammelrohr und Ureteren an die Harnblase weitergeleitet wird ⁸⁵. Die glomeruläre Filtrationsrate (GFR), anhand welcher auch die CKD klassifiziert wird, bezeichnet das primär in den Nieren an den Glomeruli filtrierte Gesamtvolumen und liegt physiologisch bei über 120 ml/min. Abhängig ist sie vom effektiven kapillaren Druck, der Filtrationsfläche und der Durchlässigkeit des glomerulären Filtrationsapparats. Um die glomeruläre Filtration aufrecht zu erhalten, ist eine starke Durchblutung notwendig, weshalb die Nieren zu den am stärksten

durchbluteten Organen zählen. Die renale Perfusionsrate liegt bei ungefähr 1,2 l/min, was ungefähr 20% des gesamten Herzzeitvolumen entspricht ¹⁰⁵.

2.1.3. Glomerulärer Filtrationsapparat

Pathophysiologisch entsteht die CKD zumeist als Folge einer Schädigung des glomerulären Filtrationsapparates. Die häufigsten Ursachen einer CKD wie die diabetische Nephropathie, der arterielle Hypertonus aber auch der Glomerulonephritis haben alle eine Schädigung der Integrität der Glomeruli zur Folge ^{4,86,104}.

Der Glomerulus bildet über seine einzigartige Struktur die Filtrationseinheit der Niere und wurde erstmals konkret beschrieben durch William Bowman im Jahr 1842 ²¹. Hierbei handelt es sich um eine Kapillarschleife, welche der Arteria renalis entspringt und das erste Kapillarbett der Niere darstellt. Diese Schleife wird vom glomerulären Filtrationsapparat bedeckt. Dieser besteht aus dem fenestrierten Kapillarendothel inklusive einer negativ geladenen Glykokalyx, der glomerulären Basalmembran (GBM) sowie den von der Harnseite aufliegenden Podozyten (siehe Abb. 2A & B). Die GBM besteht aus einer dreilagigen Struktur, welche aus der Lamina densa, der Lamina rara interna und der Lamina rara externa besteht. Gebildet wird die GBM durch die Endothelzellen sowie den Podozyten und besteht hauptsächlich aus Kollagen Typ IV, Laminin und Proteoglykanen. Funktionell spielt sie eine entscheidende Rolle bei der Verhinderung der Proteinfiltration.

Der Filtrationsapparat ermöglicht die Selektivität der Filtration: Wasser und kleine gelöste Stoffe wie Harnstoff oder Glukose werden frei filtriert, die Passage von Zellen und Makromolekülen wie zum Beispiel von Proteinen wird wiederum verhindert. Bei Schädigungen des glomerulären Filtrationsapparats kommt es zu einem Verlust der Filterfunktion, wodurch es sowohl zum Durchtritt nicht zu filtrierender Substanzen, wie beispielsweise Albumin, als auch zu einer Abnahme der Gesamtfiltrationsrate kommt. Dies hat einen Anstieg auszuscheidender Stoffe im Blut zur Folge. Unter anderem zählen Kreatinin und Harnstoff hierzu, welche auch zur Bestimmung der Filtrationsfunktion genutzt werden ^{33,127,139}.

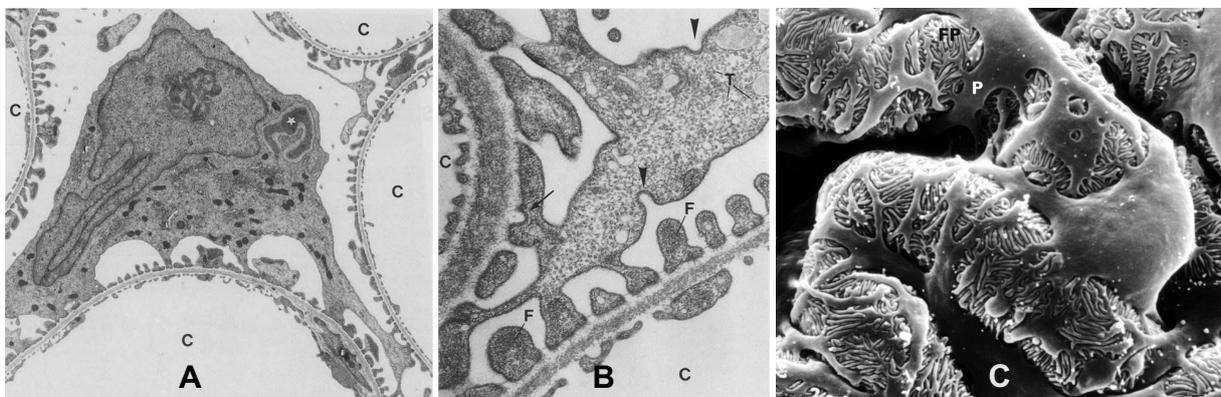


Abb. 2: Elektronenmikroskopische Darstellung des glomerulären Filtrationsapparates. Zusammengestellt aus Mundel et al. ⁹³(A, B) und Pavenstädt et al. ¹⁰⁸(C)

Die Kapillaren (C) sind von den Fußfortsätzen (F) der Podozyten bedeckt. Dazwischen liegt die GBM sowie das fenestrierte Kapillarendothel (Abb. A, B) ⁹³. Die Fußfortsätze verschränken sich mit den Fußfortsätzen der benachbarten Podozyten und bilden so ein Netz, welches die Basis des glomerulären Filtrationsapparats bildet (Abb. C). ¹⁰⁸

2.1.4. Podozyten

Podozyten sind enddifferenzierte und polarisierte epitheliale Zellen und liegen der glomerulären Basalmembran von der Urinseite auf und damit auch die Kapillaren umhüllen. Sie bestehen aus einem die Zellorganellen beinhaltendem Zellkörper und den sogenannten Fußfortsätzen, welche sich über Primär- und Sekundärfortsätze mit den Fußfortsätzen benachbarter Podozyten verzahnen. Zudem sind die Podozyten über Integrine und Dystroglykane mit der GBM verankert (siehe Abb. 2C). Zwischen den Fußfortsätzen zweier Podozyten entsteht dadurch ein ungefähr 40nm breiter Filtrationsschlitz, welcher von einer aufliegenden dünnen Membran, der sogenannten Schlitzmembran (SM), überspannt ist und darüber die Filtrationseigenschaften erhält ^{94,127}. Die SM wird über spezialisierte Zell-Zell-Kontakte verbunden und besteht aus Transmembranproteinen, welche über spezifische Proteine an das Aktin-Zytoskelett der Podozyten gebunden wird. Zu den Proteinen der Schlitzmembran gehören unter anderem Nephrin und Podocin. Nephrin interagiert direkt mit dem Nephrin des gegenüberliegenden Fußfortsatzes. Podocin wiederum ermöglicht die oben genannte Verankerung mit dem zelleigenen Aktin-Zytoskelett ^{20,59,70}. Daneben spielen auch α -Aktinine eine entscheidende Rolle in der Stabilität und Funktion der Schlitzmembran und der Adhäsion von Podozyten ³⁴. Es ist bekannt, dass bestimmte Mutationen im *Actn4*-Gen, welches für α -Actinin-4 kodiert, ursächlich für eine fokale segmentale Glomerulosklerose (FSGS) sein kann ¹⁴⁸. Auch für Mutationen in Podocin (kodiert durch das *Nphs2*-Gen) ist bekannt, dass sie Ursache einer FSGS und damit einer CKD sein können. So konnte in einem Mausmodell gezeigt werden, dass spezifische Mutationen im *Nphs2*-Gen zu einer progressiven Nierenfunktionsstörung mit einer zunehmenden Schädigung des Filtrationsapparates führen ²⁶. Hierbei kommt es unter anderem auch zu Veränderungen in der Morphologie der Fußfortsätze, was zu einer Reduktion der Länge und Dichte der Schlitzmembran führt, wobei die genaue Pathogenese der Proteinurie nicht vollständig verstanden ist. Aktuelle Studien lassen vermuten, dass nicht nur die strukturellen Anomalien der Schlitzmembran im Rahmen von podozytärer Schädigung den Filtrationsprozess beeinflussen. Zusätzlich wird vermutet, dass die Podozyten die Fähigkeit verlieren, die erforderliche Gegenkraft gegen den Filtrationsdruck aufrechtzuerhalten ^{16,27,114}. Gemäß der Gelkompressionshypothese hat dies zur Folge, dass durch den Blutdruck die Basalmembran zunehmend aufgespannt wird und diese dadurch zunehmend durchlässig wird ⁴⁴.

2.2 Glomerulonephritis

Glomerulonephritiden (GN) beinhalten eine sehr heterogene Gruppe an entzündlichen Erkrankungen des glomerulären Filtrationsapparats. Sie gehören zu den häufigsten Ursachen einer chronischen Nierenerkrankung und können bis hin zum terminalen Nierenversagen (end-stage renal disease, ESRD) führen. Insgesamt verursachen die GN über 20% der CKD, wobei die GN bei jüngeren Menschen sogar die häufigste Ursache einer CKD und eines terminalen Nierenversagens darstellen ⁴⁵.

Klinisch gibt es kein spezifisches Symptom, welches bei einer GN auftritt, weshalb die Diagnose häufig erst verzögert gestellt wird ⁴⁵. Als Folge einer GN wird zwischen dem 1947 erstmals von Henry Christian beschriebenen nephrotischen Syndrom und dem primär entzündlich geprägten nephritischen Syndrom differenziert ³⁰. Das nephrotische Syndrom tritt vor allem bei einer überwiegenden podozytären Schädigung auf und bezeichnet die Symptomkombination aus einer Proteinurie mit $>3,5\text{g}/24\text{h}$, einer Hypoproteinämie, einer Hyperlipoproteinämie und peripheren Ödemen und gilt als direktes Zeichen einer Schädigung der Glomeruli ⁵⁰. Davon abzugrenzen ist das nephritische Syndrom, welches als Zeichen einer direkten Inflammation der Glomeruli auftritt und in erster Linie mit einer akuten GN einhergehen kann. Hierbei kommt es aufgrund der Schädigung der Kapillarwand zu einer Hämaturie in Kombination mit einer Proteinurie und einem Hypertonus. Zusätzlich kann die Nierenfunktion eingeschränkt sein, was ebenfalls Ödeme und eine Anurie zur Folge haben kann ¹³⁰.

Zunächst wird bei den GN zwischen primären und sekundären Ursachen unterschieden. Während bei den sekundären GN eine Systemerkrankung vorliegt, bei welcher Glomeruli sekundär mitbetroffen sind, liegt bei der primären GN ein ausschließlicher und initialer Befall der Niere und der Glomeruli vor. Es sind unterschiedlichste Ursachen für die glomeruläre Schädigung im Rahmen einer GN bekannt. Am häufigsten liegt der GN eine autoimmune Ursache zu Grunde, die vor allem mit einem nephritischen Syndrom einhergehen. Bei Veränderungen der glomerulären Filtrationsbarriere hingegen kommt es eher zu einer Störung der glomerulären Filtration und in der Folge kann ein nephrotisches Syndrom mit starker Proteinurie entstehen.

Goldstandard der Diagnostik der GN ist die Nierenbiopsie ¹²⁵. Lange Zeit wurden die GN auch mangels Alternativen insbesondere rein nach ihrem histopathologischen Bild eingeteilt. Dabei wird zunächst das Ausmaß des Schadens bezeichnet, indem die Anzahl der betroffenen Glomeruli evaluiert und zwischen fokal (nur einige Glomeruli betroffen) und diffus (alle oder nahezu alle Glomeruli) sowie zwischen segmental (ein Teil des Glomerulus) und global (das gesamte Glomerulus) differenziert wird. Bezüglich des Befallmusters kann zum Beispiel die endokapilläre proliferative GN von der membranproliferativen GN und der rasch progredienten GN differenziert werden ¹²⁸. Die rasch progrediente GN wird aufgrund der proliferierenden epithelialen Zellen und infiltrierenden Immunzellen entlang der Bowman-

Kapsel und der sich daraus entwickelnden – histologisch abzugrenzenden – halbmondförmigen Gebilde, welche daher im angloamerikanischen Raum auch als „crescentic“ GN bezeichnet wird⁶⁷. Das histopathologische Erscheinungsbild der glomerulären Veränderungen ist weiterhin wichtig, um das Ausmaß und den Fortschritt der Erkrankung zu klassifizieren, lässt jedoch häufig keinen genauen Rückschluss auf die therapeutisch entscheidende Differenzierung der zu Grunde liegenden Ursache zu. Folgend hat sich in den letzten Jahren zunehmend eine Einteilung entsprechend der Pathogenese durchgesetzt. Hierfür werden neben dem glomerulären Schädigungsmuster auch Immunophänotypisierung durch immunhistochemische Färbungen und Immunfluoreszenz sowie elektronenmikroskopische Aufnahmen genutzt. Dies berücksichtigend hat die Mayo Clinic/Renal Pathology Society 2016 ein Konsensuspapier erstellt¹²⁹, nach welchem die GN anhand der Ätiologie grob in folgende fünf Gruppen eingeteilt werden können: Immunkomplex-vermittelte GN, ANCA-assoziierte GN, Anti-GBM GN, monoklonale Immunglobulin-assoziierte GN und die C3-assoziierten Glomerulopathien und im Folgenden näher beschrieben werden. Die genaue Einteilung der GN bleibt jedoch weiterhin umstritten. So schlagen Anders et. al. eine Einteilung der GN entsprechend der immunopathophysiologischen Grundlage vor. Dadurch könne die GN in fünf Kategorien differenziert werden: infektionsassoziierte GN, autoimmun vermittelte GN, alloimmun assoziierte GN, autoinflammatorisch vermittelte GN und zur monoklonalen Gammopathie assoziierte GN⁴.

2.2.1. Immunkomplex-vermittelte GN

2.2.1.1 Lupusnephritis

Die Lupusnephritis (LN) ist eine häufige und schwerwiegende Organmanifestation des systemischen Lupus erythematodes (SLE), die bei mehr als 50% der Patienten auftritt. Die klinische Manifestation einer LN ist sehr variabel und reicht von asymptomatischer Proteinurie, über ein nephrotisches Syndrom bis hin zu terminalem Nierenversagen, wobei etwa 20% der Patienten ein terminales Nierenversagen entwickeln. Ein Großteil der Patienten mit LN ist jünger als 50 Jahre. Das Auftreten einer LN im Rahmen eines SLE erhöht signifikant die Mortalität. Für einen SLE besteht eine genetische Prädisposition, aber auch Umweltfaktoren scheinen eine Rolle zu spielen. Zusätzlich scheint bei Patienten mit SLE die Expression von Genen im Zusammenhang mit dem Typ-I-Interferon-Signalweg gestört zu sein, was zu einer erhöhten Krankheitsaktivität führt³⁷. Die Nierenbiopsie gilt auch hier als Goldstandard für die Diagnose von der LN³. Aktuell wird die LN nach ihrem histopathologischen Bild gemäß der International Society of Nephrology und der Renal Pathology Society in sechs verschiedene Klassen eingeteilt¹⁴⁷. Bei der LN kommt es zur Ablagerung von Immunkomplexen im Glomerulus. Diese Komplexe bestehen aus Antikörpern, insbesondere anti-dsDNA-Antikörpern, die sich mit nukleären Antigenen verbinden. Die Ablagerung dieser Immunkomplexe führt zur Aktivierung des Komplementsystems, einschließlich der

Komplementkomponenten C3a, C4a und C5a, die wiederum die Infiltration von Immunzellen fördern. In der Immunfluoreszenz zeigen sich hierbei typischerweise Ablagerungen von IgA, IgG und IgM-Antikörpern sowie C1q und C3-Komplementfaktoren, wobei sich die Lokalisation je nach Klasse unterscheidet⁵⁸. Die Prognose einer LN ist auch stark abhängig von der vorliegenden Klasse³.

2.2.1.2 IgA Nephropathie

Bei der IgA-Nephropathie handelt es sich um die häufigste Form der idiopathischen GN¹²⁴. Die Erkrankung entsteht durch eine mesangiale Ablagerung von Immunkomplexen, welche durch die Bildung von Antikörper gegen abnorme Formen des IgA1-Moleküls entstehen. Klinisch manifestiert sich die Erkrankung meist mit einer asymptomatischen Hämaturie und typischerweise in der 2.-3. Lebensdekade¹³⁴. Der histopathologische Befund kann nach der Oxford-Klassifikation eingeteilt werden, häufig auch als MEST-C-Score bezeichnet¹³³. Dieser berücksichtigt folgende, häufig auftretende pathologische Veränderungen: Hyperzellularität des Mesangiums, endokapilläre Proliferation, segmentale Glomerulosklerose, tubuläre Atrophie bzw. interstitielle Fibrose sowie die Ausbildung von glomerulären halbmondförmigen Formationen¹³³.

2.2.1.3 Infekt-assoziierte GN

Die Gruppe der Infekt-assoziierten GN umfasst neben der postinfektiösen GN, welche erst nach dem vollständigen Auskurieren einer Infektion und einem infektionsfreien Intervall auftritt, auch die mit einer akuten Infektion assoziierten GN. Weltweit handelt es sich bei den infekt-assoziierten GN um die häufigste Form der GN. Diese tritt insbesondere im Kindesalter als akute postinfektiöse GN nach viralen, bakteriellen oder Protozoeninfektionen. Am häufigsten tritt die postinfektiöse GN nach einer Infektion mit beta-hämolytischen Streptokokken auf, und somit häufig nach Infektionen der oberen Atemwege wie beispielsweise Tonsillitiden. Insbesondere in Ländern mit höheren Einkommen sinkt die Rate an postinfektiösen GN nach Streptokokkeninfektionen in den letzten Jahren deutlich. Eher die ältere Bevölkerung betreffen postinfektiöse GN nach bakteriellen Endokarditiden oder Staphylokokkeninfektionen⁵⁴.

Pathophysiologisch haben die unterschiedlichen Infekt-assoziierten GN gemeinsam, dass die körpereigene immunologische Antwort auf eine systemische Infektion eine glomeruläre Schädigung zur Folge hat. Der genaue Pathomechanismus ist derzeit noch nicht verstanden, es wird davon ausgegangen, dass die Antikörper, die aufgrund der Infektion gebildet werden, zur Formung von Immunkomplexen führen, welche dann zur glomerulären Immunkomplexablagerung führt und die glomeruläre Schädigung durch verschiedene Entzündungsreaktionen hervorruft^{76,117,134,155}.

2.2.2. ANCA-assoziierte GN

Die ANCA-assoziierte GN ist eine häufige Präsentation der ANCA-assoziierten Vaskulitis (AAV) und eine Nierenbeteiligung tritt in ca. 70% der Fälle auf. Die systemischen AAVs werden gemäß der International Chapel Hill Consensus Conference in die mikroskopische Polyangiitis (mPA), Granulomatose mit Polyangiitis (GPA) und in die eosinophile Granulomatose mit Polyangiitis (EGPA) klassifiziert⁶⁶. Bei den anti-neutrophilen cytoplasmatischen Antikörpern (ANCA) handelt es sich um Autoantikörper gegen Antigene im Zytoplasma neutrophiler Granulozyten, wobei man zwei Haupttypen differenziert: cytoplasmatische ANCA (cANCA) und perinukleäre ANCA (pANCA). Die spezifischen Antikörper bestimmen weitgehend den Phänotyp der Erkrankung. cANCA sind typischerweise mit der GPA und pANCA mit mPA und EGPA assoziiert. Die Nierenbeteiligung kann sich klinisch unterschiedlich ausprägen, teils auch in Form einer rasch fortschreitenden Glomerulonephritis mit einem schnellen Verlust der GFR. Das histopathologische Bild ist bei den ANCA-assoziierten Glomerulonephritiden durch eine pauci-immune Vaskulitis gekennzeichnet, wobei nur wenige oder keine Immunglobuline und Komplementablagerungen nachweisbar sind. Insbesondere in den früheren Stadien zeigt sich eine Invasion neutrophiler Granulozyten in den Gefäßwänden, was Nekrosen und fibrinoide Veränderungen zur Folge haben kann. Im Verlauf werden die neutrophilen Granulozyten durch mononukleäre Leukozyten abgelöst⁷¹. Gemäß der Berden-Klassifikation unterteilt man folgende histopathologische Hauptmerkmale der ANCA-assoziierten GN: sklerotisch, fokal, Halbmondformationen und gemischt¹⁷.

2.2.3. Anti-GBM GN

Bei der anti-glomeruläre Basalmembran Glomerulonephritis (anti-GBM GN) handelt es sich um eine Erkrankung, welche als Vaskulitis der kleinen Gefäße sowohl die Kapillarbetten der Nieren als auch der Lunge betreffen. Insgesamt handelt es sich bei der anti-GBM GN um eine sehr seltene Erkrankung mit einer Inzidenz von ca. 1-2 Fällen pro 1 Mio. Menschen¹³⁶. Die genaue Ursache bleibt noch ungeklärt. Es wird wie bei vielen autoimmunen Erkrankungen davon ausgegangen, dass es durch einen Trigger, wie zum Beispiel eine Infektion, zur Ausbildung von Antikörpern gegen spezifische Teile, der vor allem in der Lunge und den Glomeruli vorkommenden $\alpha 3$ NC1-Domäne des Typ-IV-Kollagens der Basalmembran, kommt^{28,89}. Folge der anti-GBM GN ist häufig eine rasch fortschreitende Glomerulonephritis und charakterisiert durch die Ausbildung von den zuvor beschriebenen halbmondförmigen glomerulären Formationen als Hinweis auf die infiltrierenden Immunzellen³².

2.2.4. Monoklonale Ig GN

Die monoklonalen Ig-GN sind charakterisiert durch monoklonale Antikörperablagerungen an den Glomeruli. Hierbei kommt es entweder zur Ablagerung gesamter Antikörper oder spezifischer Teile von Antikörpern wie zu Beispiel der Leichtketten. Zu den Vertretern dieses

Spektrums gehören beispielsweise auch die kryptoglobulinämischen GN. Namensgebend sind hier die im Serum zu findenden Kryptoglobuline, also Immunglobuline, die bei niedriger Temperatur Ausfällen.²⁵

2.2.5. C3-assoziierte GN

Die C3-assoziierte GN ist eine seltene Form, bei der es durch eine Dysregulation der Komplementaktivierung zu vermehrten glomerulären Ablagerungen von Komplementfaktoren kommt. Histopathologisch zeigt sich häufig das Bild einer membranproliferativen GN in Kombination mit dem immunfluoreszenzbasierten Nachweis einer deutlichen Ablagerung von C3, ohne oder mit nur minimalem Nachweis von zusätzlichen Immunglobulinen. Die Therapie richtet sich nach der klinischen Ausprägung. Während milde Verläufe konservativ behandelt werden können, sollte bei größerer Ausprägung eine immunsuppressive Behandlung eingeleitet werden⁵².

2.2.6. Therapie der Glomerulonephritis

Bei der Therapie der GN ist man trotz der Fortschritte in der Diagnostik und der Kenntnis der unterschiedlichen Ursachen weiterhin sehr begrenzt. Wie zuvor beschrieben, kann eine nicht adäquat behandelte Glomerulonephritis bis hin zum terminalen Nierenversagen führen⁵⁴, wobei der Verlauf auch maßgeblich von der Ursache abhängt. Zusammengefasst besteht die Therapie meist aus dem Risikomanagement in Kombination mit einer unspezifischen Immuntherapie, zum Beispiel mittels Kortikosteroiden, Calcineurin-Inhibitoren oder Rituximab, bei sekundären GN zusätzlich der Behandlung der grundlegenden Erkrankung.¹¹⁸

2.3 Immunsystem

Das Immunsystem dient dem Körper der Abwehr von Krankheitserregern, Toxinen und der Reaktion auf Schädigungen des Gewebes. Es ist ein komplexes Zusammenspiel aus verschiedenen Komponenten. Hier unterscheidet man grob Effektorzellen, Antikörper, Rezeptoren, Signalmoleküle und das Komplementsystem. Funktionell kann das Immunsystem in einen angeborenen und einen adaptiven Teil unterschieden werden, wobei beide Systeme stark miteinander interagieren. Während die angeborene Immunität unspezifisch, aber dafür sehr schnell auf Pathogene reagieren kann, steht die adaptive Immunität vor allem für eine spezifische, zielgerichtete Reaktion auf Pathogene.

Entscheidend ist bei der Immunreaktion die Unterscheidung zwischen körpereigenen und körperfremden Molekülen. Diese Unterscheidung ist essenziell, um den Körper vor Infektionen zu schützen, ohne das eigene Gewebe anzugreifen. Das erfordert komplexe Mechanismen und beinhaltet eine sogenannte Toleranzentwicklung. Wenn solche Toleranzmechanismen versagen, kann das Immunsystem körpereigene Zellen und Gewebe angreifen, was zu sogenannten Autoimmunerkrankungen führen kann. Die genauen Ursachen vieler

Autoimmunerkrankungen sind bisher unbekannt und häufig multifaktoriell und beinhaltet neben der genetischen Prädisposition sowie endogene und exogene Faktoren.⁹⁶

2.3.1. Angeborenes Immunsystem

Beim angeborenen Immunsystem handelt es sich um ein stark konservierten und hochkomplexen Teil des Immunsystems, welcher in allen Geweben des Körpers vorkommt und vor allem die initiale Immunantwort und Aktivierung des adaptiven Immunsystems verantwortet. Zum angeborenen Immunsystem gehören verschiedene Immunzellklassen wie neutrophile Granulozyten, Makrophagen, Mastzellen und dendritische Zellen. Die Initiierung des angeborenen Immunsystems geschieht überwiegend über Rezeptoren, welche auf Gewebeschädigungen, Infektionen oder Toxine reagieren, die sogenannten „pattern recognition-receptors“ (PRR), zu welchen auch die sogenannten Toll-like Rezeptoren zählen. Diese Rezeptoren dienen der Erkennung von spezifischen molekularen Mustern, die sogenannten damage-associated molecular patterns (DAMPs), welche durch den Untergang von Gewebezellen entstehen, bzw. als pathogen-associated molecular pattern (PAMPs) im Rahmen von Infektionen freigesetzt werden. Solche Rezeptoren werden auf einer Vielzahl von Zellen exprimiert. Hierzu zählen neben bestimmten Immunzellen auch Gewebezellen, wie unter anderem auch Podozyten^{47,96,113}.

2.3.2. Toll-Like-Rezeptorsignalweg

Die Idee, dass es Rezeptoren gibt, die PAMPs und DAMPs erkennen können wurde zunächst von Charles Janeway etabliert⁶⁵. Zunächst wurden die sogenannten Toll-Proteine in der Fruchtfliege, der *Drosophila melanogaster*, entdeckt⁵, welche Ähnlichkeit zum damals bereits bekannten Interleukin-1-Rezeptor zeigten^{49,53}. Im Säugetier wurde dann wenige Jahre später die ersten Proteine mit großer Ähnlichkeit zu Toll entdeckt und erstmals näher untersucht, unter anderem erneut durch die Arbeitsgruppe um Charles Janeway⁹⁰.

Mittlerweile wurden bei Säugetieren mehr als zehn verschiedene Familien von Toll-like Rezeptoren (TLR) identifiziert. Die TLR 3, 7, 8 und 9 sind primär in Endosomen lokalisiert, wo sie Nukleinsäuren sowohl von Wirts- als auch von Fremdorganismen erkennen. Im Gegensatz dazu sind andere TLR-Familien, wie beispielsweise TLR4, vorwiegend an der Plasmamembran lokalisiert (siehe Abbildung 3)⁷⁸. Nach der Bindung eines Liganden führt die Dimerisierung der TLRs zur Aktivierung von Signalkomplexen, die häufig durch den Myeloid Differentiation Factor 88 (MyD88), aber auch durch TRAM/TRIF vermittelt werden. Die MYD88-abhängigen Signale aktivieren über IRAK4 und IRAK1/2 den nuclear factor-κB (NF-κB) essential modulator (NEMO) und damit den NF-κB -Signalweg sowie weitere, durch mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPKs) abhängige, primär proinflammatorische Signalkaskaden. Zusätzlich kann über TRAF3, überwiegend TRIF-abhängig, die Translokation des Transkriptionsfaktors IRF3 gefördert werden, was die Expression von Typ-I-Interferon-

assoziierten Genen steigert ^{38,103}. Bemerkenswert ist die Einzigartigkeit von TLR4, da es sowohl über MyD88 als auch über TRIF signalisiert, während alle anderen TLR spezifische Adaptorproteine verwenden ¹⁵⁰.

Interessanterweise wurde MYD88 bereits im Jahr 1990, also vor der Entdeckung der Toll-like Rezeptoren, beschrieben ⁸³ und dient der Signalweiterleitung von TLR und IL-1-Rezeptoren. Sobald diese stimuliert werden, wird MyD88 über die TIR-Domäne rekrutiert, wodurch es zur Bildung von Oligomeren angeregt wird. Wenn diese eine Schwelle überschritten haben, kommt es zur Interaktion mit IRAK4 und IRAK1/2, wodurch ein sogenanntes Myddosome gebildet wird, welches das Signal wie oben beschrieben weiter verarbeitet ^{48,79}. MYD88 ist über die Beteiligung am TLR an unzählige Prozesse im menschlichen Körper beteiligt. Eine verminderte MYD88-Aktivität, zum Beispiel durch Mutationen, kann beispielsweise eine Immunschwäche zur Folge haben und zu vermehrten bakteriellen Infekten führen ¹⁸. In Zusammenhang mit autoimmunassoziierten Erkrankungen, wie zum Beispiel Diabetes mellitus, konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass ein spezifischer *Myd88*^{KO} in myeloischen Zellen einen schützenden Effekt aufweist ⁶. Neben der unverzichtbaren Rolle von Myd88 in Immunprozessen, spielt das Adaptorprotein eine vielseitige Rolle in onkologischen Erkrankungen. So konnte dieselbe Arbeitsgruppe ebenfalls nachweisen, dass ein *Myd88*^{KO} in intestinalen Mesenchymalzellen die spontane intestinale Tumorgenese hemmt ⁷⁴. Außerdem sind Zusammenhänge zwischen Mutationen im *Myd88*-Gen und vielen B-Zell-Malignomen bekannt, wie zum Beispiel dem diffus großzellige B-Zelllymphom, mutmaßlich über eine vermehrte Aktivierung des NF-κB-Signalwegs, welcher zur gesteigerten Proliferation der B-Lymphozyten führt ^{72,99,143}. Auch in verschiedenen weiteren Karzinomen scheint MyD88 eine Rolle in der Pathogenese zu spielen, zum Beispiel in Zellen eines Mammakarzinoms, wo eine vermehrte MYD88-Aktivität auch mit einer erhöhten Aggressivität des Tumors assoziiert ist ¹⁴⁹.

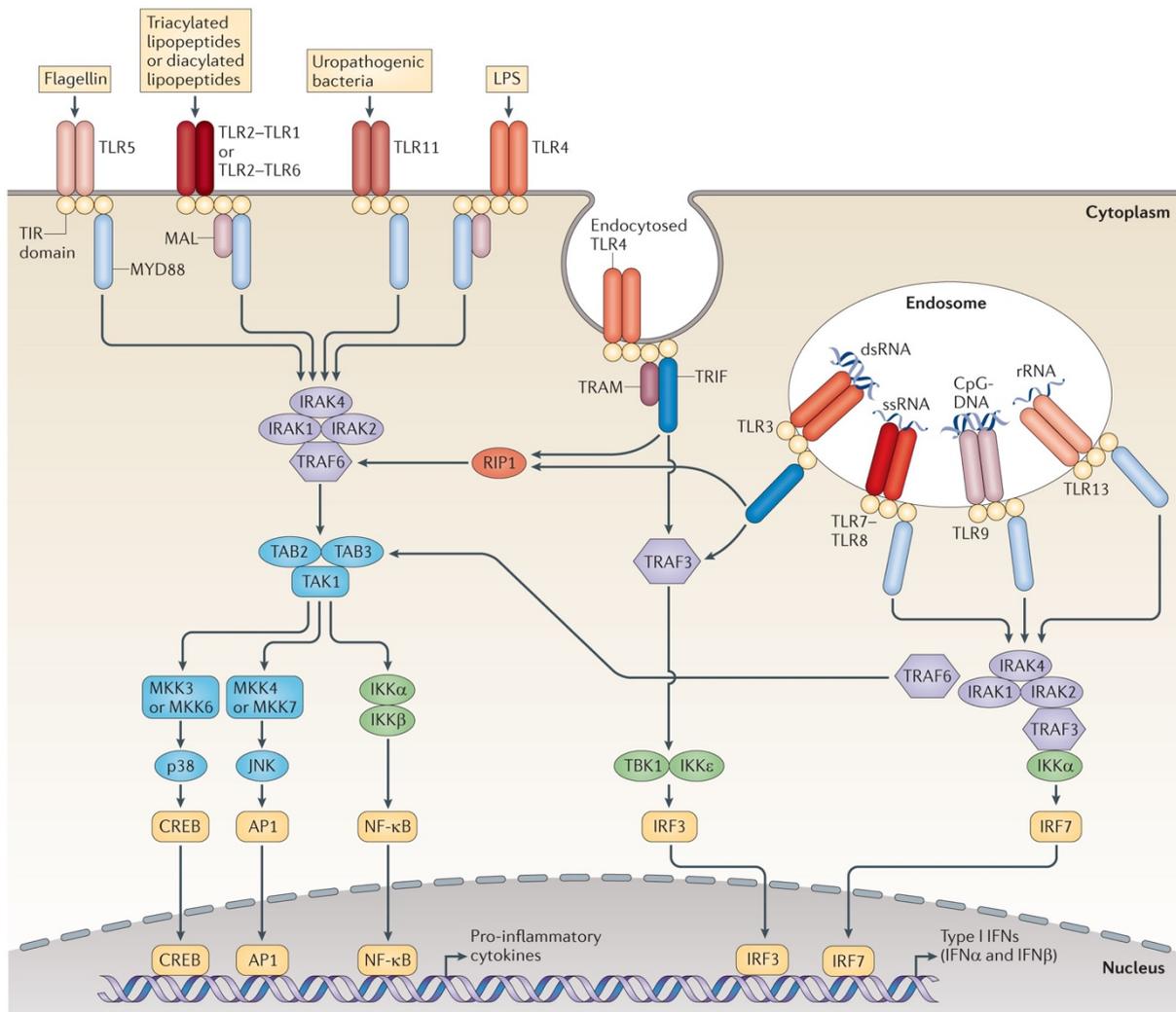


Abbildung 3. Signalweg der verschiedenen Toll-like Rezeptoren, häufig mit MYD88 als Adaptorprotein. Aus O'Neill et al. ¹⁰³

2.3.3. NF-κB-Signalweg

Der nuclear factor-κB (NF-κB)-Signalweg ist ein zentraler Regulator von Inflammationsprozessen und spielt zudem eine bedeutende Rolle in der Regulation des Zellüberlebens sowie der Tumorgenese. Die Aktivierung dieses Signalwegs erfolgt nicht nur über Toll-like Rezeptoren (TLRs), sondern auch durch andere proinflammatorische Rezeptoren wie IL-1- und TNF-α-Rezeptoren. Diese Aktivierung führt zur Stimulierung des IκB-Kinase-Komplexes (IKK), welcher eine Signalkaskade in Gang setzt, die zur Phosphorylierung und anschließenden Abbau von IκB, dem Inhibitor von NF-κB, führt. Ein entscheidender Bestandteil des IKK-Komplexes ist NEMO (NF-κB Essential Modulator), auch als IKKγ bekannt. NEMO fungiert als regulatorisches Protein, das für die Phosphorylierung von IκB unerlässlich ist. Ohne NEMO ist die Aktivierung des NF-κB-Signalwegs damit stark beeinträchtigt. Durch den Abbau von IκB wird NF-κB freigesetzt und kann in den Zellkern

wandern, wo es die Transkription spezifischer proinflammatorischer und anti-apoptotischer Zielgene induziert¹⁰⁶. Die Zielgene von NF- κ B sind vielfältig. Neben multiplen Cytokinen wie IL-1 und IL-6 werden auch TNF- α exprimiert sowie multiple Chemokine wie CXCL1⁸⁰. Letzteres hat eine Rolle in der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten¹²³.

Die Auswirkungen der NF- κ B-Signalisierung sind interessanterweise stark gewebespezifisch. Somit kann die Inhibition von NF- κ B-abhängigen Signalwegen in verschiedenen Geweben unterschiedliche, teils gegensätzliche Effekte haben. Beispielsweise zeigte eine Studie von Rudolph et al., dass Mäuse, denen das NEMO/IKK γ -Protein fehlt, nicht lebensfähig sind und bereits intrauterin an massivem Leberschaden sterben¹¹⁹. Dies unterstreicht die essenzielle Rolle von NF- κ B im Überleben von Leberzellen während der Entwicklung. Ähnliche gewebespezifische Effekte wurden auch in anderen Organen beobachtet. Ein spezifischer Knockout des NF- κ B-Signalwegs über NEMO in intestinalen Epithelzellen führte zu chronischen intestinalen Entzündungen und beförderte die Entwicklung von autoimmunassoziierten Erkrankungen, wobei vermutet wird, dass NF- κ B eine wichtige Rolle in der Steuerung des intestinalen Immunsystems hat⁹⁸. Ebenso beförderte eine Inaktivierung von NF- κ B in Keratinozyten die Entstehung autoimmunologischer Erkrankungen der Haut, weshalb eine ähnliche Rolle vermutet wird¹⁰⁷. Im Gegensatz dazu zeigte sich, dass die spezifische Unterdrückung des NF- κ B-Signalwegs im zentralen Nervensystem (ZNS) protektive Effekte haben kann. So haben Studien gezeigt, dass die Hemmung von NF- κ B in neuronalen Parenchymzellen den Verlauf verschiedener neuronaler Erkrankungen abmildern kann, wie zu Beispiel im Rahmen einer autoimmuner Enzephalomyelitis²⁴, sowie das ischämiebedingte Absterben neuronaler Zellen³⁹. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass NF- κ B gewebespezifisch variable, teils divergente Funktionen übernimmt, was sowohl für therapeutische Ansätze als auch für das Verständnis der zugrunde liegenden Mechanismen von entscheidender Bedeutung sein könnte⁸⁰.

2.3.4. Typ-I-Interferon vermittelter Signalweg

Interferone (IFN) wurden erstmals 1957 als biologische Produkte beschrieben, welche die virale Replikation hemmen können⁶¹. Heute werden IFNs in Gruppen eingeteilt, abhängig davon, mit welchem Rezeptor sie interagieren. Der Typ-I-Interferon-(IFN)-vermittelte Signalweg spielt eine wichtige Rolle in der generellen Immunantwort. Eine Bindung der Typ-I Interferone (IFN-I), insbesondere IFN α und IFN β , an ihren spezifischen Rezeptor, den IFN- α/β -Rezeptor (IFNAR), führt zunächst zur Aktivierung des JAK/STAT-Signalwegs, der letztlich die Expression von IFN-stimulierten Genen (ISG) verstärkt¹⁰⁹. IFN α wird vor allem durch Immunzellen, vorrangig durch dendritische Zellen, ausgeschüttet²⁹. IFN β wiederum wird eher durch Fibroblasten und verschiedene epitheliale Zellen ausgeschüttet^{11,112}.

Die Ausschüttung von IFN-I kann durch unterschiedliche Pattern-Recognition-Rezeptoren (PRR) stimuliert werden, darunter auch die TLR. Diese Rezeptoren aktivieren über

unterschiedliche Signalwege Transkriptionsfaktoren wie den Interferon Regulatory Factor 3 (IRF3) oder den Stimulator von Interferon-Genen (STING), die dann über Translokation in den Zellkern zur Ausschüttung von IFN-I beitragen ⁸².

Die Komplexität des Typ-I-IFN-Signalwegs, der sowohl antivirale als auch proinflammatorische Funktionen umfasst, hat weitreichende biologische und klinische Auswirkungen. Ähnlich wie beim NF- κ B-Signalweg hat eine Beeinflussung des Typ-I-IFN-Signalwegs je nach Gewebe divergente Folgen. Zum Beispiel kann die chronische Aktivierung von IRF3 die Entstehung autoimmuner Erkrankungen fördern, während eine gezielte Modulation dieser Signalwege in der Krebstherapie oder bei viralen Infektionen therapeutisches Potenzial zeigt. So scheint der Typ-I-IFN-Signalweg eine zentrale Rolle in der Pathogenese des SLE zu spielen. Es wird angenommen, dass eine Überproduktion von IFN α zu einer verstärkten Expression von ISG führt, die die Autoimmunität antreiben und so zur stetigen Aktivierung von Immunzellen führt ^{9,110}. Im Rahmen einer Multiplen Sklerose wiederum konnte gezeigt werden, dass das Serumlevel von IFN β erniedrigt ist, weshalb sich IFN β auch als erste immunmodulatorische Therapie der MS etabliert hat ⁴³. Auch im Kontext von Viruserkrankungen – wie zuletzt SARS-CoV-2 - ist die Rolle von IRF3 und die Interaktion mit Typ-I-IFN-Signalwegen von besonderem Interesse. Das Virus hat Mechanismen entwickelt, um IRF3-vermittelte Signalvermittlung zu blockieren, was die Pathogenese der Erkrankung entscheidend beeinflusst ⁴².

Diese Erkenntnisse unterstreichen die vielseitige Bedeutung des Typ-I-IFN-Systems in der Pathogenese von unterschiedlichen Krankheitskomplexen wie Autoimmunerkrankungen, Krebserkrankungen und Infektionskrankheiten. Daher fördern solche Erkenntnisse die Entwicklung neuer Therapieansätze.

2.3.5. Adaptives Immunsystem

Vom angeborenen Immunsystem wird das adaptive Immunsystem unterschieden. Zusammenfassend reagiert das adaptive Immunsystem des Körpers spezifischer, jedoch auch langsamer als das angeborene Immunsystem. Es zeichnet sich insbesondere durch die Fähigkeit der immunologischen Gedächtnisbildung aus, welches bei einer erneuten Infektion eine schnellere und spezifischere Reaktion ermöglicht. Hauptakteure des adaptiven Immunsystems sind die Lymphozyten, welche in erster Linie aus T- und B-Zellen bestehen. T-Zellen werden wiederum in zwei Haupttypen der T-Helferzellen (CD4+) und der zytotoxischen T-Zellen (CD8+) eingeteilt. T-Helferzellen sind vorwiegend in die Koordination der Immunantwort involviert, in dem sie unter anderem an der Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen und B-Zellen beteiligt sind. Zytotoxische T-Zellen sind durch die Fähigkeit des spezifischen Abtötens von infizierten Zellen ein essenzieller Bestandteil des adaptiven Immunsystems, während B-Zellen in erster Linie für die Produktion von Antikörpern verantwortlich sind. Antikörper wiederum spielen eine Schlüsselrolle im adaptiven Immunsystem, indem sie entweder Pathogene direkt neutralisieren oder deren Erkennung

durch andere Immunzellen erleichtern und sind wesentlich an der Aktivierung des Komplementsystems beteiligt⁹⁶.

Im Rahmen der Immunabwehr ist das Zusammenspiel zwischen angeborenem und adaptiven Immunsystem entscheidend. Meist kommt es zunächst zur Aktivierung des angeborenen Immunsystems, welches dann die Antwort des adaptiven Immunsystems beeinflusst. TLR zum Beispiel sind zunächst einmal Teil des angeborenen Immunsystems, stellen jedoch eine wichtige Verbindungsstelle zum adaptiven Immunsystems dar. Die Erkennung von molekularen Mustern von Krankheitserregern der TLRs auf Immunzellen wie Makrophagen oder dendritischen Zellen führt zunächst über oben genannte Prozesse zur Freisetzung von Zytokinen, welche wiederum Zellen des adaptiven Immunsystems aktivieren können^{64,96}. Auch das komplexe Zusammenspiel des adaptiven Immunsystems spielt eine entscheidende Rolle im Verlauf der Glomerulonephritis und steht daher auch im Fokus vieler Studien. So konnte beispielsweise die Forschung unsere Arbeitsgruppe, auch unter meiner Beteiligung im Rahmen der Promotionsarbeit ebendort, dass die Gabe des Immuncheckpoint-Moleküls B- and T-lymphocyte attenuator (BTLA) den Verlauf einer experimentellen Glomerulonephritis abmildern kann. Gegensätzlich zeigen *Btla*^{KO}-Mäuse einen schwereren Verlauf einer experimentellen Glomerulonephritis, was zusammenfassend mutmaßlich mit der zentralen Rolle von BTLA in der T-Zell-Aktivierung zusammenhängt³⁶.

2.3.6. Reaktion der Podozyten auf inflammatorische Stimuli

Wie oben bereits beschrieben, sind Podozyten insbesondere an der Aufrechterhaltung der Integrität der glomerulären Filtrationsbarriere beteiligt. Podozyten können sich als entdifferenzierte Zellen nicht regenerieren bzw. erneuern, weshalb ein Verlust mit einem zunehmenden Nierenversagen assoziiert ist^{95,97}. In den letzten Jahren wurde zunehmend bekannt, dass Podozyten auch direkt in die Immunantwort im Rahmen von glomerulären Erkrankungen beteiligt sind. Grundlage hiervon ist, dass Podozyten eine Vielzahl an Rezeptoren zur Erkennung von molekularen Mustern von Krankheitserregern und Schädigungen exprimieren. Hierzu zählen neben den Toll-like Rezeptoren auch NOD-like Rezeptoren, RIG-I-like Rezeptoren und C-type lectin Rezeptoren⁶³. Interessanterweise exprimieren humane Podozyten alle Subgruppen der Toll-like Rezeptoren. Banas et al. beschrieben zusätzlich, dass TLR4 im Rahmen einer MPGN vermehrt exprimiert wird und eine Aktivierung des TLR4 zu einer vermehrten Ausschüttung von Chemokinen führt. Damit sind Podozyten sogar unmittelbar an der Aufrechterhaltung eines proinflammatorischen Milieus beteiligt¹². Auch in weiteren glomerulären Erkrankungen wurde die Rolle von podozytären TLR untersucht. Im Mausmodell der MPGN konnte exemplarisch gezeigt werden, dass eine glomeruläre Überexpression von TLR 9 mit einer vermehrten podozytären Schädigung assoziiert ist⁸⁸. Außerdem wurde bei der Lupusnephritis der podozytäre TLR9 in humanen

Proben nur unter Krankheitsaktivität nachgewiesen, nicht aber in gesunden Nieren bzw. unter Remission⁸⁴.

Neben der Beteiligung an der Immunantwort, scheinen podozytäre TLR-vermittelte Signalkaskaden auch an podozytärer Schädigung bzw. dem podozytären Verlust durch Zelltod beteiligt zu sein. So konnte gezeigt werden, dass Podozyten auf LPS mit einer Hemmung von PDK1 reagieren, was über den Akt-Signalweg zum Zelltod führen kann. Eine Hemmung des TLR-Signalweges (in diesem Fall spezifisch TLR 2/6 und 4) über ein spezifisches immunmodulatorisches Molekül (GIT27) konnte wiederum die Hemmung von PDK, und damit mutmaßlich die Induktion der Apoptose, verhindern¹²². Ähnliches konnte bei der spezifischen Aktivierung von TLR 9 beobachtet werden, wobei die Apoptose hier über den p38/MAPK- und NF-κB-Signalweg vermittelt wird¹³.

Ein weiterer PRR des angeborenen Immunsystems, welcher in Podozyten nachgewiesen ist, ist der sogenannte cyclic GMP-AMP synthase (cGAS)-stimulator of IFN genes (STING)-Signalweg (cGAS-STING). Eine Aktivierung dieses Signalwegs kann beispielsweise zu einer vermehrten Expression von APOL1 führen kann³⁵, was zumindest in bestimmten genetischen Varianten mit der Entwicklung einer FSGS assoziiert ist¹⁰⁰. In neueren Studien konnte gezeigt werden, dass eine Inhibierung von STING den Krankheitsprogress von diabetischer Nephropathie und Alport-Syndrom verlangsamen kann⁹¹.

Zudem scheinen Podozyten auch als Verbindung zum adaptiven Immunsystem als sogenannte Antigen-präsentierende Zelle (APC) zu fungieren. APCs sind dadurch klassifiziert, dass sie mittels des major histocompatibility complex (MHC) Antigene an der Zelloberfläche präsentieren und mit Hilfe einer zwingend notwendigen ergänzenden Stimulation T-Zellen aktivieren können^{55,60,96}. Es konnte gezeigt werden, dass eine podozytäre MHC-Expression die Induktion den Verlauf einer experimentellen GN abmildern kann⁵¹. Auch der weitere Aspekt einer APC wurde erfüllt, indem gezeigt werden konnte, dass Podozyten das kostimulierende Protein B7 exprimieren und in *B7*^{KO} Mäuse im Kontrast zur Kontrollgruppe auf die Injektion von LPS nicht mit einem nephrotischen Syndrom reagierten¹¹³.

Insgesamt erscheinen Podozyten somit unter Einbezug des angeborenen und adaptiven Immunsystem maßgeblich an lokalen Inflamationsprozessen beteiligt zu sein. Trotz der in den letzten Jahren deutlich zunehmenden Erkenntnisse bleibt die genaue Rolle der Podozyten und insbesondere des podozytären Toll-like Rezeptors weiterhin unklar.

2.4 Glomeruläre Forschung in der renalen Immunologie

2.4.1. Mausmodell der Glomerulonephritis

Um die Antwort der Podozyten auf eine Schädigung im Rahmen einer Glomerulonephritis zu untersuchen, benötigt man ein Modell zur Induktion einer glomerulären Inflammation. Ein Weg

zur Erforschung dieser ist die Induktion einer experimentellen Glomerulonephritis. Hierbei werden der Maus ein sogenanntes Nephrotoxisches Serum (NTS) über die Schwanzvene injiziert, wodurch eine nephrotoxische Nephritis (NTN) induziert wird. Dieses Modell spiegelt am ehesten die humane anti-GBM GN wider. Das NTS wird erzeugt, indem Glomeruli aus der Maus isoliert werden und dessen Bestandteile daraufhin einem Schaf injiziert werden. Dieses entwickelt daraufhin Antikörper gegen die Zellen und Strukturen, woraufhin diese Antikörper aus dem Serum des Schafes isoliert werden können. Nach Injektion des NTS in die Schwanzvene der Maus kommt es durch den glomeruläre Schaden über verschiedene Mechanismen sowohl zu einem histologischen als auch funktionellem Schaden mit einer Proteinurie als Zeichen der Schädigung des Filterapparats ¹⁵⁴. Der Verlauf der NTN wird für gewöhnlich in zwei Phasen eingeteilt: Zunächst folgt auf die Injektion der Antikörper die akute, heterologe Phase. Diese ist gekennzeichnet durch die Ablagerung der Antikörper am Glomerulus, wodurch das angeborene Immunsystem aktiviert wird und durch die Ausschüttung von proinflammatorischen Molekülen eine lokale Inflammation entsteht. Im Verlauf, für gewöhnlich nach ungefähr 7-10 Tagen, entwickelt sich dann die chronische, autologe Phase. Diese ist Ausdruck der systemischen, adaptiven Immunantwort und unter anderem gekennzeichnet durch Aktivierung von B-Zellen zur Bildung von Antikörpern gegen die initial applizierten Antikörper, welche sich eben diesen am Glomerulus anlagern. Dies kann den Verlauf der GN durch die Bildung von Immunkomplexen zusätzlich verstärken und beispielsweise zu einer sich verstärkenden Proteinurie führen ^{57,140,141}.

2.4.2. Präparation glomerulärer Zellen

Wie oben bereits beschrieben, bestehen Glomeruli aus unterschiedlichen Bestandteilen und Zellpopulationen. Insbesondere die Untersuchung von Genexpressionsprofilen erfordert eine hohe Spezifität der Zellpopulation, um eben diese Expressionsmuster nicht durch unspezifische Ergebnisse zu verfälschen. Im Falle von Podozyten ist es daher erforderlich, zunächst die Glomeruli zu isolieren und daraus dann folgend die Zellpopulation der Podozyten zu extrahieren. 2002 wurde von Takemoto et al. eine Methode beschrieben, mit Hilfe derer man nahezu alle Glomeruli aus Mausnieren isolieren kann. Grundlage dieser Isolation ist, dass es sich bei den Glomeruli um das erste Kapillarbett nach der Arteria renalis handelt. Hierfür werden den Mäusen nach Euthanasie die Nieren und deren blutversorgenden Gefäße inklusive der abdominalen Aorta entnommen. Die Nierenarterien werden anschließend mit kleinsten magnetischen Kugeln mit einem Durchmesser von wenigen μm (sog. Dynabeads, Thermo Fisher Scientific) perfundiert werden, welche sich aufgrund ihres geringen Durchmessers dann im ersten Kapillarbett der Nieren, dem glomerulären Kapillarbett, fangen. Daraufhin können die Nieren mechanisch und enzymatisch verdaut werden, wodurch die Glomeruli mit Hilfe eines Magneten isoliert werden können ¹³⁵. Mittels weiterer Verdauungsschritte können die Glomeruli dann in ihre einzelnen Zellen zerlegt werden, und

diese dann zum Beispiel mittels antikörpergetriggerten, Immunfluoreszenzfärbungen oder durch genetisch implementierte, intrinsisch exprimierte Fluorophore mittels Zellsortierung („fluorescent activated cell sorting“ (FACS)) getrennt werden und für weitere Untersuchungen genutzt werden ⁷³.

2.4.3. BulkRNA Sequenzierung

Bei der Bulk-RNA Sequenzierung handelt es sich um eine Methode zur Analyse eines Transkriptoms einer gepoolten Zellpopulation, wobei die durchschnittliche Expression der einzelnen Gene über alle Zellen zu einem Genexpressionsprofil zusammengefasst wird. Zunächst wird die RNA aus einer Zellpopulation extrahiert und in cDNA umgewandelt. Diese wird fragmentiert und dann sequenziert. Die resultierenden Sequenzen werden über Datenbanken bestimmten Genen zugeordnet und anschließend quantifiziert ^{92,138}. Um zu differenzieren, ob sich verschiedene experimentelle Proben in ihren Expressionsmustern unterscheiden bzw. sich gruppieren (sogenanntes Clustering), kann eine statistische Methode angewandt werden, die principal component analysis (PCA). Hierfür werden die hochkomplexen Datensätze runtergebrochen, indem die Varianz der Genexpressionsdaten betrachtet wird, und aus den größten Varianzen die beiden Hauptkomponenten berechnet werden (principal components). Nun kann man diese Hauptkomponenten für jedes Versuchstier auf einem Graphen darstellen und dahingehend analysieren, ob es zu einer Gruppierung der Versuchsgruppen kommt ^{68,115}.

2.5 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Die vorliegende Arbeit verfolgt zwei Ziele. Zum einen soll allgemein das Verständnis verbessert werden, wie Podozyten auf eine immunologisch getriggerte Schädigung reagieren und adaptieren. Zum anderen soll hierbei insbesondere die durch Brähler et al. geleistete Vorarbeit, welche die Auswirkung des NF- κ B-Signalweges in eben diesem Kontext untersucht haben, durch Analyse der Rolle des diesem vorgeschalteten Toll-like-Rezeptor-Signalweges fortgeführt werden, da diese eine zentrale Rolle in der Erkennung von Schädigungen und Initiierung von Immunantworten haben. Beide Faktoren – sowohl die spezifische Untersuchung einzelner Signalwege als auch die unspezifischere, aber umfassendere Untersuchung von Genexpressionsprofilen – können helfen, um in Zukunft möglicherweise spezifischere therapeutische Angriffspunkte identifizieren zu können und dadurch das Spektrum an therapeutischen Optionen zu erweitern.

Um diese Ziele zu erreichen, sollen im Detail die drei folgenden Fragestellungen beantwortet werden:

- 1. Welche Anpassungsmechanismen finden in Podozyten als Antwort auf eine Schädigung im Rahmen einer Glomerulonephritis statt?**

Wie zuvor bereits beschrieben, gibt es viele Studien, die sich mit der proinflammatorischen Rolle von Podozyten beschäftigen. Hierbei standen jedoch meist einzelne, spezifische Signalwege oder Moleküle im Vordergrund. Um diese eher allgemein formulierte Frage zu adressieren, nutzen wir ein durch unsere Arbeitsgruppe kurz vor Studienbeginn publiziertes Mausmodell⁷³, welches podozytenspezifisch ein Fluorchrom exprimiert und es uns so ermöglichte, Podozyten spezifisch zu isolieren. Diese können dann für die Sequenzierung der RNA genutzt werden, um darüber die podozytären Genexpressionsprofile zwischen gesunden und erkrankten Mäusen zu vergleichen. Dieser umfassende Ansatz über das podozytäre Transkriptom ermöglicht es, neben immunologischen Adaptationen auch die Veränderungen in anderen Zellkompartimenten besser zu verstehen.

2. Welchen Einfluss hat der podozytäre MYD88-abhängige Toll-Like-Rezeptor-Signalweg auf die physiologische Entwicklung der Nieren und wie beeinflusst er den Krankheitsverlauf im Krankheitsmodell?

Toll-like-Rezeptoren spielen eine entscheidende Rolle in der Aktivierung des angeborenen Immunsystems durch die Erkennung von Molekülen, die entweder mit Erregern und zellulären Schäden assoziiert sind. Ein zentraler Baustein des Signalwegs vieler Toll-like-Rezeptoren bildet das Adaptorprotein MYD88, welches das Signal der Toll-like-Rezeptoren über weitere Kaskaden bis an den Zellkern weitergibt, damit dort über Transkriptionsfaktoren entsprechende Adaptationen vorgenommen werden können. Um die Rolle dieses Signalwegs in Podozyten näher untersuchen zu können, wurde ein Mausmodell über Kreuzung etabliert, welches einen podozytenspezifischen Knock-out von *Myd88* aufweist. Zunächst erfolgt die Prüfung des Knock-outs, welcher Grundvoraussetzung des in-vivo Ansatz ist. Dem folgend wird überprüft, ob das Mausmodell im gesunden, basalen Zustand Einschränkungen entwickelt. Nach der Etablierung kann die Hypothese überprüft werden, ob und inwiefern der podozytenspezifische Knock-out von *hat Myd88* Einfluss auf den Krankheitsverlauf einer experimentellen Glomerulonephritis. Dies wird sowohl auf funktioneller als auch histologischer Ebene untersucht. Zudem nutzen wir hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie, um mittels computer-basierter Analyse die Veränderungen auf Ebene der Schlitzmembran zu untersuchen.

3. Inwiefern unterscheidet sich die Adaptation der Podozyten auf eine Glomerulonephritis ohne den MyD88-abhängigen Toll-Like-Rezeptor-Signalweg?

Nachdem das Mausmodell auf funktioneller Ebene analysiert ist, steht weiterhin die Frage im Raum, wie und ob Podozyten den Mangel an MYD88-abhängigem Signal ausgleichen können und ob es mögliche kompensatorische Signalwege gibt. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurde erneut eine Genexpressionsanalyse von isolierten Podozyten aus den Mäusen mit podozytärem *Myd88*-Knockout durchgeführt. Dieser Ansatz ermöglicht dann den Vergleich mit

dem Transkriptom aus Podozyten von gesunden Kontrollmäusen und erlaubt die Identifizierung alternativer Signalwege.

3. Publikation

“The podocytes’ inflammatory responses in experimental GN are independent of canonical MYD88-dependent toll-like receptor signaling”

www.nature.com/scientificreports

scientific reports

 Check for updates

OPEN The podocytes’ inflammatory responses in experimental GN are independent of canonical MYD88-dependent toll-like receptor signaling

Thomas Schömig¹, Paul Diefenhardt¹, Ingo Plagmann¹, Bastian Trinsch¹, Tim Merz¹, Giuliano Crispantu^{1,2}, David Unnersjö-Jess¹, Jasper Nies¹, David Pütz¹, Claudio Sierra Gonzalez¹, Bernhard Schermer^{1,2}, Thomas Benzing^{1,2}, Paul Thomas Brinkkoetter^{1,3} & Sebastian Brähler^{1,3}

Podocytes form the kidney filtration barrier and continuously adjust to external stimuli to preserve their integrity even in the presence of inflammation. It was suggested that canonical toll-like receptor signaling, mediated by the adaptor protein MYD88, plays a crucial role in initiating inflammatory responses in glomerulonephritis (GN). We explored the influence of podocyte-intrinsic MYD88 by challenging wild-type (WT) and podocyte-specific *Myd88* knockout (*MyD88^{pk0}*) mice, with a model of experimental GN (nephrotoxic nephritis, NTN). Next-generation sequencing revealed a robust upregulation of inflammatory pathways and changes in cytoskeletal and cell adhesion proteins in sorted podocytes from WT mice during disease. Unchallenged *MyD88^{pk0}* mice were healthy and showed no proteinuria, normal kidney function and lacked morphological changes. During NTN, *MyD88^{pk0}* exhibited a transient increase in proteinuria in comparison to littermates, while histological damage, podocyte ultrastructure in STED imaging and frequencies of infiltrating immune cells by flow cytometry were unchanged. MYD88-deficiency led to subtle changes in the podocyte transcriptome, without a significant impact on the overall podocyte response to inflammation, presumably through MYD88-independent signaling pathways. In conclusion, our study reveals a comprehensive analysis of podocyte adaptation to an inflammatory environment on the transcriptome level, while MYD88-deficiency had only limited impact on the course of GN suggesting additional signaling through MYD88-independent signaling.

Podocytes are highly specialized epithelial cells that constitute the core of the renal filtration barrier. Their limited capacity for regeneration underscores the importance of preserving their structure and function. Any impairment or loss of podocytes can result in reduced renal function, proteinuria, and eventually, end-stage kidney disease. In certain conditions like minimal change disease and membranous nephropathy, podocytes are directly damaged¹. In contrast, rapid and progressive glomerulonephritis (RPGN) primarily targets endothelial cells (e.g., anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated GN) or the glomerular basement membrane (anti-GBM-GN)^{2,3}. However, the subsequent infiltration of immune cells and production of proinflammatory cytokines during RPGN create a highly inflammatory environment, which eventually harms podocytes⁴.

We have recently demonstrated that a podocyte-specific knockout of the NF- κ B-essential modulator (NEMO), a central molecule of the pro-inflammatory NF- κ B signaling cascade, can reduce proteinuria in a model of experimental GN (nephrotoxic nephritis, NTN) by decreasing the secretion of inflammatory cytokines⁵. Moreover we found that signaling through NEMO causes alterations of the actin cytoskeleton through small GTPases of the Rho family⁶. Despite the association between most glomerular diseases and a pro-inflammatory environment,

¹Department II of Internal Medicine and Center for Molecular Medicine Cologne, University of Cologne and University Hospital Cologne, Cologne, Germany. ²Cluster of Excellence Cellular Stress Response in Aging-associated Diseases (CECAD), Faculty of Medicine and University Hospital Cologne, University of Cologne, Cologne, Germany. [✉]email: paul.brinkkoetter@uk-koeln.de; sebastian.braehler@uk-koeln.de

the mechanisms by which podocytes detect and respond to these stimuli are not fully understood. Toll-like receptors (TLRs) are among the most prominent receptor families responsible for transmitting inflammatory signals to cells, comprising 10 members in humans and 13 members in rodents⁷. These signaling pathways can be divided into two distinct classes based on their downstream adaptor proteins.

The TIR domain-containing adaptor-inducing IFN β (TRIF)-dependent pathway, which is activated by TLR3 and TLR4, is primarily active in macrophages and dendritic cells to create type 1 interferon responses^{8,9}. TLR1,2,5–9 signaling, on the other hand, leads to the activation of myeloid differentiation factor 88 (MYD88) dependent pathways. MYD88, a cytoplasmic adaptor protein, is not only central in TLR signal transduction, but is also involved in IL-1R signaling, acting via IRAK1, IRAK4, IRF7, TRAF6 and NEMO to ultimately activate NF- κ B-dependent gene products^{7,10}. As a result, TLR stimulation induces the transcription of pro-inflammatory cytokines such as IFN α , IL-6, IL-1 β , TNF α as well as chemokines such as IP-10 and MIG^{10,11}.

Within the kidney, TLRs are found in various cell types, including podocytes, and can be triggered by different stimuli like lipid A and fibrinogen¹². Furthermore, in murine models of glomerular inflammation such as cryoglobulinemic MPGN and streptozotocin-induced diabetic nephropathy, an increase in TLR expression within the kidney is observed as the disease progresses. Depleting TLR2 and TLR4 has been shown to reduce renal inflammation in these models^{13–15}. Notably, studies in a murine model of membranoproliferative GN revealed a connection between disease severity and the expression of TLR9 in the periglomerular area¹⁶. In humans, TLR2 and TLR4 are predominantly found in endothelial cells and podocytes, whereas TLR9 is almost exclusively localized in podocytes. Patients with ANCA-associated GN exhibited a significant upregulation of these TLRs. Intriguingly, the expression levels of TLR2 and TLR4 correlate with both the extent of histological damage and decline in renal function, suggesting that TLR signaling plays a central role in human disease¹⁷.

TLR signaling through MYD88 is known for its central role in initiating the NF- κ B pathway and activating the innate immune response. However, there is a lack of experimental evidence regarding the functional role of TLR signaling in podocytes. In this study, we aimed to investigate the transcriptomic response of podocytes during glomerular inflammation and to assess the influence of MYD88-dependent signaling in podocytes under both healthy and diseased conditions.

Materials and methods

Animals

Myd88^{lox} mice were a kind gift from Manolis Pasparakis¹⁸. They were mated with our recently published *Nplis2.2a.iCre.2a.mTomato* (*Pod*^{TOM}) mouse, which combines podocyte-specific Cre-expression with expression of the fluorophore mTomato¹⁹. Mice were kept on a C57BL/6N background and housed under specific pathogen-free conditions. Animal experiments were performed according to national and institutional animal care and ethical guidelines (Animal welfare office, University of Cologne, Germany) and were approved by the State office of North Rhine-Westphalia, Germany, Department of Nature, Environment and Consumer protection (LANUV NRW, approval AZ 81-02.04.2019.A085).

Animal experiments and functional studies

Groups of *Pod*^{TOM} \times *Myd88*^{lox/lox} mice (referred to as *Myd88*^{pkko}) and *Pod*^{wt/wt} \times *Myd88*^{lox/lox} littermate controls (referred to as WT) were analyzed between the ages of 8–52 weeks. NTN was induced in 8- to 16-weeks old, male *Myd88*^{pkko} and WT controls by tail vein injection of 9 μ l per gram body weight of nephrotoxic sheep serum (PTX-001 Sheep Anti-GBM, Probetex Inc., Texas, USA) on two consecutive days. The dosage of this batch of nephrotoxic serum was based on a recent publication²⁰. Organs were harvested at the time points indicated in the figures and in the figure legends after cardiac perfusion with cold PBS. For fluorescent activated cell sorting (FACS), *Myd88*^{pkko} mice and *Pod*^{TOM} controls were used. All methods are reported in accordance with the ARRIVE guidelines.

Albuminuria was determined in spot urine by standard ELISA (Bethyl Laboratories). Urinary creatinine was measured using a standard assay (Cayman Chemicals). BUN was measured using standard laboratory methods or colorimetric assay (Cayman Chemicals).

Morphometric studies

For histology, 2 μ m sections of FFPE kidney tissues were stained with periodic-acid-Schiff and acid Fuchsin Orange G following standard protocols. For immunohistochemistry, 4 μ m thick sections were blocked with peroxidase blocking buffer and Avidin/Biotin Blocking Kit (SP-2001, Vector Laboratories), stained with antibodies directed against WT1 (abcam, clone CAN-R9(IHC)-56-2, diluted 1:1000), and developed using an HRP immunodetection Kit (Vectastain Elite ABC anti-mouse Kit) and DAB staining solution (DAB Substrate Kit, Vector Laboratories). 25 glomerular cross-sections per kidney section were analyzed in a blinded fashion, and the positive cells were counted manually. For IF, mouse kidneys were frozen, and embedded in Tissue-Tek OCT (Sakura). Sections were fixed with 4% PFA and blocked using 5% normal donkey serum with 0.1% Triton-sodium azide. Slides were incubated with antibodies against Podocin (P0372, Sigma-Aldrich) and Cy3 coupled donkey anti-sheep-IgG (Jackson ImmunoResearch), followed by AF488 coupled donkey anti-rabbit antibody for 1 h at room temperature (Jackson Immuno Research) and mounted with ProLong Gold Antifade Reagent with DAPI (Invitrogen). IF was analyzed using a Zeiss Apotome 2 microscope.

Stimulation emission depletion (STED) microscopy and semi-automated quantification of slit diaphragm length

The protocol was performed as previously described²¹. Briefly, formalin-fixed kidney tissue was incubated in hydrogel solution (4% vol/vol acrylamide, 0.25% wt/vol VA-044 initiator, and PBS) and cut using a Vibratome.

Sections were incubated in clearing solution (200 mM boric acid and 4% SDS, pH 8.5) for 16 h at 50 °C and thereafter washed in 0.1% Triton X in PBS (PBST). Cleared sections were incubated with primary antibodies at 37 °C for 24 h followed by secondary antibodies (24 h at 37 °C). A rabbit anti-Podocin primary antibody (catalog no. P0372; RRID: AB_261982; 1:100; Sigma-Aldrich) and a donkey anti-rabbit Abberior STAR 635P secondary antibody (1:50) were used to stain for Podocin. The secondary antibodies were conjugated as follows: fluorophores (Atto-594 NHS ester; catalog no. 08741; Sigma-Aldrich or Abberior STAR 635P NHS ester; catalog no. 07679; Sigma-Aldrich) were conjugated to a donkey anti-rabbit IgG (catalog no. A16037; RRID: AB_2534711; Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany), 1 M NaHCO₃ was added at a dilution of 1:10 to ensure basic conjugation conditions. The fluorophores were dissolved in DMSO at a concentration of 10 mg/ml. Fluorophores and antibodies were mixed at a 20-fold molar excess of fluorophores and incubated on a shaker (1 h at room temperature). A centrifugal filter (Amicon Ultra 0.5 centrifugal filter 30-MW cutoff; catalog no. UFC5030; Sigma-Aldrich) and centrifugation at 14,000×g (10 min) was used to remove the excess fluorophores. After filling up with PBS containing 0.1% sodium azide, the centrifugation step was repeated, and PBS containing 0.1% sodium azide was added for a final antibody concentration of 1 mg/ml. Morphometric analyses of the STED images and semi-automated detection and quantification were performed with ImageJ/Fiji software using a recently published algorithm^{21,22}.

Renal leukocyte isolation

Kidneys were minced and incubated in digestion medium (RPMI 1640 medium containing 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, 250 µg/ml Collagenase B, and 30U/ml DNase) at 37 °C for 45 min, then dissociated using the gentleMACS dissociator (Miltenyi Biotec). Percoll gradient (37% Percoll; GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Great Britain) centrifugation was performed. The leukocyte layer was carefully aspirated and transferred to a 96-well plate or flow cytometry tubes for antibody staining.

Staining for flow cytometry

Cells were pre-incubated with anti-CD16/32 antibody (Biolegend) for 5 min at 4 °C. Fluorochrome-labeled antibodies were added and incubated for 30 min at 4 °C. The following antibodies were used for stainings: anti-CD45 (30-F11), anti-CD19 (1D3) purchased from BD Bioscience, anti-CD4 (GK1.5), anti-CD8a (53-6.7), anti-TCRb (H57-597), anti-CD11b (M1/70), anti-F4/80 (BM8), anti-NK1.1 (PK136), anti-Ly6C (HK1.4) and anti-Ly6G (1A8) all purchased from Biolegend. Zombie Aqua staining (Biolegend) was used to exclude dead cells during flow cytometry. Data was acquired on a BD LSR Fortessa Cytometer (BD Bioscience).

Podocyte isolation and RNA isolation

Podocytes were isolated from the kidneys as previously described²³. Kidneys were harvested, and both renal arteries were dissected. Kidneys were perfused with 2 ml of Dynabeads solution (Dynabeads M-450 tosylactivated, Thermo Fisher Scientific) through the renal artery. After mincing, an enzymatic digestion was performed with Collagenase II (300U/ml, Worthington), Pronase E (1 mg/ml, Sigma-Aldrich) and DNase I (50 U/µl, Applichem) at 37 °C for 15 min. After sieving through a 100 µm strainer, glomeruli were isolated using a DynaMag magnet (DynaMag-2, Invitrogen). Glomeruli were then disrupted through a combination of enzymatic digestion and manual disruption by repetitive pipetting for 45 min at 37 °C. After sieving through a 40 µm cell strainer, cells were stained with DAPI and sorted using a BD FACSAria III (BD Bioscience). Living podocytes were defined as DAPI⁺mTomato⁻. Flow cytometry of isolated glomeruli revealed 85.67% living cells, of which 19.88% were podocytes. RNA was isolated following manufacturers protocol (RNAqueous Micro-Kit, Thermo Fisher Scientific). Extraction quality control was performed using the Agilent 2200 TapeStation.

Pre-amplification, library prep and RNA sequencing

Due to the low amount of input material, pre-amplification using the Ovation RNASeq System V2 was performed. cDNA synthesis, library preparation and quantification was performed as was described previously²⁴. Sequencing was performed on a NovaSeq 6000 sequencing instrument with a 2 × 100 bp paired-end sequencing setup.

Bulk RNA-sequencing analysis

After demultiplexing, adapters were trimmed using cutadapt 3.5. Reads were then pseudoaligned to the mm10 / GRCm38 reference genome using kallisto-0.43.1²⁵. Differential isoform expression analysis was conducted using sleuth-0.3.0 (R-3.5.0)²⁶. Ensembl v90 was used to annotate transcripts, while pathway analysis was facilitated using ConsensusPathDB-r35 with default settings (Pathway-based sets; minimum overlap with input list: 2; p-value cutoff: 0.01). Unannotated genes were removed from further analysis.

Quantitative PCR for isolated podocytes and renal cortex

Total RNA was extracted from isolated podocytes as described above and from renal cortex using Direct-zol RNA Miniprep kit (R2050, Zymo Research, Irvine, USA), and then reverse transcribed into cDNA using High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific). Quantitative PCR was performed on an Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System with standard protocol and following TaqMan gene expression assays (Thermo Fisher Scientific): *Myd88* (Mm00440338_m1), *Ccl2* (Mm00441242_m1), *Ilib* (Mm00434228_m1) and *Actb* (Mm02619580_g1) as the internal control for normalization. Data were analyzed using the $\Delta\Delta Ct$ method.

Results

Bulk RNA sequencing of sorted podocytes reveals profound transcriptional changes in cytoskeletal, adhesion and proinflammatory pathways during GN

To gain a comprehensive insight into the transcriptional changes during experimental GN, bulk-RNA sequencing was performed on sorted podocytes under healthy conditions and on day 5 after NTN induction. FACS was facilitated by the expression of mTomato under the control of the podocin promoter¹⁹. Principal component analysis (PCA) confirmed the clustering of podocytes into their respective experimental group (Fig. 1A). A total of 2915 transcripts were upregulated, and 2328 were downregulated (Fig. 1B, C). We analyzed the top 100 most

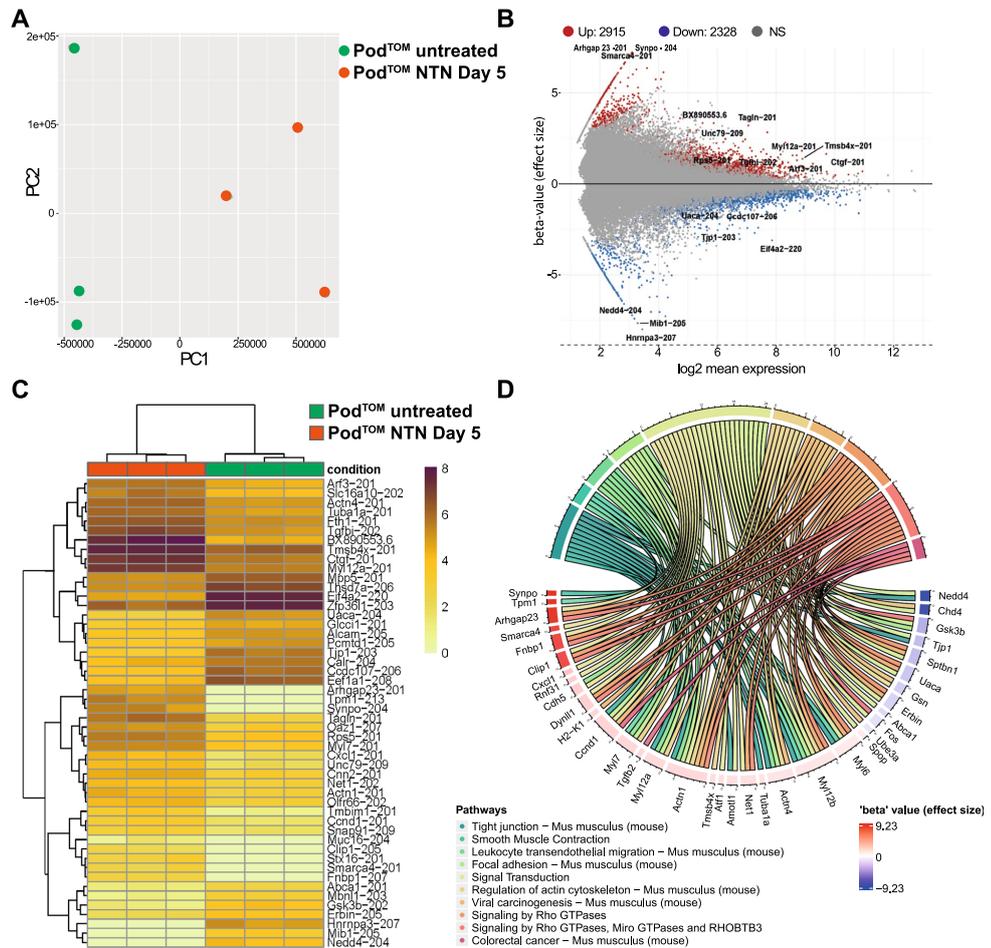


Figure 1. Bulk RNA sequencing of sorted podocytes under healthy conditions (Pod^{TOM} untreated) and on day 5 after NTN induction (Pod^{TOM} NTN Day 5) reveals profound transcriptional changes in cytoskeletal, adhesion and proinflammatory pathways during GN. (A) Principal component analysis of podocytes from healthy and nephritic mice reveals robust clustering into healthy (n = 3) and injured conditions (n = 3). (B) MA-Plot of differentially and significantly expressed genes (adj. p-value < 0.05) reveals 2915 up- and 2328 downregulated genes in Pod^{TOM} NTN Day 5 vs. Pod^{TOM} untreated podocytes. If multiple transcripts were present, only the one with CCDS entry, high transcript support level and highest effect size (in that order) was considered. (C) Heatmap of the top 50 regulated genes with adj. p-value < 0.05. (D) Chord plot of the top 100 significantly enriched biological pathways (q-value < 0.1) linked among the 100 top-regulated genes ordered by their beta-value (effect size).

significantly up- and downregulated genes (sorted by ascending adjusted p-value) enriched in pathway-based GO terms. This analysis revealed a pronounced upregulation of genes associated with the actin cytoskeleton and its regulation. Key genes, such as *Actn1*, *Actn4*, *Fnbp1* and *Arhgap23*, which are critical for actin cytoskeletal organization and remodeling through small Rho GTPases, along with genes pivotal for cell contractility like *Tpm1*, *Myl12b*, *Myl6* were significantly upregulated. This upregulation reflects the extensive structural remodeling observed in podocytes, known as foot process effacement (Fig. 1D). Notably, *Synpo*, an actin-associated protein, was the most differentially expressed gene, underscoring the recently described protective function in adriamycin-induced podocyte injury²⁷. Among the most differentially expressed genes was *Cxcl1*, encoding a potent chemoattractant for neutrophil granulocytes as well as other chemokine genes including *Tgfb2*, *Cxcl10*, *Cxcl12* and *Cxcl15* (Fig. 5E). Among the TLR genes, *Tlr1*, *Tlr2*, and *Tlr4* were significantly upregulated whereas *Tlr7* was downregulated. *Tlr3*, which is associated with the MYD88-independent pathway, was not regulated.

Maintenance of podocyte function and structure is independent of MYD88

To investigate the role of MYD88-dependent TLR signaling in podocytes during renal homeostasis and glomerular inflammation, mice with a podocyte-specific knockout of *Myd88* were generated ($\text{Pod}^{\text{Tomato}} \times \text{Myd88}^{\text{fllox/fllox}}$ = MyD88^{pk0}) and compared with healthy littermate controls (*Myd88*^{fllox/fllox} = WT). Successful knockout of *Myd88* in mice was confirmed by qPCR of sorted podocytes (Fig. 2A). MyD88^{pk0} mice were observed up to 52 weeks of age and remained viable and fertile, showing no overt phenotype. Confirming these observations, no proteinuria or elevated blood urea nitrogen (BUN) levels were detected in mice up to 52 weeks of age (Fig. 2B and Supplemental Fig. 1). Morphologically, glomeruli appeared normal in PAS stainings and had no changes in the expression of the slit diaphragm protein podocin (Fig. 2C, D). As light microscopy is prone to miss subtle changes in podocyte architecture and slit diaphragm morphology, we employed stimulated emission depletion (STED) microscopy in combination with a recently published semi-automated quantification algorithm to quantify SD length and morphology, revealing no differences in MyD88^{pk0} mice compared to age-matched wild type control mice (Fig. 2E)²⁴.

MYD88-deficiency in podocytes does not influence the course of experimental glomerulonephritis

Having shown that MYD88 in podocytes is dispensable for renal homeostasis and the maintenance of podocyte function and structure, we next aimed to investigate its role in glomerular inflammation. To this end, NTN was induced in MyD88^{pk0} mice and WT controls. IF staining for podocin and sheep IgG 10 days after disease induction confirmed equal glomerular binding of nephrotoxic sheep IgG in both control and MyD88^{pk0} mice (Supplemental Fig. 2A). After NTN induction, MyD88^{pk0} and littermates developed proteinuria, with a significant but only transient increase in proteinuria seen in MyD88^{pk0} mice at day 10 (Fig. 3A). Both, control and MyD88^{pk0} mice, showed similar numbers of WT1-positive cells at day 10 of NTN indicating no increased podocyte loss (Fig. 3B). In line, we observed similar extent of histological damage in PAS and AFOG stained kidney sections (Fig. 3C). STED microscopy revealed comparable shortening of the slit diaphragm in nephritic MyD88^{pk0} and WT controls, indicating similar levels of foot process effacement. Of note, despite declining proteinuria on day 21 of NTN, the extent of morphological changes in the foot processes persisted at this late stage of disease (Fig. 3D, E and Supplemental Fig. 2B).

In line with the unchanged functional and histological parameters, no differences were observed in the number of renal macrophages, monocytes, NK cells, B cells, CD4⁺ T helper cells and CD8⁺ cytotoxic T cells (Fig. 4A, B). In addition, transcript levels of *Ccl2* and *Il1-β*, two proinflammatory signaling molecules, did not differ between the groups using qPCR (Fig. 4C).

Bulk RNA sequencing of nephritic MyD88^{pk0} podocytes reveals MYD88 independent signaling pathways in NTN

Considering the profound transcriptional changes in podocytes during NTN, including NF-κB dependent genes, the apparent absence of a renal phenotype in MyD88^{pk0} mice pointed towards a potential compensatory mechanism. To pin down potential genes involved, we compared the transcriptome from nephritic mTomato-positive podocytes ($\text{Pod}^{\text{Tomato}}$) (one of the groups from Fig. 1) with the transcriptome of nephritic MyD88^{pk0} mice.

Compared to $\text{Pod}^{\text{Tomato}}$ podocytes, *Myd88* deficient podocytes showed a similar expression profile during NTN, with only 125 significantly upregulated and 111 significantly downregulated genes (Fig. 5A, B). Pathway-based analysis of transcriptional changes indicated a subtle downregulation in the expression of genes important for integrity and function of tight junctions, including *Scrib*, *Synpo*, *Myh9*, *Actg1*, *Actn1* except for *Myl12a*, which did not follow this trend (Fig. 5C, D).

A more detailed analysis of chemokines and cytokines revealed a similar pattern of expression between injured MyD88^{pk0} and $\text{Pod}^{\text{Tomato}}$ podocytes and their respective healthy controls, suggesting a compensatory mechanism for the *Myd88* deficiency. Analysis of TLR receptors and downstream signaling molecules revealed an increase in gene expression for TLR3 and transcription factor IRF3 along with IRF3 targets like *Irf44* and *Ift1* suggesting the presence of MYD88 independent signaling (Fig. 5E). In addition, glomerulonephritis caused the differential expression of various genes related to the type I interferon mediated signaling pathway, including an upregulation of *Irf3*, *Iftm3*, *Ifnar2* and *Wnt5a* (Suppl. Figure 4).

Discussion

Upon injury, podocytes undergo profound structural changes, including flattening of their foot processes, a phenomenon referred to as foot-process effacement. How podocytes sense external inflammatory stimuli is incompletely understood. In addition to their role as signal receivers, podocytes have the capacity to emit signals into

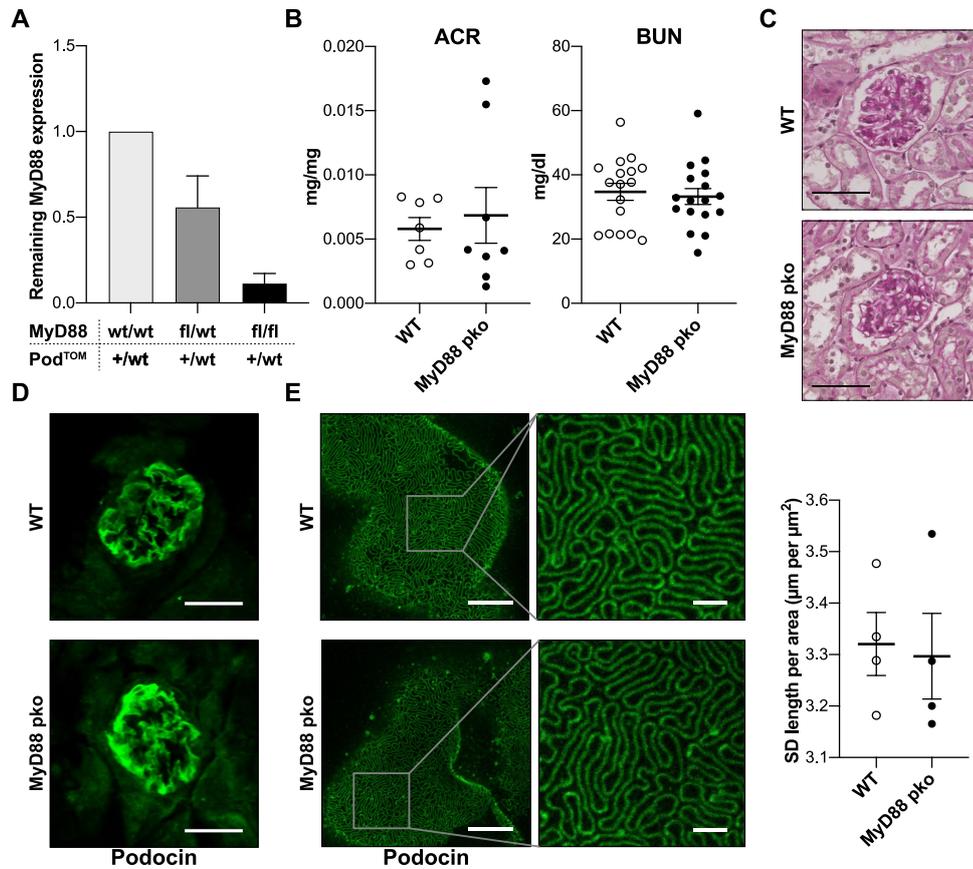


Figure 2. Maintenance of podocyte function and structure is independent of MYD88. **(A)** Real time qPCR for *Myd88* expression in podocytes isolated by FACS using the podocyte-specific mTomato fluorochrome of mice with heterozygous Podocin.2a.iCre.2a.mTomato (Pod^{Tom}) background. Comparison between mice with following additional genotypes: *Myd88* wild type (wt/wt) (n = 3), heterozygous *Myd88* flox (fl/wt) (n = 3) and *Myd88* flox/flox (fl/fl, MyD88^{pko}) (n = 3). The analysis reveals a sufficient podocyte-specific depletion of *Myd88* in MyD88^{pko} mice compared to MyD88^{wt/wt}, and a partial *Myd88* knockdown in MyD88^{fl/wt} mice. **(B)** No significant difference in baseline kidney function is observed in albumin-to-creatinine ratio (ACR, n = 7 vs. 8) and blood urea nitrogen levels (BUN, n = 17 each) of 8–14 weeks old (n = 17 vs. 17), untreated male WT and MyD88^{pko} littermates. **(C)** Representative pictures of PAS stainings showing no glomerular abnormalities in untreated MyD88^{pko} and WT mice. Scale bars 30 µm. **(D)** Additionally, no difference is seen in baseline immunofluorescence staining for the slit diaphragm protein podocin (Scale bar: 30 µm). **(E)** Representative images of STED microscopy and quantification of slit diaphragm length of healthy MyD88^{pko} mice (n = 4) and wild type littermate controls (n = 4). Scale bar overview: 5 µm. Scale bar high magnification: 1 µm.

their surroundings, thereby orchestrating the integrity of the glomerulus. One of the most prominent signaling molecules originating in podocytes is VEGF1, which plays a vital role in maintaining the health of glomerular endothelial cells²⁸. In addition, podocytes are responsible for generating NF-κB-dependent pro-inflammatory signals, which actively contribute to the progression of murine crescentic glomerulonephritis⁵.

To understand the adaptive changes in the podocyte transcriptome during GN, we conducted bulk RNA sequencing of sorted podocytes from mice undergoing NTN and their healthy littermates. Injured podocytes displayed significant regulation of genes associated with the control of the actin cytoskeleton. The most enriched GO-terms were linked to the regulation of cell–cell interactions, including tight junctions and focal adhesions, as well as components of the cytoskeleton and signaling pathways involving Rho GTPases. These results highlight the significance of dynamic changes in podocyte structure during the diseased state. Among the genes that were

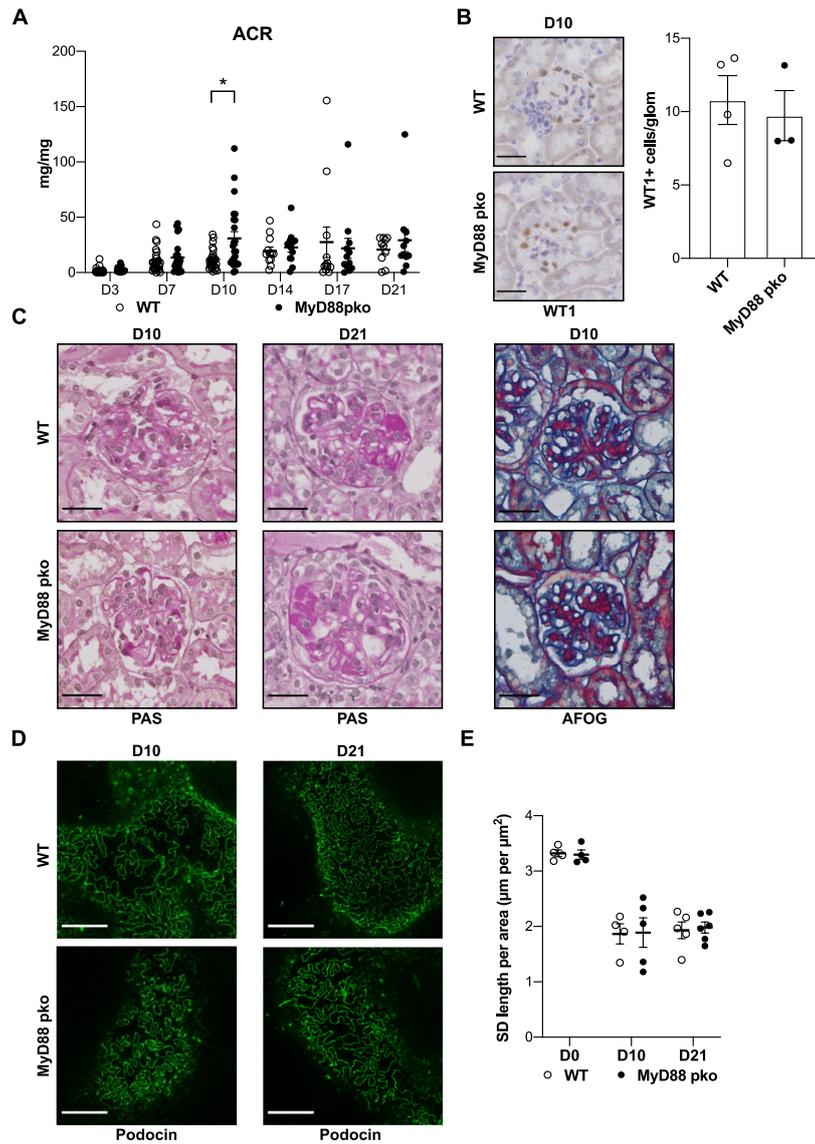


Figure 3. MYD88-deficiency in podocytes does not influence the course of experimental glomerulonephritis. (A) Albumin-to-creatinine ratio (ACR) shows a significant albeit transient increase of proteinuria in MyD88^{pko} mice 10 days after NTS injection (Day 3–10: n = 24 each. Day 14–21 n = 12 each). **p* < 0.05, unpaired t-test. (B) Quantification of WT1 positive cells per glomerulus. Depicted is the mean with SD of WT (n = 4) vs MyD88^{pko} (n = 3) (C) Representative PAS stainings at day 10 and day 21 of NTN showing PAS-positive glomerular deposits in both groups. Additionally, AFOG staining reveals no difference in glomerular fibrosis at day 10 after injection. Scale bars: 30 μm. (D) Representative pictures of STED microscopy showing changed morphology of the slit diaphragm at day 10 and 21 of NTN with reduced slit diaphragm coverage of basal membrane. Scale bars: 5 μm. (E) Semi-automated quantification of the slit diaphragm coverage per area showing a significant reduction in coverage at indicated time points after NTN induction compared to untreated mice (D0), but no significant difference between MyD88^{pko} mice and wild type controls (D0: n = 4 each, D10: n = 4 vs. 5, D21: n = 5 vs. 6).

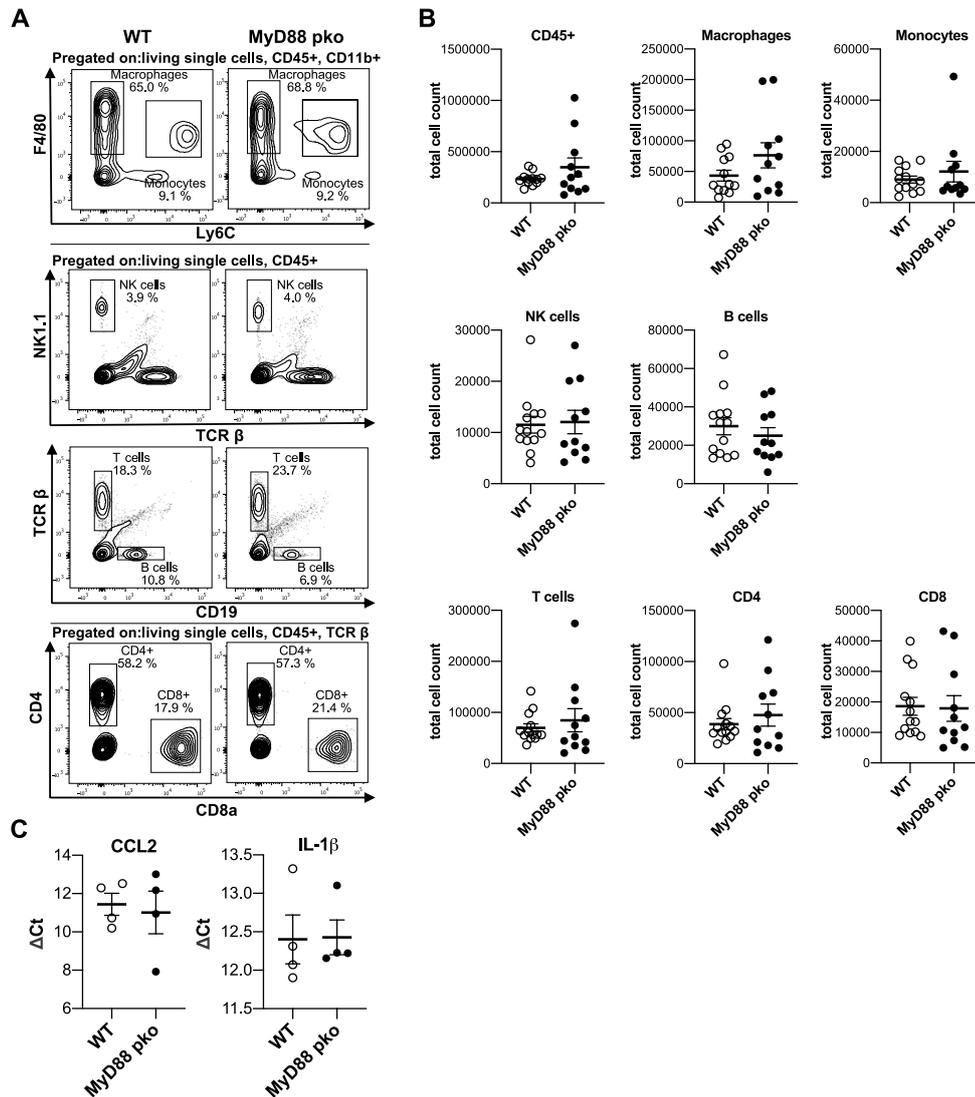


Figure 4. Absence of MYD88 signaling in podocytes has no impact on the composition of renal immune cells during NTN. (A) Gating strategy for flow cytometry analysis of indicated immune cell subsets in the kidney of MyD88^{pk0} (n = 12) and WT mice at day 10 of NTN (n = 13). (B) Flow cytometry analysis shows no difference in leucocyte numbers (CD45⁺) at day 10 after induction, as well as no difference in the following immune cell subsets: macrophages (CD45⁺ CD11b⁺ F4/80⁺ Ly6C⁺), monocytes (CD45⁺ CD11b⁺ F4/80^{int} Ly6C⁺), NK cells (CD45⁺ NK1.1⁺ TCRβ⁺), B cells (CD45⁺ CD19⁺ TCRβ⁺), T cells (CD45⁺ TCRβ⁺) and the T cell-subsets T helper cells (CD45⁺ TCRβ⁺ CD4⁺ CD8⁻) and cytotoxic T cells (CD45⁺ TCRβ⁺ CD8⁺ CD4⁻). (C) Real time qPCR for *Ccl2* and *Il-1β* normalized to *Actb* in kidney cortex reveals no difference for general pro-inflammatory signaling between MyD88^{pk0} (n = 4) and controls (n = 4).

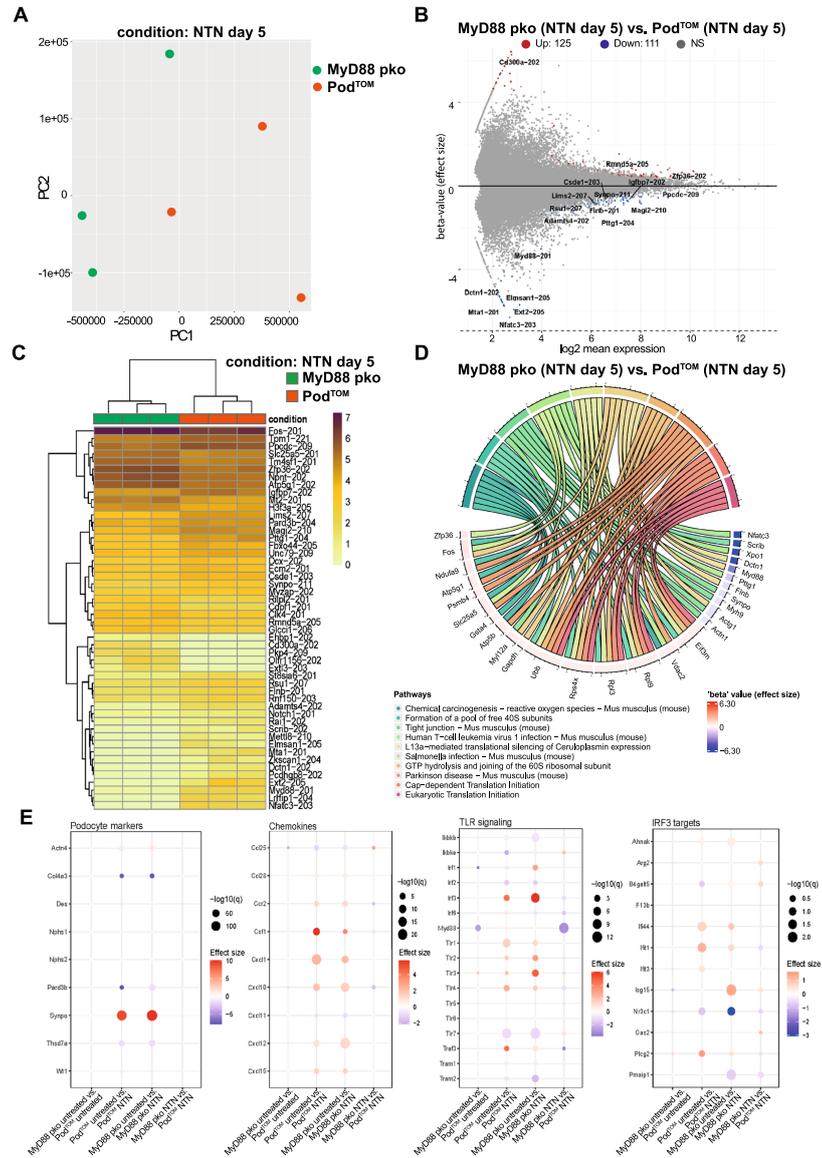


Figure 5. Bulk RNA sequencing of nephritic MyD88^{pko} podocytes reveals MyD88 independent signaling pathways in GN. (A) Principal component analysis of podocytes isolated from nephritic mice at day 5 after NTS injection with intact MyD88 signaling (Pod^{TO}M) (n = 3) and nephritic mice with podocyte specific Myd88 knock out (MyD88^{pko}) (n = 3). (B) MA-Plot of differentially and significantly expressed genes (adj. p-value < 0.05) genes reveals 125 up- and 111 downregulated genes. If multiple isoforms were present, only the one with CCDS entry, high transcript support level and highest effect size (in that order) was considered. (C) Heat map of the top 50 regulated and significant genes (adj. p-value < 0.05). (D) Chord plot of top 10 significantly enriched pathways (q-value < 0.1) linked among the 100 top-regulated genes ordered by their beta-value (effect size). (E) Expression profiles of podocyte markers, cytokine receptors, chemokines/cytokines and members of the TLR signaling pathways for the indicated comparisons between groups (p-value < 0.05).

notably upregulated, we observed the actin bundling molecule synaptopodin, as well as ARHGAP23 and tropomyosin 1 presumably representing an attempt to stabilize the podocyte actin cytoskeleton. Synaptopodin and tropomyosin were found to work in concert to presumably reinforce RhoA activity^{29,30}. ARHGAP23, a relatively lesser-known Rho-GAP, was recently discovered to stabilize neuronal synapses by deactivating RAC1²¹. While the role of ARHGAP23 in podocytes remains unclear, its substantial upregulation suggests potential importance, especially considering the impact of other ARHGAPs like ARHGAP24 on the podocyte cytoskeleton³². Mice expressing constitutively active RAC1 develop rapid onset proteinuria, foot process effacement, and increased motility^{33,34}.

As expected, several genes encoding for pro-inflammatory chemokines, such as *Cxcl1*, were significantly upregulated in the inflamed condition. CXCL1 is an NF- κ B-dependent potent neutrophil chemoattractant that was found to be expressed in *Actn4* KO podocytes and upregulated in FSGS kidney biopsies³⁵. Among the most downregulated genes, the E3-ubiquitin ligase NEDD4 was recently found to be involved in ubiquitin-mediated proteasomal degradation of nephrin³⁶. Therefore, this downregulation might represent an attempt to stabilize nephrin under stress.

As TLRs are among the most important sensors of an inflammatory environment, it was unexpected that a knockout of the central adaptor protein MYD88 in podocytes did not result in a significant alteration of experimental GN, especially as a podocyte-specific knockout of the NF- κ B adaptor NEMO resulted in a significant attenuation of GN⁵. There are two plausible explanations for this observation. On the one hand, reducing podocyte-intrinsic MYD88-dependent TLR signaling alone may have minimal impact on the highly inflammatory environment during NTN, which is primarily orchestrated by endothelial cells and leukocytes. On the other hand, it is possible that the existence of MYD88-independent signaling pathways upstream of the NEMO/Ikka/Ikk β complex compensate for the loss of MYD88. In this context, TLR3 and TLR4 signaling may be important, as both can activate NF- κ B signaling and Type I interferon responses via IRF3 independently of MYD88^{8,9}. Indeed, we observed an induction of *Irf3* and its downstream targets, *Irfi44* and *Irfi1*, with a significant differential expression of *Isg15* when comparing nephritic and healthy MyD88^{ko} mice. While our study suggests the potential involvement of IRF3-related signaling in podocyte injury, this finding has to be confirmed experimentally in future studies. The identification and a better understanding of these compensatory processes is important for our understanding of the role of podocytes in the pathophysiology of inflammatory glomerular diseases and for the development of more specific therapeutic strategies. The recently published *Irf3*^{lox} mouse now offers the opportunity to investigate the role of this molecule and interferon-related signaling specifically in podocytes in detail³⁷.

Another limitation of our study is the use of a single disease model, as MYD88 might have context-dependent functions in podocytes. While our model causes glomerular injury by the deposition of immune complexes, the cytotoxic adriamycin model might be more suitable to analyze the impact of MyD88 on podocyte survival in future studies.

In summary, our study is the first to inhibit MYD88-dependent TLR signaling specifically in podocytes. In addition to shedding light on the adaptive mechanisms involved in immune-complex-mediated podocyte injury, this study highlights the significance of MYD88-independent signaling pathways in recognizing and responding to cellular injury. This prompts the question of whether these pathways might be potential therapeutic targets in the future.

Data availability

Bulk RNA-seq data is available at Gene Expression Omnibus (GEO) with accession number GSE222625. Other data underlying this article is either available in the article and its supplementary material or will be shared on a reasonable request to the corresponding author.

Received: 16 November 2023; Accepted: 20 January 2024

Published online: 27 January 2024

References

1. Benzing, T. & Salant, D. Insights into glomerular filtration and albuminuria. *N. Engl. J. Med.* **384**, 1437–1446 (2021).
2. McAdoo, S. P. & Pusey, C. D. Anti-glomerular basement membrane disease. *CJASN* **12**, 1162–1172 (2017).
3. Kitching, A. R. *et al.* ANCA-associated vasculitis. *Nat. Rev. Dis. Primers* **6**, 1–27 (2020).
4. Kurts, C. & Meyer-Schwesinger, C. Protecting the kidney against autoimmunity and inflammation. *Nat. Rev. Nephrol.* **15**, 66–68 (2019).
5. Brähler, S. *et al.* Intrinsic proinflammatory signaling in podocytes contributes to podocyte damage and prolonged proteinuria. *Am. J. Physiol.-Renal Physiol.* **303**, F1473–F1485 (2012).
6. Brähler, S. *et al.* The NF- κ B essential modulator (NEMO) controls podocyte cytoskeletal dynamics independently of NF- κ B. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **309**, F617–626 (2015).
7. Duan, T., Du, Y., Xing, C., Wang, H. Y. & Wang, R.-F. Toll-like receptor signaling and its role in cell-mediated immunity. *Front. Immunol.* **13**, 812774 (2022).
8. Fitzgerald, K. A. *et al.* LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF- κ B involves the toll adapters TRAM and TRIF. *J. Exp. Med.* **198**, 1043–1055 (2003).
9. Yamamoto, M. *et al.* Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* **301**, 640–643 (2003).
10. Deguine, J. & Barton, G. M. MyD88: A central player in innate immune signaling. *F1000Prime Rep.* **6**, 32 (2014).
11. Muzio, M., Ni, J., Feng, P. & Dixit, V. M. IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. *Science* **278**, 1612–1615 (1997).
12. Banas, M. C. *et al.* TLR4 links podocytes with the innate immune system to mediate glomerular injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* **19**, 704–713 (2008).
13. Zhang, B., Ramesh, G., Uematsu, S., Akira, S. & Reeves, W. B. TLR4 signaling mediates inflammation and tissue injury in nephrotoxicity. *J. Am. Soc. Nephrol.* **19**, 923–932 (2008).

14. Ma, J. *et al.* TLR4 activation promotes podocyte injury and interstitial fibrosis in diabetic nephropathy. *PLoS One* **9**, e97985 (2014).
15. Devaraj, S. *et al.* Knockout of toll-like receptor-2 attenuates both the pro-inflammatory state of diabetes and incipient diabetic nephropathy. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31**, 1796–1804 (2011).
16. Masum, M. A. *et al.* Overexpression of toll-like receptor 9 correlates with podocyte injury in a murine model of autoimmune membranoproliferative glomerulonephritis. *Autoimmunity* **51**, 386–398 (2018).
17. Wang, H., Gou, S.-J., Zhao, M.-H. & Chen, M. The expression of Toll-like receptors 2, 4 and 9 in kidneys of patients with anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated vasculitis. *Clin. Exp. Immunol.* **177**, 603–610 (2014).
18. Vlantis, K. *et al.* TLR-independent anti-inflammatory function of intestinal epithelial TRAF6 signalling prevents DSS-induced colitis in mice. *Gut* **65**, 935–943 (2016).
19. Koehler, S. *et al.* Construction of a viral T2A-peptide based knock-in mouse model for enhanced Cre recombinase activity and fluorescent labeling of podocytes. *Kidney Int.* **91**, 1510–1517 (2017).
20. Diefenhardt, P. *et al.* Stimulation of immune checkpoint molecule B and T-lymphocyte attenuator alleviates experimental crescentic glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **34**, 1366–1380 (2023).
21. Butt, L. *et al.* A molecular mechanism explaining albuminuria in kidney disease. *Nat. Metabol.* **2**, 461–474 (2020).
22. Schindelin, J. *et al.* Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **9**, 676–682 (2012).
23. Takemoto, M. *et al.* A new method for large scale isolation of kidney glomeruli from mice. *Am. J. Pathol.* **161**, 799–805 (2002).
24. Jais, A. *et al.* PNOCARC neurons promote hyperphagia and obesity upon high-fat-diet feeding. *Neuron* **106**, 1009–1025.e10 (2020).
25. Bray, N. L., Pimentel, H., Melsted, P. & Pachter, L. Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nat. Biotechnol.* **34**, 525–527 (2016).
26. Pimentel, H., Bray, N. L., Puente, S., Melsted, P. & Pachter, L. Differential analysis of RNA-seq incorporating quantification uncertainty. *Nat. Methods* **14**, 687–690 (2017).
27. Ning, L., Suleiman, H. Y. & Miner, J. H. Synaptopodin deficiency exacerbates kidney disease in a mouse model of Alport syndrome. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **321**, F12–F25 (2021).
28. Eremina, V. *et al.* Glomerular-specific alterations of VEGF-A expression lead to distinct congenital and acquired renal diseases. *J. Clin. Invest.* **111**, 707–716 (2003).
29. Asanuma, K. *et al.* Synaptopodin orchestrates actin organization and cell motility via regulation of RhoA signalling. *Nat. Cell Biol.* **8**, 485–491 (2006).
30. Wong, J. S. *et al.* Rescue of tropomyosin deficiency in Drosophila and human cancer cells by synaptopodin reveals a role of tropomyosin in RhoA stabilization. *EMBO J.* **31**, 1028–1040 (2012).
31. Martin-Vilchez, S. *et al.* RhoGTPase regulators orchestrate distinct stages of synaptic development. *PLOS ONE* **12**, e0170464 (2017).
32. Akilesh, S. *et al.* Arhgap24 inactivates Rac1 in mouse podocytes, and a mutant form is associated with familial focal segmental glomerulosclerosis. *J. Clin. Invest.* **121**, 4127–4137 (2011).
33. Brähler, S. *et al.* Intravital and kidney slice imaging of podocyte membrane dynamics. *JASN* **27**, 3285–3290 (2016).
34. Yu, H. *et al.* Rac1 activation in podocytes induces rapid foot process effacement and proteinuria. *Mol. Cell. Biol.* **33**, 4755–4764 (2013).
35. Grgic, I. *et al.* Discovery of new glomerular disease-relevant genes by translational profiling of podocytes in vivo. *Kidney Int.* **86**, 1116–1129 (2014).
36. Dong, Q.-Q. *et al.* Serum and glucocorticoid-inducible kinase 3/Nedd4-2 signaling pathway participates in podocyte injury by regulating the stability of nephrin. *Front. Physiol.* **12**, 810473 (2021).
37. Yanai, H. *et al.* Revisiting the role of IRF3 in inflammation and immunity by conditional and specifically targeted gene ablation in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **115**, 5253–5258 (2018).

Acknowledgements

We thank Sachiko Kolar, Angelika Köser, Francesco Landini, the FACS and Imaging Core Unit of the Max Planck Institute for Aging as well as the Cologne Center for Genomics (CCG) of the University of Cologne for excellent technical support.

Author contributions

T.S., P.D., P.B. and S.B. designed the study and conceived experiments; T.S., P.D., B.T., D.U.-J., I.P., T.M., D.P. and S.B. performed experiments; T.S., P.D., G.C. and S.B. analyzed the data; T.S., P.D., P.B., C.S.G., J.N., D.P., and S.B. interpreted results; T.S., P.D., G.C. and S.B. prepared figures; T.S., P.D. and S.B. drafted manuscript; P.D., B.S., T.B. P.B. and S.B. edited and revised manuscript. All authors approved the final version of the manuscript.

Funding

Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL. This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) CRU329, the Center for Molecular Medicine Cologne, the Advanced Cologne Clinician Scientist Program of the University of Cologne (to S. Brähler) and by the Koeln Fortune Program/ Faculty of Medicine, University of Cologne (to T. Schömig). B. Schermer was supported by the DFG (SCHE1562/7, CRU329). P. Brinkkötter declares research funding from the DFG BR-2955/8 and from the German Federal Ministry of Education and Research (STOP-FSGS 01GM1901E). T. Benzing was supported by the DFG (BE221 and CRU329).

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-024-52565-8>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to P.T.B. or S.B.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2024

Data supplement:

Supplemental Figure 1. Podocyte specific *Myd88* knock out does not alter kidney function in 52 weeks old mice

(A) No significant difference is detected in urine albumin-to-creatinine-ratio (ACR) and blood urea nitrogen (BUN) in 52 weeks old, untreated *MyD88^{pk0}* (n=5) and WT littermates (n=5).

Supplemental Figure 2. Semi-automated analysis of the podocyte ultrastructure does not reveal significant differences between *MyD88^{pk0}* and WT mice during NTN

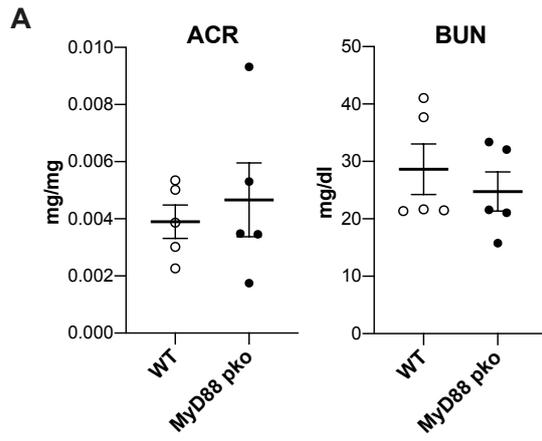
(A) Representative pictures of sheep IgG (magenta) and podocin (green) co-stainings show glomerular nephrotoxic IgG deposition at day 10 of NTN. No difference was observed between the groups. **(B)** Representative, pre-adjusted STED images and semi-automated segmentation of the slit diaphragm (red) at indicated time point after NTN induction. The cyan line indicates the ROI in which the analysis was carried out. The slit diaphragm length is used to compare the extend of podocyte damage. No significant difference was observed in *MyD88^{pk0}* mice compared to WT littermates.

Supplemental Figure 3. Sorting of podocytes before bulk RNA sequencing

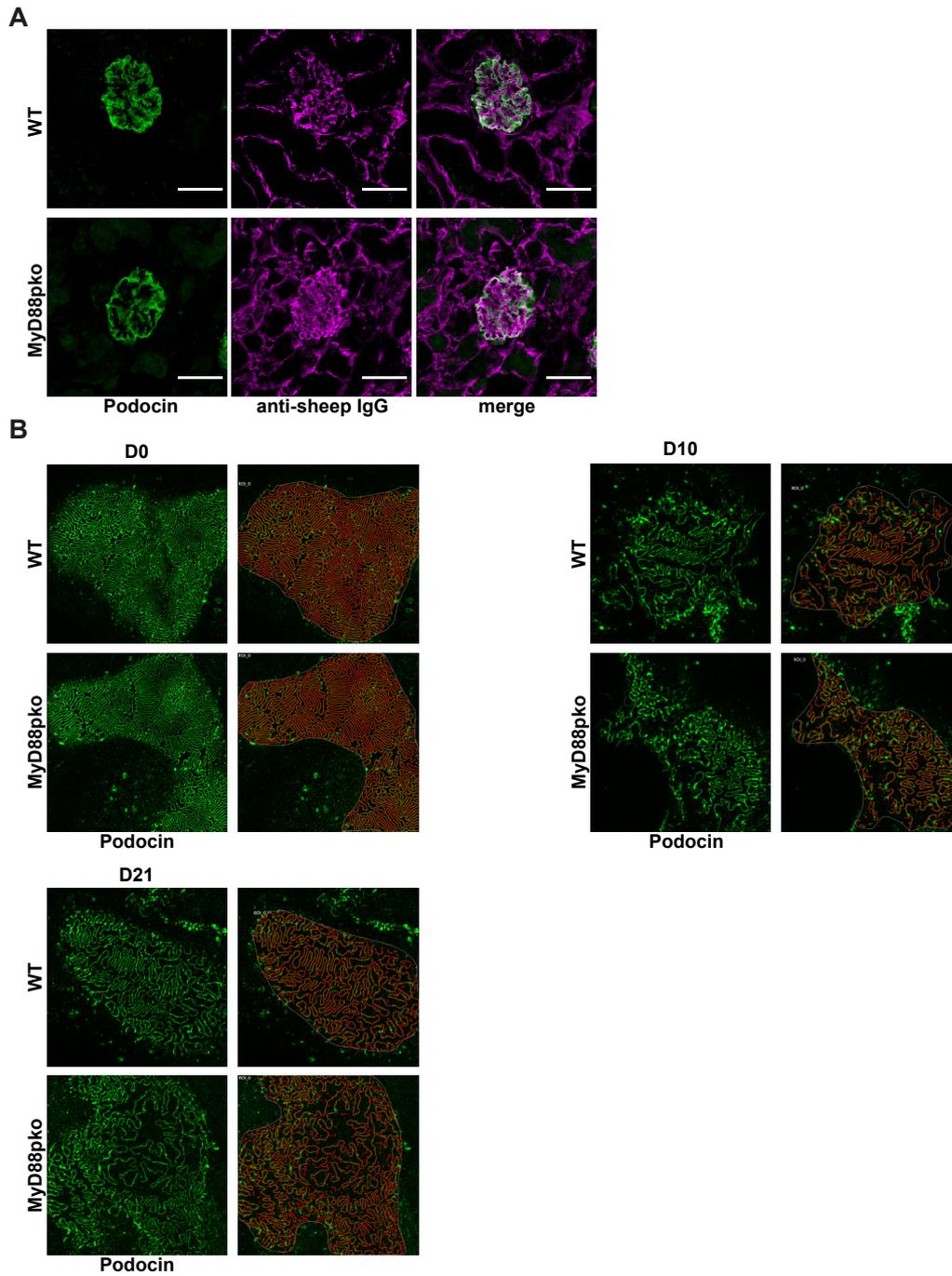
(A) Urine albumin-to-creatinine-ratio (ACR) of nephritic *MyD88^{pk0}* and control mice before extraction of mTomato-positive podocytes using FACS. **(B)** Exemplary gating strategy of mTomato-positive podocytes. No significant difference was observed in purity and viability of FACS sorted podocytes before bulk RNA sequencing.

Supplemental Figure 4. Differential expression of type-I interferon related genes in experimental GN.

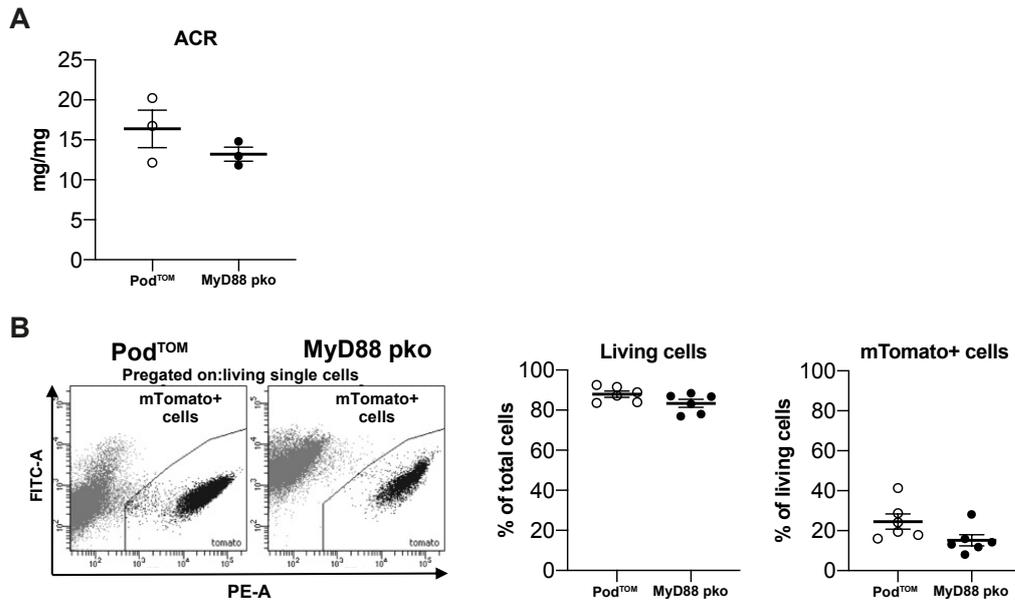
Expression profiles of differentially expressed genes associated with the type-I interferon signaling pathway in sorted podocytes between indicated groups (p-value<0.05). The bulk RNA-seq data was searched for genes related to the Gene Ontology term GO: 0060337. If multiple isoforms were present, only the one with CCDS entry, high transcript support level and highest effect size (in that order) was considered.



Supplemental Figure 1. Podocyte specific *Myd88* knock out does not alter kidney function in 52 weeks old mice



Supplemental Figure 2. Semi-automated analysis of the podocyte ultrastructure does not reveal significant differences between MyD88^{pko} and WT mice during NTN



Supplemental Figure 3. Sorting of podocytes before bulk RNA sequencing

4. Diskussion

Podozyten sind hochspezialisierte, enddifferenzierte Zellen, welche mit der von ihnen geformten Schlitzmembran entscheidend an der glomerulären Filtration sowie an der funktionellen Integrität der Glomeruli beteiligt sind. Glomeruläre Erkrankungen, wie auch Glomerulonephritiden (GN), sind häufig mit umfassenden Veränderungen in der Funktion sowie dem Verlust von Podozyten assoziiert^{93,95}. Diese Schädigungen umfassen insbesondere auch einen erheblichen Umbau ihres Zytoskeletts mit dem Verlust der dreidimensionalen Struktur der Fußfortsätze, was auch als „Effacement“ bezeichnet wird. Folge der Schädigung des Filtrationsapparates ist häufig primär der Verlust von Blutbestandteilen wie Proteinen über den Urin, gefolgt von einer insgesamt abnehmenden Filtrationsfähigkeit, welche bis hin zu einem terminalen Nierenversagen führen kann¹⁶. Der genaue Prozess der glomerulären Schädigung und insbesondere die Rolle der Podozyten sind hierbei noch nicht vollständig verstanden.

Vor diesem Hintergrund wurde in der im Ergebnisteil vorgestellten Studie „*The podocytes' inflammatory responses are independent of canonical MYD88-dependent toll-like receptor signaling*“ untersucht, welche Anpassungsmechanismen allgemein in Podozyten im Verlauf einer GN stattfinden. Zusätzlich wurde explizit die Rolle des MYD88-abhängigen Toll-like-Rezeptor-Signalwegs in Podozyten bei einer glomerulären Schädigung beleuchtet und welche möglichen alternativen Signalwege involviert sind. Die Ergebnisse der Studie werden folgend anhand der zuvor eingeführten Fragestellungen diskutiert.

4.1 Diskussion der Ergebnisse

4.1.1. Anpassungsmechanismen der Podozyten auf das entzündliche Milieu im Rahmen einer experimentellen Glomerulonephritis

Um zunächst ein umfassendes Bild über die generelle Anpassung von Podozyten im Krankheitsmodell der nephrotoxischen Nephritis zu bekommen, wurde die Methode der bulk RNA-Sequenzierung aus isolierten Podozyten genutzt. Da in diesem Krankheitsmodell bisher noch keine Transkriptomanalyse erfolgt ist, bot uns diese Methode einen neuartigen Einblick in Veränderungen des Genexpressionsprofils der Podozyten.

Als Versuchstier wurde ein bereits publiziertes, in unserer Arbeitsgruppe etabliertes Mausmodell genutzt, welches unter anderem podozytenspezifisch ein fluoreszierendes Protein (*mTomato*) exprimiert¹³¹. Dies wurde erreicht, indem die genetische Information von *mTomato* an das podozytenspezifische *Podocin* gekoppelt wurde, wodurch erstgenanntes in den Zellen exprimiert wird, welche auch Podocin exprimieren⁷³. Zusätzlich ist die genetische Information einer Cre-Rekombinase gekoppelt, welche mittels des Cre/loxP-Systems¹²¹ eine podozytenspezifische Deletion von Genen erlaubt (folgend *PodCre*). Zunächst aber ermöglicht das podozytenspezifisch exprimierte mTomato nach Präparation der Glomeruli die Isolation

der Podozyten aus den Mausnieren mittels fluoreszenzabhängiger Zellsortierung (FACS). Aufgrund des begrenzten Ausgangsmaterials der RNA-Extraktion aus den Podozyten wurde die cDNA-Synthese für die bulk RNA-Sequenzierung zunächst voramplifiziert. Mittels Principal Component Analysis (PCA) konnte zunächst bestätigt werden, dass die Induktion der nephrotoxischer Nephritis (NTN) zu einer deutlichen Gruppierung der verschiedenen experimentellen Gruppen führte, was auf substantielle transkriptionelle Veränderungen infolge der Erkrankung hindeutet ¹¹⁵.

Insgesamt zeigten sich nach Induktion einer NTN über 5000 Gene unterschiedlich reguliert. Dies bestätigt die erfolgreiche Umsetzung der Methodik, unterstreicht aber auch die Rolle und die ausgeprägten Adaptationsprozesse von Podozyten in einem solchen entzündlichen Milieu. Zur Klassifikation der einzelnen Gene wurden GO-Terms genutzt, welche eine funktionale Einordnung eben dieser ermöglicht ⁸. In der detaillierten Analyse der transkriptionellen Veränderungen fiel auf, dass während einer NTN Signalwege, die mit der podozytären Struktur und dem Zytoskelett, aber - wie erwartet - auch solche, die mit Entzündungsprozessen assoziiert sind, besonders different reguliert waren.

Auf Seiten der podozytären Struktur ist dabei die Regulation des podozytären Aktin-Zytoskeletts hervorzuheben, welches eine bedeutende Rolle für die strukturelle Integrität der Podozyten und dessen Fußfortsätzen spielt ⁴¹. Zu den signifikant hochregulierten Genen gehören unter anderem *Actn1* und *Arhgap23*. Bei letzterem handelt es sich um ein Rho-GTPase aktivierendes Protein, welches, wie in neueren Studien gezeigt wurde, RAC1 inaktivieren kann und dadurch neuronale Synapsen stabilisieren kann ¹. Die Rolle von RAC1 in Podozyten wiederum ist bereits näher untersucht. Asao et al. konnten mittels podozytenspezifischer *Rac1*^{KO} Maus im sogenannten Adriamycin-Krankheitsmodell zeigen, dass RAC1 zu einer verminderten mTOR-Aktivierung führt und im Krankheitsmodell zu einer vermehrten Bildung von FSGS führt ⁷. Auch den sogenannten α -Aktininen (codiert unter anderem durch das deutlich hochregulierte *Actn1*) kommt eine besondere Relevanz in der Pathogenese glomerulärer Erkrankungen zu. Es ist bekannt, dass Mutationen im für α -Aktinine codierende *Actn4*-Gen zu einer FSGS mit Nierenversagen führt ¹³². α -Aktinine scheinen hier eine zentrale Rolle in der Ausbildung der Zellstruktur und Adhäsionen der Podozyten zu spielen ^{69,75}. Weitere hochregulierte Gene, die über Myosin mit der Zellstruktur und Kontraktilität in Verbindung stehen, waren unter anderem Gene wie *Tpm1* und *Myl12b* ^{14,142}. Bei dem am meisten unterschiedlich reguliertem Gen handelte es sich interessanterweise um *Synpo*, welches für Synaptopodin codiert. Hierbei handelt es sich um ein Aktin-assoziiertes Protein, welches unterschiedliche Funktionen in der Regulation des Zytoskeletts hat. In einer Studie mit *Synpo*^{KO}-Mäusen konnte gezeigt werden, dass *Synpo* mutmaßlich eine protektive Funktion im Rahmen von Podozytenschädigungen im Adriamycin-Krankheitsmodell hat. Interessanterweise wurde auch in dieser Studie gezeigt, dass der Verlust von *Synpo* im

Krankheitsmodell ebenfalls eine erhöhte Rac1-Aktivierung gezeigt hat ^{101,102}. Zusammenfassend sprechen all diese Veränderungen auf Genexpressionslevel für ein stattfindendes strukturelles Remodeling im Rahmen der Podozytenschädigung im Krankheitsmodell der experimentellen Glomerulonephritis.

Im Einklang mit der veränderten Genexpression bezüglich des Zytoskeletts zeigten sich auch in der hochauflösenden STED-Mikroskopie deutliche Veränderungen im NTN-Modell verglichen mit der Kontrollgruppe. Mittels STED können morphologische Veränderungen der durch Podozyten gebildeten Schlitzmembran dargestellt werden ¹⁴⁴. Diese Veränderungen können mittlerweile semiautomatisiert erfasst werden und erlauben über die quantitative Bestimmung der Schlitzmembranlänge in einem vorbestimmten Areal Rückschlüsse auf die Schlitzmembran-Abdeckung der Basalmembran ²⁷. Unter NTN kam es in den Glomeruli der erkrankten Versuchstiere zu einer deutlichen Reduzierung dieser Schlitzmembran-Abdeckung, sowohl nach 10 als auch 21 Tagen, jeweils verglichen mit der gesunden Vergleichsgruppe. Diese Beobachtung bestätigt das bereits auf Genexpressionsebene vermutete strukturelle Remodeling der Podozyten, welches eine potenzielle Adaption auf das entzündliche Milieu darstellen kann.

Neben den zytoskelettalen Veränderungen kam es auch zu einer veränderten Expression von proinflammatorischen Genen. Unter den direkten proinflammatorischen Signalmolekülen war besonders die deutlich erhöhte Expression von *Cxcl1* auffällig. Hierbei handelt es sich um ein Chemokin, welches an die Chemokinrezeptoren CXCR1 und CXCR2 bindet und hauptsächlich die Infiltration von neutrophilen Granulozyten fördert und unter anderem über den NF- κ B - Signalweg reguliert wird ¹⁰. Bisherige Studien lassen vermuten, dass CXCL1 ein möglicher Mediator eines akuten Nierenversagens ist ¹²⁰. Es wurde bereits gezeigt, dass die Inhibition von CXCL1 und dessen Rezeptor CXCR2 die Infiltration von Granulozyten vermindern kann und dadurch wohl den Verlauf eines akuten Nierenversagens abmildert ⁴⁰. Neben den direkten proinflammatorischen Signalmolekülen zeigten insbesondere auch mehrere TLR-Gene, darunter *Tlr1*, *Tlr2*, *Tlr3* und *Tlr4*, eine vermehrte Expression. Diese Gene sind zentrale Komponenten des angeborenen Immunsystems und spielen eine Schlüsselrolle bei der Aktivierung der Immunantwort. Die erhöhte Expression dieser TLR-Gene deutet darauf hin, dass Podozyten aktiv an der Vermittlung der entzündlichen Antwort beteiligt sind, indem sie PAMPs und DAMPs erkennen und proinflammatorische Signale aussenden.

Zusammenfassend lässt sich diskutieren, dass mittels der Genexpressionanalysen mehrere funktionale Signalwege identifiziert werden konnten, welche verschiedene Anpassungsmechanismen des Podozyten nach Induktion einer Glomerulonephritis darstellen. Neben dem folgend näher beleuchtetem Signalweg des Toll-like-Rezeptors erscheint unter anderem auch das podozytäre Aktinzytoskelett während einer GN stark beeinflusst, was somit ein interessantes Ziel weiterer, zukünftiger Studien ist.

4.1.2. Einfluss des podozytenspezifischen Knockout des zentralen Adaptorproteins MYD88 auf den Krankheitsverlauf der experimentellen Glomerulonephritis

Um nun die spezifische Rolle von Toll-like-Rezeptoren zu untersuchen, wurde sich für ein Mausmodell mit Ausschaltung des im TLR-Signalweg zentralen Adaptorproteins MYD88 entschieden. Dafür wurde durch die Kreuzung der zum einen durch Viantis et al. publizierten *Myd88-flox/flox*-Maus¹⁴⁵ und der oben eingeführten *PodCre*-Maus mit podozytenspezifisch exprimierten Cre-Rekombinase eine neue Mauslinie etabliert. Die das *Myd88*-Gen flankierenden loxP-Sequenzen („flox“) dienen hier der Cre-Rekombinase zur Erkennung, welche dann die Exzision und somit die Ausschaltung des Gens vermittelt. Mithilfe der quantitativer PCR von aus der neu etablierten Mauslinie isolierten Podozyten konnte der podozytenspezifische Knockout von *Myd88* (*Myd88*^{pko}) erfolgreich bestätigt werden. Hierfür wurde neben *Myd88* auch die RNA von *Actb* (β -Aktin) quantifiziert, welches als endogenes Referenzgen zur Normalisierung genutzt wird¹³⁷. Dies ermöglicht die Anwendung der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode zur Bestimmung der relativen Expression von *Myd88* in Podozyten der *Myd88*^{pko}-Gruppe verglichen zur Kontrollgruppe⁸¹.

Vor Induktion einer GN, also im gesunden, basalen Phänotyp, zeigten die *Myd88*^{pko}-Mäuse keine Unterschiede in der Nierenfunktion und in histologischen Untersuchungen. Diese Ergebnisse lassen eine regelrechte, physiologische Nierenentwicklung vermuten. In publizierten Voruntersuchungen von Brähler et al. konnte gezeigt werden, dass das podozytenspezifische Ausschalten von NEMO als zentraler Bestandteil des NF- κ B-Signalweges den Verlauf einer experimentellen Glomerulonephritis abmildert. Mutmaßlich wird dies durch eine verminderte Sekretion von entzündungsfördernden Zytokinen vermittelt^{22,23}. In unserer Studie zeigte sich nach Induktion einer GN bei podozytenspezifischem Knockout von *Myd88* überraschenderweise wiederum kein relevanter Unterschied im Krankheitsverlauf. Dies ist insbesondere in Kenntnis der Voruntersuchungen zu NEMO überraschend, da die TLR der Erkennung und Vermittlung von Schädigungen dienen, und MYD88 wichtig für die Initiierung der Effektorprozesse ist, darunter unter anderem auch des NEMO-abhängigen NF- κ B-Signalwegs². Bereits die funktionellen Parameter wie die Analyse der Proteinurie und Histologie zu unterschiedlichen Zeitpunkten zeigten jedoch keinen signifikanten Unterschied. Um auch mögliche, geringere strukturelle und immunologische Unterschiede nicht zu verpassen, wurden weitere molekularbiologische Untersuchungen ergänzt. Mittels STED-Mikroskopie wurde auch hier semi-automatisiert die Länge der Schlitzmembran auf der glomerulären Kapillare als Marker für die Schlitzmembranabdeckung untersucht. Jeweils zeigte sich zwar erneut eine deutliche Reduzierung dieser, letztlich jedoch auch hier ohne Unterschiede zur Kontrollgruppe. Auch in der Anzahl infiltrierender

Immunzellen in der Niere und deren Subgruppen mittels FACS ergaben sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen.

Diese Beobachtungen werfen die Frage auf, warum der Knockout von *Myd88* in Podozyten keinen maßgeblichen Einfluss auf den Krankheitsverlauf hatte, obwohl initiale Genexpressionsanalysen zeigten, dass TLR-Signalwege aktiviert werden und daher mutmaßlich auch eine Rolle bei der podozytären Antwort auf glomeruläre Schädigung haben. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass Podozyten und damit die podozytenspezifischen TLR doch einen geringeren Einfluss auf den inflammatorischen Verlauf haben als erwartet, und dass der Krankheitsverlauf hauptsächlich durch Immunzellen und Endothelzellen getriggert wird. Alternativ könnten aber auch kompensatorische Mechanismen innerhalb des Podozyten die fehlende MYD88-abhängigen Wege ausgleichen und damit dafür sorgen, dass trotzdem proinflammatorische Signalmoleküle von den Podozyten ausgeschüttet werden und zum inflammatorischen Milieu beitragen.

4.1.3. Kompensationsmechanismen der Podozyten auf den Mangel an MYD88-abhängigen Signalwegen

Um mögliche kompensatorische Mechanismen detektieren zu können, wurden erneut Analysen des Transkriptoms zwischen den *Myd88*^{pk0}-Mäusen sowie der Kontrollgruppe gemacht. Auch hier ergab die PCA eine Clustering der experimentellen Gruppen, was dafürspricht, dass sich deren Genexpressionsprofile teils deutlich unterscheiden. Die detaillierte Analyse des Genexpressionsprofils unter NTN-Bedingungen zeigte unter anderem eine vermehrte Aktivierung des IRF3-Signalwegs. Wie bereits beschrieben, kann der IRF3-Signalweg als Teil des Typ-I-IFN-Signalweges unabhängig von MYD88 über TLR aktiviert werden. Hierbei fungiert statt MYD88 das Adaptorprotein TRIF als Verbindung zur proinflammatorischen Signalkaskade, welches dann über Kaskaden unter anderem zur Aktivierung von IRF3 führen kann ¹⁵¹. Auch weitere Typ-I-IFN assoziierte Gene werden hochreguliert. Hierzu zählt unter anderem *Isg15* und *Ifit1*. Somit erscheint die Typ-I-Interferon-Signalkaskade über IRF3 einen potenziellen kompensatorischen Mechanismus darzustellen. Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass die podozytenspezifische Ausschaltung von MYD88 keinen signifikanten Einfluss auf den Verlauf der experimentellen Glomerulonephritis hat. Dies legt nahe, dass andere Signalwege und Mechanismen die Rolle von MYD88 in Podozyten kompensieren könnten. Die detaillierte Untersuchung dieser kompensatorischen Mechanismen, insbesondere des IRF3-Signalwegs, könnte neue Einblicke in die molekularen Grundlagen der Podozytenschädigung und der entzündlichen Reaktion in der Niere liefern und möglicherweise neue therapeutische Ansätze eröffnen. Hierbei könnte beispielsweise das zuletzt publizierte Mausmodell genutzt werden, welches über die eingebrachten loxP-Seiten am *Irf3*-Gen mit einer Cre-Rekombinase einen zellspezifischen Gen-Knockout ermöglicht ¹⁵². In Kombination mit dem auch in unserer Studie eingesetztem Mausmodell mit

podozytenspezifischer Cre-Rekombinase⁷³ würde dies die genauere Untersuchung des Typ-I-Interferon-Signalwegs und von IRF3 unter experimenteller GN ermöglichen.

4.1.4. Translation der Ergebnisse auf die humane Glomerulonephritis

Wie in der Einleitung eingeführt, beruhen Glomerulonephritiden auf unterschiedlichsten pathophysiologischen Mechanismen, die alle eine Schädigung der Glomeruli gemeinsam haben. Dabei spielen verschiedene Zelltypen innerhalb der Niere und der Glomeruli eine Rolle. Ein wesentlicher limitierender Faktor in der Behandlung von GN ist derzeit weiterhin die geringe Spezifität der Therapie, welche häufig auf einer unspezifischen Hemmung des Immunsystems beruht¹¹⁸, weshalb immunologische Forschung an Glomerulonephritiden weiterhin dringend notwendig ist. Problematisch ist, dass humane GN aufgrund des begrenzten humanen Probenmaterials nur eingeschränkt untersucht werden können, was den Einsatz von Tiermodellen erforderlich macht. Das Modell der experimentellen Glomerulonephritis mittels nephrotoxischen Serums, welches pathophysiologisch am ehesten der anti-GBM-GN ähnelt, dient hierbei als allgemein akzeptiertes Modellsystem⁵⁷. Es erlaubt die Untersuchung grundlegender Schädigungsmechanismen und inflammatorischer Prozesse innerhalb der Glomeruli sowie des Zusammenspiels mit den Zellen des Immunsystems.

Die Untersuchungen mittels STED-Mikroskopie der Glomeruli bestätigen, dass die Glomerulonephritis mit einer Schädigung der Schlitzmembran und einer verminderten Abdeckung einhergehen, begleitet von einer Proteinurie, passend zu bisherigen Erkenntnissen zur Schädigung des glomerulären Filtrationsapparates²⁷. Die Genexpressionsdaten zeigen ebenfalls eine deutliche Veränderung im Aktinzytoskelett der Podozyten, welches eng mit der Funktion der Schlitzmembran verwoben ist⁵⁹. Diesbezüglich wäre ein Vergleich mit humanen Proben für zukünftige Studien aufschlussreich, um mögliche Prozesse zur Regulierung des Aktinzytoskeletts in Hinblick auf mögliche therapeutische oder protektive Ansätze zu finden. Ein solcher könnte darin bestehen, Proteine zu identifizieren, die Schlüsselproteine der Schlitzmembran wie Nephrin oder Podocin stabilisieren und somit potenziell protektiv für die Schlitzmembran und Podozyten sein könnten⁸⁷.

Ein weiteres zentrales Ergebnis der Studie ist, dass der Verlust von MYD88 in Podozyten überraschenderweise keinen wesentlichen Einfluss auf den Krankheitsverlauf hatte. Dies steht im Kontrast zu früheren Studien, die gezeigt haben, dass die Modulation proinflammatorischer Signalwege in Podozyten durchaus eine protektive Wirkung auf den Verlauf einer GN haben können. In Übertragung zur humanen GN bedeutet dies, dass die Modulation des podozytären MYD88 als therapeutisches Ziel weniger relevant erscheint. Allerdings haben die umfassenden Sequenzierungsanalysen der Studie potenzielle interessante alternative Zielstrukturen identifiziert, hierunter auch den Typ-I-Interferon-Signalweg. Denn die Modulation von Signalwegen, die mit TLR in Zusammenhang stehen, erscheinen sowohl aus

immunmodulatorischer Hinsicht interessant, aber auch aus der Idee, dass TLR mit Apoptoseprozessen in Podozyten in Verbindung stehen¹²².

Zusammenfassend handelt es sich bei der vorliegenden Arbeit zwar um eine tierexperimentelle Untersuchung, mit welcher die Pathophysiologie humaner GN nur partiell abgebildet werden kann. Dennoch bietet diese Studie potenzielle Ansatzpunkte für weitere Forschungsarbeiten mit dem Ziel, neue therapeutische Strategien entwickeln zu können. Hierfür wird die Validierung von Ergebnissen an humanen Proben entscheidend sein, um deren klinische Relevanz überprüfen zu können.

4.2 Limitationen

Ein wesentlicher limitierender Faktor der vorliegenden Arbeit ist die ausschließliche Verwendung eines Krankheitsmodells, der experimentellen Glomerulonephritis durch die Injektion von nephrotoxischem Serum, welche am ehesten der anti-GBM-GN ähnelt. Andere, mit Glomerulonephritiden assoziierte Krankheitsmodelle, wie das Adriamycin-Modell, das spezifischere Einblicke in die Mechanismen von Podozytenschädigungen und den Verlust von Podozyten bieten könnte, wurden nicht berücksichtigt. Dies wäre von besonderem Interesse, da – wie in der Einleitung bereits eingeführt - TLR und dessen Adaptorprotein MYD88 in vielfältige physiologische Prozesse involviert sind, darunter auch an der Steuerung von Apoptose und dem Verlust von Podozyten^{13,122}.

Eine weitere Limitation der Studie sind die auf einen spezifischen Zeitpunkt begrenzten Transkriptomanalysen. Zugrunde liegt dem der insgesamt aufwendige Versuchsaufbau mit aus Nieren der Versuchstiere isolierten Podozyten im gesunden Zustand und unter experimenteller Glomerulonephritis und dem anschließenden RNA-Sequenzierung, was einen in der Wahl der Zeitpunkte limitiert. Immunologische Veränderungen sind meist dynamisch und verändern sich auch über den Verlauf einer Erkrankung. Der Verlauf der NTN lässt sich klassischerweise in zwei Phasen unterteilen, dazu gehört die heterologe Phase zu Beginn des Krankheitsverlaufs und die später einsetzende autologe Phase. Auch basierend auf vorherigen Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe³⁶, wurden die Transkriptomanalysen in dieser Studie in der heterologen Phase der NTN durchgeführt, welche sich durch die Ablagerung der injizierten Antikörper und Initiierung des angeborenen Immunsystems kennzeichnet. Um trotzdem mögliche Unterschiede im Verlauf der autologen Phase zu erkennen, wurden die funktionellen und histologischen Untersuchungen auch zu späteren Zeitpunkten durchgeführt. Trotzdem könnte auch eine weitere Transkriptomanalyse zu einem späteren Zeitpunkt sinnvoll sein, um subtile oder verzögerte Effekte der MYD88-Defizienz und sich ergebende Kompensationsmechanismen vollständig zu erfassen. Zudem wurde für die Erstellung der Genexpressionsprofile wurde zudem die Methode der bulkRNA-Sequenzierung genutzt. Dadurch erhält man gemittelte Werte für die Genexpressionsprofile, wodurch die Methode

insgesamt sehr sensitiv ist, verpasst jedoch Subgruppierungen, wenn möglicherweise nur Teile der Podozyten betroffen sind. Hierfür würde sich die in den letzten Jahren eingeführte Methode der single-cell RNA-Sequenzierung eignen, welche Zellen einzeln anhand der Expressionsprofile klassifiziert und gruppiert ³¹. Dies würde neben der Subgruppierung der Podozyten auch einen Einblick in die Interaktion der Podozyten mit den verschiedenen weiteren glomerulären Zelltypen ermöglichen und daher interessant für weitere Forschungsarbeiten. In diesem Zusammenhang erscheinen neuere Technologien wie zum Beispiel die der „Spatial Transcriptomics“ interessant, welche eine präzise räumliche Kartierung der Genexpressionsprofile ermöglichen und im Feld der Nierenforschung in den letzten Jahren zunehmend an Relevanz gewonnen haben ⁶².

Darüber hinaus kann diskutiert werden, dass in dieser Arbeit kein Zellkulturmodell verwendet wurde, obwohl in-vitro-Ansätze teils wertvolle Einsichten in molekulare Mechanismen bieten können. Zellkulturmodelle ermöglichen häufig die Beantwortung spezifischer molekularer Fragestellungen oder die Validierung von Erkenntnissen aus Tiermodellen. Im Feld der Podozytenforschung sind mit sowohl murinen als auch humanen, immortalisierten Podozyten jeweils zwei Zelllinien weit verbreitet. Trotzdem wurde bei dieser Arbeit aus zwei verschiedenen Gründen auf ein Zellkulturmodell verzichtet. Zum einen sind immunologische Fragestellungen stark beeinflusst durch komplexe Interaktionen im gesamten Organismus, die in einem Zellkulturmodell meist nicht adäquat dargestellt werden können. Zum anderen haben vorherige Studien gezeigt, dass viele der vorliegenden immortalisierten murinen Podozyten zahlreiche podozytenspezifische Proteine nicht oder nur unzureichend exprimieren ¹¹⁶, weshalb entsprechende Ergebnisse aus einem Zellkulturmodell nur eingeschränkt übertragbar sind. Insgesamt wurde daher die Entscheidung getroffen, Podozyten mittels zuvor beschriebener Methode direkt aus dem Tiermodell zu isolieren und diese mittels RNA-Sequenzierung zu analysieren, um möglichst der wahren Physiologie nahekommende Daten zu generieren. Letztlich stellt das Modell der experimentellen Glomerulonephritis nur ein artifizielles Krankheitsmodell im Säugetier dar, in welchem Theorien zu Pathophysiologie und therapeutischen Ansätzen entwickelt werden können. Um die Translation zum menschlichen Organismus zu ermöglichen, wäre es notwendig, diese auch an Patientenproben zu validieren, was jedoch auch durch begrenztes Probenmaterial herausfordernd bleibt.

Zusammenfassend müssen diese Limitationen bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden und weisen auf die Notwendigkeit weiterer Studien hin, um die gewonnenen Ergebnisse weiter zu validieren und zu erweitern.

4.3 Schlussfolgerung

Unsere Studie ist die erste ihrer Art, die die spezifische Rolle des MYD88-abhängigen TLR-Signalweges in Podozyten untersucht. Die Studie liefert wertvolle Erkenntnisse darüber, wie Podozyten auf entzündliche Stimuli reagieren und welche Signalwege dabei eine Rolle spielen. Eine wichtige Errungenschaft dieser Arbeit ist die Feststellung, dass die podozytenspezifische Ausschaltung von *Myd88* keinen signifikanten Einfluss auf den Verlauf der experimentellen Glomerulonephritis hat. Diese Beobachtung war unerwartet. Zum einen konnten Brähler et al. zeigen, dass ein Ausschalten des NF- κ B-Signalweges sehr wohl den Verlauf einer experimentellen GN abmildert. Bei MYD88 wiederum handelt es sich um das zentrale Adapterprotein in vielen TLR-Signalwegen und diesem kommt somit eine Schlüsselrolle in der angeborenen Immunantwort zu, unter anderem auch in der Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs. Durch die umfassenden Transkriptomanalysen konnten wichtige zusätzliche Informationen gewonnen werden. Die Studienergebnisse zeigen, dass die Abwesenheit von MYD88 in Podozyten zum Teil wahrscheinlich durch andere Signalwege kompensiert wird, insbesondere der IRF3-Signalweg und die damit assoziierten Typ-I-Interferone. Diese potenziellen kompensatorischen Mechanismen ermöglichen es möglicherweise den Podozyten, trotz des Fehlens von MYD88 eine adäquate Antwort auf entzündliche Stimuli zu generieren. Dies weist auf die ausgeprägte Plastizität und Anpassungsfähigkeit der eigentlich enddifferenzierten Podozyten hin, die es ihnen ermöglicht, ihre Funktion und Integrität zu bewahren.

Ein weiterer wichtiger Aspekt dieser Studie ist die detaillierte Charakterisierung der zytoskelettalen und proinflammatorischen Veränderungen in Podozyten unter NTN-Bedingungen. Die Ergebnisse zeigen, dass Glomerulonephritiden einen großen Einfluss auf das Zytoskelett der Podozyten haben und zu umfangreichen Remodelling führen, die sicherlich auch mit den von uns beobachteten Veränderungen der Schlitzmembran in Zusammenhang stehen. Diese Erkenntnisse tragen zu einem besseren Verständnis der Podozytenschädigung zu Grunde liegenden molekularen Mechanismen im Rahmen einer GN bei. Dies leistet einen Beitrag zur Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze, die darauf abzielen, die Stabilität des Zytoskeletts von Podozyten zu bewahren und so die Progression glomerulärer Erkrankungen zu verlangsamen. Hier wäre in Zukunft interessant, die entdeckten Veränderungen auf Transkriptomebene zu validieren und die exakte Rolle der different regulierten Gene wie zum Beispiel Synaptopodin auch im Modell der experimentellen Glomerulonephritis näher zu untersuchen.

Ein wichtiges Merkmal dieser Arbeit liegt auch in der methodischen Herangehensweise. Durch die Anwendung der bulk-RNA-Sequenzierung und die detaillierten Transkriptomanalysen konnten spezifische Genexpressionsmuster identifiziert werden, die mit entzündlichen und strukturellen Veränderungen in Podozyten assoziiert sind. Diese Methodik ermöglicht es,

tiefere Einblicke in die komplexen Signalwege zu gewinnen, die die Reaktionen der Podozyten auf entzündliche Stimuli steuern.

Zusammenfassend leistet diese Studie einen Beitrag zum Verständnis der Rolle von MyD88 und anderen Signalwegen in Podozyten. Die Erkenntnisse über die kompensatorischen Mechanismen und die spezifischen zytoskelettalen und proinflammatorischen Veränderungen bieten wertvolle Ansätze für zukünftige Forschungen. Insbesondere die Identifikation des IRF3-Signalwegs als potenziellen kompensatorischen Mechanismus eröffnet neue Ansätze für das Verständnis über die Rolle dieses Signalwegs in der podozytenspezifischen Antwort auf entzündliche Stimuli. Mit der kürzlich publizierten *Irf3*-flox-Maus¹⁵³ besteht die Möglichkeit, diesen Signalweg gezielt zu untersuchen und möglicherweise neue therapeutische Ziele zur Behandlung von Glomerulonephritis und anderen entzündlichen Nierenerkrankungen zu identifizieren. Insbesondere der neuartige Datensatz von der Veränderung des Genexpressionsprofils von Podozyten während der experimentellen GN ist hierbei erneut hervorzuheben. Dieser bislang einmalige Datensatz ermöglicht, eine Vielzahl weiterer podozytärer Signalkaskaden zu identifizieren, welche mit einer Glomerulonephritis assoziiert sind. Dies kann zum Verständnis der bisher noch wenig erforschten Beteiligung von Podozyten an inflammatorischen Erkrankungen der Glomeruli beitragen. Bei Podozyten - ähnlich wie Neuronen - handelt es sich um terminal differenzierte Zellen, deren Verlust irreversibel ist und welcher nur bis zu einem gewissen Grad kompensiert werden kann¹¹¹. Insbesondere daher ist ein therapeutischer Eingriff in den Schädigungsprozess auf Ebene der Podozyten von besonderem Interesse, um deren Verlust zu verhindern. Zudem befinden sich Podozyten im Zentrum des Glomerulus, weshalb eine zentrale Rolle in der Erkennung und Vermittlung der proinflammatorischen Stimuli wahrscheinlich erscheint. Aus diesen Gründen entsteht die Hoffnung, durch das verbesserte Verständnis um die Rolle und Schädigung von Podozyten bei einer Glomerulonephritis, zukünftig präzisere und wirksamere Therapien entwickeln zu können. Hierfür wird auch die Translation der weiteren Erkenntnisse entscheidend sein, was aber unter anderem aufgrund der aufwändigen Probengewinnung aus Patienten eine Herausforderung bleibt.

Die Ergebnisse dieser Studie unterstreichen die Komplexität der immunologischen und zytoskelettalen Veränderungen in Podozyten und bieten eine solide Grundlage für zukünftige Untersuchungen, die darauf abzielen, die molekularen Mechanismen zu entschlüsseln, die zur Podozytenschädigung und zur Progression glomerulärer Erkrankungen beitragen.

5. Literaturverzeichnis

- 1 Akilesh S, Suleiman H, Yu H, *et al.* Arhgap24 inactivates Rac1 in mouse podocytes, and a mutant form is associated with familial focal segmental glomerulosclerosis. *J Clin Invest* 2011; **121**: 4127–37.
- 2 Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell* 2006; **124**: 783–801.
- 3 Anders HJ, Saxena R, Zhao M hui, Parodis I, Salmon JE, Mohan C. Lupus nephritis. *Nature Reviews Disease Primers* 2020 6:1 2020; **6**: 1–25.
- 4 Anders H-J, Kitching AR, Leung N, Romagnani P. Glomerulonephritis: immunopathogenesis and immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2023; **23**: 453–71.
- 5 Anderson K V., Jürgens G, Nüsslein-Volhard C. Establishment of dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product. *Cell* 1985; **42**: 779–89.
- 6 Androulidaki A, Wachsmuth L, Polykratis A, Pasparakis M. Differential role of MyD88 and TRIF signaling in myeloid cells in the pathogenesis of autoimmune diabetes. *PLoS One* 2018; **13**. DOI:10.1371/JOURNAL.PONE.0194048.
- 7 Asao R, Seki T, Takagi M, *et al.* Rac1 in podocytes promotes glomerular repair and limits the formation of sclerosis. *Scientific Reports* 2018 8:1 2018; **8**: 1–11.
- 8 Ashburner M, Ball CA, Blake JA, *et al.* Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nature Genetics* 2000 25:1 2000; **25**: 25–9.
- 9 Baechler EC, Batliwalla FM, Karypis G, *et al.* Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; **100**: 2610–5.
- 10 Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 1998 392:6676 1998; **392**: 565–8.
- 11 Bailey G, Dimlich R, Alexander K, *et al.* Constitutive Expression of Interferon β in Differentiated Epithelial Cells. *Microscopy and Microanalysis* 1997; **3**: 151–2.
- 12 Banas MC, Banas B, Hudkins KL, *et al.* TLR4 Links Podocytes with the Innate Immune System to Mediate Glomerular Injury. *J Am Soc Nephrol* 2008; **19**: 704–13.
- 13 Bao W, Xia H, Liang Y, *et al.* Toll-like Receptor 9 Can be Activated by Endogenous Mitochondrial DNA to Induce Podocyte Apoptosis. *Scientific Reports* 2016 6:1 2016; **6**: 1–11.
- 14 Bareja I, Wioland H, Janco M, *et al.* Dynamics of Tpm1.8 domains on actin filaments with single-molecule resolution. *Mol Biol Cell* 2020; **31**: 2452–62.
- 15 Bello AK, Okpechi IG, Levin A, *et al.* An update on the global disparities in kidney disease burden and care across world countries and regions. *Lancet Glob Health* 2024; **12**: e382–95.

- 16 Benzing T, Salant D. Insights into Glomerular Filtration and Albuminuria. *N Engl J Med* 2021; **384**: 1437–46.
- 17 Berden AE, Ferrario F, Hagen EC, *et al.* Histopathologic classification of ANCA-associated glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 2010; **21**: 1628–36.
- 18 Von Bernuth H, Picard C, Jin Z, *et al.* Pyogenic Bacterial Infections in Humans with MyD88 Deficiency. *Science* 2008; **321**: 691.
- 19 Bikbov B, Purcell C, Levey AS, *et al.* Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet* 2020; **395**: 709–33.
- 20 Boute N, Gribouval O, Roselli S, *et al.* NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nature Genetics* 2000 24:4 2000; **24**: 349–54.
- 21 Bowman W. IV. On the structure and use of the Malpighian bodies of the kidney, with observations on the circulation through that gland. *Philos Trans R Soc Lond* 1997; **132**: 57–80.
- 22 Brähler S, Ising C, Barrera Aranda B, *et al.* The NF- κ B essential modulator (NEMO) controls podocyte cytoskeletal dynamics independently of NF- κ B. *Am J Physiol Renal Physiol* 2015; **309**: F617–626.
- 23 Brähler S, Ising C, Hagmann H, *et al.* Intrinsic proinflammatory signaling in podocytes contributes to podocyte damage and prolonged proteinuria. *Am J Physiol Renal Physiol* 2012; **303**: F1473–F1485.
- 24 Brambilla R, Persaud T, Hu X, *et al.* Transgenic inhibition of astroglial NF-kappa B improves functional outcome in experimental autoimmune encephalomyelitis by suppressing chronic central nervous system inflammation. *J Immunol* 2009; **182**: 2628–40.
- 25 Bridoux F, Leung N, Hutchison CA, *et al.* Diagnosis of monoclonal gammopathy of renal significance. *Kidney Int* 2015; **87**: 698–711.
- 26 Butt L, Unnersjö-Jess D, Hohne M, *et al.* Super-Resolution Imaging of the Filtration Barrier Suggests a Role for Podocin R229Q in Genetic Predisposition to Glomerular Disease. *J Am Soc Nephrol* 2022; **33**: 138–54.
- 27 Butt L, Unnersjö-Jess D, Höhne M, *et al.* A molecular mechanism explaining albuminuria in kidney disease. *Nat Metab* 2020; **2**: 461–74.
- 28 Canney M, O’Hara P V, McEvoy CM, *et al.* Spatial and Temporal Clustering of Anti-Glomerular Basement Membrane Disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2016; **11**: 1392–9.
- 29 Cella M, Jarrossay D, Facchetti F, *et al.* Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nature Medicine* 1999 5:8 1999; **5**: 919–23.

- 30 Christian H. Bright's Disease. *Oxford loose-leaf medicine, Oxford University Press* 1947; : 640.
- 31 Chung J-J, Goldstein L, Chen Y-JJ, *et al.* Single-Cell Transcriptome Profiling of the Kidney Glomerulus Identifies Key Cell Types and Reactions to Injury. *Journal of the American Society of Nephrology* 2020; **31**: 2341–54.
- 32 Cornell LD. Anti–Glomerular Basement Membrane Disease: Broadening the Spectrum. *American Journal of Kidney Diseases* 2024; **83**: 701–3.
- 33 Daehn IS, Duffield JS. The glomerular filtration barrier: a structural target for novel kidney therapies. *Nature Reviews Drug Discovery* 2021 20:10 2021; **20**: 770–88.
- 34 Dandapani S V, Sugimoto H, Matthews BD, *et al.* Alpha-actinin-4 is required for normal podocyte adhesion. *J Biol Chem* 2007; **282**: 467–77.
- 35 Davis SE, Khatua AK, Popik W. Nucleosomal dsDNA Stimulates APOL1 Expression in Human Cultured Podocytes by Activating the cGAS/IFI16-STING Signaling Pathway. *Scientific Reports* 2019 9:1 2019; **9**: 1–14.
- 36 Diefenhardt P, Braumann M, Schömig T, *et al.* Stimulation of Immune Checkpoint Molecule B and T-Lymphocyte Attenuator Alleviates Experimental Crescentic Glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 2023; **34**: 1366–80.
- 37 Ding X, Ren Y, He X. IFN-I Mediates Lupus Nephritis From the Beginning to Renal Fibrosis. *Front Immunol* 2021; **12**. DOI:10.3389/fimmu.2021.676082.
- 38 Duan T, Du Y, Xing C, Wang HY, Wang R-F. Toll-Like Receptor Signaling and Its Role in Cell-Mediated Immunity. *Front Immunol* 2022; **13**. DOI:10.3389/fimmu.2022.812774.
- 39 Dvorientchikova G, Barakat D, Brambilla R, *et al.* Inactivation of astroglial NF-kappa B promotes survival of retinal neurons following ischemic injury. *Eur J Neurosci* 2009; **30**: 175–85.
- 40 Edelstein CL, Akcay A, Nguyen Q. Mediators of inflammation in acute kidney injury. *Mediators Inflamm* 2009; **2009**. DOI:10.1155/2009/137072.
- 41 Faul C, Asanuma K, Yanagida-Asanuma E, Kim K, Mundel P. Actin up: regulation of podocyte structure and function by components of the actin cytoskeleton. *Trends Cell Biol* 2007; **17**: 428–37.
- 42 Feng K, Zhang HJ, Min YQ, *et al.* SARS-CoV-2 NSP13 interacts with host IRF3, blocking antiviral immune responses. *J Med Virol* 2023; **95**: e28881.
- 43 Filipi M, Jack S. Interferons in the Treatment of Multiple Sclerosis: A Clinical Efficacy, Safety, and Tolerability Update. *Int J MS Care* 2020; **22**: 165.
- 44 Fissell WH. Reconsidering Garth Robinson: Fluid flow and the glomerular filtration barrier. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2020; **29**: 273–9.
- 45 Floege J, Amann K. Primary glomerulonephritides. *The Lancet* 2016; **387**: 2036–48.

- 46 Frei U, Schober-Halstenberg H-J. Nierenersatztherapie in Deutschland - Bericht 2005/2006. 2006.
- 47 Gasteiger G, D’Osualdo A, Schubert DA, Weber A, Bruscia EM, Hartl D. Cellular Innate Immunity: An Old Game with New Players. *J Innate Immun* 2017; **9**: 111–25.
- 48 Gay NJ, Gangloff M, O’Neill LAJ. What the Myddosome structure tells us about the initiation of innate immunity. *Trends Immunol* 2011; **32**: 104–9.
- 49 Gay NJ, Keith FJ. Drosophila Toll and IL-1 receptor [5]. *Nature* 1991; **351**: 355–6.
- 50 Gipson DS, Massengill SF, Yao L, *et al.* Management of childhood onset nephrotic syndrome. *Pediatrics* 2009; **124**: 747–57.
- 51 Goldwich A, Burkard M, Ölke M, *et al.* Podocytes are nonhematopoietic professional antigen-presenting cells. *Journal of the American Society of Nephrology* 2013; **24**: 906–16.
- 52 Goodship THJ, Cook HT, Fakhouri F, *et al.* Atypical hemolytic uremic syndrome and C3 glomerulopathy: conclusions from a ‘Kidney Disease: Improving Global Outcomes’ (KDIGO) Controversies Conference. *Kidney Int* 2017; **91**: 539–51.
- 53 Guida S, Heguy A, Melli M. The chicken IL-1 receptor: differential evolution of the cytoplasmic and extracellular domains. *Gene* 1992; **111**: 239–43.
- 54 Guo Q, Wu S, Xu C, Wang J, Chen J. Global Disease Burden From Acute Glomerulonephritis 1990–2019. *Kidney Int Rep* 2021; **6**: 2212–7.
- 55 den Haan JMM, Arens R, van Zelm MC. The activation of the adaptive immune system: cross-talk between antigen-presenting cells, T cells and B cells. *Immunol Lett* 2014; **162**: 103–12.
- 56 Häckl D, Kossack N, Schoenfelder T. Prävalenz, Kosten der Versorgung und Formen des dialysepflichtigen chronischen Nierenversagens in Deutschland: Vergleich der Dialyseversorgung innerhalb und außerhalb stationärer Pflegeeinrichtungen. *Gesundheitswesen* 2021; **83**: 818.
- 57 Hoppe JM, Vielhauer V. Induction and Analysis of Nephrotoxic Serum Nephritis in Mice. *Methods in Molecular Biology* 2014; **1169**: 159–74.
- 58 Hu W, Chen Y, Wang S, *et al.* Clinical-Morphological Features and Outcomes of Lupus Podocytopathy. *Clin J Am Soc Nephrol* 2016; **11**: 585–92.
- 59 Huber TB, Benzing T. The slit diaphragm: a signaling platform to regulate podocyte function. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2005; **14**: 211–6.
- 60 Immun J, Doherty PC, Zinkernagel RM, *et al.* Immunological surveillance against altered self components by sensitised T lymphocytes in lymphocytes choriomeningitis. *Nature* 1974 251:5475 1974; **251**: 547–8.
- 61 Isaacs A, Lindenmann J. Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1957; **147**: 258–67.

- 62 Isnard P, Humphreys BD. Spatial Transcriptomics: Integrating Morphology and Molecular Mechanisms of Kidney Diseases. *Am J Pathol* 2024; published online Aug 5. DOI:10.1016/J.AJP.2024.06.012.
- 63 Issa W, Njeim R, Carrasco A, Burke GW, Mitrofanova A. Role of the Innate Immune Response in Glomerular Disease Pathogenesis: Focus on Podocytes. *Cells* 2024; **13**. DOI:10.3390/CELLS13131157.
- 64 Iwasaki A, Medzhitov R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nature Immunology* 2015 **16**:4 2015; **16**: 343–53.
- 65 Janeway CA. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1989; **54 Pt 1**: 1–13.
- 66 Jennette JC. Overview of the 2012 Revised International Chapel Hill Consensus Conference Nomenclature of Vasculitides. *Clin Exp Nephrol* 2013; **17**: 603–6.
- 67 Jennette JC, Harrington JT, Kausz A, *et al.* Rapidly progressive crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int* 2003; **63**: 1164–77.
- 68 Jolliffe IT, Cadima J. Principal component analysis: a review and recent developments. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci* 2016; **374**. DOI:10.1098/RSTA.2015.0202.
- 69 Kaplan JM, Kim SH, North KN, *et al.* Mutations in ACTN4, encoding alpha-actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Genet* 2000; **24**: 251–6.
- 70 Kestilä M, Lenkkeri U, Männikkö M, *et al.* Positionally cloned gene for a novel glomerular protein--nephrin--is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol Cell* 1998; **1**: 575–82.
- 71 Kitching AR, Anders H-J, Basu N, *et al.* ANCA-associated vasculitis. *Nat Rev Dis Primers* 2020; **6**: 1–27.
- 72 Knittel G, Liedgens P, Korovkina D, *et al.* B-cell-specific conditional expression of Myd88p.L252P leads to the development of diffuse large B-cell lymphoma in mice. *Blood* 2016; **127**: 2732.
- 73 Koehler S, Brähler S, Braun F, *et al.* Construction of a viral T2A-peptide based knock-in mouse model for enhanced Cre recombinase activity and fluorescent labeling of podocytes. *Kidney Int* 2017; **91**: 1510–7.
- 74 Koliaraki V, Chalkidi N, Henriques A, *et al.* Innate Sensing through Mesenchymal TLR4/MyD88 Signals Promotes Spontaneous Intestinal Tumorigenesis. *Cell Rep* 2019; **26**: 536.
- 75 Kos CH, Le TC, Sinha S, *et al.* Mice deficient in α -actinin-4 have severe glomerular disease. *Journal of Clinical Investigation* 2003; **111**: 1683–90.
- 76 Lange K, Ahmed U, Kleinberger H, Treser G. A hitherto unknown streptococcal antigen and its probable relation to acute poststreptococcal glomerulonephritis. *Clin Nephrol* 1976; **5**: 207–15.

- 77 Levey AS, Eckardt K-U, Dorman NM, *et al.* Nomenclature for kidney function and disease: report of a Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Consensus Conference. *Kidney Int* 2020; **97**: 1117–29.
- 78 Lim K-H, Staudt LM. Toll-Like Receptor Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013; **5**. DOI:10.1101/cshperspect.a011247.
- 79 Lin SC, Lo YC, Wu H. Helical assembly in the MyD88:IRAK4:IRAK2 complex in TLR/IL-1R signaling. *Nature* 2010; **465**: 885.
- 80 Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2017 2:1 2017; **2**: 1–9.
- 81 Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; **25**: 402–8.
- 82 Lodi L, Mastrolia M V., Bello F, *et al.* Type I interferon-related kidney disorders. *Kidney Int* 2022; **101**: 1142–59.
- 83 Lord KA, Hoffman-Liebermann B, Liebermann DA. Nucleotide sequence and expression of a cDNA encoding MyD88, a novel myeloid differentiation primary response gene induced by IL6. *Oncogene* 1990; **5**: 1095–7.
- 84 MacHida H, Ito S, Hirose T, *et al.* Expression of Toll-like receptor 9 in renal podocytes in childhood-onset active and inactive lupus nephritis. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2010; **25**: 2430–537.
- 85 Maezawa Y, Cina D, Quaggin SE. Glomerular Cell Biology. *Seldin and Giebisch's The Kidney: Physiology and Pathophysiology* 2013; : 721–55.
- 86 Maranduca MA, Clim A, Pinzariu AC, *et al.* Role of arterial hypertension and angiotensin II in chronic kidney disease (Review). *Exp Ther Med* 2023; **25**. DOI:10.3892/ETM.2023.11852.
- 87 Martin CE, Petersen KA, Aoudjit L, *et al.* ShcA Adaptor Protein Promotes Nephrin Endocytosis and Is Upregulated in Proteinuric Nephropathies. *J Am Soc Nephrol* 2018; **29**: 92–103.
- 88 Masum MA, Ichii O, Hosny Ali Elewa Y, *et al.* Overexpression of toll-like receptor 9 correlates with podocyte injury in a murine model of autoimmune membranoproliferative glomerulonephritis. *Autoimmunity* 2018; **51**: 386–98.
- 89 McAdoo SP, Pusey CD. Anti-Glomerular Basement Membrane Disease. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 2017; **12**: 1162–72.
- 90 Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997; **388**: 394–7.
- 91 Mitrofanova A, Fontanella A, Tolerico M, *et al.* Activation of Stimulator of IFN Genes (STING) Causes Proteinuria and Contributes to Glomerular Diseases. *Journal of the American Society of Nephrology* 2022; **33**: 2153–73.

- 92 Mortazavi A, Williams BA, McCue K, Schaeffer L, Wold B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat Methods* 2008; **5**: 621–8.
- 93 Mundel P, Kriz W. Structure and function of podocytes: an update. *Anat Embryol (Berl)* 1995; **192**: 385–97.
- 94 Mundel P, Shankland SJ. Podocyte biology and response to injury. *J Am Soc Nephrol* 2002; **13**: 3005–15.
- 95 Mundel P, Shankland SJ. Podocyte biology and response to injury. *Journal of the American Society of Nephrology* 2002; **13**: 3005–15.
- 96 Murphy K, Weaver C. Janeway Immunologie. Springer Berlin Heidelberg, 2018 DOI:10.1007/978-3-662-56004-4.
- 97 Nagata M. Podocyte injury and its consequences. *Kidney Int* 2016; **89**: 1221–30.
- 98 Nenci A, Becker C, Wullaert A, *et al.* Epithelial NEMO links innate immunity to chronic intestinal inflammation. *Nature* 2007; **446**: 557–61.
- 99 Ngo VN, Young RM, Schmitz R, *et al.* Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature* 2011; **470**: 115–21.
- 100 Nichols B, Jog P, Lee JH, *et al.* Innate immunity pathways regulate the nephropathy gene Apolipoprotein L1. *Kidney Int* 2015; **87**: 332–42.
- 101 Ning L, Suleiman HY, Miner JH. Synaptopodin is dispensable for normal podocyte homeostasis but is protective in the context of acute podocyte injury. *Journal of the American Society of Nephrology* 2020; **31**: 2815–32.
- 102 Ning L, Suleiman HY, Miner JH. Synaptopodin deficiency exacerbates kidney disease in a mouse model of Alport syndrome. *Am J Physiol Renal Physiol* 2021; **321**: F12.
- 103 O'Neill LAJ, Golenbock D, Bowie AG. The history of Toll-like receptors — redefining innate immunity. *Nature Reviews Immunology* 2013 13:6 2013; **13**: 453–60.
- 104 Pagtalunan ME, Miller PL, Jumping-Eagle S, *et al.* Podocyte loss and progressive glomerular injury in type II diabetes. *J Clin Invest* 1997; **99**: 342–8.
- 105 Päiväranta J, Anastasiou IA, Koivuviita N, *et al.* Renal Perfusion, Oxygenation and Metabolism: The Role of Imaging. *J Clin Med* 2023; **12**: 5141.
- 106 Pasparakis M. Regulation of tissue homeostasis by NF-κB signalling: implications for inflammatory diseases. *Nature Reviews Immunology* 2009 9:11 2009; **9**: 778–88.
- 107 Pasparakis M, Courtois G, Hafner M, *et al.* TNF-mediated inflammatory skin disease in mice with epidermis-specific deletion of IKK2. *Nature* 2002; **417**: 861–6.
- 108 Pavenstädt H, Kriz W, Kretzler M. Cell Biology of the Glomerular Podocyte. *Physiol Rev* 2003; **83**: 253–307.
- 109 Pestka S, Krause CD, Walter MR. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev* 2004; **202**: 8–32.

- 110 Psarras A, Wittmann M, Vital EM. Emerging concepts of type I interferons in SLE pathogenesis and therapy. *Nature Reviews Rheumatology* 2022 18:10 2022; **18**: 575–90.
- 111 Rakic P. Limits of neurogenesis in primates. *Science* 1985; **227**: 1054–6.
- 112 Reis LFL, Lee TH, Vilcek J. Tumor necrosis factor acts synergistically with autocrine interferon- β and increases interferon- β mRNA levels in human fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry* 1989; **264**: 16351–4.
- 113 Reiser J, Von Gersdorff G, Loos M, *et al.* Induction of B7-1 in podocytes is associated with nephrotic syndrome. *J Clin Invest* 2004; **113**: 1390–7.
- 114 Reiser J, Sever S. Podocyte biology and pathogenesis of kidney disease. *Annu Rev Med* 2013; **64**: 357–66.
- 115 Ringnér M. What is principal component analysis? *Nature Biotechnology* 2008 26:3 2008; **26**: 303–4.
- 116 Rinschen MM, Schroeter CB, Koehler S, *et al.* Quantitative deep mapping of the cultured podocyte proteome uncovers shifts in proteostatic mechanisms during differentiation. *Am J Physiol Cell Physiol* 2016; **311**: C404–417.
- 117 Rodríguez-Iturbe B, Batsford S. Pathogenesis of poststreptococcal glomerulonephritis a century after Clemens von Pirquet. *Kidney Int* 2007; **71**: 1094–104.
- 118 Rovin BH, Adler SG, Barratt J, *et al.* KDIGO 2021 Clinical Practice Guideline for the Management of Glomerular Diseases. *Kidney Int* 2021; **100**: S1–276.
- 119 Rudolph D, Yeh WC, Wakeham A, *et al.* Severe liver degeneration and lack of NF-kappaB activation in NEMO/IKKgamma-deficient mice. *Genes Dev* 2000; **14**: 854–62.
- 120 Safirstein R, Megyesi J, Saggi SJ, *et al.* Expression of cytokine-like genes JE and KC is increased during renal ischemia. <https://doi.org/10.1152/ajprenal19912616F1095> 1991; **261**. DOI:10.1152/AJPRENAL.1991.261.6.F1095.
- 121 Sauer B, Henderson N. Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; **85**: 5166–70.
- 122 Saurus P, Kuusela S, Lehtonen E, *et al.* Podocyte apoptosis is prevented by blocking the Toll-like receptor pathway. *Cell Death Dis* 2015; **6**: e1752.
- 123 Sawant K V., Poluri KM, Dutta AK, *et al.* Chemokine CXCL1 mediated neutrophil recruitment: Role of glycosaminoglycan interactions. *Scientific Reports* 2016 6:1 2016; **6**: 1–8.
- 124 Schena FP, Nistor I. Epidemiology of IgA Nephropathy: A Global Perspective. *Semin Nephrol* 2018; **38**: 435–42.
- 125 Schnuelle P. Renal Biopsy for Diagnosis in Kidney Disease: Indication, Technique, and Safety. *J Clin Med* 2023; **12**. DOI:10.3390/JCM12196424.

- 126 Schömig T, Diefenhardt P, Plagmann I, *et al.* The podocytes' inflammatory responses in experimental GN are independent of canonical MYD88-dependent toll-like receptor signaling. *Scientific Reports* 2024 14:1 2024; **14**: 1–12.
- 127 Scott RP, Quaggin SE. The cell biology of renal filtration. *Journal of Cell Biology* 2015; **209**: 199–210.
- 128 Sethi S, Fervenza FC. Standardized classification and reporting of glomerulonephritis. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2019; **34**: 193–9.
- 129 Sethi S, Haas M, Markowitz GS, *et al.* Mayo Clinic/Renal Pathology Society Consensus Report on Pathologic Classification, Diagnosis, and Reporting of GN. *J Am Soc Nephrol* 2016; **27**: 1278–87.
- 130 Sethi S, De Vriese AS, Fervenza FC. Acute glomerulonephritis. *Lancet* 2022; **399**: 1646–63.
- 131 Shaner NC, Campbell RE, Steinbach PA, Giepmans BNG, Palmer AE, Tsien RY. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 2004; **22**: 1567–72.
- 132 Shao H, Wingert B, Weins A, Pollak MR, Camacho C, Wells A. Focal segmental glomerulosclerosis ACTN4 mutants binding to actin: regulation by phosphomimetic mutations. *Scientific Reports* 2019 9:1 2019; **9**: 1–12.
- 133 Society AWG of the IINN and the RP, Cattran DC, Coppo R, *et al.* The Oxford classification of IgA nephropathy: rationale, clinicopathological correlations, and classification. *Kidney Int* 2009; **76**: 534–45.
- 134 Stamellou E, Seikrit C, Tang SCW, *et al.* IgA nephropathy. *Nature Reviews Disease Primers* 2023 9:1 2023; **9**: 1–21.
- 135 Takemoto M, Asker N, Gerhardt H, *et al.* A new method for large scale isolation of kidney glomeruli from mice. *Am J Pathol* 2002; **161**: 799–805.
- 136 Taylor DM, Yehia M, Simpson IJ, Thein H, Chang Y, de Zoysa JR. Anti-glomerular basement membrane disease in Auckland. *Intern Med J* 2012; **42**: 672–6.
- 137 Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, *et al.* Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol* 1999; **75**: 291–5.
- 138 Thind AS, Monga I, Thakur PK, *et al.* Demystifying emerging bulk RNA-Seq applications: the application and utility of bioinformatic methodology. *Brief Bioinform* 2021; **22**: 1–16.
- 139 Thomson SC, Blantz RC. Biophysical Basis of Glomerular Filtration. *Seldin and Giebisch's The Kidney: Physiology and Pathophysiology* 2013; : 693–719.
- 140 Tipping PG, Holdsworth SR. T cells in crescentic glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 2006; **17**: 1253–63.

- 141 Tipping PG, Holdsworth SR. Cytokines in glomerulonephritis. *Semin Nephrol* 2007; **27**: 275–85.
- 142 Tran T, Lindström NO, Ransick A, *et al.* In Vivo Developmental Trajectories of Human Podocyte Inform In Vitro Differentiation of Pluripotent Stem Cell-Derived Podocytes. *Dev Cell* 2019; **50**: 102-116.e6.
- 143 Treon SP, Xu L, Yang G, *et al.* MYD88 L265P Somatic Mutation in Waldenström's Macroglobulinemia. *New England Journal of Medicine* 2012; **367**: 826–33.
- 144 Unnersjö-Jess D, Scott L, Blom H, Brismar H. Super-resolution stimulated emission depletion imaging of slit diaphragm proteins in optically cleared kidney tissue. *Kidney Int* 2016; **89**: 243–7.
- 145 Vlantis K, Polykratis A, Welz P-S, van Loo G, Pasparakis M, Wullaert A. TLR-independent anti-inflammatory function of intestinal epithelial TRAF6 signalling prevents DSS-induced colitis in mice. *Gut* 2016; **65**: 935–43.
- 146 Webster AC, Nagler E V, Morton RL, Masson P. Chronic Kidney Disease. *The Lancet* 2017; **389**: 1238–52.
- 147 Weening JJ, D'agati VD, Schwartz MM, *et al.* The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. *Kidney Int* 2004; **65**: 521–30.
- 148 Weins A, Kenlan P, Herbert S, *et al.* Mutational and Biological Analysis of α -Actinin-4 in Focal Segmental Glomerulosclerosis. *Journal of the American Society of Nephrology* 2005; **16**: 3694.
- 149 Wu K, Zhang H, Fu Y, *et al.* TLR4/MyD88 signaling determines the metastatic potential of breast cancer cells. *Mol Med Rep* 2018; **18**: 3411–20.
- 150 Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, *et al.* Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 2003; **301**: 640–3.
- 151 Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, *et al.* Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science (1979)* 2003; **301**: 640–3.
- 152 Yan S, Kumari M, Xiao H, *et al.* IRF3 reduces adipose thermogenesis via ISG15-mediated reprogramming of glycolysis. *J Clin Invest* 2021; **131**. DOI:10.1172/JCI144888.
- 153 Yanai H, Chiba S, Hangai S, *et al.* Revisiting the role of IRF3 in inflammation and immunity by conditional and specifically targeted gene ablation in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2018; **115**: 5253–8.
- 154 Yo Y, Braun MC, Barisoni L, *et al.* Anti-mouse mesangial cell serum induces acute glomerulonephropathy in mice. *Nephron Exp Nephrol* 2003; **93**: e92–106.
- 155 Zabriskie JB, Utermohlen V, Read SE, Fischetti VA. Streptococcus-related glomerulonephritis. *Kidney Int* 1973; **3**: 100–4.

6. Anhang

6.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Diagnoseverteilung der Quasi-Nieren-Studie bei dialysepflichtigen Patienten (2005)	11
Abb. 2	Elektronenmikroskopische Darstellung des glomerulären Filtrationsapparates	12
Abb. 3	Signalweg der verschiedenen Toll-like Rezeptoren, häufig mit MYD88 als Adaptorprotein	21

6.2 Koautorenschaft

Stimulation of Immune Checkpoint Molecule B and T-Lymphocyte Attenuator Alleviates Experimental Crescentic Glomerulonephritis

Diefenhardt P, Braumann M, **Schömig T**, Trinsch B, Sierra Gonzalez C, Becker-Gotot J, Völker LA, Ester L, Mandel AM, Hawiger D, Abdallah AT, Schermer B, Göbel H, Brinkkötter P, Kurts C, Benzing T, Brähler S. *J Am Soc Nephrol.* 2023;34(8):1366-1380. doi:10.1681/ASN.000000000000159