



MISE AU POINT

Acides nucléiques microbiens dans la physiopathologie des glomérulonéphrites

Microbial nucleic acids in the pathogenesis of glomerulonephritis

Hans-Joachim Anders, Daniel Zecher, Detlef Schlöndorff*

Service de néphrologie, polyclinique médicale, université de Munich, Allemagne

Reçu le 2 octobre 2006 ; accepté le 5 octobre 2006

MOTS CLÉS

Récepteurs apparentés
au récepteur Toll ;
Acides nucléiques
microbiens
glomérulonéphrite ;
Néphropathie lupique

Résumé Les progrès récents dans la compréhension de la reconnaissance innée des organismes pathogènes ont révélé que les acides nucléiques ont des fonctions immunomodulatrices dans l'inflammation. Un panel de récepteurs dont les modalités de reconnaissance sont proches de celles des récepteurs Toll, reconnaissent différents types d'acides nucléiques microbiens, c'est-à-dire l'ARN viral double brin (TLR3), l'ARN viral simple brin (TLR7 et TLR8), et l'ADN-CpG viral et bactérien (TLR9). Tous ces récepteurs TLR sont exprimés différemment dans le rein normal ou pathologique et la liaison des récepteurs TLR peut induire ou moduler l'évolution des glomérulonéphrites expérimentales. Dans cette revue, nous résumons les nouvelles données dans ce domaine et discutons de nouvelles hypothèses éclairant la physiopathologie des maladies rénales induites par les organismes infectieux.

© 2006 Elsevier Masson SAS et Association Société de Néphrologie. Tous droits réservés.

Abbreviations : ARN pl:C, ARN polyinosinique-polycytidilique ; domaine TIR domaine du récepteur Toll-interleukine 1 ; IRAK, kinase associée au récepteur de l'interleukin-1 ; IRF, facteur de régulation de l'interféron ; LPS, lipopolysaccharide ; MyD 88, protéine 88 associée à la réponse primaire de la différenciation myéloïde ; NF- κ B, facteur nucléaire kappa B ; ODN, oligodéoxyribonucléotide ; RIP, protéine d'interaction avec le récepteur ; TIRAP, protéine adaptatrice contenant un domaine TIR ; TLR, Récepteur homologue de Toll ; TRAF, facteur associé au récepteur du TNF ; TRAM, molécule adaptatrice liée au TRIF ; TRIF, la protéine adaptatrice induisant l'interféron bêta contenant le Domaine TIR.

Abbreviations: IRAK, interleukin-1 receptor-associated kinase; IRF, interferon regulatory factor; LPS, lipopolysaccharide; MyD88, myeloid differentiation primary-response protein 88; NF- κ B, nuclear factor kappa B; ODN, oligodeoxyribonucleotide; pl:C, RNA polyinosinic-polycytidilic ribonucleic acid; RIP, receptor interacting protein; TIRAP, TIR-domain-containing adaptor protein; TIR, domain Toll-interleukin 1 receptor domain; TRAF, TNF receptor associated factor; TRAM, TRIF-related adaptor molecule; TRIF, TIR domain-containing adaptor protein-inducing-interferon beta; TLR, Toll-like receptor.

* Auteur correspondant. Medizinische Poliklinik der LMU, Pettenkoferstr. 8a, 80336 Munich, Allemagne.

Adresse e-mail : sdorff@med.uni-muenchen.de (D. Schlöndorff).

KEYWORDS

Toll-like receptors;
Microbial nucleic acids;
Glomerulonephritis;
Lupus nephritis

Abstract Recent advances in the understanding of innate pathogen recognition revealed that nucleic acids have immunomodulatory functions in inflammation. A set of Toll-like pattern-recognition receptors recognize various types of microbial nucleic acids, i.e. double-stranded viral RNA (TLR3), single-stranded viral RNA (TLR7 and TLR8), and viral and bacterial CpG-DNA (TLR9). All of these TLRs are differentially expressed in the healthy and diseased kidney and TLR ligation was shown to initiate and modulate experimental glomerulonephritis. In this review we summarize the arising evidence in this field and discuss new hypotheses for the pathogenesis of kidney diseases that are triggered by infectious organisms.

© 2006 Elsevier Masson SAS et Association Société de Néphrologie. Tous droits réservés.

Version française**Introduction**

Les glomérulonéphrites cryoglobulinémiques post-infectieuses et associées aux virus de l'hépatite sont des exemples de la façon dont la réponse immunitaire antimicrobienne peut induire une atteinte glomérulaire. De plus, l'évolutivité des glomérulopathies dans les maladies à IgA, les vascularites rénales et les néphropathies lupiques est souvent liée à des épisodes d'infection microbienne, malgré un tableau clairement distinct des glomérulonéphrites post-infectieuses. Les mécanismes moléculaires qui lient l'immunité antimicrobienne à l'activité des glomérulopathies sont complètement inconnus mais peuvent être liés aux effets immunostimulants des antigènes microbiens et aux conséquences humorales de l'immunité antimicrobienne.

La découverte de Jules Hoffmann, qui a montré le rôle du gène *Toll*, impliqué dans le développement chez la drosophile, dans l'immunité antifongique [1], a eu un impact majeur sur notre compréhension de la reconnaissance innée des pathogènes. Les homologues humains du récepteur Toll de la drosophile ont été identifiés comme une nouvelle famille de récepteurs impliqués dans les processus de reconnaissance immuns qui reconnaissent une grande variété d'agents infectieux comme les virus, les champignons et les bactéries. Les récepteurs homologues de Toll (TLR) reconnaissent des molécules conservées comme les protéoglycans, les lipopolysaccharides (LPS), et de façon plus intéressante, les acides nucléiques ([2] Fig. 1). Un sous-groupe des TLR humains connus reconnaît différentes formes d'acides nucléiques microbiens. Dans cette revue, nous résumons les nouvelles données sur le rôle fonctionnel des TLR spécifiques des acides nucléiques dans la physiopathologie des glomérulonéphrites.

Acides nucléiques microbiens et TLRs spécifiques des acides nucléiques

Quatre des onze TLRs humains connus à ce jour reconnaissent spécifiquement les acides nucléiques c'est-à-dire TLR3, TLR 7/8 et TLR9.

TLR3

TLR3 reconnaît les acides ribonucléiques doubles brins (ARNdb) présents soit dans les virus à ARNdb [3] ou comme intermédiaires de réplication dans les virus à ARNsb [4]. On a également rapporté que le TLR3 peut être activé par les

ARNm endogènes [5]. La plupart des études réalisées à ce jour ont utilisé l'ARN polyinosinique-polycytidilique (PI : C), une structure synthétique capable de mimer l'ARNdb viral et d'agir comme agoniste du TLR3. Chez l'homme le TLR3 est exprimé dans les cellules dendritiques myéloïdes, mais chez la souris, il est également exprimé sur les monocytes et les fibroblastes [3,6,7]. Il faut remarquer que le TLR3 est le seul TLR spécifique des acides nucléiques exprimé sur les cellules glomérulaires mésangiales et les cellules musculaires lisses vasculaires chez la souris et chez l'homme [8-10]. Après stimulation par l'ARNdb viral, les cellules mésangiales produisent des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL6 ainsi que des chémokines MCP-1 et RANTES [9]. En réponse aux ARNdb, les cellules dendritiques produisent certaines cytokines sélectionnées comme l'IL12 qui induit l'activation des cellules T vers un phénotype Th1 [3,11]. De plus, la liaison au TLR3 stimule les cellules dendritiques qui produisent une grande quantité d'interférons de type 1, qui sont des médiateurs puissants de l'immunité antivirale [12].

TLR7 et TLR8

Les TLR7 et 8 ont été les premiers identifiés comme susceptibles de reconnaître un groupe d'imidazoquinolines synthétiques [13]. Ce n'est que récemment que différents groupes de recherche ont identifié le ligand naturel des TLR7 et 8 humains comme étant l'ARNsb viral [14-16] ainsi que certaines séquences d'ARN endogènes impliqués dans les maladies auto-immunes [17,18].

Le TLR7 est exprimé sur les cellules dendritiques plasmacytoïdes et myéloïdes ainsi que sur les cellules B [13,19]. Le TLR8 n'est retrouvé que sur les cellules dendritiques myéloïdes et les macrophages [20]. TLR7 et TLR8 ne sont pas exprimés sur les cellules non immunes comme les cellules rénales. La liaison de TLR7 et de TLR8 par les ARNss active les cellules dendritiques, les macrophages et les cellules B et favorise la production d'interféron de type I, d'IL12 et de TNF α [13,15,21]. Cette réponse cytokinique spécifique après exposition aux ligands de TLR7 stimule l'immunité antivirale contre les virus à ADN tels que le cytomégalovirus et le virus de l'immunodéficience humaine [22,23].

TLR9

Le TLR9 reconnaît l'ADN contenant les séquences non méthylées cytosine-guanosine (CpG-ADN), séquences dinucléotidiques identifiées comme un motif stimulant dans l'ADN bactérien et viral. [24]. Chez l'homme, l'expression du TLR9 est restreinte aux cellules B et aux cellules dendritiques plasmacytoïdes, alors que chez la souris l'expression

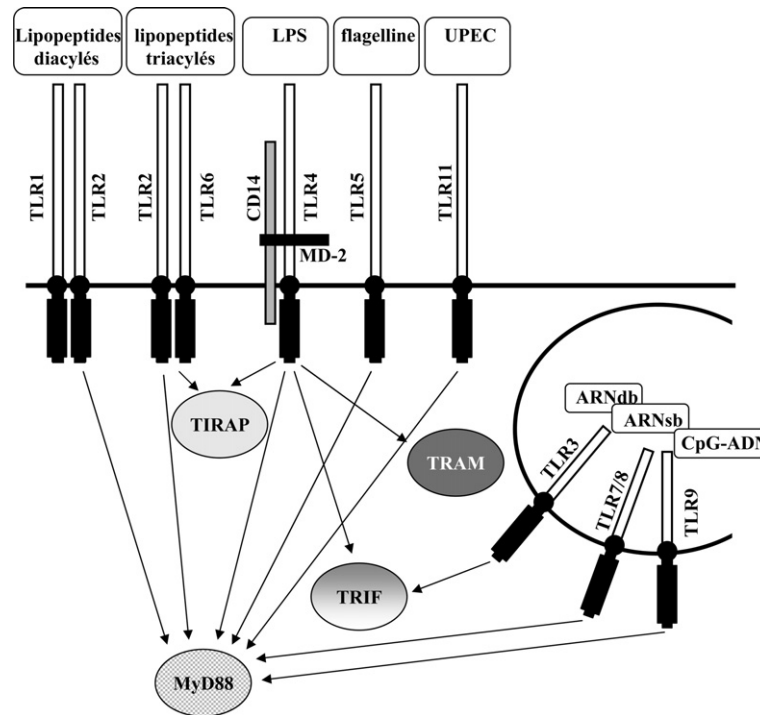


Figure 1 Voie de signalisation des TLR. Quelques TLRs reconnaissent des motifs moléculaires microbiens à la surface cellulaire. Les TLRs reconnaissant spécifiquement les acides nucléiques sont localisés dans les endosomes intracellulaires. La spécificité de la voie de signalisation des TLR est assurée par un groupe de molécules adaptatrices redistribuées vers le domaine Toll/Interleukine 1 après l'activation (réimprimé avec permission de BioMed Central, Anders H.-J., et al. *Arthritis Res. Ther.* 2005;7:215-24).

Toll-like receptor signaling. Some TLRs recognize pathogen-associated molecules at the cell surface. Nucleic-acid-specific TLRs localize in intracellular endosomes. Specificity of TLR signaling is provided by a group of cytosolic adaptor molecules redistributing to the intracellular Toll/Interleukin-1 receptor (TIR) domain upon activation (reprinted with permission from BioMed Central, Anders H.-J., et al. *Arthritis Res Ther.* 2005;7:215-24).

du TLR9 est également retrouvée dans les monocytes-macrophages et dans les cellules dendritiques myéloïdes [25]. Le TLR9 n'est pas exprimé par les cellules non immunes. L'activation du TLR9 joue un rôle majeur dans la régulation de la production d'anticorps [26].

De nombreuses données documentent la voie de signalisation complexe des TLR [2]. En résumé, tous les TLRs partagent un domaine cytoplasmique de signalisation commun, le récepteur Toll-interleukine 1 (TIR). La liaison avec le ligand, induit pour tous les TLRs sauf pour le TLR3, le recrutement de la molécule adaptatrice MyD88. D'autres molécules spécifiques du récepteur induisent finalement la translocation de NF- κ B dans le noyau, ou la transcription des gènes pro-inflammatoires incluant ceux du TGF α , de l'IL6, de l'IL18, de l'IL8, de l'IL12 et de l'IL18 ainsi que ceux des chémokines [27] est initiée. La signalisation de TLR3 au contraire, implique spécifiquement le domaine TIR contenant la protéine adaptatrice induisant l'interféron bêta (TRIF). Les voies de signalisation de TLR3 en aval de TRIF sont triples : activation des facteurs de transcription AP-1 et NF- κ B qui induit l'expression d'une large variété de gènes pro-inflammatoires comme dans la voie dépendante de MyD88 [28,29] ; activation du facteur transcriptionnel IRF-3 qui induit l'expression de l'interféron de

type 1 [30] et la stimulation de la sérine-thréonine kinase RIP3 qui active la cascade apoptotique dépendante des caspases [31].

Acides nucléiques microbiens et récepteurs analogues de Toll spécifiques des acides nucléiques dans la pathogénie des glomérulonéphrites

Rôle direct du TLR3 mésangial dans les glomérulonéphrites membranoprolifératives

Dans les glomérulonéphrites post-infectieuses, les complexes immuns circulants contenant des produits bactériens induisent une atteinte glomérulaire. Le même mécanisme explique les glomérulonéphrites associées à l'infection chronique par le virus C et par le virus du VIH. En fait, l'ARN du VHC et les anticorps anti-HCV sont retrouvés dans les glomérules de patients porteurs de glomérulonéphrite associée au virus C. Les observations montrant que lorsque du ARNdb viral est administré chez la souris atteinte de glomérulonéphrite, il est retrouvé dans le glomérule et endocyté par les cellules mésangiales dans des vésicules endosomales supportent l'hypothèse de l'implication de l'ARN dans ces phénomènes [8].

L'internalisation de l'ARNsb viral active le TLR3 et induit la production d'IL-6, IL-18, l'IL-8, ICAM, M-CSF et d'autres facteurs pro-inflammatoires dans les cellules mésangiales murines et humaines en culture [8,10]. De plus, l'analyse en PCR de glomérules microdisséqués provenant de patients atteints d'hépatite C et de glomérulonéphrite a montré une augmentation de l'expression de l'ARNm de TLR3 comparé aux isolats d'ARN glomérulaires de patients atteints de glomérulonéphrites idiopathiques, non associées à l'infection par le VHC ou chez le sujet sain [10]. Enfin, la stimulation de TLR3 induit des effets antiprolifératifs et proapoptotiques dans les cellules mésangiales humaines en culture via des mécanismes dépendants des caspase-8 [10]. C'est pourquoi l'ARNdb viral circulant, plus probablement sous la forme de complexes immuns, est un stimulus puissant de l'activation des cellules mésangiales et de l'induction de l'apoptose des cellules mésangiales dans les glomérulonéphrites. Comme les cellules mésangiales n'expriment que TLR3 mais pas TLR7/8 et TLR9, ces effets ne peuvent pas être induits par l'ARNsb ou le CpG-ADN. En fait, aucun des virus à ADN humains, c'est-à-dire les herpes virus humains, les polyomavirus, les parvovirus ou les adénovirus, n'est fréquemment associé aux glomérulonéphrites. À l'opposé, les virus fréquemment associés aux glomérulonéphrites sont les virus à ARN, c'est-à-dire, HCV et HIV. On ne sait pas actuellement si les transcripts intermédiaires doubles-brins ou si les séquences en épingle à cheveu des virus à ARNsb peuvent activer TLR3 dans les cellules mésangiales. Le fait que l'ARN viral circulant soit habituellement complexé avec des immunoglobulines ou des protéines virales pourrait proférer une résistance à la digestion rapide par les ARNses. Comme l'endothélium glomérulaire est fenêtré, ces complexes entrent probablement dans le mésangium ou ils sont exposés et internalisés par les cellules mésangiales. Ce phénomène induirait la synthèse de cytokines pro-inflammatoires et de chémokines, qui à leur tour favoriseraient l'infiltration locale par les leucocytes et leur activation et en conséquence le développement de la glomérulonéphrite.

Rôle du TLR3, -7, et -9 dans l'aggravation des néphrites à complexes immuns préexistantes

Nous avons récemment montré que l'ARNdb circulant peut aggraver les lésions liées à une glomérulonéphrite à complexes immuns préexistante chez la souris MRL^{lpr/lpr}, un modèle de néphropathie lupique humaine. L'injection d'ARNdb est associée à l'activation des cellules mésangiales et des macrophages intrarénaux (Fig. 2). De plus, l'ARNdb induit des lésions de mésangiolyse chez la souris MRL^{lpr/lpr} atteinte de glomérulonéphrite. L'ARNdb n'affecte pas la production d'autoanticorps anti-ADN ou les dépôts glomérulaires d'immuns complexes, ce qui est attendu vu l'absence d'expression de TLR3 dans les cellules B. Donc, les lésions de mésangiolyse sont plus probablement liées à l'effet direct de l'ADNdb sur les cellules mésangiales, c'est-à-dire à l'induction de phénomènes d'apoptose des cellules mésangiales comme observé dans les cultures de cellules mésangiales humaines [10].

Apparemment, l'ARNdb viral peut aggraver la néphropathie lupique localement par le biais de l'effet de TLR3 sur

les macrophages, les cellules dendritiques et les cellules glomérulaires mésangiales rénales.

L'exposition transitoire au CpG-ADN ou à l'ARNsb viral chez la souris MRL^{lpr/lpr} a également été étudiée. Le CpG-ADN ou l'ARNsb injecté se lie aux macrophages et aux cellules dendritiques localisés dans les glomérules et les aires tubulo-interstitielles des reins néphritiques [32,33]. Les cellules rénales intrinsèques n'incorporent pas ces ligands, ce qui est compatible avec l'absence d'immunomarquage pour TLR7 et de TLR9 dans les cellules intrinsèques rénales. Le traitement avec le CpG-ADN ou l'imiquimod, un agoniste du TLR7 induit de façon importante l'expression locale des chémokines dans les cellules immunes de l'infiltrat marquées positivement pour TLR7 et TLR9. Cela s'associe à une augmentation de l'infiltrat périglomérulaire et interstitiel constitué de macrophages et de cellules T. Le CpG-ADN et l'imiquimod aggravent sévèrement l'atteinte glomérulaire et tubulo-interstitielle chez la souris MRL^{lpr/lpr}. Le CpG-ADN bactérien augmente la production d'autoanticorps IgG_{2a} anti-ADNsb et les dépôts glomérulaires, le switch de classe des IgG étant un mécanisme crucial dans le lupus identifié comme médié par TLR9 [34]. Ce phénomène est moins marqué chez les souris traitées par l'imiquimod, ce qui est compatible avec l'observation que l'interaction TLR7/ARNsb n'active pas les cellules B en l'absence de taux significatifs d'IFN α [35].

En conclusion, la stimulation des cellules glomérulaires mésangiales par l'interaction du TLR3 avec l'ARNdb, son ligand, dans les maladies glomérulaires a deux effets distincts : un rôle pathogène direct comme démontré dans les glomérulonéphrites membranoprolifératives dans l'infection chronique à HCV, ainsi qu'un rôle dans l'exacerbation des maladies glomérulaires préexistantes comme dans les néphropathies lupiques. L'activité de la maladie induite par l'ARNdb est indépendante de l'activation des cellules B et de l'immunité humorale antichromatine dans le lupus expérimental, et de ce fait diffère des effets des ligands circulants TLR7 et du CpG-ADN bactérien.

Rôle du TLR9 dans la néphropathie lupique

Le lupus systémique est associé à une prolifération polyclonale B et à la production d'autoanticorps anti-ADNdb chez l'homme, ce dernier événement étant corrélé à l'activité de la maladie. On a montré que les complexes immuns contenant la chromatine du self stimulent les cellules B isolées de souris MRL^{lpr/lpr} via TLR9 [36]. Un autre marqueur de sévérité de la maladie, l'IFN α , est produit par les cellules dendritiques en réponse aux complexes autoanticorps lupiques anti ADN via TLR9, créant un lien entre la réponse immune antivirale et le lupus humain [37]. Deux groupes ont étudié le phénotype des souris MRL^{lpr/lpr} déficiente en TLR9 pour définir le rôle de TLR9 dans la pathogénie du lupus [38,39].

Malheureusement, les deux études ont démontré des résultats opposés en termes de production d'autoanticorps et de survenue du lupus.

Christensen et al. ont observé une diminution de la production d'autoanticorps anti-ADNsb chez les souris MRL^{lpr/lpr} de génération F1 déficientes en TLR9, ce qui est une stratégie de croisement insuffisante. La survenue du lupus chez ces souris n'était pas modifiée [38]. À l'opposé,

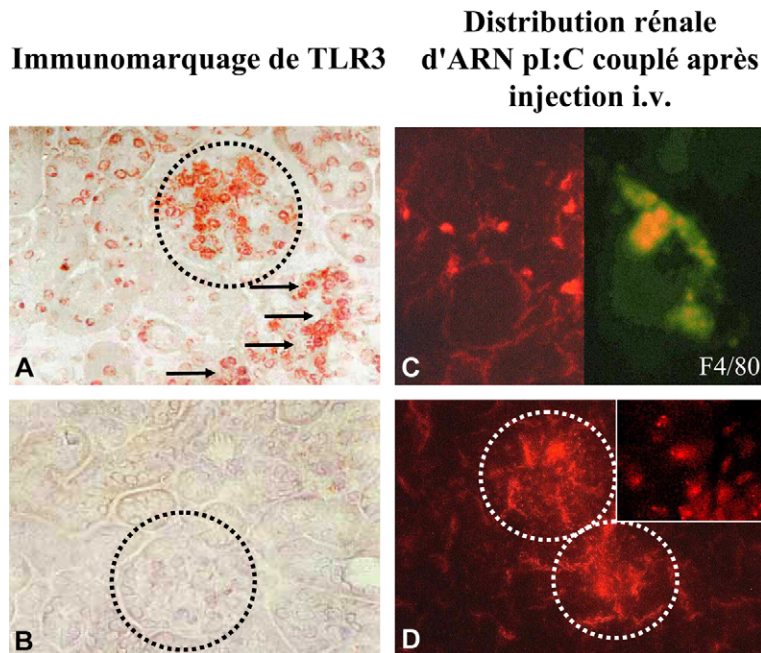


Figure 2 *TLR3 dans le rein de souris.* A : Immunomarquage de TLR3 se trouve auprès des infiltrats des cellules immunes (flèche) et auprès des glomérules d'une façon de distribution mésangiale (glomérule encerclé). B : Immunomarquage négative de contrôle. C et D : ARNdb couplés à la rhodamine ont été injectés par voie intraveineuse dans les souris MRL^{lpr/lpr} âgées de 16 semaines et le tissu rénal a été analysé deux heures après. Images de fluorescence de coupes en congélation montrent l'incorporation d'ARN pl:C par des cellules immunes de l'infiltrat interstitiel (flèches dans l'image de gauche de C) et par des cellules glomérulaires mésangiales (encerclé et magnification plus élevée à l'insertion de D) conforme au marquage de TLR3. Le comarquage avec l'anticorps F4/80 couplé à la FITC identifie les cellules immunes de l'infiltrat interstitiel positives d'ARNdb comme cellules présentatrices de l'antigène de type monocyte et illustre l'incorporation des ARNdb couplé à la rhodamine dans des endosomes intracellulaires (réimprimé avec permission de Lippincott Williams & Wilkins, Patole PS, et al. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2005;16:1326-38).

TLR3 in the mouse kidney. A: Immunostaining for TLR3 localizes to inflammatory cell infiltrates (arrows) and to glomeruli in a mesangial staining pattern (glomerulus encircled). B: negative control staining. C and D: rhodamine-labeled dsRNA was intravenously injected into 16 week old MRL^{lpr/lpr} mice and renal tissue was harvested two hours later. Fluorescence imaging of frozen sections showed uptake of labeled pl:C RNA in interstitial cells (arrows in left image of C) and in mesangial cells in glomeruli (encircled and at higher magnification in insert of D) consistent with the staining pattern for TLR3. Costaining with an FITC-labeled F4/80 antibody identified dsRNA-positive interstitial cells to be antigen-presenting cells of the monocytic cell lineage and illustrates the uptake of rhodamin-labeled-dsRNA in intracellular endosomes (reprinted with permission from Lippincott Williams & Wilkins, Patole PS, et al. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2005 May;16:1326-38).

dans l'étude de WU et al., les auteurs ont utilisé des souris déficientes en TLR9 MRL^{lpr/lpr} croisées pendant six générations pour 24 marqueurs génétiques du génotype MRL particulièrement favorisant du lupus [39]. De façon surprenante, les auteurs ont trouvé une augmentation de la production d'autoanticorps et une aggravation de la néphropathie lupique chez les souris TLR9^{-/-}. Cela pourrait être lié au rôle potentiel du TLR9 sur la fonction régulatrice des cellules T, ce qui pourrait même représenter un effet protecteur de TLR9 sur la néphropathie lupique. Ces données s'opposent à la production d'autoanticorps et à l'atteinte auto-immune induite par TLR9 discutées plus haut. Il faut noter que l'élimination génétique de TLR9 dans des modèles de knock-out pourrait modifier complètement le système immunitaire et n'est pas comparable à l'effet obtenu par inhibition ou activation spécifique de TLR9 chez la souris ayant un système immunitaire normal.

Dans tous les cas, ces données contradictoires concernant le rôle de TLR9 dans la pathogénie du lupus restent à être éclaircies.

Les récepteurs Toll spécifiques des acides nucléiques comme cibles thérapeutiques

Les effets immunostimulateurs du CpG-ADN ainsi que l'imiquimod, agoniste de TLR7 peuvent être neutralisés par des ODN synthétiques contenant certaines séquences inhibitrices [17,40,41]. Nous avons injecté des ODN susceptibles d'inhiber le CpG-ADN à des souris MRL^{lpr/lpr} de la semaine 11 à la semaine 24 postnatale. Par comparaison aux souris ayant reçu du sérum physiologique, les souris MRL^{lpr/lpr} ayant reçu les ODN inhibiteurs n'ont pas présenté d'atteinte lupique systémique ou rénale et avaient des taux d'autoanticorps anti-ADN moins élevés, des dépôts d'immuns complexes moins importants et un taux sérique

d'IFN α inférieur [42]. Ces données confirment les résultats d'une étude récente dans laquelle des souris NZB/NZW atteintes de néphropathie lupique ont reçu un ODN inhibiteur TTAGGG [43]. Dans ces deux études, les souris auto-immunes n'avaient pas été exposées à l'ADN microbien, ce qui renforce le rôle du CpG-ADN dans la production des autoanticorps anti-ADNdb et l'induction du lupus. Le CpG-ADN pourrait provenir de l'ADN du self hypométhylé ou du CpG-ADN non méthylé relargué par les bactéries intestinales. D'après les données ci-dessus, le rôle de TLR9 dans ce contexte reste controversé, mais offre potentiellement de nouvelles stratégies thérapeutiques dans le traitement du lupus chez l'homme.

Implications pour la recherche

Le lien entre les études in vitro et expérimentales et la maladie rénale chez l'homme reste à confirmer, en particulier pour le TLR9. Les données concernant le TLR3 chez l'homme dans les glomérulonéphrites associées au VHC pourraient orienter vers un nouveau mécanisme physiopathologique dans certaines formes de glomérulonéphrites. La découverte d'acides nucléiques microbiens dans les biopsies rénales humaines à l'intérieur du compartiment endosomal des cellules immunitaires ou mésangiales serait un autre élément en faveur de cette hypothèse. Cette approche est cependant difficile car la nature de l'agent pathogène est habituellement inconnue. De plus, la costimulation du TLR spécifique des acides nucléiques a des effets additifs sur la production des cytokines dans les cellules dendritiques [44]. La contribution d'une liaison simple au TLR par rapport à des interactions plus complexes associant plusieurs ligands reste à être déterminée. De plus en plus d'éléments suggèrent que les acides nucléiques endogènes ont des propriétés stimulantes de l'auto-immunité et peuvent avoir un rôle potentiellement pathogène dans les maladies auto-immunes.

Les immuns complexes contenant de l'ADN ou de l'ARN peuvent activer les cellules autoréactives B [18,36] et les cellules dendritiques plasmacytoïdes via le TLR9 et le TLR7 respectivement [37]. En accord avec « l'hypothèse du danger » proposée par Matzinger [45], les acides nucléiques relargués à partir des cellules nécrosées ou de cellules en voie d'apoptose pourraient contribuer à l'atteinte tissulaire par les mécanismes ci-dessus. Dans le contexte spécial de la présence de TLR3 dans les cellules mésangiales, il est intéressant d'imaginer que la possible liaison de l'ARNdb viral au TLR3 dans ces cellules pourrait être impliquée dans certains cas de vascularites à dépôts d'IgA et même de vascularites virales.

Remerciements

Ce travail a été financé par une bourse de la Deutsche Forschungsgemeinschaft (AN372/4-1, GRK 1201), la Fritz Thyssen Foundation, l'EU Network of Excellence « MAIN » (FP6-502935), et l'EU Integrated Project « INNOCHEM » (FP6-518167).

La rédaction remercie très vivement le Dr Corinne ISNARD-BAGNIS qui a traduit ce texte.

English version

Introduction

Postinfectious and hepatitis virus-associated cryoglobulinemic glomerulonephritis represent examples of how antimicrobial immune responses can trigger glomerular injury. Furthermore, glomerular disease activity of IgA nephropathy, renal vasculitis and lupus nephritis is often linked to episodes of microbial infection, a presentation clearly distinct from classical postinfectious glomerulonephritis. The molecular mechanisms that link antimicrobial immunity to disease activity of glomerulonephritis are largely unknown but may be related to the immunostimulatory effects of microbial antigens and the humoral consequences of antimicrobial immunity.

Jules Hoffmann's discovery, that the *Drosophila* developmental gene *Toll* is involved in antifungal immunity [1], had great impact on our understanding of innate pathogen recognition. The human homologs of *Drosophila*'s *Toll* were found as a new family of human pattern recognition receptors that recognize a great variety of pathogens including viruses, fungi and bacteria. The Toll-like receptors (TLRs) recognize conserved molecular patterns including peptidoglycans, lipopolysaccharides (LPS), and - most interestingly - nucleic acids ([2], Fig. 1). A subgroup of the known human TLRs recognizes various forms of microbial nucleic acids. In this review we summarize new data concerning the functional role of nucleic acid-specific TLRs in the pathophysiology of glomerulonephritis.

Microbial nucleic acids and the nucleic acid specific TLRs

Four of the eleven human TLRs known to date specifically recognize nucleic acids, i.e. TLR3, TLR7/8, and TLR9.

TLR3

TLR3 recognizes double-stranded RNA (dsRNA) found in either dsRNA viruses [3] or as transcription intermediates during replication of ssRNA viruses [4]. TLR3 has also been reported to be activated by endogenous mRNA [5]. Most studies performed so far used polyinosinic-polycytidilic (pI: C) RNA, a synthetic structural mimic of viral dsRNA as a TLR3 agonist. In humans TLR3 is expressed by myeloid dendritic cells, but mice do also express TLR3 on monocytes and fibroblasts [3,6,7]. Interestingly, TLR3 is the only nucleic acid-specific TLR expressed by glomerular mesangial cells and vascular smooth muscle cells in mice and humans [8-10]. After stimulation with viral double-stranded (ds) RNA, mesangial cells produce inflammatory cytokines such as IL-6 as well as the chemokines MCP-1 and RANTES [9]. In response to dsRNA, dendritic cells produce selected cytokines e.g. IL-12 which affects T cell priming towards a Th1 phenotype [3,11]. In addition, TLR3 ligation stimulates dendritic cells to produce large amounts of type I interferons, which are potent mediators of antiviral immunity [12].

TLR7 and TLR8

TLR7 and -8 were first identified to recognize a group of synthetic imidazoquinolines [13]. Only recently several groups identified the natural ligand for human TLR7 and -8 to be single-stranded viral RNA [14-16] as well as some endogenous RNA-sequences involved in autoimmune disease [17,18]. TLR7 is expressed on plasmacytoid and myeloid dendritic cells as well as on B cells [13,19]. TLR8 is only found on human myeloid dendritic cells and macrophages [20]. TLR7 and TLR8 are not expressed on any non-immune cell type including the kidney. Ligation of TLR7 and TLR8 by ssRNA activates dendritic cells, macrophages, and B cells to produce type I interferons, IL-12, and TNF α [13,15,21]. This specific cytokine response upon exposure to TLR7 ligands enhances antiviral immunity against DNA viruses such as cytomegalovirus and human immunodeficiency virus [22,23].

TLR9

TLR9 recognizes unmethylated cytosin-guanosin (CpG-) containing DNA, a dinucleotide sequence that has been identified as a stimulatory motif in bacterial and viral DNA [24]. In humans, TLR9 expression is restricted to B cells and plasmacytoid dendritic cells, whereas in mice TLR9 is also expressed on monocytes/macrophages and myeloid dendritic cells [25]. TLR9 is not expressed on non-immune cells. Activation of TLR9 plays a major role in the regulation of antibody production [26].

There are accumulating data about the complex signaling pathways of TLR [2]. Briefly, all TLRs share a common cytoplasmatic signaling domain, the Toll-interleukin 1-receptor (TIR) domain. After ligand binding, all TLRs except for TLR3 lead to the recruitment of the adaptor molecule MyD88. Further receptor-specific molecules finally induce translocation of NF- κ B into the nucleus, where the transcription of proinflammatory genes including those for TNF α , IL-6, IL-1 β , IL-8, IL-12, IL-18 as well as for chemokines [27] is initiated. TLR3 signaling, on the other hand, specifically involves the TIR domain-containing adaptor protein-inducing-interferon beta (TRIF). The TLR3 signaling pathways downstream of TRIF are threefold: activation of the transcription factors AP-1 and NF- κ B induces the expression of a wide variety of proinflammatory genes similar to the MyD88-dependent pathway [28,29], activation of the transcription factor IRF-3 results in expression of type I interferons [30], and the serine-threonine kinase RIP3 triggers caspase-induced apoptosis [31].

Microbial nucleic acids and the nucleic acid-specific toll-like receptors in the pathogenesis of glomerulonephritis

Direct involvement of mesangial TLR3 in membranoproliferative glomerulonephritis

Circulating immune complexes containing bacterial products cause glomerular injury in postinfectious glomerulonephritis. Similar mechanisms link chronic hepatitis C (HCV) and HIV infection to glomerulonephritis. In fact, HCV RNA and anti-HCV-Ab are found in glomeruli of patients with HCV-associated glomerulonephritis. That viral RNA might be involved in that process is supported by the obser-

vation that injected viral dsRNA distributes to the glomerulus and is taken up by mesangial cells into intracellular endosomes in mice with glomerulonephritis [8]. Uptake of viral dsRNA upregulates TLR3 itself and induces the production of IL-6, IL-1 β , IL-8, ICAM, M-CSF and other proinflammatory factors in cultured murine and human mesangial cells [8,10]. Furthermore, PCR analysis of microdissected glomeruli from patients with hepatitis C positive glomerulonephritis revealed increased TLR3 mRNA expression as compared to glomerular RNA isolates from either patients with idiopathic, non HCV-associated glomerulonephritis or normal human kidney [10]. Finally, TLR3 stimulation induced anti-proliferative and pro-apoptotic effects in cultured human mesangial cells via a caspase-8 dependent mechanism [10]. Hence, circulating viral dsRNA, most likely in the form of immune complexes, is a potent stimulus for mesangial cell activation and induction of mesangial cell apoptosis in glomerulonephritis. As mesangial cells only express TLR3 but lack TLR7/8 and TLR9 expression, these effects can not be induced with viral ssRNA or CpG-DNA. In fact, none of the human DNA viruses, i.e. human herpes viruses, polyomaviruses, parvoviruses or adenoviruses, are commonly associated with glomerulonephritis. By contrast, viruses commonly associated with glomerulonephritis are RNA viruses, e.g. HCV and HIV. Whether double-stranded transcript intermediates or hairpin-like sequences of ssRNA viruses activate TLR3 on mesangial cells is unknown to date. The fact that circulating viral RNA is usually complexed with immunoglobulins or viral proteins may provide resistance against rapid RNase digestion. Because of the fenestrated glomerular endothelium, such complexes are likely to enter the mesangium where they are exposed to and likely taken up by mesangial cells. This would result in the generation of proinflammatory cytokines and chemokines, which in turn would cause local leukocyte infiltration and activation and hence glomerulonephritis.

Roles of TLR3, -7, and -9 in the exacerbation of pre-existing immune complex nephritis

We have recently shown that circulating dsRNA can aggravate established immune complex glomerulonephritis in MRL^{lpr/lpr} mice, a model of human lupus nephritis [8]. Injection with dsRNA was associated with the activation of mesangial cells and intrarenal macrophages (Fig. 2). Moreover, dsRNA induced mesangiolysis in nephritic MRL^{lpr/lpr} mice. Consistent with the lack of TLR3 expression on B-cells, dsRNA did not affect DNA autoantibody production and glomerular immune complex deposits. Hence, mesangiolysis was most likely caused by a direct effect of dsRNA on mesangial cells, e.g. by inducing mesangial cell apoptosis as observed in cultured human mesangial cells [10]. Apparently, viral dsRNA can aggravate lupus nephritis locally through TLR3 on renal macrophages, dendritic cells, and glomerular mesangial cells.

Transient exposure to bacterial CpG-DNA or viral ssRNA in MRL^{lpr/lpr} mice was also studied. Injected CpG-DNA and ssRNA bound to macrophages and dendritic cells localized to glomeruli and tubulointerstitial areas in nephritic kidneys [32,33]. Intrinsic renal cells did not incorporate these ligands, consistent with a lack of TLR7 and TLR9 immunostaining on intrinsic renal cells. Treatment with bacterial

CpG-DNA or the TLR7 agonist imiquimod markedly induced local chemokine expression in immune cell infiltrates that stained positive for TLR7 and TLR9. This was associated with an increase of periglomerular and interstitial macrophage and T cell infiltrates. CpG-DNA and imiquimod severely aggravated glomerular and tubulointerstitial damage in MRL^{lpr/lpr} mice. Bacterial CpG-DNA increased the production of pathogenic IgG_{2a} dsDNA autoantibodies and glomerular IgG deposits, IgG class switching being a crucial mechanism in lupus recently identified to be mediated through TLR9 [34]. This was less prominent in imiquimod-treated mice, consistent with the observation that ssRNA/TLR7 interaction cannot activate B cells in the absence of significant IFN α levels [35].

Taken together, stimulation of glomerular mesangial cells via the interaction of TLR3 with its ligand dsRNA in glomerular disease has two distinct effects: A direct pathogenetic role as shown for membranoproliferative glomerulonephritis in chronic HCV-infection, as well as a role in exacerbation of pre-existing glomerular disease as in lupus nephritis. DsRNA-induced disease activity is independent of B cell activation and humoral anti-chromatin immunity in experimental SLE, and therefore differs from effects of circulating TLR7 ligands and bacterial CpG-DNA.

Role of TLR9 in the generation of lupus nephritis

Systemic lupus is associated with polyclonal B cell proliferation and dsDNA autoantibody production in humans, the latter correlating with disease activity. It has been shown that self chromatin-containing immune complexes stimulate B cells isolated from MRL^{lpr/lpr} mice via TLR9 [36]. Another marker of disease severity in humans, IFN α , has been shown to be produced by dendritic cells in response to human lupus autoantibody-DNA-complexes via TLR9, linking antiviral immune response to human lupus [37]. Addressing the role of TLR9 in the pathogenesis of lupus nephritis, two groups reported the phenotype of TLR9-deficient MRL^{lpr/lpr} mice [38,39]. Unfortunately, both attempts demonstrated opposite results in terms of autoantibody production and onset of lupus nephritis. Christensen et al. observed reduced dsDNA autoantibody production in TLR9-deficient MRL^{lpr/lpr} mice of the F1 generation, which represents an insufficient backcrossing strategy. Onset of lupus nephritis was unaltered in these mice [38]. In contrast, the study of Wu et al. used TLR9-deficient MRL^{lpr/lpr} mice backcrossed for 6 generations for 24 genetic markers of the particular lupus-prone MRL genotype [39]. Surprisingly, they found increased autoantibody production and aggravation of lupus nephritis in TLR9^{-/-} mice. This may relate to a potential role of TLR9 on the function of regulatory T cells which could even represent a protective effect of TLR9 on lupus nephritis. These findings are in contrast to the TLR9-mediated autoantibody production and autoimmune injury in lupus discussed earlier. It should be noted that genetically eliminating TLR9 by knock-out may alter the entire immune system and cannot be compared with results obtained by studies that specifically inhibited or stimulated the TLR9-system in mice with a normal immune system. In any case, these inconsistent data about a role of TLR9 in the pathogenesis in lupus nephritis remain to be resolved.

Nucleic acid-specific Toll-like receptors as therapeutic targets

The immunostimulatory effects of CpG-DNA as well as the TLR7-agonist imiquimod can be neutralized with synthetic ODN of certain inhibitory sequence motifs [17,40,41]. We injected ODN known to inhibit CpG-DNA into MRL^{lpr/lpr} mice from week 11 to 24 of age. When compared with saline-injected MRL^{lpr/lpr} mice, inhibitory ODN prevented systemic lupus and lupus nephritis, associated with decreased production of dsDNA autoantibodies, glomerular immune complex deposits as well as systemic IFN α levels [42]. These data confirmed the results of a recent study that applied inhibitory TTAGGG ODN in NZB/NZW mice with lupus nephritis [43]. In both studies the autoimmune mice had not been exposed to microbial DNA, which supports the role of CpG-DNA for dsDNA autoantibody production and lupus nephritis. Such CpG-DNA might either originate from hypomethylated self-DNA or unmethylated CpG-DNA released from intestinal bacteria. With respect to the above mentioned data, the role of TLR9 in this context remains controversial, but potentially offers new therapeutic strategies in the treatment of human lupus.

Implications for future research

The relevance of the in vitro and experimental data for human kidney disease remains uncertain, especially for TLR9. The data on TLR3 in human HCV-associated glomerulonephritis may be seen as a first indication of a novel disease mechanism of some forms of glomerulonephritis. Further support could come from the detection of microbial nucleic acids in human renal biopsies within the endosomal compartment of immune cells or mesangial cells. This approach is often difficult, however, as the nature of the pathogen is usually unknown. Moreover, costimulation of nucleic acid-specific TLR was shown to have additive effects on cytokine production in dendritic cells [44]. The contribution of single TLR ligands in comparison to exposure to a more complex interplay of multiple possible ligands in vivo remains to be determined.

There is increasing evidence that endogenous nucleic acids have stimulatory capacity and potentially pathogenetic relevance in autoimmune diseases. DNA-containing as well as RNA-containing immunocomplexes were able to activate autoreactive B cells [18,36] and plasmacytoid dendritic cells [37] via TLR9 and TLR7, respectively. In accordance with the 'danger hypothesis' proposed by Matzinger [45] nucleic acids released from necrotic cells or cells undergoing programmed cell death could contribute to tissue injury via the above mentioned mechanisms.

In the special context of the presence of TLR3 on mesangial cells, it is intriguing to speculate whether binding of viral ds-RNA to TLR3 on these cells may be involved in some cases of IgA nephritis and even viral infection associated vasculitis.

Acknowledgement

This work was supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (AN372/4-1, GRK 1201), the Fritz Thyssen Foundation, the EU Network of Excellence "MAIN"

(FP6-502935), and the EU Integrated Project "INNOCHEM" (FP6-518167).

Références

- [1] Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 1996;86:973-83.
- [2] Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signaling. *Nat Rev Immunol* 2004;4:499-511.
- [3] Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 2001;413:732-8.
- [4] Wang T, Town T, Alexopoulou L, Anderson JF, Fikrig E, Flavell RA. Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis. *Nat Med* 2004;10:1366-73.
- [5] Kariko K, Ni H, Capodici J, Lamphier M, Weissman D. mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3. *J Biol Chem* 2004;279:12542-50.
- [6] Applequist SE, Wallin RP, Ljunggren HG. Variable expression of Toll-like receptor in murine innate and adaptive immune cell lines. *Int Immunol* 2002;14:1065-74.
- [7] Heinz S, Haehnel V, Karaghiosoff M, Schwarzfischer L, Muller M, Krause SW, et al. Species-specific regulation of Toll-like receptor 3 genes in men and mice. *J Biol Chem* 2003;278:21502-9.
- [8] Patole P, Gröne HJ, Segerer S, Ciubar R, Belemezova E, Henger A, et al. Viral double-stranded RNA aggravates lupus nephritis through Toll-like receptor-3 on glomerular mesangial cells and antigen-presenting cells. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:1326-38.
- [9] Tsuboi N, Yoshikai Y, Matsuo S, Kikuchi T, Iwami K, Nagai Y, et al. Roles of toll-like receptors in C-C chemokine production by renal tubular epithelial cells. *J Immunol* 2002;169:2026-33.
- [10] Wörnle M, Schmidt H, Banas B, Merkle M, Henger A, Roeder M, et al. Novel role of Toll-like receptor-3 in hepatitis-associated membranoproliferative glomerulonephritis. *Am J Pathol* 2006;168(2):370-85.
- [11] Kapsenberg ML. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol* 2003;3:984-93.
- [12] Matsumoto M, Funami K, Oshiumi H, Seya T. Toll-like receptor 3: a link between toll-like receptor, interferon and viruses. *Microbiol Immunol* 2004;48:147-54.
- [13] Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O, Sato S, Sanjo H, Hoshino K, et al. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol* 2002;3:196-200.
- [14] Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis e Sousa C. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 2004;303:1529-31.
- [15] Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, et al. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 2004;303:1526-9.
- [16] Lund JM, Alexopoulou L, Sato A, Karow M, Adams NC, Gale NW, et al. Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:5598-603.
- [17] Vollmer J, Tluk S, Schmitz C, Hamm S, Jurk M, Forsbach A, et al. Immune stimulation mediated by autoantigen binding sites within small nuclear RNAs involves Toll-like receptors 7 and 8. *J Exp Med* 2005;202(11):1575-85.
- [18] Lau CM, Broughton C, Tabor AS, Akira S, Flavell RA, Mamula MJ, et al. RNA-associated autoantigens activate B cells by combined B cell antigen receptor/Toll-like receptor 7 engagement. *J Exp Med* 2005;202(9):1171-7.
- [19] Edwards AD, Diebold SS, Slack EM, Tomizawa H, Hemmi H, Kaisho T, et al. Toll-like receptor expression in murine DC subsets: lack of TLR7 expression by CD8 alpha+ DC correlates with unresponsiveness to imidazoquinolines. *Eur J Immunol* 2003;33:827-33.
- [20] Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S, Krug A, Jahrsdorfer B, Giese T, et al. Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 2002;168:4531-7.
- [21] Sauder DN, Smith MH, Senta-McMillian T, Soria I, Meng TC. Randomized, single-blind, placebo-controlled study of topical application of the immune response modulator resiquimod in healthy adults. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:3846-52.
- [22] Crozat K, Beutler B. TLR7: A new sensor of viral infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:6835-6.
- [23] Lore K, Betts MR, Brenchley JM, Kuruppu J, Khojasteh S, Peretto S, et al. Toll-like receptor ligands modulate dendritic cells to augment cytomegalovirus- and HIV-1-specific T cell responses. *J Immunol* 2003;171:4320-8.
- [24] Krieg AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, et al. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 1995;374:546-9.
- [25] Wagner H. The immunobiology of the TLR9 subfamily. *Trends Immunol* 2003;25:381-6.
- [26] Poeck H, Wagner M, Battiany J, Rothenfusser S, Wellisch D, Hornung V, et al. Plasmacytoid dendritic cells, antigen, and CpG-C license human B cells for plasma cell differentiation and immunoglobulin production in the absence of T-cell help. *Blood* 2004;103(8):3058-64.
- [27] Chen LF, Greene WC. Shaping the nuclear action of NF-kappaB. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004;5:392-401.
- [28] Meylan E, Burns K, Hofmann K, Blancheteau V, Martinon F, Keller M, et al. RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF-kappaB activation. *Nat Immunol* 2004;5:503-7.
- [29] Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H, et al. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 2003;301:640-3.
- [30] Yamamoto M, Sato S, Mori K, Hoshino K, Takeuchi O, Takeda K, et al. Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol* 2002;169:6668-72.
- [31] Han KJ, Su X, Xu LG, Bin LH, Zhang J, Shu HB. Mechanisms of the TRIF-induced interferon-stimulated response element and NF-kappaB activation and apoptosis pathways. *J Biol Chem* 2004;279:15652-61.
- [32] Anders HJ, Vielhauer V, Eis V, Linde Y, Kretzler M, Perez de Lema G, et al. Activation of toll-like receptor-9 induces progression of renal disease in MRL-Fas(lpr) mice. *FASEB J* 2004;18:534-6.
- [33] Pawar RD, Patole PS, Zecher D, Kretzler M, Schlöndorff D, Anders HJ. Toll-like receptor-7 modulates immune complex glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 2006;17(1):141-9.
- [34] Ehlers M, Fukuyama H, McGaha TL, Aderem A, Ravetch JV. TLR9/MyD88 signaling is required for class switching to pathogenic IgG2a and 2b autoantibodies in SLE. *J Exp Med* 2006;211:4043-50.
- [35] Bekeredjian-Ding IB, Wagner M, Hornung V, Giese T, Schnurr M, Endres S, et al. Plasmacytoid dendritic cells control TLR7 sensitivity of naive B cells via type I IFN. *J Immunol* 2005;174:4043-50.
- [36] Leadbetter EA, Rifkin IR, Hohlbaum AM, Beaudette BC, Shlomchik MJ, Marshak-Rothstein A. Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature* 2002;416:603-7.

- [37] Means TK, Latz E, Hayashi F, Murali MR, Golenbock DT, Luster AD. Human lupus autoantibody-DNA complexes activate DCs through cooperation of CD32 and TLR9. *J Clin Invest* 2005;115(2):407-17.
- [38] Christensen SR, Kashgarian M, Alexopoulou L, Flavell RA, Akira S, Shlomchik MJ. Toll-like receptor 9 controls anti-DNA autoantibody production in murine lupus. *J Exp Med* 2005;202:231-321.
- [39] Wu X, Peng SL. Toll-like receptor 9 signaling protects against murine lupus. *Arthritis Rheum* 2006;54(1):336-42.
- [40] Ashman RF, Goeken JA, Drahos J, Lenert P. Sequence requirements for oligodeoxyribonucleotide inhibitory activity. *Int Immunol* 2005;17:411-20.
- [41] Barrat FJ, Meeker T, Gregorio J, Chan JH, Uematsu S, Akira S, et al. Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligands for Toll-like receptors and may promote systemic lupus erythematosus. *J Exp Med* 2005;202(8):1131-9.
- [42] Patole P, Zecher D, Pawar RD, Gröne HJ, Schlöndorff D, Anders HJ. G-rich DNA suppresses systemic lupus. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:3273-80.
- [43] Dong L, Ito S, Ishii KJ, Klinman DM. Suppressive oligodeoxynucleotides delay the onset of glomerulonephritis and prolong survival in lupus-prone NZB x NZW mice. *Arthritis Rheum* 2005;52:651-8.
- [44] Napolitani G, Rinaldi A, Berton F, Sallusto F, Lanzavecchia A. Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells. *Nat Immunol* 2005;6:769-76.
- [45] Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science* 2002;296:301-5.