

Aus der Medizinischen Poliklinik - Innenstadt,
Abteilung für klinische Biochemie
Nephrologisches Zentrum
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Kommissar. Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

**Polyomavirus DNA induziert eine antivirale Immunantwort
in murinen Tubulusepithelzellen über einen Toll-like
Rezeptor- unabhängigen Signalweg**

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



vorgelegt von:
Peter Dimov Kurktschiev
München 2011

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

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

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Edgar Meinl

Prof. Dr. med. Heiko Adler

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

Tag der mündlichen Prüfung: 10.11.2011

- *meinen Eltern* -

Veröffentlichungen

Publikationen

1. Ribeiro A, Wörnle W, Motamedi N, Anders HJ, Nitschko H, **Kurktschiev P**, Debiec H, Kretzler M, Cohen CD, Mihatsch MJ, Gröne HJ, Schlöndorff D, Schmid H: *“Activation of innate immune defense mechanisms in Polyomavirus BK associated Nephropathy.”* Manuskript bei Kidney International zur Publikation angenommen.

Vorträge

1. **Kurktschiev P.**, *Erkennung viraler Nukleinsäuren in Tubulusepithelzellen*, „Junge Niere“, 13. Mai 2007, Göttingen
2. **Kurktschiev P.**, *BK virus transplant nephropathy: Innate recognition of poliomavirus by tubular epithelial cells*, Ergebniskolloquium im Rahmen des Graduiertenkollegs 1202 der DFG, 2. Juli 2007, München

Poster

1. **Kurktschiev P.**, Anders HJ., *Polyomavirus (PV) Nephropathie: PV DNA löst unabhängig von Toll-like Rezeptor 9 eine antivirale Immunantwort durch Tubuluszellen aus und ist potentiell an der Pathogenese der PV Nephropathie beteiligt.*, Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin e.V. (DGIM), 1. April 2008, Wiesbaden.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	7
1.1.	Chronische Niereninsuffizienz und Nierentransplantation	7
1.2.	Virale Nephropathien	9
1.3.	BK- Virus Nephropathie beim nierentransplantierten Patienten	10
1.3.1.	Struktur und Replikationszyklus	10
1.3.2.	BK- Virus- assoziierte Krankheitsbilder	12
1.3.3.	BK- Virus Nephropathie	13
1.3.4.	Diagnostik	15
1.3.5.	Therapie	18
1.4.	Antivirale Mechanismen der angeborenen Immunität	18
1.4.1.	Rezeptoren der angeborenen Immunität	19
1.4.1.1.	Toll-like Rezeptoren (TLRs)	19
1.4.1.2.	RIG-like Helikasen (RLHs)	22
1.4.1.3.	Zytoplasmatische DNA- Rezeptoren	24
1.4.2.	Antivirale Effektorproteine	27
1.4.2.1.	Interferone	28
1.5.	Renale dendritische Zellen	29
1.6.	Fragestellung	30
2.	Material und Methoden	32
2.1.	Material	32
2.1.1.	Geräte	32
2.1.2.	Chemikalien, Lösungen, Puffer	33
2.1.3.	Materialien für die Zellkultur	33
2.1.4.	Oligonukleotide, Liganden, Zytokine, Stimulanzen	34
2.1.5.	Reagenziensätze	34
2.1.6.	Antikörper und Western Blot Reagenzien	34
2.1.7.	Realtime- PCR Primer	35
2.1.8.	Reagenzien zur RNA- Isolation und realtime PCR	36
2.1.9.	Zelllinie	36
2.1.10.	Versuchsmäuse	36
2.2.	Zellkultur	36
2.2.1.	Allgemeine Zellkulturbedingungen	36
2.2.2.	Bestimmung von Zellzahl und Vitalität	37
2.2.3.	Einfrieren und Auftauen von Zellen	37
2.2.4.	Gewinnung und Kultivierung von primären Tubulusepithelzellen	37
2.2.5.	Gewinnung und Kultivierung von primären renalen dendritischen Zellen	38
2.2.6.	Stimulationsexperimente	38
2.2.7.	Annealing	39
2.3.	Tierhaltung	39

2.4.	Immunologische Methoden	40
2.4.1.	Zytokin- ELISA zur IL-6 Messung	40
2.4.2.	Proliferationsmessung	40
2.4.3.	Apoptosisanalyse mittels Durchflusszytometrie (FACS)	41
2.5.	Molekularbiologische Methoden	43
2.5.1.	RNA- Isolation für Polymerasekettenreaktion in Echtzeit	43
2.5.2.	Bestimmung des RNA Gehaltes	44
2.5.3.	Synthese von cDNA	44
2.5.4.	Quantitative realtime PCR	45
2.5.5.	IPS1 Western Blot	46
2.6.	Konfokale Mikroskopie	47
2.7.	Statistische Analyse	47
3.	Ergebnisse	49
3.1.	Induktion proinflammatorischer Zytokine	49
3.1.1.	Zytokinantwort in Wildtyp Tubulusepithelzellen	49
3.1.2.	Zytokinantwort in MyD88 ^{-/-} und TRIF ^{-/-} Tubulusepithelzellen	52
3.2.	Produktion chemotaktischer Proteine	54
3.3.	Zeitlicher Verlauf der Zytokinantwort	56
3.4.	Produktion antiviraler Proteine	57
3.5.	Stimulierbarkeit von TECs durch Interferone	59
3.6.	Zytokinantwort in renalen dendritischen Zellen	60
3.7.	Auswirkungen auf die Zellproliferation	61
3.8.	Autokrine Stimulation durch Typ-I Interferone	62
3.9.	Konfokale Mikroskopie	64
3.10.	Auswirkungen auf das Apoptoseverhalten von Tubulusepithelzellen	65
3.11.	IPS1 Western Blot	66
4.	Diskussion	68
4.1.	Zytosolische Oligonukleotide als Auslöser einer pro-inflammatorischen Reaktion in murinen Tubulusepithelzellen	68
4.2.	Bedeutung für die Pathogenese der BK- Virusnephritis	71
4.3.	Technisch- experimentelle Limitationen	73
5.	Zusammenfassung	74
6.	Literaturverzeichnis	77
7.	Tabellen- und Abbildungsverzeichnis	95
8.	Verwendete Abkürzungen	97
9.	Danksagung	101

1. Einleitung

1.1. Chronische Niereninsuffizienz und Nierentransplantation

Bei der chronischen Niereninsuffizienz (cNI) handelt es sich um den Zustand eines irreversiblen glomerulären, tubulären und endokrinen Funktionsverlustes beider Nieren und dessen Folgen für den ganzen Körper. In Westeuropa liegt ihre Inzidenz bei 10 von 100.000 Patienten pro Jahr (1). Die häufigsten Ursachen sind die diabetische Nephropathie 28% (davon 24% Typ-II und 4% Typ-I Diabetes mellitus), Glomerulonephritiden 19%, vaskuläre Nephropathie 17%, chronische tubulo-interstitielle Nephritiden 12% und weitere seltenere Erkrankungen (1). Pathophysiologisch von Bedeutung sind hierbei das Versagen der exkretorischen Funktion, der gestörte Wasser-, Elektrolyt-, und Säure- Basen- Haushalt, die reduzierte Sekretion von Botenstoffen wie Erythropoetin, Renin und Vitamin D, sowie die toxischen Organschäden durch die retinierten harnpflichtigen Substanzen.

Die Klassifikation der chronischen Niereninsuffizienz erfolgt nach den KDOQI- (*Kidney Disease Outcomes Quality Initiative*) Leitlinien der National Kidney Foundation (NKF) der USA. Hierbei wird chronische Niereninsuffizienz definiert als (1.) persistierende Reduktion der glomerulären Filtrationsrate (GFR) unter 60 ml/min/1,73m² für mehr als 3 Monate, mit oder ohne nachweisbaren Nierenschaden, oder (2.) bei über 3 Monate lang nachweisbaren Nierenschaden im Sinne von funktionellen und strukturellen Anomalien, mit oder ohne Reduktion der GFR. Die verschiedenen Stadien sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Einteilung der chronischen Niereninsuffizienz nach der NKF.

Stadium	Bezeichnung	GFR (ml/min/1,73m ²)	Procedere/ Therapieziel
0	Erhöhtes Risiko	>90	Prophylaxe
1	Nierenschaden mit normaler Nierenfunktion	>90	Verlangsamung der Progression
2	Leichte Niereninsuffizienz	60-89	wie in 1
3	Mittelschwere Niereninsuffizienz	30-59	Behandlung von Komplikationen
4	Schwere Niereninsuffizienz	15-29	Nierenersatztherapie vorbereiten
5	Nierenversagen	<15	Nierenersatztherapie

Laut den KDOQI- Leitlinien ist die GFR der empfohlene Parameter zur Einschätzung der Gesamtnierenfunktion. Die GFR kann unter Verwendung verschiedener Formeln geschätzt werden. Bei Erwachsenen werden meist die MDRD- (Modification of Diet in Renal Disease), oder Cockcroft- Gault Formeln verwendet.

$$eGFR(ml/min/1,73m^2) =$$

$$a) \frac{(140 - \text{Alter}) \times \text{Gewicht}}{72 \times S_{Cr}} \times (0,85 \text{ falls weiblich})$$

$$b) = 186 \times (S_{Cr})^{-1,154} \times (\text{Alter})^{-0,203} \times (0,742 \text{ falls weiblich}) \times (1,210 \text{ falls schwarze Hautfarbe})$$

Abbildung 1: Die geschätzte glomeruläre Filtrationsrate (eGFR) wird in der Praxis nach der Cockcroft-Gault- Formel (a) berechnet. Die genauere aber komplexere Alternative ist die MDRD- Formel (b).
 S_{Cr} = Serumkreatinin.

Da eine fortgeschrittene Niereninsuffizienz zu lebensgefährlichen Stoffwechsellagen führen kann, muss rechtzeitig eine Nierenersatztherapie eingeleitet werden. Bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz ist die Nierentransplantation die Methode der Wahl (2, 3).

Sie ist den anderen Nierenersatzverfahren überlegen und bietet im Vergleich zur Dialysetherapie eine verlängerte Lebenserwartung und bessere Lebensqualität (2, 4). Jedoch ist diese Therapieoption durch den Mangel an Spenderorganen limitiert.

Nach Angaben von Eurotransplant (ET)/ Deutsche Stiftung Organtransplantation (DSO) sind von den seit 1963 in Deutschland transplantierten 98.051 Organen die Nieren mit >65.000 das mit großem Abstand am häufigsten transplantierte Organ. Im Jahr 2009 sind in Deutschland insgesamt 4.709 Organe transplantiert worden, davon am häufigsten die Niere mit 2.772 Transplantationen. Hiervon ist der Großteil (2.172 Organe) nach postmortaler Organspende transplantiert, 600 Patienten erhielten ein Lebendspenderorgan. Am Ende des Jahres 2009 standen nach Angaben der DSO über 8.000 Dialysepatienten auf der Warteliste für eine Nierentransplantation, hiervon wurden 2.878 im Jahr 2009 neu angemeldet. Auf eine Organspende warteten die Patienten, die im Jahr 2009 transplantiert wurden, im Durchschnitt 40 Monate, somit zwischen 3 und 4 Jahren, nachdem sie auf der Warteliste registriert worden waren (5). Die maximale Wartezeit lag bei fast 16 Jahren (1).

Diese Daten zeigen deutlich, wie wertvoll ein Spenderorgan ist. Da das Problem des Organmangels in naher Zukunft nicht zu beheben sein wird, ist es umso wichtiger die transplantierten Organe möglichst lange funktionsfähig zu erhalten und die Zahl der Transplantatabstoßungen so niedrig wie möglich zu halten. Um die Wartezeit bis zur Transplantation zu überbrücken, ist der Patient auf die Dialysetherapie angewiesen. Ende des Jahres 2006 wurden 66.508 Patienten mit Dialyseverfahren versorgt.

Das hierbei in Deutschland am häufigsten verwendete Verfahren ist die Hämodialyse, die bei 63.307 der Patienten zum Einsatz kam. Die restlichen 3.201 Patienten (4,8%) wurden mittels Peritonealdialyse versorgt (1). Um Abstoßungsreaktionen zu vermeiden, ist eine lebenslange Immunsuppression erforderlich. Diese erfolgt meist mit einer Kombination von Calcineurininhibitoren, Mycophenolat und Corticoiden (6, 7). Neben den Abstoßungsreaktionen sind Infekte, deren Auftreten durch die Immunsuppression begünstigt wird, und ein mögliches Rezidiv der Grunderkrankung im Spenderorgan, z.B. eine Glomerulonephritis, weitere Ursachen für einen Organverlust. Die 5 Jahres Funktionsraten transplantierte Nieren in Deutschland betragen derzeit ca. 70% bei Totspenden und bis zu 84,3% bei Lebendspenden (5). Die häufigsten Todesursachen nach Nierentransplantation sind kardiovaskuläre Komplikationen (23-61%), Infektionen (12-40%) und Malignome (9-16%) (8).

1.2. Virale Nephropathien

Die unterschiedlichen Zellarten der Niere können durch eine Vielzahl verschiedener Viren infiziert und geschädigt werden. Dabei führen Infektionen mit einigen dieser Viren bereits beim Immungesunden zu einer manifesten Erkrankung. Andere Viren hingegen werden erst im Kontext der Immunsuppression, z.B. nach Nierentransplantation, klinisch manifest. Dabei können verschiedene Kompartimente der Niere betroffen sein (glomerulär, tubulointerstitiell, vaskulär) (9). Problematisch bei der Diagnostik ist die Fragestellung nach der Kausalität zwischen Virusnachweis und Krankheitsbild, da die Viren zum Teil auch bei klinisch gesunden Patienten nachgewiesen werden können und der Organschaden z.B. bei Transplantationspatienten auch durch eine Abstoßungsreaktion verursacht sein kann.

An der Pathogenese der Nephropathien sind neben einem direkten zytopathischen Effekt, z.B. in Podozyten (10), auch indirekte immunkomplex- vermittelte Vaskulopathien beteiligt (11, 12). Die Ablagerung von Immunglobulinen und Komplementfaktoren unter der glomerulären Basalmembran stimuliert eine inflammatorische Reaktion, die zu glomerulärer Hyperproliferation führen kann (11).

Die wichtigsten durch Viren ausgelösten Krankheitsbilder der Niere sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Zusammenfassend muss beachtet werden, dass viele der pathophysiologischen Veränderungen bei viralen Nephropathien nicht durch den Erreger, sondern durch die gegen ihn gerichtete Immunantwort bedingt sind.

Tabelle 2: Renale Manifestation von viralen Erkrankungen

Virus	renale Manifestation
HBV (Hepatitis B- Virus)	Membranöse Glomerulonephritis (GN), seltener mesangio-, oder membranoproliferativ, klassische Panarteriitis nodosa
HCV (Hepatitis C- Virus)	Membranoproliferative GN, oft mit Kryoglobulinämie, seltener IgA-Nephropathie, fokal-segmentale Glomerulosklerose (FSGS)
HIV (Humanes Immun-defizienz Virus)	HIV- assoziierte Nephropathie (HIVAN), selten membranoproliferative GN, IgA- Nephropathie
Parvovirus B19	Nephrotisches Syndrom, akute GN, selten hämolytisch urämisches Syndrom, FSGS
Polyomaviren (BK- Virus)	Bei Immunsupprimierten Transplantationspatienten, Tubulointerstitielle Nephritis (BK- Virus-Nephropathie)
CMV (Cytomegalievirus)	Bei immunsupprimierten Patienten, Glomerulonephritis, thrombotische Mikroangiopathie
EBV (Epstein- Barr- Virus)	Posttransplantationelle lymphoproliferative Störungen, selten akute interstitielle Nephritis oder Glomerulonephritis
Hantavirus	Hämorrhagisches Fieber mit renalem Syndrom, akutes Nierenversagen, Hämaturie
Adenoviren	Meist bei Immunsuppression (Transplantation, HIV- Infektion), akutes Nierenversagen, hämorrhagische Zystitis

Verschiedene DNA und RNA- Viren können die Niere direkt zytopathologisch schädigen oder indirekt über aktivierte Immunzellen und zirkulierende Immunkomplexe die sich unter anderem im Glomerulum ablagern können (9).

1.3. BK- Virus Nephropathie beim nierentransplantierten Patienten

1.3.1. BK- Virus: Struktur und Replikationszyklus

Das humane BK-Virus ist ein Vertreter aus der Familie der Polyomaviren, zu denen auch das JC-Virus und das Simian Vacuolating (sv40)-Virus gehören. Das Viruspartikel ist lediglich 45 nm groß (13). Die genomische DNA wird von einem hüllenlosen ikosaedrischen Kapsid umgeben und ist mit Histonen assoziiert (14). Das Kapsid besteht aus 3 Proteinen: VP1 (viral protein 1), VP2, und VP3 (15). Die genomische Information ist in Form von zirkulärer doppelsträngiger DNA kodiert und umfasst etwa 5,1 Mbp (16). Die Virusgene können in 2 Gruppen unterteilt werden. Nach Eintritt in die Zelle werden zunächst die sogenannten frühen Gene large T-Ag (T-Ag) und small t-Ag (t-Ag) transkribiert. Diese binden an Tumorsuppressorproteine wie p53 und Rb und initiieren hierüber den Zellzyklus in der infizierten Zelle (17).

Da das BK- Virus die Kernmembran nicht direkt passieren kann, sich aber im Kern repliziert, kann es sich nur in mitotischen Zellen ausbreiten in denen sich die Kernmembran vorübergehend für die Kernteilung auflöst (18).

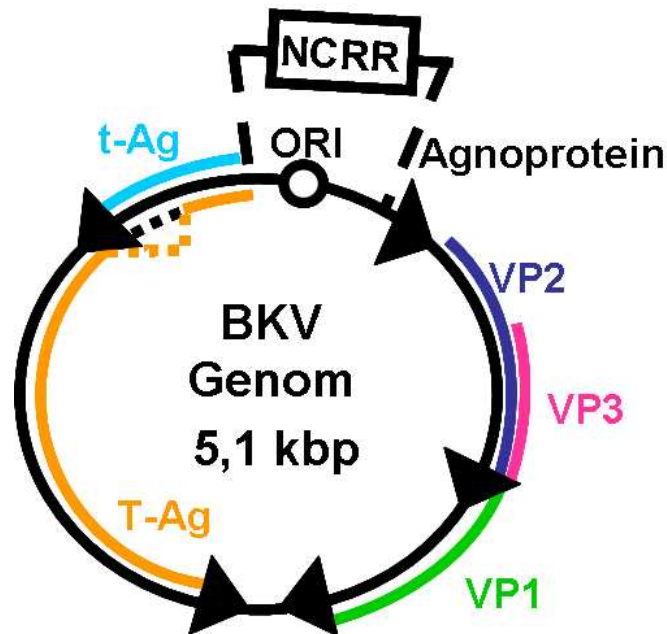


Abbildung 2: BK- Virus Genomstruktur. Zuerst werden die frühen Gene für T-Ag und t-Ag exprimiert. Danach folgen die späten Gene für die viral proteins (VP) des Kapsids, die in gegenläufiger Richtung kodiert sind. Manche Genabschnitte kodieren für mehrere Proteine, so nutzen z.B. T- Ag und t- Ag, sowie VP2 und VP3 zum Teil gemeinsame Sequenzen. Die Proteine entstehen durch alternatives Spleißen. Dadurch kann das Genom möglichst kompakt gehalten werden. Nach (19).

Die sogenannten späten Gene kodieren für VP1, 2 und 3, die die Bestandteile des Viruskapsids bilden, sowie dem Agnoprotein. Dieses greift in den Zellzyklus ein und ist für die Regulation der Virusreplikation von Bedeutung (20, 21).

Anhand der VP1- Gen Varianten werden 4 Subtypen von BK Viren unterschieden, von denen Typ 1 und 4 die häufigsten sind (22). Zusätzlich enthält das Genom die so genannte non-coding regulatory region (NCRR), die nicht für Proteine kodiert. Stattdessen beinhaltet sie den origin of replication (ORI), den Startpunkt für die Transkription, und Regulationselemente wie Enhancer- und Promoterregionen die die virale Transkription beeinflussen (19). Über eine eigene DNA- Polymerase verfügt das Virus nicht. Für den Eintritt in die Wirtszelle spielt das VP1 Protein des Kapsids eine wichtige Rolle, da es die äußere Hülle des Virus bildet. Als Rezeptor wird ein N- glykosyliertes Glykoprotein, welches die Ganglioside GT1b und GD1b enthält genutzt. Als entscheidendes Element scheint eine α 2-8 gebundene Di-Neuraminsäure zu fungieren (23-25). Eine alpha(2,3)-Neuraminsäurevariante ist auch als Rezeptor beschrieben (26). Nach enzymatischer Zersetzung dieser Strukturen in der Zellmembran, ist das Virus nicht mehr in der Lage in die Zelle zu gelangen.

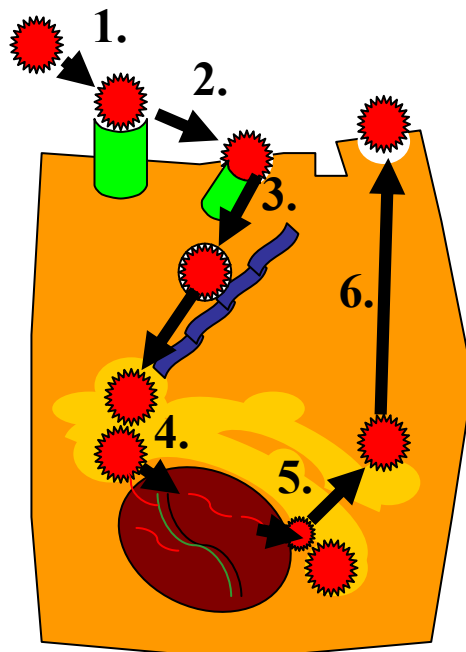


Abbildung 3: Intrazellulärer Transport von BK- Viruspartikeln. 1. Anheftung an ein Neuraminsäuregebundenes Glykoprotein. 2. Caveolae-medierte Endozytose 3. Transport entlang Mikrotubuli 4. Aufnahme in das endoplasmatische Retikulum 5. Verpackung replizierter DNA 6. Zellyse und Verteilung des Virus in die Umgebung. Modifiziert nach (19).

Mittels Elektronenmikroskopie in Biopsien humaner Nieren konnte gezeigt werden, dass nach Rezeptorbindung die Viruspartikel über Chlathrin-freie Vesikel mittels caveolärer Endozytose in die Zelle gelangen (15). Bei knockdown Experimenten mit small interfering RNA (siRNA) gegen Caveolin-1 konnte die Infektionsrate gesenkt werden. Dabei ist auch der Cholesteringehalt der Membran von Bedeutung (15). Der weitere intrazelluläre Transport verläuft entlang den Mikrotubuli des Zytoskeletts und im endoplasmatischen Retikulum (24, 27).

Das Virus kodiert in seinem kompakten Genom alle Proteine, die es für seine Struktur und für die Beeinflussung der Wirtszellen benötigt und ist einem komplexen intrazellulären Transportweg unterworfen.

1.3.2. BK- Virus- assoziierte Krankheitsbilder

In epidemiologischen Studien verschiedener Populationen konnte gezeigt werden, dass 60 - 90% der Bevölkerung bis zum Erwachsenenalter mit dem BK Virus exponiert gewesen sind. Die Primärinfektion ist in der Regel klinisch inapparent und findet meist um das fünfte Lebensjahr statt (28-30). Die häufigste durch BK Viren bedingte Symptomatik bei Primärinfektion ist eine Infektion der oberen Atemwege, meist bei pädiatrischen Patienten (31). Es werden verschiedene Übertragungswege für die Primärinfektion mit BKV angenommen. Dazu gehören die Übertragung über die Atemwege, den Gastrointestinaltrakt, diaplazentar und durch infizierte Spenderorgane bei Transplantationen (18, 32-35). Kurz nach der Primärinfektion kommt es zu einer vorübergehenden virämischen Phase.

Das Virus verteilt sich in dieser Phase in seinen Zielgeweben, insbesondere im Harnwegsepithel, Lymphgewebe und im Gehirn (36). Weitere mögliche Zielorgane sind die Lunge, Retina und die Leber (18). In diesen Gewebstypen kann das Virus in der folgenden Latenzphase viele Jahre verweilen (37). Sollte es zu einer Beeinträchtigung des Immunsystems kommen, kann das Virus reaktiviert werden. Risikofaktoren für eine Reaktivierung sind HIV (38), Transplantationen (18), Schwangerschaft (39), Diabetes mellitus, fortgeschrittenes Alter und Malignome (18). Kommt es zu einer Reaktivierung der latenten Infektion kann das Virus in der Niere zu einer tubulo-interstitiellen Nephritis, der Polyomavirus-assoziierten Nephritis (PVAN), auch BK- Virusnephritis (BKVN) genannt, führen (40). Weitere mögliche klinische Manifestationen einer BK-Virus Reaktivierung umfassen eine hämorrhagische Zystitis, meist im Zusammenhang mit hämatopoetischer Stammzelltransplantation. Ebenfalls beschrieben sind Stenosen des Ureters (41-43). In der Lunge kann das Virus zu einer Pneumonie (44) und im ZNS zu einer Meningoenzephalitis führen (45, 46). In einzelnen Fallberichten werden auch eine atypische Retinitis (47) und Leberfunktionsstörungen (48), sowie eine BKV- Vaskulopathie beschrieben (49). Da BKV-DNA in verschiedenen Neoplasien nachgewiesen werden konnte und es über die T-Antigenproteine die Tumorsuppressoren Rb und p53 beeinflusst, vermutet man eine Beteiligung an der Tumorgenese (50-55).

Das BK-Virus ist weit in der Bevölkerung verbreitet und klinisch meist inapparent, kann aber bei Beeinträchtigung des Immunsystems reaktiviert werden und zu unterschiedlichen klinischen Manifestationen führen.

1.3.3. BK- Virus Nephropathie

Die BKVN hat bei nierentransplantierten Patienten eine Prävalenz von ca. 1-10 %. Der übliche Zeitraum des Auftretens ist 12-13 Monate post transplantationem mit einer Spannweite von 1- 45 Monaten (56). In 50- 80% der Fälle kommt es durch BKVN zum Organverlust (57, 58). Das Krankheitsbild gewinnt zunehmend an klinischer Bedeutung durch die steigende Inzidenz und den häufig damit verbundenen Spenderorganverlust (58). Der Anstieg der Inzidenz ist mit den Entwicklungen im Bereich der Transplantationsmedizin verbunden. Einerseits konnte die Zahl von Abstoßungsreaktionen in den letzten Jahren gesenkt werden (59). Andererseits hat die neue Generation hochpotenter Immunsuppressiva, wie Tacrolimus (>8 ng/ml) und Mycophenolat- Mofetil (1,5-2 g/d), eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber infektiösen Erregern (60-62) zur Folge gehabt. Ein zusätzlicher Faktor ist die hohe Durchseuchungsrate, mit einem hohen Prozentsatz latent infizierter Spendernieren. Vor dem Hintergrund der Spenderorganknappheit, die zu jahrelangen Wartezeiten auf ein Organ mit reduzierter Lebensqualität führt, stellt die BKVN eine wachsende klinische Herausforderung dar.

Tabelle 3: Prävalenz von BKVN und dadurch bedingter Organverlust (63)

Studie	Zentrum	Prävalenz	Spenderorganverlust
Mengel et al. 2003	Hannover, Deutschland	1,1%	71%
Trofe et al. 2003	Cincinnati, USA	2,1%	54%
Buehrig et al. 2003	Rochester NY, USA	2,7%	38%
Ginevri et al. 2003	Genova, Italien	3,0%	33%
Rocha et al. 2004	Durham NC, USA	3,1%	-
Rahaminov et al. 2003	Petah, Israel	3,8%	14%
Kang et al. 2003	Seoul, Südkorea	3,9%	100%
Hirsch et al. 2002	Basel, Schweiz	6,0%	0%
Namba et al. 2005	Osaka, Japan	6,9%	33%
Maiza et al. 2002	Lyon, Frankreich	7,1%	50%
Matlosz et al. 2004	Warschau, Polen	7,9%	-
Durchschnitt		5%	46%

Der auslösende Erreger, das BK Virus, wurde erstmals 1971 aus dem Harn eines nierentransplantierten Allograftempfängers mit den Initialen B.K. isoliert, der post transplantationem an einer Ureterstriktur litt (64). Die BK- Virus assoziierte Nephropathie wurde erstmals 1995 als Krankheitsbild bei einem nierentransplantierten Patienten nach polyzystischer Nierenerkrankung beschrieben. Bei diesem kam es im Verlauf zu Symptomen, die auf eine akute Abstoßung deuten ließen. Der Patient wurde zu der Zeit mit Tacrolimus und Prednison behandelt (65). Bei der durchgeführten Nadelbiopsie zeigten sich virale Einschlusskörper, die nicht mit Antikörpern gegen CMV, Herpesviren oder Adenoviren markiert werden konnten und schließlich konnte mit immunhistochemischen und elektronenmikroskopischen Methoden das BK- Virus als Auslöser bestätigt werden.

Es konnte ein Zusammenhang von Seropositivität des Spenders mit Virurie, Virämie und Entwicklung einer BK- Virus Nephritis gezeigt werden (66-68). Kurz darauf häuften sich Fallberichte aus mehreren Transplantationszentren und es kam der Verdacht auf, dass ein Zusammenhang mit der Immunsuppressiven Therapie, besonders mit Tacrolimus, Sirolimus und Mycophenolat Mofetil bestehen könnte (69, 70). Da jedoch im Vergleich zur Zahl der immunsupprimierten Patienten mit latenter BKV- Infektion relativ wenige Patienten eine BKV- Nephropathie entwickeln, nimmt man eine sogenannte 2-Hit Reaktivierung an. Dabei geht man davon aus, dass die Immunsuppression einer der 2 Auslöser („hits“) ist und der zweite hit auf einen Tubulusschaden z.B. durch Abstoßung zurückgeht (56). Dafür sprechen Daten am Mausmodell, in dem ein vorausgegangener Tubulusschaden zu einer deutlichen Replikationssteigerung des BK- Virus führte (71). Passend dazu gingen vielen der beschriebenen BKV-Nephropathiefällen klinisch manifeste Abstoßungsepisoden voraus (61).

Nach seiner Reaktivierung proliferiert das BK- Virus in den Zellkernen des Harnwegsepithels und der renalen Tubuli. Es breitet sich dabei aufsteigend von Zelle zu Zelle aus (72). Die klinische Manifestation kann sich auf eine asymptomatische Virurie beschränken, aber auch zur interstitiellen Nephritis bis hin zum Nierenversagen entwickeln. Bei geschwächter Immunkontrolle kommt es so zu einer fortschreitenden Infektion (14). Die durch die Lyse freigesetzten Viruspartikel gelangen unter anderem ins Tubuluslumen und somit in den Harn, womit eine Virurie nachweisbar werden kann. Weiterhin gelangt das Virus in das Tubulointerstitium und befällt dort Tubulusepithelzellen. Der Tubuluszelluntergang führt zu einer histologisch nackten Basalmembran. In ihr lassen sich gelegentlich Immunkomplexeinlagerungen im Rahmen der BKV- Nephropathie nachweisen (73). Später kann sich das Virus auch über die Tubuluskapillaren ausbreiten (74). Es folgt eine entzündliche Infiltration mit erhöhter Ausschüttung profibrotischer Mediatoren und einem fortschreitenden Funktionsverlust. Die fortschreitende Entzündung, Fibrose und Kalzifikation des Nierenparenchyms, sowie der ausgeprägte Zelluntergang führen zu einer schweren progressiven Einschränkung der Nierenfunktion bis hin zum Verlust der Transplantatniere (26, 75, 76).

Die BKVN ist Folge einer BK-Virus Reaktivierung unter Immunsuppression und führt durch eine progressive Entzündung zu Parenchymschaden bis hin zum Organverlust.

1.3.4. Diagnostik

Die klinische Diagnostik beruht auf dem Vorliegen von Virämie, Virurie und Decoy- Zellen im Urin. Das Virus kann jedoch auch in 10- 60% der Fälle im Urin asymptomatischer Patienten nach Nierentransplantation nachgewiesen werden (63). Bei nierentransplantierten Patienten treten BK- Virurie in 30%, Virämie in 13%, und Nephritis in 8% auf (13). Von entscheidender Bedeutung für die Prognose ist der Diagnosezeitpunkt, da bei rechtzeitigem Einschreiten der Schaden noch reversibel ist (77).

Die Diagnose wird über die histologische Aufarbeitung einer Transplantatbiopsie gesichert. Hierbei wird in der Regel ein immunhistochemischer Nachweis von sv40 (simian virus 40) T- Antigen genutzt, der auf alle Polyomaviren reagiert. Zur Bestätigung können auch eine in-situ Hybridisierung oder Elektronenmikroskopie durchgeführt werden. Diese sind jedoch für die Routinediagnostik aufgrund des technischen Aufwandes ungeeignet (61, 78). Bei klinischem Verdacht kann auch ein Nachweis von BKV-DNA durch PCR- Techniken (polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion) versucht werden (28). Die Bestimmung der Viruslast ist für die Verlaufskontrolle von Bedeutung (79). Histologisch kennzeichnend sind die interstitielle Nephritis und Tubulitis mit viralen Einschlusskörperchen in den Tubuluszellen (3). Im Frühstadium ist zunächst das Nierenmark betroffen bevor sich die Krankheit im weiteren Verlauf auch auf die Nierenrinde ausbreitet (76).

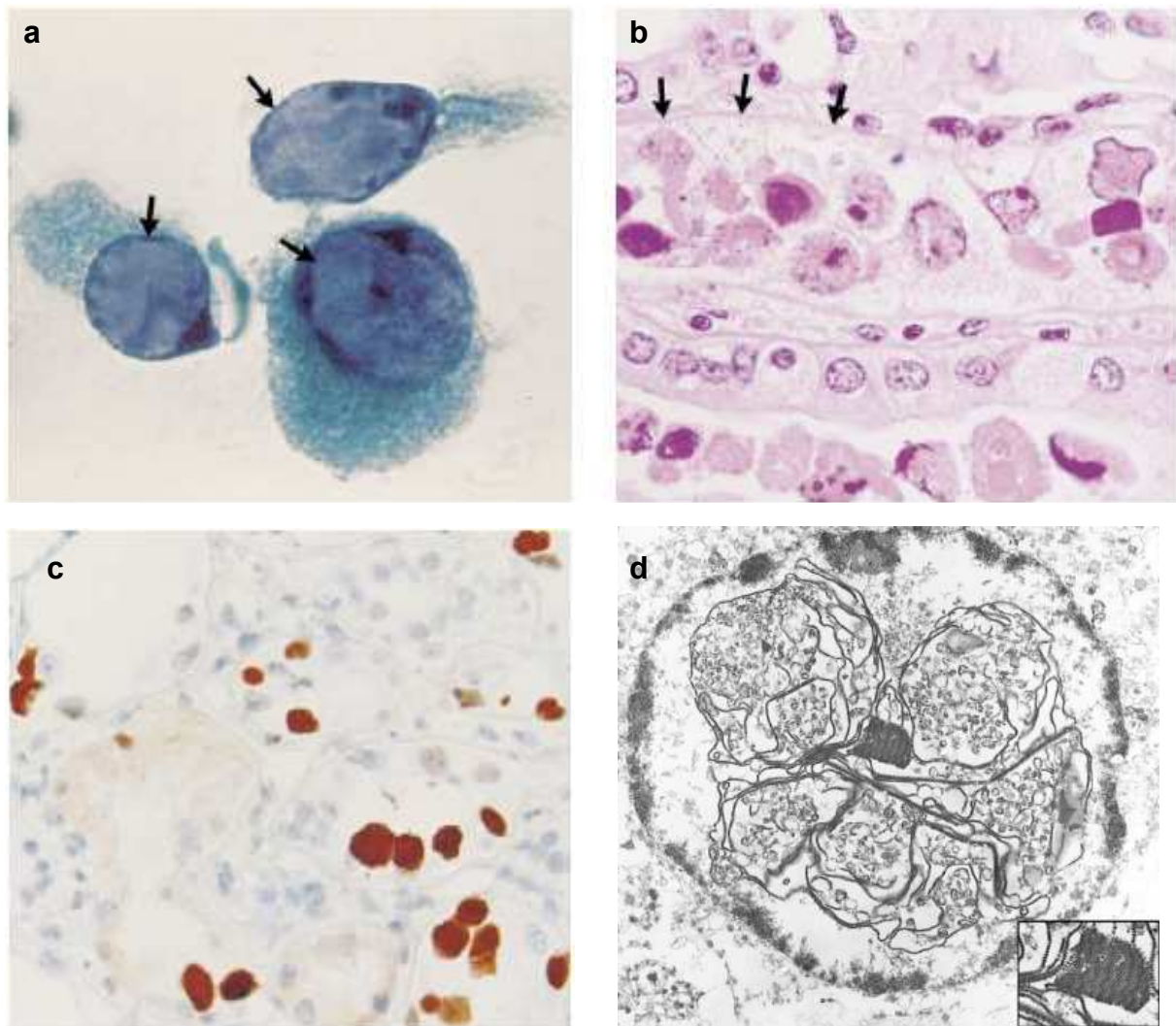


Abbildung 4: a. Urinzytologie. Decoy-Zellen mit milchglasartigen viralen Einschlusskörperchen (**Pfeile**) im Zellkern. (Papanicolaoufärbung, 400x) b. Nierenbiopsie. Einschlusskörperchen in Tubulusepithelzellen mit Kernvergrößerung und Ablösung von der Basalmembran (**Pfeile**) (H.-E. Färbung, 160x). c. Immunhistochemischer Nachweis von large T-Ag im Zellkern der Tubulusepithelzellen (100x). d. Elektronenmikroskopie eines infizierten Zellkerns. Im vergrößerten Ausschnitt ist ein kristallines Viruspartikel erkennbar. Quellen:(79, 80)

Abbildung 4 stellt entscheidende histologische Merkmale einer BKVN zusammen. Diagnostisch ist vor allem der Nachweis von Decoy-Zellen, T-Ag und viralen Einschlusskörperchen von Bedeutung.

Eine differentialdiagnostische Herausforderung ist die Unterscheidung der BKV-Nephropathie von einer Abstoßungsreaktion. Da beide Krankheitsbilder einen entgegengesetzten Therapieansatz erfordern ist die Differenzierung sehr wichtig. Bei einer Abstoßungsreaktion wird die immunsuppressive Therapie verstärkt, während man bei der BKV-Nephropathie eine Reduktion der immunsuppressiven Medikamente vornimmt. Der Nachweis von hochreguliertem HLA-DR (human leukocyte antigen- DR) und Ablagerungen von C4d, einem Zwischenprodukt des Komplementfaktorsystems, an den peritubulären Kapillaren sprechen für eine Abstoßungsreaktion und gegen eine BKV Nephropathie und sind somit für die Differentialdiagnostik hilfreich (81).

In Abbildung 5 sind histologische Kennzeichen einer entzündlichen BKVN zusammengefasst. Hierzu gehört eine ausgeprägte lymphozytäre Infiltration des tubulointerstitiellen Raums und IgG-Ablagerungen an der tubulären Basalmembran.

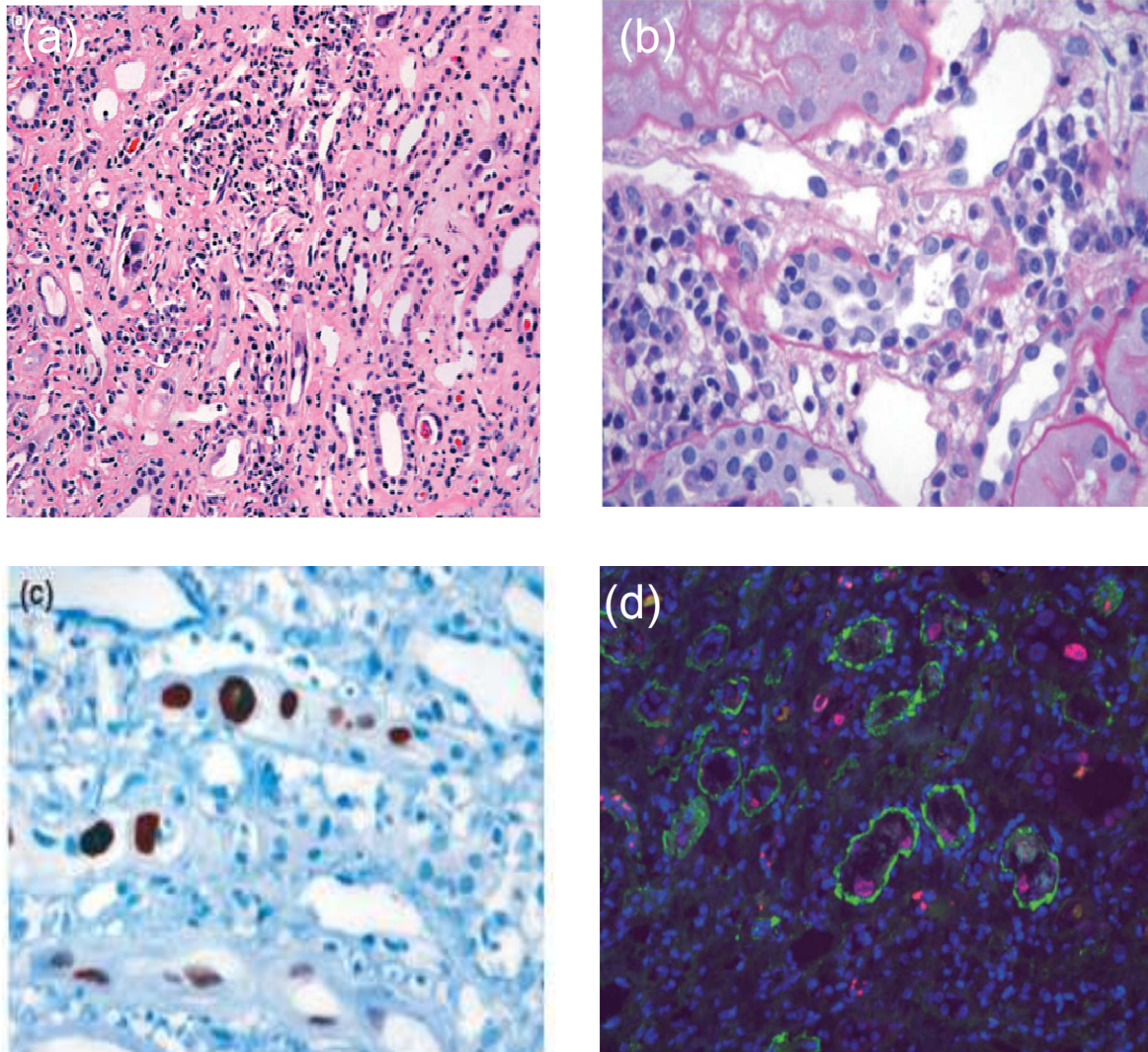


Abbildung 5: a. Plasmazellreiche BKVN, die virusinfizierten Tubuli des Nierenmarks sind von Plasmazellen umgeben. (H.-E. Färbung, 130x). b. Massive interstitielle Lymphozyteninfiltration mit Plasmazell tubulitis. (PAS- Färbung, 320x). c. Immunhistochemische sv40 Färbung x200. d. IgG-Ablagerungen in tubulärer Basalmembran sv40 positiver Tubuli. Immunfluoreszenzfärbung auf sv40 (rosa) und IgG (grün) x320. Quelle: (82)

Die rechtzeitige Diagnose der BKVN ist von entscheidender Bedeutung für das Überleben des Transplantatorgans und wird durch immunhistochemischen Nachweis von sv40 in Tubulusepithelzellen gesichert. Eine Abschätzung des Schweregrades ist histologisch anhand verschiedener Klassifizierungen möglich (s. Tabelle 4).

Tabelle 4: Histologisch lässt sich die BKVN in 3 Muster einteilen (83).

Muster	Histologie	Nierenversagen [%]	Differentialdiagnose
A	Intranukleäre Einschlüsse, geringe Entzündungsreaktion und Fibrose	13%	Normalbefund
B	Intranukleäre Einschlüsse, mittlere bis schwere interstitielle Entzündung, geringe Tubulusatrophie und Fibrose	55%	Interstitielle Nephritis, akute Abstoßungsreaktion
C	Intranukleäre Einschlüsse, mittlere bis schwere Tubulusatrophie und Fibrose	100%	Chronische Transplantatnephropathie

1.3.5. Therapie

Derzeit steht keine spezifische Therapie gegen BKVN zur Verfügung. Präventive Maßnahmen wie die Kontrolle von Virämie und Virurie und das Absetzen bzw. die Reduktion der Immunsuppressiva bei Auftreten sind heute die Primärtherapie bei manifester BKVN (84-87). Wenn es hierunter zu keiner ausreichenden Symptombesserung kommt, muss eine Therapie mit Virustatika wie Cidofovir, einem Cytidinnukleotidanalogen mit potenziell nephrotoxischen Nebenwirkungen, und Leflunomid, einem Dihydroorotatdehydrogenasehemmer, versucht werden (88, 89). Die generelle Wirksamkeit dieser Therapien ist noch nicht durch Studien gesichert (9). Neuere Ansätze sind der Einsatz von intravenösen Immunglobulinen (90) und Fluorochinolonen (91), sowie eine Kombination von Sirolimus mit Leflunomid mit der Absicht der durch das BK- Virus bedingten Proteinkinasereaktionen entgegenzuwirken (92). Zusätzlich ist eine Retransplantation in den meisten Fällen erfolgreich und führt innerhalb kurzer Zeit zum starken Absinken der Viruslast im Plasma (93-96).

Sollte durch eine Reduktion der Immunsuppressiva oder den probatorischen Einsatz von Virustatika kein Erfolg erzielt werden, muss ggf. eine Retransplantation erfolgen.

1.4. Antivirale Mechanismen der angeborenen Immunität

Neben den Mechanismen des erworbenen Immunsystems wurden in den letzten Jahren bisher unbekannte Pathogenerkennungsrezeptoren entdeckt und charakterisiert, die dem angeborenen Immunsystem zugeordnet werden. Diese sind in der Lage konservierte molekulare Muster, die mit Pathogenen assoziiert sind, zu erkennen. Zu den wichtigsten erkannten viralen Strukturmustern gehören Motive von viralen Proteinen aus Kapsid und Hülle, sowie von Nukleinsäuren, die das Virus für seine Replikation in die Wirtszelle

einschleusen muss (97). Nach Interaktion der Liganden mit dem entsprechenden Rezeptor wird eine intrazelluläre Signalkaskade in Gang gesetzt, die über verschiedene Adaptorproteine Transkriptionsfaktoren mobilisiert und über diese die Expression von Effektormolekülen, wie Zytokinen, Chemokinen und Interferonen auslöst (97). Diese Rezeptorgruppen sind in verschiedenen Zellkompartimenten verteilt und decken ein breites Spektrum molekularer Muster ab. Unabhängig davon existieren zahlreiche weitere Mechanismen einer viralen Infektion entgegenzuwirken, die im Folgenden dargestellt werden.

1.4.1. Rezeptoren der angeborenen Immunität

1.4.1.1. Toll-like Rezeptoren

Die Toll-like Rezeptoren sind die zurzeit am besten charakterisierten Pathogenerkennungsrezeptoren der angeborenen Immunität. Es sind 13 verschiedene Typen bei Säugetieren bekannt. Nach der Entdeckung, dass das Toll Protein in *Drosophila melanogaster* an der antifungalen angeborenen Immunabwehr wesentlich beteiligt ist (98), konnten kurze Zeit später homologe Proteine in Säugetieren nachgewiesen werden (99). Diese sind ebenfalls an der Induktion einer inflammatorischen Antwort beteiligt und für die Erkennung von bakteriellen Lipopolysacchariden von Bedeutung. Das humane Homolog des Toll Proteins entspricht Toll-like Rezeptor 4 (99, 100). Es folgte die Entdeckung einer Reihe weiterer homologer Proteine, die unter dem Namen Toll-like Rezeptoren zu einer Gruppe zusammengefasst wurden (101). Bei den TLRs handelt es sich um integrale Membranglykoproteine vom Typ I, deren extrazelluläre Domäne so genannte leucine rich repeats (LRRs) beinhaltet, die für die Ligandenerkennung verantwortlich ist. Die Signalweiterleitung erfolgt über die intrazelluläre Toll/IL-1R homology (TIR) Domäne, die der Interleukin-1 Rezeptordomäne sehr ähnlich ist (102). Zusätzlich dazu sind die TLRs in der Lage Homo- und Heterodimere miteinander, aber auch mit anderen Pathogenerkennungsrezeptoren zu bilden. Somit sind sie in der Lage eine Vielzahl pathogenassoziierter Muster zu erkennen. Die Toll-like Rezeptoren 3 (103), 7, 8 (104) und 9 (105) sind für die Erkennung von Nukleinsäuren und somit für antivirale Immunität zuständig. TLR3 erkennt dsRNA (Doppelstrang- RNA), TLR7 und 8 ssRNA (single stranded RNA, Einzelstrang- RNA) und TLR9 erkennt unmethylierte CpG DNA, die in Bakterien und Viren vorkommt. Diese Rezeptoren befinden sich jedoch alle hauptsächlich im endosomalen Kompartiment, sodass für die zytosolische Nukleinsäureerkennung zusätzliche Rezeptoren verantwortlich sind (97, 106-108). Abbildung 6 gibt einen Überblick über die wichtigsten Liganden der TLRs und ihrer Verteilung in unterschiedlichen Zellkompartimenten.

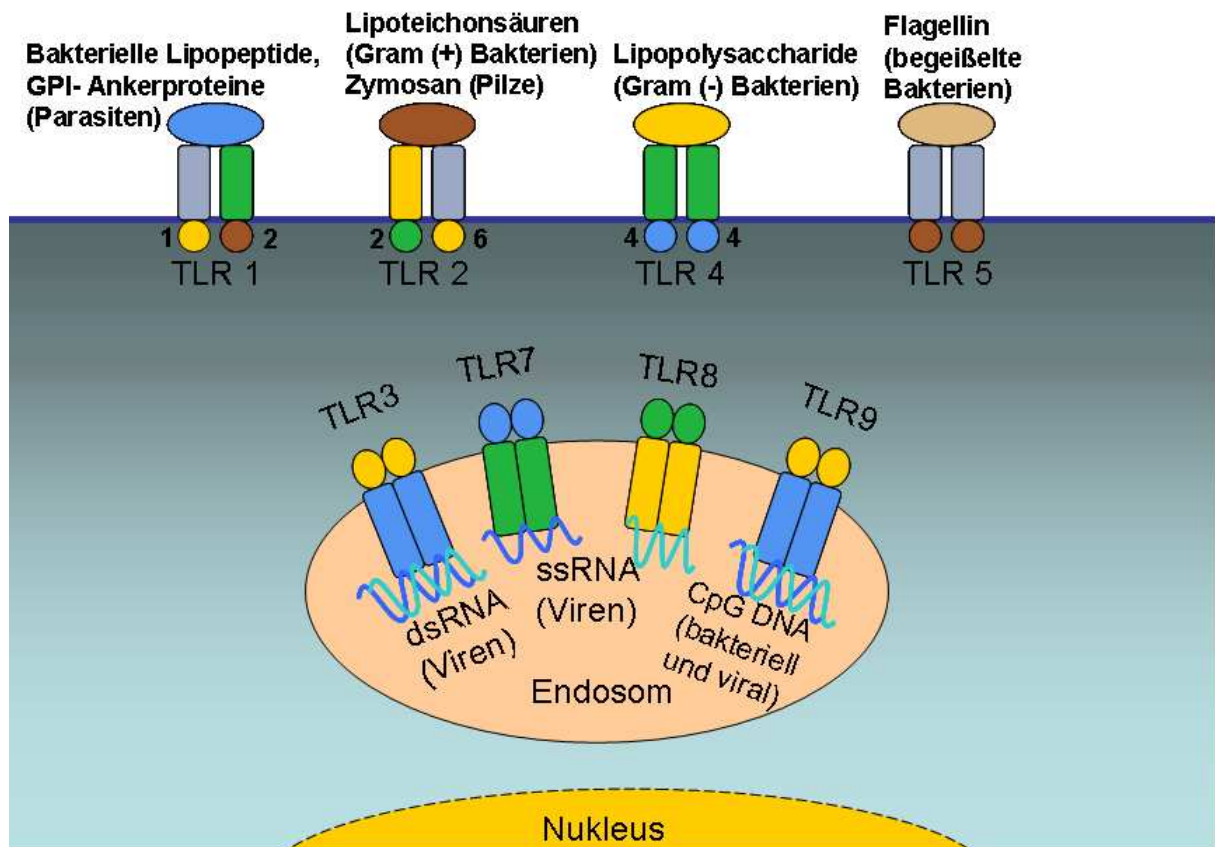


Abbildung 6: Toll-like Rezeptoren und ihre pathogenassoziierten Liganden. Die TLRs befinden sich entweder in der Zellmembran, oder im Falle der nukleinsäureerkennenden TLRs 3, 7, 8 und 9 in der Membran von Endosomen. Für die Erkennung zytosolisch gelegener Nukleinsäuren sind die TLRs nicht verantwortlich. (109)

Die Signalweiterleitung aktivierter TLRs geschieht zellintern über verschiedene Adaptormoleküle: myeloid differentiation factor 88 (MyD88), TIR domain-containing adaptor inducing IFN- β (TRIF), TRIF-related adapter molecule (TRAM) und TIR domain-containing adaptor protein (TIRAP). Diese können jeweils von bestimmten TLRs aktiviert werden (siehe Abbildung 7). Für die nukleinsäureerkennenden TLRs sind die Adaptormoleküle MyD88 und TRIF von Bedeutung. MyD88 ist ebenfalls an den Interleukin-1 und -18 Signalwegen beteiligt (110). Es verfügt über eine C- Terminale TIR- Domäne die mit der intrazellulären TIR- Domäne der Rezeptorproteine reagiert und eine N- Terminale death- Domäne, die mit der korrespondierenden Domäne der Interleukin-1-Rezeptor assoziierten Proteinkinase (IRAK), einer Serin- Threonin Kinase, interagiert (111, 112). Schon bald zeigte sich, das MyD88 nicht das einzige Signalmolekül sein kann, da TLRs z.T. auch unabhängig davon ihre Funktion ausüben können. So wurden weitere TIR- Domänen- haltige Adaptormoleküle gesucht und gefunden, unter anderem TRIF (113, 114).

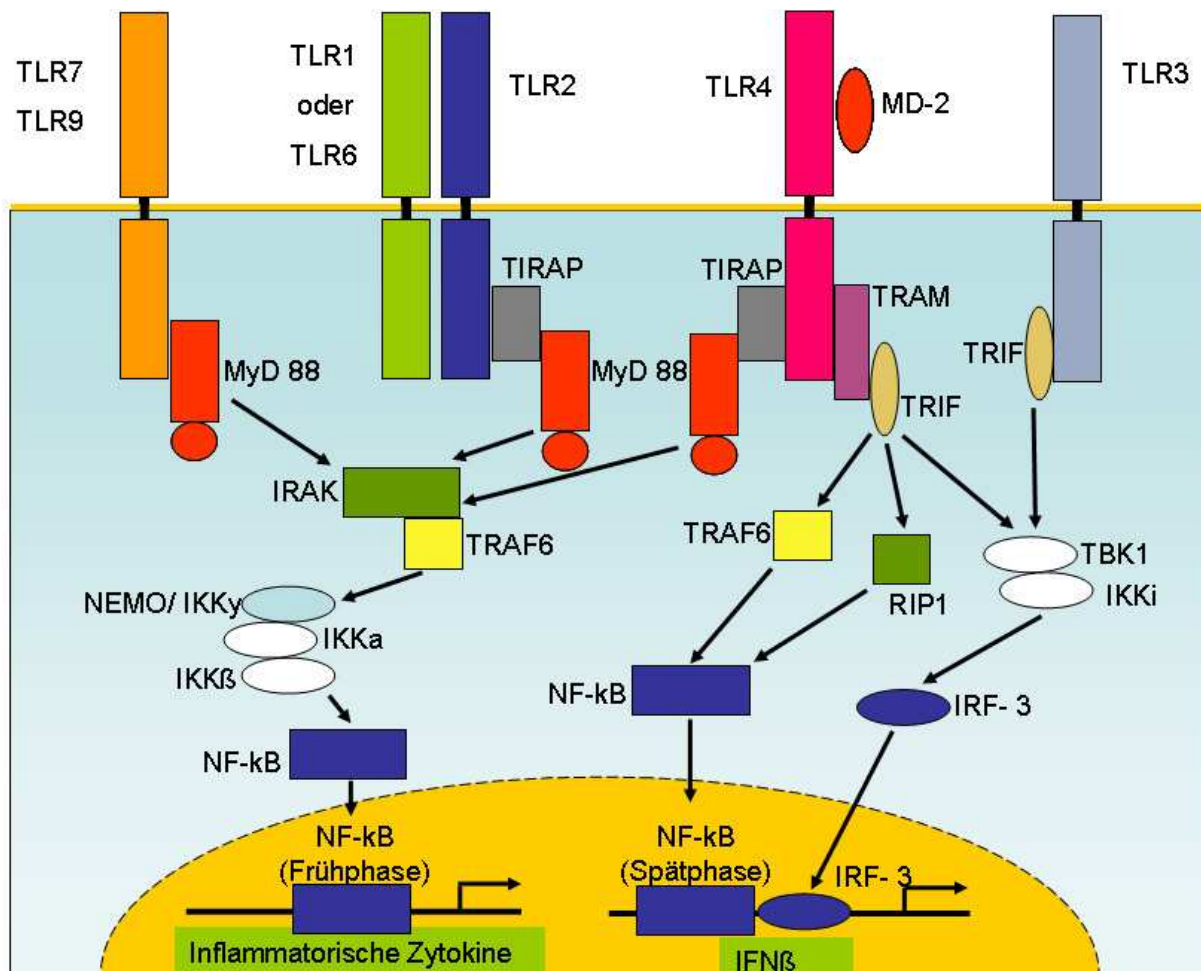


Abbildung 7: Toll-like Rezeptoren und ihre zellinternen Signalwege. TLR 1 und 6 können mit TLR 2 dimerisieren. Über NFκB und interferon regulatory factor 3 (IRF3) führen sie zur Produktion inflammatorischer Zytokine und Interferon β. (115)

Die Adaptormoleküle aktivieren ihrerseits den nuclear factor kappa B (NFκB) und interferon regulatory factor 3 (IRF3), einen Transkriptionsfaktor aus der Familie der IRFs, die für die Expression inflammatorischer Zytokine, Interferone und weiterer Effektormoleküle verantwortlich sind.

In Tabelle 5 sind die vielfältigen Wirkungen dieser regulativen Transkriptionsfaktoren dargestellt.

Tabelle 5: Interferon-regulierende Faktoren (IRFs) und ihre Bedeutung für die Immunantwort. (116)

	Expression	Zielgene	Bedeutung
IRF1	konstitutiv, durch IFN γ induzierbar	NOS2, GBP1	fördern antibakterielle und antivirale angeborene Immunmechanismen
		IL-12	fördert Th1-Zellantwort
		IL-15	steuert Entwicklung hämatopoetischer Zellen
		TAP1, LMP2	binden kurze Peptide an MHC I
		CDKN1A	steuert Zellzyklus und Apoptose
		Caspase-1	kontrolliert Apoptose, prozessiert IL-1 β
IRF2	konstitutiv	ISGs (OAS, PKR, IRF7)	vermindern Typ I IFN- Antwort
		IL-12	fördert Th1-Zellantwort
IRF3	konstitutiv	IFN β , IFN α 4, CXCL9, CXCL10, CCL5	fördern antibakterielle und antivirale angeborene Immunmechanismen
IRF4	konstitutiv, TLR- induzierbar	IL-4, GATA3	steuern T-Zell Funktion
		IGK, CD23	steuern B-Zell Entwicklung und Funktion
IRF5	konstitutiv, induzierbar durch TLRs und Typ I IFN	IL-6, IL-12, TNF, NFKBIZ, CXCL2	entzündungsfördernd
IRF6	unbekannt	unbekannt	unbekannt
IRF7	konstitutiv, durch Typ I IFN Induzierbar	IFN α , IFN β	fördern antivirale angeborene Immunmechanismen
IRF8	konstitutiv, durch IFN γ induzierbar	IL-12, IL-18	fördern Th1-Zellantwort
IRF9	konstitutiv	ISGs (siehe IRF2)	mediieren Typ I IFN- Antwort

1.4.1.2. RIG-like Helikasen

Neben der Gruppe der Toll-like Rezeptoren wurde eine weitere Gruppe nukleinsäureerkennender Rezeptoren entdeckt. Sie werden zur Gruppe der RIG-like Helikasen (RLHs) zusammengefasst. Diese sind notwendig, da die membrangebundenen TLRs nicht in der Lage sind zytoplasmatisch gelegene Nukleinsäuren zu erkennen. Retinoic acid inducible gene I (RIG-I) war das erste Protein dieser Gruppe, das beschrieben wurde (117). Es enthält 2 N- terminale caspase recruitment domains (CARD), eine DExD/H Box RNA Helikase und eine C- terminale repressor domain (RD). Weitere Mitglieder dieser Gruppe sind das MDA-5 (melanoma differentiation- associated gene 5) und LGP2 (Laboratory of Genetics and Physiology-2), welches als negativer Regulator gilt (118, 119). RIG-I und MDA-5 erkennen dabei ein unterschiedliches Spektrum an Viren (120, 121). Der Ligand von RIG-I ist 5'Triphosphat ssRNA (122, 123). MDA5 kann poly IC (poly Inosin-

Cytosin RNA) erkennen, RIG I nicht (124). Über die Helikasedomäne wird dsRNA gebunden, die CARD- Domänen sind für die Signalweiterleitung verantwortlich und die Repressor Domäne inaktiviert die RLHs im unstimulierten Zustand. Das entscheidende Adaptormolekül hierbei ist der IFN- β promoter stimulator 1 (IPS1, auch MAVS, VISA oder CARDIF) (125-128). Bei Abwesenheit von IPS1 sind die betroffenen Zellen nicht in der Lage adäquat Typ I Interferone zu produzieren im Falle einer RNA- Virusinfektion (126, 129). Interessant ist ebenfalls die Lokalisation innerhalb der äußeren Mitochondrienmembran, sodass Mitochondrien neben ihren Aufgaben am Zellstoffwechsel und Zelltod ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Produktion von Typ I Interferonen spielen.

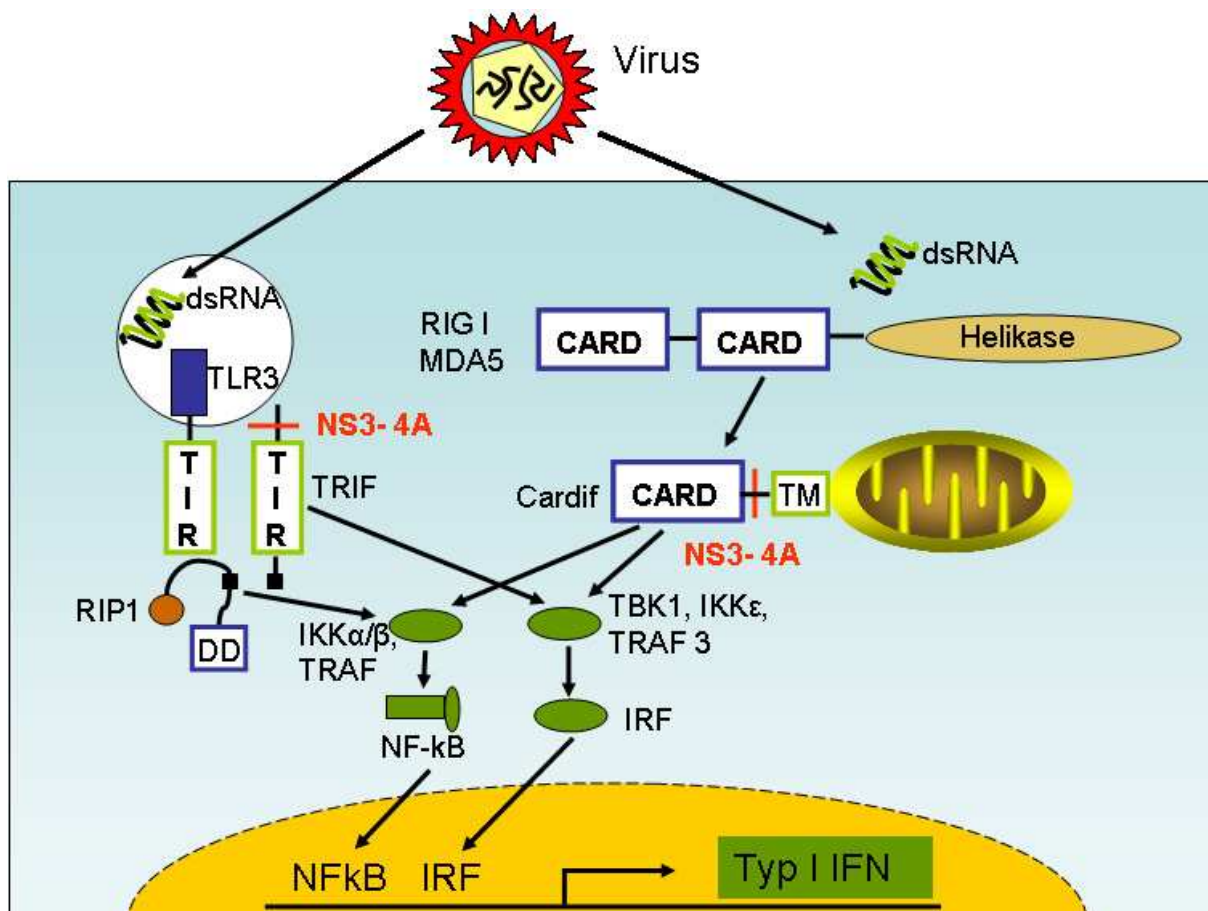


Abbildung 8: Erkennung von intrazellulärer dsRNA endosomal über TLR 3 und zytosolisch über die RIG-like Helikasen MDA-5 und RIG-I. Das Hepatitis C Virus besitzt das Enzym NS3-4A mit dem es die Adaptoren TRIF und Cardif inaktivieren kann um die Signalweiterleitung zu blockieren (130).

IPS1 kann über seine CARD- Domäne auch über das Autophagosomensystem negativ reguliert werden und bietet somit einen weiteren immunologischen Schaltpunkt (131). Die Signalweiterleitung geschieht durch TNF-receptor-associated factor (TRAF) 3, der ähnlich dem TLR- Signalweg die Kinasen TANK-binding kinase 1 (TBK1) und induzierbare I κ B kinase (IKK-i; oder IKKe) aktiviert (132). Schließlich werden IRF3 und IRF7 durch die Kinasen phosphoryliert und bilden Homo-, oder Heterodimere aus, die in den Zellkern

translozieren und an IFN-stimulated response elements (ISREs) im Zellkern binden. Dort initiieren sie die Transkription von Effektorproteinen.

Zusätzlich kann IPS1 auch über das Molekül FAS-associated death domain-containing protein (FADD) die Produktion von NF κ B einleiten, sodass auch eine Verbindung zu den Signalwegen der Apoptose besteht (133).

1.4.1.3. Zytoplasmatische DNA- Rezeptoren

Endosomal gelegene unmethylierte DNA mit sogenannten CpG Motiven kann durch TLR9, ähnlich der RNA- Erkennung durch die Toll- like Rezeptoren 7,8 und 3 erkannt werden.

Schon bald nach der Entdeckung von TLR 9 zeigte sich an TLR9-defizienten Mäusen, dass DNA auch TLR 9-unabhängig eine Interferonantwort bewirkt (105). Nachdem mit RIG-I und MDA5 neue Rezeptoren zur Erkennung zytoplasmatischer RNA entdeckt und charakterisiert wurden, ist die Beschreibung von analogen Rezeptorsystemen zur Erkennung zytoplasmatischer DNA Gegenstand intensiver Grundlagenforschung. Eine genauere Charakterisierung der ablaufenden Prozesse ist wichtig um das Gesamtbild der zytosolischen Nukleinsäureerkennung als wichtigen Mechanismus der virusassoziierten Pathogenerkennung zu vervollständigen (10).

Es konnte gezeigt werden, dass zytosolische B- DNA unabhängig von Toll-like Rezeptoren über einen IRF3- abhängigen Signalweg in der Lage ist die Produktion von Typ-I Interferonen auszulösen (134). Im Modell einer Infektion mit *Listeria monocytogenes* in Doppel- K.O. Zellen für MyD88 und TRIF bzw. MyD88 und RIP2 wurde weiterhin Interferon- β produziert, obwohl die Adaptermoleküle der Toll-like und NOD- Rezeptoren, einer weiteren Gruppe von Rezeptoren der angeborenen Immunität, nicht in diesen Zellen exprimiert wurden. Die Erkennung erfolgt dabei sequenzunspezifisch und ist abhängig vom Zuckerphosphatgerüst der DNA (135). Die DNA Erkennung findet auch unabhängig von IPS1, dem Adaptormolekül der RIG-like Helikasen statt (129). Auf der Suche nach geeigneten Proteinen wurden Microarrayanalysen auf interferoninduzierbare Proteine mit DNA- Bindungsdomänen durchgeführt. Als erstes Protein mit DNA- Erkennungseigenschaften wurde DAI (ZBP-1) beschrieben. Seine Überexpression in der murinen Fibroblastenzelllinie L929 führte zu einer gesteigerten Produktion von Typ-I Interferonen nach dsDNA Stimulation, während knockdown Experimente eine verringerte Interferonproduktion zeigten (136).

DAI liegt zytosolisch vor und verfügt über 3 DNA- Bindungsdomänen. N-terminal befinden sich 2 Z-DNA bindende Domänen die Z α und Z β genannt wurden; die dritte DNA- Bindungsdomäne heißt D3 (137).

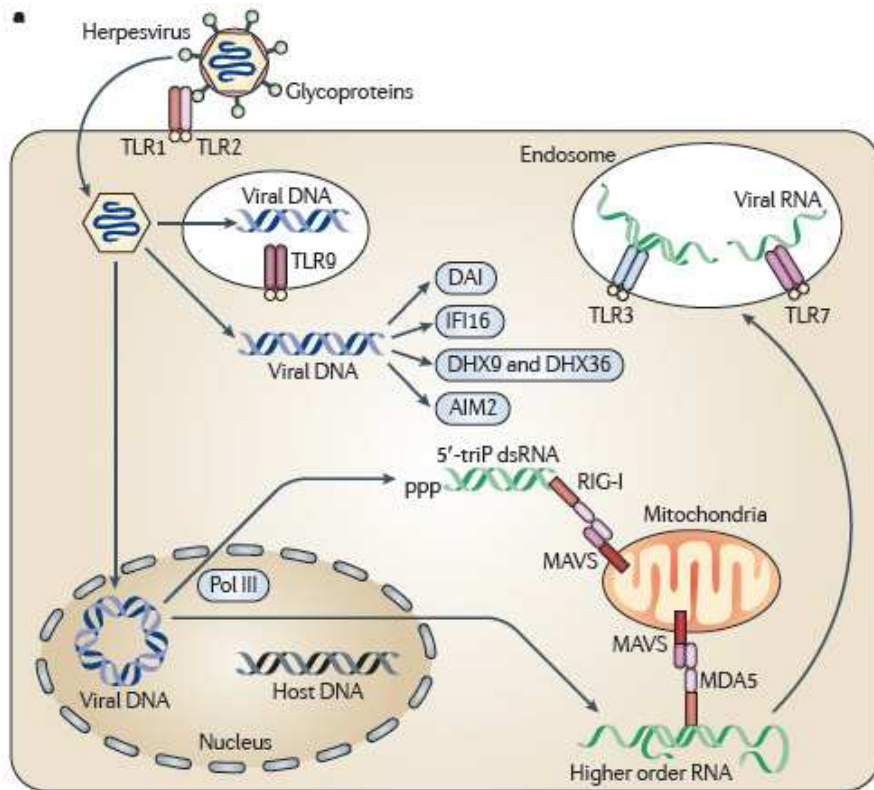


Abbildung 9: Erkennung von DNA-Viren. Am Beispiel der Herpesviren ist eine Übersicht der möglichen Erkennungsmechanismen der angeborenen Immunität dargestellt. Aus (138).

Zytosolische DNA wird zunächst an DAI gebunden. Danach wird die Bindung zusätzlich durch $Z\alpha$ und $Z\beta$ stabilisiert. In diesem Zustand können die DAI-DNA-Komplexe multimerisieren (139). Artifiziiell dimerisiertes DAI-Protein ist auch ohne DNA-Bindung in der Lage Interferone zu induzieren (137). An aktiviertem DAI kann über eine C-terminale Domäne die Serin-Threonin Kinase TBK1 binden. Sie reguliert die phosphorylierungsabhängige Aktivierung des interferoninduzierenden Transkriptionsfaktors IRF 3 (140). Dieser bewirkt eine gesteigerte Synthese von Typ-I Interferonen. Ein weiteres Adaptorprotein für aktiviertes DAI ist die sogenannte Receptor-interacting protein Kinase 1 (RIP1). Diese kann auch durch TLR 3, 4, RIG-I und den death Rezeptor aktiviert werden und ist wichtig für die Induktion von NF κ B, welches seinerseits die Produktion inflammatorischer Effektorproteine anregt. Die Aktivität von RIP1 ist phosphorylierungsabhängig und wird von RIP3 reguliert (140). Es sind auch einige Proteine beschrieben, die als negative Regulatoren dienen. Dazu gehört die 3' repair Exonuklease 1 (Trex1), deren Fehlen zu schwerer Autoimmunerkrankung führt (141). Ein weiterer negativer Regulator ist die adenosine deaminase acting on RNA 1 (ADAR1). Auch das E3L Protein des Vaccinia Virus, einem DNA Virus, wirkt hemmend auf die DNA-abhängige Interferoninduktion (137). Es zeigte sich jedoch, dass es weitere Rezeptoren geben muss (142), da DAI-defiziente Mäuse keine erhöhte Empfindlichkeit gegen DNA-Viren zeigten.

Binnen kurzer Zeit konnten mehrere weitere Proteine von mehreren Arbeitsgruppen identifiziert werden. So konnte AIM-2 als DNA-Rezeptor identifiziert werden, der über eine Aktivierung von Inflammasomen zu einer Aktivierung von Caspase-1 und dadurch von Interleukin-1 und -18 führt (143, 144). Wichtige Komponenten hierfür sind der zytoplasmatische Rezeptor NALP3 und sein Adaptor ASC, da ihre Abwesenheit zu einer deutlich abgeschwächten Antwort führt (145). Ein weiterer Mechanismus nutzt RNA-Polymerase III, die AT-reiche Virus-DNA in 5'triphosphat RNA transkribiert und hierüber RIG-I induziert (146, 147). Erst vor kurzem wurde IFI 16 beschrieben, dass durch zytoplasmatische DNA zur Aktivierung von IRF3 und NFκB angeregt wird (148). Abbildung 9 faßt die beteiligten intrazellulären Signalwege zusammen.

Zusammenfassend verfügt das Immunsystem über mehrere Rezeptorsysteme für RNA und DNA in den verschiedenen Zellkompartimenten. Diese interagieren auf vielfältige Weise untereinander und führen zu einer Signalweiterleitung auf Transkriptionsfaktoren, die zur Expression von Effektormolekülen führen.

In Tabelle 6 ist eine Übersicht verschiedener nukleinsäure-erkennender Rezeptoren der angeborenen Immunität und hierdurch erkannter Viren zusammengestellt.

Tabelle 6: Viruserkennung durch Rezeptoren der angeborenen Immunität (138, 149-151).

Rezeptor	Viren
TLR-2	HSV-1, HSV-2, CMV, EBV, VZV
TLR-3 (dsRNA)	Reoviren, respiratory syncytial Virus, HSV-1, encephalomyocarditis virus (EMCV), West Nile virus
TLR-7	HIV, Influenzavirus, Vesicular stomatitis virus (VSV)
TLR-9	HSV-1, HSV-2, CMV, EBV
RIG-I	Paramyxoviren, Influenzavirus, VSV, Japanese encephalitis virus, EBV
MDA-5	Picornaviruen, EMCV, Mengovirus, Theilervirus
DAI	HSV1, CMV
Polymerase III	HSV1, EBV
IFI 16	HSV1

1.4.2. Antivirale Effektorproteine

Die bisher beschriebenen Rezeptoren dienen alle als Sensoren für eine Invasion durch Pathogene. Gleichzeitig reichen sie diese Information über komplexe Signalwege an den Zellkern weiter. Dort führen die aktivierten Transkriptionsfaktoren zur Expression von Effektormolekülen, die den erkannten Pathogenen entgegenwirken sollen.

Zu diesen Effektormolekülen gehören eine Reihe von Proteinen mit direkter antiviraler Aktivität, wie z.B. Fv (Friend virus susceptibility) und TRIM 5 α (tripartite-motif containing 5 α) die an die Kapside von Retroviren binden und Mx (myxovirus resistance 1), das auf Nukleoproteine von Bunya- und Orthomyxoviren reagiert.

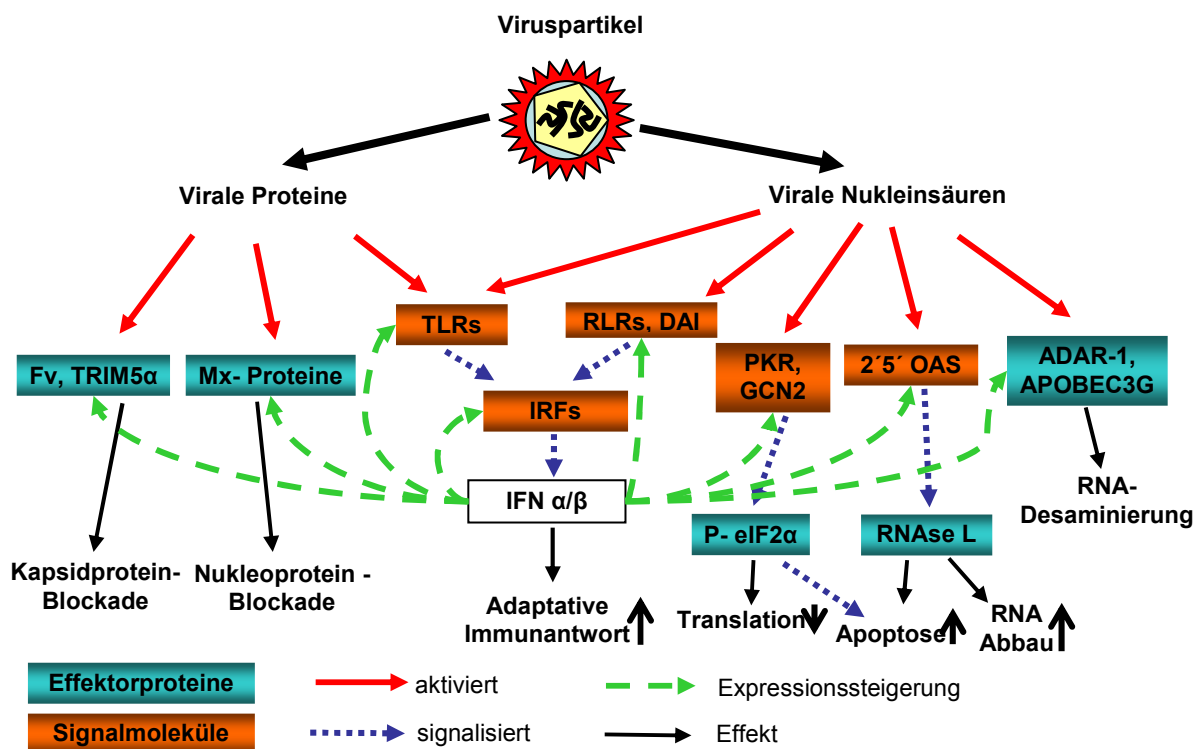


Abbildung 10. Angeborene antivirale Immunität. (152)

Ein anderer Mechanismus wird über den Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like editing complex (APOBEC) genutzt, der retrovirale Genome desaminiert und somit zu einer erhöhten Mutationsrate führt die ihrerseits die Virusproliferation behindert (153, 154). Weitere Enzyme nehmen Einfluss auf den RNA- Stoffwechsel. Proteinkinase R (PKR) und general control non-derepressible -2 (GCN2) werden durch virale RNAs aktiviert und führen über eine Phosphorylierung der α - Untereinheit des eIF2 α , einem Initiationsfaktor der Translation, zu einer verminderten mRNA Translation (155, 156).

Der Abbau bereits vorhandener RNA wird durch das Enzym RNase L beschleunigt, die durch die 2'-5'Oligoadenylat Synthetase (2'5'OAS) initiiert wird. Auch hierbei wirken virale RNAs aktivierend (157). Zusätzlich trägt RNase L zur verstärkten Interferon- β Produktion bei,

indem sie kleine Fragmente aus eigener RNA nach viraler Infektion produziert, die zusätzlich stimulierend auf die RIG- like Helikasen (RLHs) wirken (158). Die Adenosindesaminase acting on RNA (ADAR1) desaminiert Zwischenprodukte der viralen RNA- Maschinerie (159). Alle genannten Prozesse beeinträchtigen auch lebenswichtige physiologische Prozesse in der Zelle und können somit zur Initiierung von Apoptose führen. Deswegen müssen diese Prozesse in engem Rahmen reguliert und spezifisch in infizierten Zellen aktiviert werden. Abbildung 10 veranschaulicht die wichtigsten Zusammenhänge.

1.4.2.1. Interferone

Die Interferone (IFN) sind eine Gruppe von antiviralen Effektorproteinen, denen eine besondere Bedeutung bei der Viruselimination zukommt. Sie wurden erstmals 1957 beschrieben (160). Schon 1963 wurde gezeigt, dass Nukleinsäuren die Interferonsynthese stimulieren und dass Interferone an der antiviralen Immunantwort maßgeblich beteiligt sind (161). Passend dazu werden Interferone unter anderem durch TLRs und RLHs induziert, die eine wichtige Rolle bei der Erkennung viraler Partikel spielen.

Interferone lassen sich derzeit in 3 Gruppen einteilen. Typ-I Interferone können von allen kernhaltigen Zellen im Falle einer viralen Infektion produziert werden. Zu den Typ-I Interferonen gehören das IFN- β und 14 Untertypen von IFN α . Weitere seltenere Interferone wie die IFN- Typen kappa, zeta, epsilon, delta, omega und tau werden auch hierzu gezählt (162). Typ-II Interferon wird nur von T- Lymphozyten und NK- Zellen produziert, bei entsprechender Aktivierung des T-Zell-Rezeptors (TCR) oder des NK- Rezeptors. Zu den Typ III Interferonen zählen IFN lambda 1, 2 und 3 (163).

Der Rezeptor für Typ I- IFN ist der IFNAR, der auf alle Untertypen von Typ-I IFN reagiert und ebenfalls auf allen Zellen exprimiert wird (164). Die Bedeutung der Interferone zeigt sich sehr deutlich am Phänotyp von signal transducer and activation of transcription 1 (STAT1) defizienten Zellen. STAT1 ist an allen Interferonsignalwegen beteiligt und sein Fehlen führt zu einer drastisch erhöhten Anfälligkeit gegenüber viralen Infektionen (165, 166). Das beruht unter anderem darauf, dass die Interferone an der Aktivierung aller obengenannten antiviralen Effektorproteine über die Steigerung ihrer Expression beteiligt sind. Die Gensequenzen der durch Interferone induzierten antiviralen Proteine werden als Interferon-stimulierte Gene (ISGs) bezeichnet. Tabelle 7 gibt einen Überblick über die Vielfalt von Proteinen und Effekten die durch Interferone gesteuert werden. Weitere Wirkungen sind die Stimulation von NK- Zellen, Aktivitätssteigerung von dendritischen Zellen und Einleitung der adaptativen Immunantwort (167).

Somit sind die Interferone entscheidende Regulatoren einer sehr breiten Palette an Effektorproteinen, die die Zelle vor Pathogenen schützen.

Tabelle 7. Interferon-stimulierte Gene (ISGs) und ihrer Wirkung. (109)

Gene	Proteinfunktion	Wirkmechanismus
OAS, RNase L	RNA Spaltung	Abbau viraler und zellulärer RNA, Induktion von Typ I Interferonen
PKR	Phosphorylierung von EIF2a	blockt Proteinsynthese
p56	bindet EIF3	blockt Proteinsynthese
Mx1	umhüllt Viruskapside	stört intrazellulären Transport
PLSCR1	Phospholipidmigration, DNA- Bindung	verstärkt Expression einiger ISGs
TRAIL/Apo2L	Ligand von Apoptoserezeptoren	Apoptose
XAF1	blockiert Apoptoseinhibitor	Apoptose
G1P3	inhibiert Caspase 3	anti- apoptotisch
GBP1	GTPase	antiviral, Angiogeneseinhibitor
PML	unbekannt	antiviral
ADAR1	dsRNA Adenosindesaminase	RNA editing
Viperin (cig5)	unbekannt	antiviral
iNOS	induzierbare NO- Synthase	antiviral
Nup98/Nup96	Nukleoporin	antiviral
IRF7, RIG-I, MDA5, STAT1	Signalmoleküle der Interferonaktivierung	induzieren Typ-I Interferone

1.5. Renale dendritische Zellen

Dendritischen Zellen kommt große Bedeutung bei der Aktivierung und Regulation des adaptativen Immunsystems, seiner Interaktion mit dem angeborenen Immunsystem, der Entwicklung von Selbsttoleranz und Gewebereparatur zu (168). Die genaue Funktion der Subpopulation der renalen dendritischen Zellen ist bisher nicht ausreichend geklärt. Zuerst wurden die Zellen elektronenmikroskopisch beschrieben, wobei sie als tubulointerstitielle Zellen mit DC- Morphologie auffielen (169). Es konnte auch gezeigt werden, dass diese Zellen MHC-II exprimieren und in der Lage sind T- Zellen zu aktivieren (170). Dabei war zunächst strittig, ob es sich nicht um Makrophagen handelt, da die Zellen z.B. die Makrophagenmarker CD11b und F4/80 exprimieren. Es konnte aber gezeigt werden, dass diese Marker auch von einigen Subpopulationen dendritischer Zellen exprimiert werden (171). Desweiteren konnte eine gemeinsame Vorläuferzelle für dendritische Zellen und Makrophagen beschrieben werden, die auf eine sehr nahe Verwandtschaft dieser beiden Zellpopulationen deutet (172). Zusätzlich wurde der DC- spezifische Marker CD11c auf den Zellen nachgewiesen. Die CD11c positiven Zellen konnten isoliert werden und zeigten

Eigenschaften von dendritischen Zellen (173). Diese Subpopulation renaler DCs exprimiert als Marker den Chemokinrezeptor CX₃CR1 (Fractalkine). Dieser Marker wurde mit GFP gekoppelt um mittels konfokaler Mikroskopie die intrarenale Verteilung dieser Zellpopulation zu untersuchen. Hierbei zeigte sich, dass die CX₃CR1 positiven Zellen über ihre Fortsätze ein umfassendes zusammenhängendes Netzwerk im gesamten Interstitium und Mesangium der Niere ausbilden. Ihre Fortsätze durchstreifen das Interstitium und haben wahrscheinlich die Funktion der Antigenaufnahme (174). Auch Antigene aus dem Tubuluslumen können aufgenommen werden (175). Das generelle Konzept ist, dass zunächst die unreifen Vorläuferzellen aus dem Knochenmark über den Blutstrom in die verschiedenen Zielgewebe, unter anderem der Niere, gelangen. Dort kommen sie in Kontakt mit verschiedenen Antigenen die sie verarbeiten können und erkennen Pathogene über eine Vielzahl von Rezeptoren der angeborenen Immunität (176). Diese Prozesse führen zur Reifung der Zellen, die daraufhin ihre phagozytische Aktivität einschränken und mit einer verstärkten Expression co-stimulatorischer Moleküle beginnen. In diesem Zustand migrieren die Zellen in die drainierenden Lymphknoten der entsprechenden Organe und treffen dort unter anderem auf naive T-Zellen. Diese werden aktiviert und dienen als Effektorzellen der adaptativen Immunantwort (177). In Abwesenheit pathogen-assoziiertter Antigene verweilen die dendritischen Zellen im unreifen Zustand. Dabei nehmen sie Autoantigene auf, für die sie in den T-Zellen Toleranz bewirken. Ob diese Funktionen auch in der Niere nach diesem Modell ablaufen, konnte bisher nicht zufriedenstellend geklärt werden. Dies ist unter anderem durch die technisch aufwändige Isolation der Zellen bedingt.

Die renalen dendritischen Zellen bilden ein tubulo-interstitielles Netzwerk aus, das als Teil der angeborenen Immunität die Umgebung nach Antigenen absucht und durch die Präsentation dieser Antigene an Lymphozyten eine Schnittstelle zum erworbenen Immunsystem darstellt.

1.6. Fragestellung

Die hohe Transplantatverlustrate bei Ausbruch der BK-Virusnephritis ist besonders im Hinblick auf die schwierige Versorgungslage mit Spendernieren von hoher klinischer und sozialer Bedeutung. Die Auswirkungen der Infektion mit dem dsDNA Virus BKV auf die Transplantationsmedizin einerseits und die neuen Erkenntnisse über angeborene Abwehrmechanismen gegen DNA-Viren andererseits führten bei uns zur Fragestellung welche Folgen das Vorliegen von Sequenzen des BKV-Genoms im Zytosol der Tubulusepithelzellen, zu dem es auch bei einer BKV-Nephropathie kommt, bewirkt und ob die beschriebenen Abwehrmechanismen, die durch virale Nukleinsäuren ausgelöst werden, auch für die Tubulusepithelzellen gelten. Sollte dies der Fall sein, so ist auch eine Beschreibung der hervorgerufenen Effekte von Interesse.

Werden wichtige Effektorproteine wie Zytokine, Chemokine und Interferone produziert und welche Schlüsse kann man für die Pathophysiologie einer tatsächlichen BKV- Infektion der Niere ableiten? Die Erforschung der ablaufenden pathophysiologischen Prozesse ist wichtig um langfristig neue pharmakologische Ziele für die Prävention und Therapie DNA-virusbedingter Erkrankungen und somit auch der BKVN zu ermöglichen.

Unsere Hypothese ist, dass renale Tubulusepithelzellen in der Lage sind über Mechanismen der angeborenen Immunabwehr zytosolisch gelegene DNA unabhängig von TLRs zu erkennen. Hierzu untersuchten wir die Expression von Effektormolekülen, wie bestimmter Zytokine, Chemokine und Interferone unter verschiedenen Ausgangsbedingungen und verglichen Wildtypzellen mit Tubulusepithelzellen, die defizient für entscheidende Adaptorproteine des TLR-Systems sind.

Uns interessierte auch ob renale dendritischen Zellen ebenfalls auf dsDNA Liganden reagieren, da sie im Gegensatz zu Tubulusepithelzellen, als antigenpräsentierende Zellen Lymphozyten aktivieren und somit die erworbene Immunantwort initiieren können.

Wir wollten untersuchen, ob DNA-Sequenzen des BKV zu einer relevanten Immunantwort durch Tubulusepithelzellen führen und die induzierte Antwort auf ihre Korrelation mit bestimmten Ligandenkonzentrationen analysieren. Die Reaktion der Tubulusepithelzellen sollte durch Bestimmung der Konzentrationen ausgewählter Effektorproteine charakterisiert werden. Desweiteren wollten wir zeigen, dass auch renale dendritische Zellen in der Lage sind dsDNA Liganden zu erkennen und mit den Tubulusepithelzellen bei der Koordination der Immunantwort kooperieren.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

Durchflußzytometer

FACSCalibur

Becton Dickinson, San Jose, USA

ELISA-Reader

Tecan, GENios Plus

Tecan, Crailsheim

ELISA- Plattenwascher

Microplate Washer Elx 50

Biotek, Bad Friedrichshall

TaqMan Sequence Detection System

ABI prism 7700 sequence detector

PE Biosystems, Weiterstadt

Zellinkubator

Typ B5060 EC-CO2

Heraeus Sepatech, München

Zentrifugen

Heraeus, Biofuge primo

Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau

Heraeus, Minifuge T

VWR International, Darmstadt

Heraeus, Sepatech Biofuge A

Heraeus Sepatech, München

Waagen

Analytische Waage, BP 110 S

Sartorius, Göttingen

Mettler PJ 3000

Mettler-Toledo, Greifensee, Schweiz

Mikroskope

Leica DC 300F

Leica Microsystems, Cambridge, UK

Olympus BX50

Olympus Microscopy, Hamburg

Spektrophotometer

Beckman DU 530

Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA

Thermocycler

Biometra Uno 2

Biometra, Göttingen

Sonstiges

Midi MACS

Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

pH meter WTW

WTW GmbH, Weilheim

Thermomixer 5436

Eppendorf, Hamburg

Vortex Genie 2™

Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz

Wasserbad HI 1210

Leica Microsystems, Bensheim

Tierhaltung

Makrolone Typ II Käfige
Tierfutter

Techniplast, Hamburg
Ssniff Spezialdiäten, Soest

2.1.2. Chemikalien, Lösungen und Puffer

Bovines Serumalbumin (BSA)

Roche, Mannheim

Collagen IV

Fluka, Buchs, Schweiz

Diethylpyrocarbonat (DEPC)

Fluka, Buchs, Schweiz

RNase- freie DNase Typ I

Qiagen, Hilden

Dimethylsulfoxid (DMSO)

Merck, Darmstadt

Ethylendiamintetraacetat (EDTA)

Calbiochem, San Diego, USA

Ethanol 70%

Merck, Darmstadt

FACS Flow

Becton Dickinson, Heidelberg

Rhodamine-Maleimide

Invitrogen, Paisley, UK

Salzsäure HCl (5N)

Merck, Darmstadt

β- Mercaptoethanol

Roth, Karlsruhe

Trypanblau

Sigma, Deisenhofen

Puffer:

10x HBSS (1L): 4g KCl, 0,6g KH₂PO₄, 80g NaCl, 0,621g NaH₂PO₄xH₂O

MACS-Puffer: 2mM EDTA, 0,5% BSA, pH 7,2

20x PBS: 2,74M NaCl, 54mM KCl, 30mM KH₂PO₄, 130mM NaH₂PO₄ in ddH₂O, pH mit HCl auf 7,5 eingestellt.

FACS- Puffer: PBS, 0,1% Na Azid, 0,2% BSA

2.1.3. Materialien für die Zellkultur

DMEM- Medium

GIBCO/Invitrogen, Paisley, UK

RPMI-1640- Medium

GIBCO/Invitrogen, Paisley, UK

Opti- MEM- Medium

GIBCO/Invitrogen, Paisley, UK

Fötale Kälberserum (FCS)

Biochrom KG, Berlin

ITS, Insulin, Transferrin, Selen

Roche, Mannheim

Penicillin/Streptomycin (100x)

PAA Laboratories GmbH, Cölbe

Dulbecco's PBS (1x)

PAA Laboratories GmbH, Cölbe

Preseparation Filter

Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

2.1.4. Oligonukleotide, Liganden, Zytokine, Stimulanzen**Oligonukleotide:****VP1- Teilsequenz:**

sense: 5' AGCCCAGAGAGAAAAATGCTTCCCTGTTACAGCACAGCAA 3'

antisense: 5' TTGCTGTGCTGTAACAGGGAAGCATTCTCTCTGGGCT 3'

T-Ag Teilsequenz:

sense: 5' GCTGTTGCTTCTTCATCACTGGCAAACATATCTTCATGGC 3'

antisense: 5' GCCATGAAGATATGTTTGCCAGTGATGAAGAAGCAACAGC 3'

CpG- ODN 1668

TIB Molbiol, Berlin

IFN γ

Peptotech, Rocky Hill, NJ, USA

Lipofectamin 2000 Reagent

Invitrogen, Paisley, UK

Poly (I:C), dsRNA

Invivogen, Toulouse, F

2.1.5. Reagenziensätze**RNA- Isolation**

RNeasy Mini Kit

Qiagen, Hilden

Zellproliferation

Cell Titer 96 Proliferation Assay

Promega, Mannheim

ELISA- Kits

Maus IL-6

Becton Dickinson, Heidelberg

Maus IFN γ

Becton Dickinson, Heidelberg

Maus MCP-1

BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA

Maus IP-10

R&D Systems, Minneapolis, USA

Apoptosemessung

Annexin V FACS Kit

Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

Caspase-8 Inhibitor (Ac-IETD-CHO)

Biomol, Hamburg

2.1.6. Antikörper und Western Blot Reagenzien

CD11b microbeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Polyklonaler anti-Cardif AT107	Alexis Biochemicals, Grünberg
peqGOLD Protein marker	peqlab, Erlangen
Esel anti-Hase HRP Antikörper	GE Healthcare, München
enhanced chemiluminescence, ECL	Amersham Pharmacia Biotech Europe, Freiburg
Hase anti-Maus Rab5 Antikörper	Sigma Aldrich, Deisenhofen
FITC-anti- Hasen IgG	Sigma Aldrich, Deisenhofen

2.1.7. Realtime- PCR- Sonden

Sämtliche Sonden für die TaqMan rtPCR wurden über Applied Biosystems (Darmstadt) bezogen.

mGAPDH	forward	5' CATGGCCTTCCGTGTTCCCTA 3'
	reverse	5' ATGCCTGCTTCACCACCTTCT 3'
	FAM	5' CCCAATGTGTCCGTCGTGGATCTGA 3'
18S rRNA	forward	5' GCAATTATTCCCCATGAACG 3'
	reverse	5' AGGGCCTCACTAAACCATCC 3'
Mx-1	Sonden-ID	Mm00487796_m1
	FAM	5'-TGTAAGTCTAAGTCCAAAATTAAG-3'
IL-6	Sonden-ID	Mm00446190_m1
	FAM	5'-AAATGAGAAAAGAGTTGTGCAATGG-3'
CXCL 10	Sonden-ID	Mm00445235_m1
	FAM	5'-GACTCAAGGATCCCTCTCGCAAGG-3'
IPS-1	Sonden-ID	Mm00523168_m1
	FAM	5'-AGTGACCAGGATCGACTGCGGGCTT-3'
IFN-β	Sonden-ID	Mm00439546_s1
	FAM	NCBI Reference Sequence: NM_010510.1

2.1.8. Reagenzien zur RNA Isolation und rt- PCR

1kb DNA Ladder	Invitrogen, Karlsruhe
10x Puffer	Minerva BioLabs, Berlin
Hexanucleotide	Roche, Mannheim
RNasin	Promega, Mannheim
Superscript	Invitrogen, Karlsruhe
Taq DNA Polymerase	Minerva BioLabs, Berlin
TaqMan universal PCR master mix	Applied Biosystems, Darmstadt

2.1.9. Zelllinie

MCT- murine Tubulusepithelzelllinie. Transformiert mit nicht- replizierendem sv40-Virus. Haverty 1988 (178).

2.1.10. Versuchsmäuse

C57BL/6 Wildtyp	Charles River, Sulzfeld
C57BL/6 - TRIF -/- Mutanten	Hoebe 2003 (179)
C57BL/6 – MyD88 -/- Mutanten	Adachi 1998 (110)
Sv129 Wildtyp	Taconic Farms, Germantown, USA
Sv129 IFN-R1 -/- Mutanten	

2.2. Zellkultur

2.2.1. Allgemeine Zellkulturbedingungen

Die isolierten Primärzellen und die Zelllinien wurden in einem Begasungsbrutschrank bei 37°C und 95% Luftfeuchtigkeit bei einem Anteil von 5% CO₂ in der Atmosphäre inkubiert. In der Regel wurde als Nährmedium Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM) verwendet, das mit FCS von verschiedenen Konzentrationen (2,5-5%) versetzt wurde. Zur Reduktion des Risikos einer mikrobiellen Kontamination wurden dem Medium 1% Penicillin/Streptomycin zugegeben. Bei Erreichen einer etwa 80%-igen Konfluenz der Zellen erfolgte die Ablösung von den Kulturplatten mit EDTA-Trypsin. Nach Resuspension in PBS und einem Waschschrift in der Zentrifuge bei 1100 rpm für 3 min, wurden die Zellen erneut im Kulturmedium aufgelöst und auf neue Platten verteilt. Diese sogenannte „Passage“ der Zellen, sowie die im weiteren durchgeführten Stimulationsexperimente erfolgten unter einer Sterilbank. Durch den laminaren Luftstrom und den verwendeten Filtern wurde eine keimfreie Umgebung gewährleistet. Sämtliche Arbeitsoberflächen und Instrumente wie z.B. Pipetten wurden vor Verwendung mit alkoholischer Lösung gründlich desinfiziert, sofern sie nicht schon zuvor steril verpackt oder autoklaviert wurden. Die verwendeten Medien und Substanzen wurden gleichfalls steril gelagert.

2.2.2. Bestimmung von Zellzahl und Vitalität

Die Bestimmung von Zellzahl und Vitalität erfolgte mittels einer Trypanblaufärbung der Zellen unter Verwendung einer Neubauer Zählkammer. Trypanblau gelangt nur bei avitalen Zellen durch die Zellmembran ins Zytoplasma. Somit sind abgestorbene Zellen im Mikroskop an der dunkelblauen Färbung zu erkennen, während vitale Zellen hell erscheinen, da sie den Farbstoff nicht aufnehmen. Die Zellzahl wird bestimmt, indem ein definiertes Volumen einer gefärbten Zellsuspension auf die Neubauer Zählkammer gegeben wird und anschließend manuell die vitalen Zellen ausgezählt werden. Die Kammer ist in quadratische Sektoren mit fest definierter Fläche eingeteilt. Bei der Auszählung werden die Zellen mehrerer Großquadrate der Zählkammer ermittelt und der Mittelwert pro Großquadrat errechnet. Um die Zellkonzentration pro ml der untersuchten Suspension zu erhalten, muss dieser Wert nun mit dem Verdünnungsfaktor (bei der Färbung mit Trypanblau meist 1:10) und der Konstante 10^4 (da das ausgezählte Volumen von 0,1 μ l auf 1 ml umgerechnet wird) multipliziert werden.

2.2.3. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden die jeweiligen Zellen zuerst mit EDTA durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren von den Kulturplatten abgelöst und danach zentrifugiert. Das Zellmaterial wurde dann mit 90% FCS und 10% DMSO auf eine Konzentration von etwa 1 Mio. Zellen pro ml resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde in beschriftete Kryoröhrchen überführt und in einer mit Isopropanol gefüllten Kühlbox bei -80°C für 24 Stunden eingefroren. Schließlich wurden die tiefgefrorenen Zellen in einem Stickstoffgefriertank gelagert.

Aufzutauende Zellen wurden im Wasserbad bei 37°C erwärmt. Anschließend wurden sie unter sterilen Bedingungen in Zellkulturschalen mit vorgewärmtem Medium überführt. Da DMSO zytotoxisch wirkt, muss die Überführung in Kulturmedium zügig erfolgen. Nach 24 Stunden wurde das Medium erneut gewechselt.

2.2.4. Gewinnung und Kultivierung von primären Tubulusepithelzellen

Die Isolation von murinen Tubulusepithelzellen erfolgte aus den Nieren von C57Bl/6 Mäusen mit Wildtyp, Trif $-/-$ oder MyD88 $-/-$ Genotyp im Alter von 4-6 Wochen. Die primären Tubuluszellen wurden im Gegensatz zur Zelllinie auf mit $6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ humanen placentaren Collagen IV (Fluka/Sigma) beschichteten 24-well Platten (Corning) angezüchtet. Die Inkubation mit Collagen erfolgte für 2-6 Stunden. Diese Vorbehandlung der Platten ist für eine effektive Adhäsion der Tubulusepithelzellen notwendig. Als Nährmedium dient hierbei K1- Medium, das auf D-MEM + 10% FCS + 1% PS basiert und zusätzlich 2,5% 1M HEPES, 1% Hormonmischung (Insulin-Transferrin-Sodium-Selenit (ITSS), PGE-1, T3 und Hydrocortison in HBSS/HEPES gelöst) und EGF (20 ng/ml) enthält.

Nach zervikaler Dislokation wurden beide Nieren der Mäuse mit dem gewünschten Genotyp chirurgisch entnommen und in Petrischalen in ca. 0,5 ml HBSS -HEPES – Puffer, der zur Gewährleistung eines physiologischen pH dient, mit einem Skalpell zerkleinert. Nach einer möglichst homogenen Zerkleinerung wurde die Zellmasse mit ca. 5 ml HBSS-HEPES resuspendiert und mittels eines 30 µm MACS-Präseparationsfilters (Miltenyi) in ein 15 ml Falcon filtriert. Die Zellsuspension wurde anschließend für 5 Minuten zentrifugiert bei 1100 rpm und 4°C. Nach abgießen des Überstandes wurde die gewonnene Zellmasse erneut resuspendiert mit ca.10 ml D-MEM+10% FCS+1% PS und auf eine Zellkulturplatte ausplattiert. Danach wurde die Platte für 1-2 Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ aufbewahrt um die schneller-adhärierenden Zellen abzutrennen (u.a. Makrophagen). Der Überstand mit den Tubulusepithelzellen wurde erneut abgenommen und zentrifugiert bei 1100 rpm und 5 Minuten bei Raumtemperatur. Die Zellen wurden dann im zukünftigen Kulturmedium K1 resuspendiert und auf 12- oder 24-well Platten verteilt.

2.2.5. Gewinnung und Kultivierung von primären renalen dendritischen Zellen

Es wurden beide Nieren von Mäusen des gewünschten Genotyps entnommen und auf einer Petrischale in 200-300 µl RPMI-Medium zerkleinert. Die Zellen wurden mittels 30 µm MACS Präseparationsfilter aufgereinigt und anschließend bei 1500 rpm für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Die gewonnenen Zellen wurden mit 100 µl Bead-Puffer (90 µl PBS + 0,5% BSA+ 2mM EDTA und 10 µl anti-CD11b+ micro beads (Miltenyi)) resuspendiert. Es wurde für 15-30 Minuten im Kühlraum bei 4°C inkubiert um ein Anheften der Antikörper zu erreichen. Daraufhin folgte ein Waschschriff mit 5 ml des Waschpuffers (PBS + 0,5% BSA+ 2mM EDTA) bei 1500 rpm für 10 Minuten bei 4°C. Die magnetische Trennsäule MACS Separation Column LS (Miltenyi) wurde ins Magnetfeld gestellt und mit 3 ml Waschpuffer angefeuchtet. Anschließend erfolgte die Zugabe der im Waschpuffer resuspendierten Zellen. Die Säule wurde danach 3 mal mit 3 ml Waschpuffer gespült um die unmarkierten Zellen aus der Säule zu entfernen. Der dabei gewonnene Durchfluß kann zur Tubuluszellisolation genutzt werden. Die CD11b+ Zellen wurden aufgrund der magnetisch markierten Antikörper und dem anliegenden Magnetfeld in der Trennsäule gehalten. Nach Entfernen der Säule aus dem Magnetfeld und anschließendem Spülen mit 5 ml Waschpuffer wurden die gewonnenen Zellen gezählt und in RPMI + 10% FCS + 1% PS + 1 ng/ml GM-CSF auf 24-well Platten kultiviert.

2.2.6. Stimulationsexperimente

Die Stimulation von Primärzellen und Zelllinienzellen erfolgte mit 2 Oligonukleotiden aus den Gensequenzen von large T-Ag und VP1 des murinen BK-Virus Genoms. Diese sollten stellvertretend das Vorliegen von dsDNA Fragmenten im Zytosol der Zellen simulieren.

Der Einfachheit halber werden die verwendeten Oligonukleotide nach den Genen aus denen sie stammen benannt: VP1 und T-Ag. Die Sequenzen sind unter 2.1.4. aufgeführt.

Die Zellen wurden dem experimentellen Aufbau entsprechend in 6-, 12-, 24-, 48-, oder 96-well Platten stimuliert, sobald eine etwa 80% Konfluenz erreicht war. Zuvor wurden die Zellen für 24 Stunden in dem entsprechenden Medium mit 1% FCS und ohne Penicillin/Streptomycin inkubiert. Die verwendeten Liganden zur Stimulation umfassen neben den obengenannten Oligonukleotiden zusätzlich CpG DNA 1668 und Poly (I:C)- RNA. Zur Stimulation intrazellulär gelegener Rezeptoren war die Transfektion mittels Lipofectamine 2000 (Invitrogen) erforderlich. Hierzu wurde in 2 Eppendorfgläsern von je 1,5 ml jeweils 25µl OptiMEM Medium gegeben. Für jedes µg des Liganden, der in das eine Gefäß zugegeben wurde, wurde 1µl Lipofectamin in Gefäß 2 zugefügt. Anschließend wurde der Inhalt beider Gefäße zusammengeführt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe der Stimulanzien zum Kulturmedium wurden die Zellen für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Der Überstand wurde zur weiteren Analyse nach der Inkubationszeit in Eppendorfgläsern bei -20°C asserviert. Eine der verwendeten Negativkontrollen umfasst eine Gruppe, deren DNA- Liganden zuvor mit DNase I verdaut wurden. Hierzu wurde RNase- freie DNase (Qiagen) verwendet.

2.2.7. Annealing

Unsere Oligonukleotidsequenzen wurden in Form von ssDNA bei -20°C gelagert. Die komplementären Stränge wurden vor Verwendung in PBS aufgelöst und in einem Thermocycler zu dsDNA verschmolzen. Dies geschieht durch Erhitzen der ssDNAs der beiden komplementären Stränge auf 96°C für 45 Minuten. Das Mischungsverhältnis betrug 1:1, um möglichst wenig überschüssige ssDNA zu erhalten.

2.3. Tierhaltung

Die Isolation von Primärzellen erfolgte aus jeweils 5 Mäusen, die unter sterilen Bedingungen in autoklavierten Filter-Top-Käfigen bei einem 12 stündigen Hell-Dunkel-Rhythmus und freiem Zugang zu Wasser und Futter gehalten wurden. Alle experimentellen Verfahren wurden nach den Vorschriften des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt und sind durch die Regierung von Oberbayern genehmigt worden.

2.4. Immunologische Methoden

2.4.1. Zytokin- ELISA zur IL- 6 Messung:

Zur Konzentrationsbestimmung von Interleukin-6 (Detektionsbereich: 5-300 pg/ml) im Überstand der Zellkulturplatten wurden ELISA-Kits zum Selbstbeschichten verwendet. Die hierzu verwendete Technik ist seit langem etabliert (180). Dabei werden die Wände der Vertiefungen von 96-Well-Platten über Nacht mit Antikörpern gegen das zu messende Zytokin beschichtet. Zur Verhinderung von unspezifischen Bindungen wird die Platte am nächsten Tag mit einem Blockierungsreagenz (fötales Kälberserum in PBS) geblockt, bevor dann nach einem Waschschrift die zu analysierenden Proben und die Standardkurvenreichtproben in die Vertiefungen pipettiert werden. Die Zytokine (IL-6) der Probe und der Standards können dann an die entsprechenden Antikörper binden und verbleiben somit nach weiterem Waschen im Well. Im nächsten Schritt werden die fixierten Zytokine mit einem sekundären, biotinylierten Antikörper, der ebenfalls spezifisch gegen das zu messende Zytokin gerichtet ist, und mit einem Streptavidin-Meerrettichperoxidase Gemisch inkubiert. Der sekundäre Antikörper bindet dabei an das entsprechende Zytokin während das Streptavidin-Meerrettichperoxidase Gemisch über das Avidin an das Biotin des sekundären Antikörpers bindet. Bei einem weiteren Waschschrift werden alle nicht gebundenen Antikörper und Peroxidase Gemische aus den Wells entfernt. Nach Zugabe eines chromogenen Substrates, welches von der Peroxidase zu einem gelben Farbstoff umgesetzt werden kann, wird die Reaktion mittels Schwefelsäure (2M H₂SO₄) gestoppt und die Farbstoffentwicklung am ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm photometrisch gemessen. Dabei ist die gemessene Absorption des Farbstoffes proportional zu der Menge des gebundenen Zytokins. Die Konzentration des entsprechenden Zytokins wird daraufhin durch Vergleich mit der Absorption der Standards ermittelt.

2.4.2. Proliferationsmessung

Die Proliferation von Tubuluszellen wurde mit dem CellTiter 96 Proliferation Assay- Kit (Promega, Mannheim, Deutschland) bestimmt. Hierbei handelt es sich um ein kolorimetrisches Verfahren, das zur Bestimmung der Zahl vitaler Zellen geeignet ist. Die ablaufende Reaktion basiert auf die Reduktion der zugegebenen Tetrazoliumverbindung (MTS) in eine lösliche gelbfarbige Formazanverbindung durch vitale Zellen. Die Reduktion erfolgt hierbei über NADPH und NADH in stoffwechselaktiven Zellen. Das entstandene farbige Endprodukt kann über ein spektrophotometrisches Plattenlesegerät bei 492 nm gemessen werden. Die gemessene Absorption ist der Zahl vitaler Zellen proportional. Pro Well wurden ca. 30.000 Zellen in 100 µl FCS-freiem D-MEM+1%PS, also einem Hungermedium, für 24 Stunden inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Stimulation mit den jeweiligen Liganden für 24 Stunden in dem normalen Zellkulturmedium, welches vor dem

Hungermedium verwendet wurde. Zu jedem Well wurden nach Stimulation 20 µl CellTiter 96 Aqueous One Solution (Promega) hinzugegeben und bei 37 °C für 2-4 Stunden inkubiert. Hiermit wurde das Proliferationsverhalten der jeweiligen mit verschiedenen Liganden stimulierten Gruppen ermittelt. Zur Ermittlung der geeigneten Zellzahl pro Well für die Stimulationsexperimente wurde eine Eichkurve vorbereitet. Hierbei sollte der Bereich ermittelt werden, in dem die Zunahme der Absorption und Zellzahl möglichst linear verläuft.

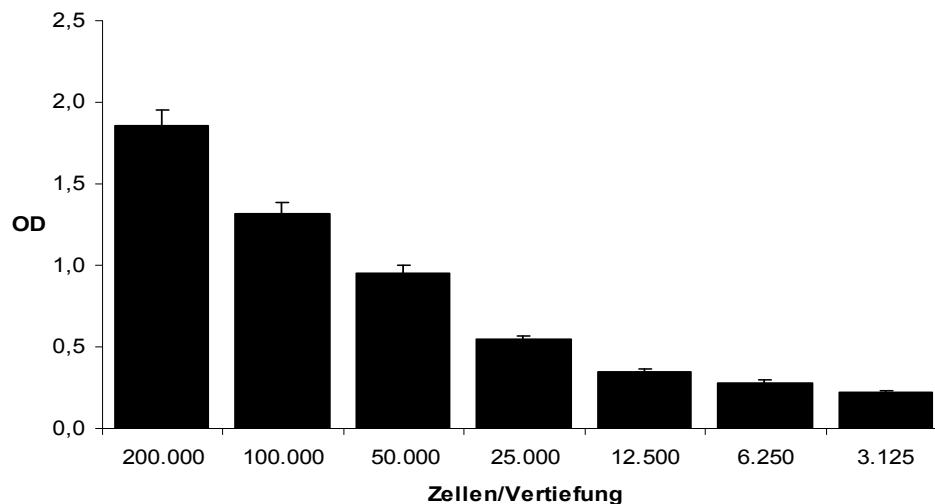


Abbildung 11: Die Absorption in relativen Einheiten (OD=optische Dichte) ist im Verhältnis zur Zellzahl pro Plattenvertiefung aufgetragen. Wir entschieden uns für eine Zellzahl von 30.000 pro Vertiefung (96-well Platte), da ab hier die Zunahme der Zellzahl zur Absorption annähernd linear ansteigt.

2.4.3. Apoptosisanalyse mittels Durchflußzytometrie/ FACS

Bei diesem Verfahren werden die optischen Eigenschaften der zu untersuchenden Zellen ausgenutzt um Rückschlüsse auf Größe, Struktur und Oberflächenproteine ziehen zu können. Dabei wird eine Einzelzellsuspension durch einen Wasserstrahl durch ein Messröhrchen geströmt und die Zellen mit einem elliptisch fokussierten Laser bestrahlt. Die Lichtbeugung des eintreffenden Laserstrahls mit gleicher Wellenlänge (FSC= forward scatter) dient als Maß der Zellgröße. Die Lichtbrechung auf 90° (SSC= sideward scatter) dient der Beschreibung der Zellstruktur (Granulation). Die Zellen können zusätzlich mit farbstoffgekoppelten Antikörpern für spezifische Oberflächenproteine markiert werden. Die Farbstoffe werden durch den Laserstrahl zur Emission von Licht stimuliert, welches von Lichtsensoren- und verstärkern registriert wird. Die Auswertung erfolgte mit der Software CellQuest.

Für die Apoptosebestimmung wurde das Annexin V- FITC Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen) eingesetzt. Annexin V ist ein phospholipidbindendes Protein mit hoher Affinität für Phosphatidylserin (PS). PS kommt normalerweise nur im inneren Layer der Zellmembran

vor, gelangt jedoch bei Apoptose auf die Außenseite. In diesem Fall kann es durch Antikörper gegen PS gebunden werden und durch die Konjugation mit einem Farbstoff, in diesem Fall Fluorescein- Isothiocyanat (FITC), im FACS- Gerät registriert werden. Annexin V ist ein Marker der frühen Apoptose. Um diese von der späten Apoptose oder Nekrose unterscheiden zu können, wird die Annexin V Färbung mit der Propidiumiodid (PI) Färbung kombiniert. Die Zellmembran ist erst in Stadien der späten Apoptose oder Nekrose für Propidiumiodid durchlässig.

Tubulusepithelzellen wurden in 6-well Platten wie oben beschrieben kultiviert und mit verschiedenen Konzentrationen (3, 10 µg/ml) von dsDNA Liganden mit kationischen Lipiden behandelt. Als Negativkontrollen dienten unstimulierte Zellen, Zellen die nur mit Lipofectamine stimuliert wurden und Zellen die zwar mit den Liganden inkubiert wurden, jedoch zuvor mit einem Inhibitor der Caspase 8 (Ac-IETD-CHO (5 µg/ml; Biomol)), einem Signalmolekül der Apoptose- pathways, wie beschrieben vorbehandelt wurden (181). Positivkontrollen wurden mit einer höheren Dosis pIC (synthetische Doppelstrang RNA), die apoptoseinduzierend wirkt, stimuliert. Nach 18 Stunden Stimulation nach oben beschriebenem Schema wurde das Medium entnommen und je nach Gruppe in 15 ml Falcons pipettiert. Zu den Wells wurde PBS gegeben und die noch adhärenen Zellen wurden mittels Zellschaber vorsichtig vom Plattenboden gelöst. Die Zellsuspension wurde den entsprechenden 15 ml Falcons hinzugefügt. Somit wurden apoptotische und nekrotische Zellen erfasst, die sowohl adhären als auch im Stimulationsmedium gelöst waren.

Das gewonnene Zellmaterial wurde in PBS bei 1500 rpm zentrifugiert. Die Zellpellets wurden in 8 ml PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert.

Es folgt ein weiterer Waschschrift mit PBS und einer Verteilung der Proben mit Duplikaten auf 1,5 ml Eppendorfgefäße. Dabei wurden je 200 µl des in PBS resuspendierten Zellmaterials in die Gefäße pipettiert. In den Eppendorfgefäßen wurde erneut 2-mal mit PBS gewaschen und die Zellen mit 1x Annexin V Binding Buffer (BD Pharmingen) auf eine Konzentration von 10^6 Zellen/ml resuspendiert. 100 µl dieser Lösung wurden in die Analyseröhrchen pipettiert und jeweils 5 µl Annexin V – FITC und PI hinzugefügt (beide BD, Pharmingen). Die Zellen wurden vorsichtig gemischt und 15 Minuten lang bei Raumtemperatur im dunklen inkubiert. Zu den 100 µl in den Analyseröhrchen wurden nun 400 µl 1x binding buffer zugegeben. Die analysfertigen Proben wurden mit dem Gerät FACScalibur von BD ausgewertet unter Verwendung der Software CellQuest.

2.5. Molekularbiologische Methoden

2.5.1. RNA- Isolierung für Polymerasekettenreaktion in Echtzeit (rtPCR)

Bei der Polymerase-Kettenreaktion in Echtzeit (realtime polymerase chain reaction, rtPCR) wird der quantitative Gehalt an mRNA für das gewünschte zu analysierende Genprodukt in den stimulierten Zellen bestimmt. Hierzu muss die RNA zunächst aus den Zellen isoliert werden. Aus Primärzellkulturen und Zelllinienzellen, die für Stimulationsexperimente kultiviert wurden, wurde die enthaltene RNA mittels RNeasy Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) entsprechend dem mitgelieferten Protokoll isoliert. Hierzu wurden die Zellen nach erfolgter Stimulation zuerst mit sterilem PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen mit 350 µl RLT- Puffer mit 1% β -Mercaptoethanol behandelt. Dabei handelt es sich um einen stark denaturierenden guanidinthiocyanathaltigen Puffer, der unter anderem die RNAsen im Isolat inaktiviert und die Zellyse erleichtert. Das ebenfalls hinzugegebene β -Mercaptoethanol spaltet Disulfidbrücken innerhalb von Proteinen und trägt somit ebenfalls zu RNase-Denaturierung bei. Die Zellen wurden mittels Zellschaber von der Plattenoberfläche gelöst und mechanisch lysiert. Das gewonnene Material wurde in RNase freien Eppendorf-Gefäßen bei -20°C aufbewahrt, falls nicht sofort weiterbearbeitet. Zu den Proben wurden dann 350 µl 70%-iges Ethanol gegeben. 700 µl der Probe wurden nun auf die Trennsäule mit Silica-Trennmembran gegeben, an der die mRNAs adhären. Beim folgenden Schritt werden die Proben bei 10.000 rpm für 15 Sekunden zentrifugiert.

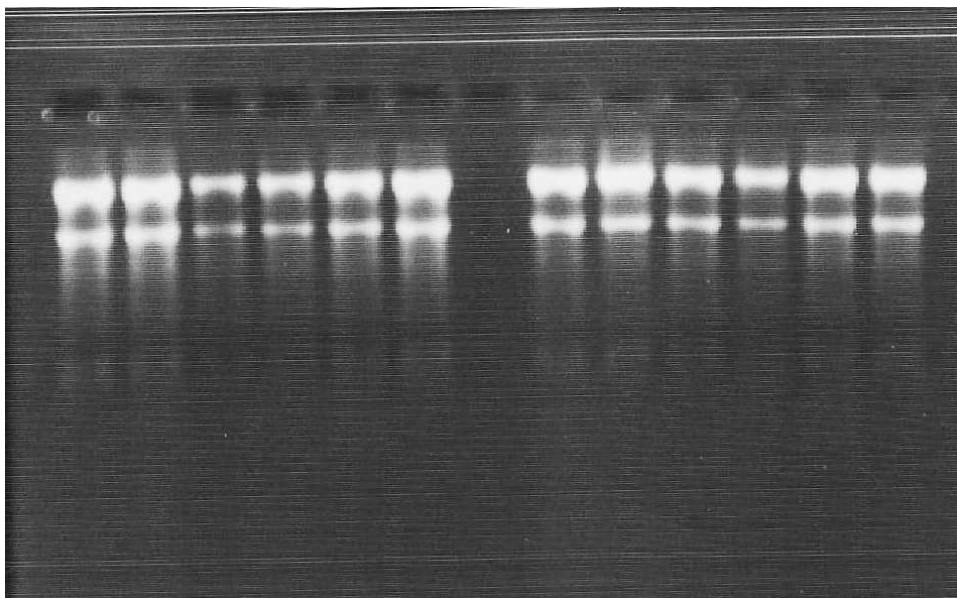


Abbildung 12: Kontrolle der RNA- Integrität durch Gelelektrophorese.

Der Überstand wurde entfernt und eine DNase Verdauung zur Beseitigung von DNA-Kontamination durchgeführt. Dazu wurde das RNase-freie DNase-Set (Qiagen) verwendet. Nach Gabe von RW1-Puffer wurde die membrangebundene RNA mit DNase I inkubiert um eventuelle DNA-Kontamination der Proben zu beseitigen. Die DNase wurde im

anschließenden Waschschrift mit RW1 wieder entfernt. Nach 2 weiteren Waschschriften mit 500µl RPE Puffer wurde das Auffanggefäß ausgewechselt und die in den Trennsäulen enthaltene RNA mit 40µl RNase-freiem Wasser abzentrifugiert und aufgefangen. Die so gewonnene RNA wurde bei -80°C konserviert. Alle mit dem Zelllysate in Kontakt kommenden Materialien wurden zuvor mit DEPC, einem starken RNase-Inhibitor, behandelt.

Abbildung 12 zeigt eine Aufnahme der RNA-Integritätsprüfung mittels Gelelektrophorese. Ein kleiner Teil der gewonnenen RNA- Probe wird auf Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend mit UV-sensitiven Farbstoffen markiert. Bei intakter RNA sind 2 Banden zu erkennen, die der 28S und 18S rRNA entsprechen.

2.5.2. Bestimmung des RNA Gehalts

Die Bestimmung der Menge der durch die oben beschriebenen Methoden isolierten RNA erfolgte über spektrophotometrische Bestimmung. Hierzu wurden 2 µl der gewonnenen RNA-Lösung 50-fach in DEPC-behandeltem Wasser verdünnt. Die optische Dichte der Proben wurde anschließend bei 260 und 280nm gemessen. Die RNA-Konzentration der Proben in µg/ml wurde bestimmt, indem die gemessene Extinktion mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert wurde. Die Reinheit der Proben wurde über das Extinktionsverhältnis von 260nm/280nm ermittelt. Dieses liegt bei gutem Reinheitsgrad über 1,6.

2.5.3. Synthese von cDNA

Die Synthese von komplementärer DNA (complementary DNA, cDNA) aus der gewonnenen RNA ist notwendig, da die Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion nur mit DNA funktioniert. Diese Umschreibung geschieht mithilfe der reversen Transkriptase. Hierzu wurden die isolierten RNA Proben auf eine Konzentration von 0,05 µg/µl DEPC-Wasser verdünnt. Es wurde ein sogenannter Mastermix angefertigt, der die für die PCR notwendigen Bestandteile enthält. Dabei handelt es sich um 9 µl 5X Puffer (Invitrogen), 1 µl von 25mM dNTP- Gemisch (Amersham Pharmacia Biotech), 2 µl von 0,1 M DTT (Invitrogen), 1 µl von 40U/µl RNAsin (Promega), 0,5 µl von 15 µg/ml linearem Acrylamid (Ambion Ltd.), 0,5 µl Hexanukleotide (Roche), und 1 µl Superscript (Invitrogen) bzw. RNase-freies Wasser als Negativkontrolle zum Ausschluss von Amplifikation aufgrund von DNA Kontamination. Zu dem 1 µg RNA in 20 µl DEPC- behandeltem Wasser werden 15 µl Mastermix zugegeben und für eine Stunde bei 42°C in einem Probenschüttler inkubiert. Die gewonnene cDNA wurde bei -20°C bis zur Weiterverarbeitung konserviert.

2.5.4. Quantitative realtime PCR

Zur Bestimmung der mRNA Expression des zu analysierenden Genes erfolgte mit den gewonnenen cDNA Proben eine quantitative realtime PCR. Die Analyse wurde an dem Gerät TaqMan® ABI Prism 7000 bzw. 7700 (Applied Biosystems) durchgeführt. Bei der quantitativen realtime PCR binden die hinzugegebenen Primer und Proben für das zu untersuchende Gen an komplementäre Sequenzen in der synthetisierten cDNA. Die cDNA Moleküle, die die entsprechende Sequenz enthalten, werden nun durch Polymerasekettenreaktion amplifiziert. Die Menge an amplifizierter DNA wird in Echtzeit photometrisch über die in den Proben eingebauten Fluoreszenzfarbstoffe gemessen. Fluoreszenz und DNA-Menge sind zueinander direkt proportional. Der CT- Wert („Cycle Threshold“) wurde für jede Probe errechnet. Dabei handelt es sich um die Zahl an Zyklen die notwendig war um einen vom Untersucher festgelegten Schwellenwert zu überschreiten, der für eine signifikante Probenamplifikation spricht. Die Quantifizierung erfolgt relativ zu der Menge eines ebenfalls amplifizierten Referenzgens. Hierzu werden in der Regel sogenannte „housekeeper“ Gene wie 18S rRNA und GAPDH verwendet. Diese werden gleichmäßig exprimiert und liegen daher in allen Proben in etwa gleicher Menge vor. In der TaqMan Analyse sind die Primer mit einem Fluoreszenzfarbstoff und einem sogenannten „Quencher“ konjugiert, der das Fluoreszenzsignal unterdrückt, solange er nicht abgetrennt wird. Bei Amplifikation des Zielbereiches wird durch die DNA- Polymerase der Quencher abgelöst und somit das Fluoreszenzsignal freigesetzt. Die nach obenstehender Methode gewonnenen cDNA Proben wurden für die rtPCR Analyse 1:10 verdünnt. Der TaqMan® universal PCR MasterMix mit den forward Primern, reverse Primern (Endkonzentration 300nM) und Proben (Endkonzentration 100nM) wurde auf Eis gekühlt. Er enthält PCR- Puffer, dNTPs und AmpliTaqGold® TaqPolymerase mit 5'- 3' Polymerase- und 5'- 3' Exonukleaseaktivität, jedoch ohne 3' - 5' Exonukleaseaktivität. 18 µl MasterMix wurden in die Wells einer 96-well Platte pipettiert und anschließend 2 µl DNA als Matritze hinzugegeben.

Anschließend wurde die Platte mittels Abdeckfilm versiegelt und bei 280g zentrifugiert. Danach wurden die Proben mittels TaqMan® ABI Prism 7000 oder 7700 analysiert. Es wurden dabei folgende Temperatureinstellungen verwendet: der erste Inkubationsschritt wurde über 2 Minuten bei 50°C durchgeführt, gefolgt von 95°C über 10 Minuten um die Polymeraseaktivität auszulösen. Die DNA- Matritzen wurden in 40 Zyklen zu je 15 Sekunden bei 95°C gefolgt von einer Minute Inkubation bei 60°C amplifiziert. Die rtPCR für die Housekeeper (18-S rRNA, GAPDH) wurde unter den selben Bedingungen durchgeführt. Die CT- Werte wurden über die ABI Prism Sequence detection software (Version 1.0) aufgenommen und die Resultate in Bezug auf den jeweiligen Housekeeper ausgewertet. Als Negativkontrollen dienten Gruppen mit ddH₂O, die negativ für die Housekeeper- und Zielgene ausfielen.

2.5.5. Western Blot zum Nachweis von IPS-1

Primäre Tubulusepithelzellen wurden wie oben beschrieben in 12-Well-Platten kultiviert und mit kationischen Lipiden, pur oder mit 3, 10 und 30 µg/ml des Liganden T-Ag inkubiert. Als Positivkontrolle diente das Zelllysate von CHO-Zellen, in denen konstitutiv IPS1 exprimiert wird. Nach 18 Stunden Stimulation wurden die Zellen 2-mal mit PBS gewaschen. Sämtliches übrig gebliebenes Medium und PBS wurden danach mit einer Absaugvorrichtung entfernt. Nun wurden die Zellen mit RIPA-Puffer mit 40 µl/ml Proteaseinhibitor lysiert. Dabei wurden je 20 µl des Puffers pro Well zugegeben und anschließend sterile Zellschaber zur mechanischen Lyse verwendet. Das gewonnene Zelllysate wurde dann in Eppendorfgefäße pipettiert und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurde das Material bei 15 000 U/min 10 Minuten lang zentrifugiert. Der gewonnene Überstand wurde in neuen Eppendorfgefäßen bei -20°C aufbewahrt bis zur weiteren Analyse. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das BioRad Dc Protein assay – Kit verwendet. Die Proben wurden nach Auftauen 30 Minuten lang in 65°C mit 4-fach Laemmli-Puffer (60mM TRIS, pH6,8 ; 10% Glycerin, 2% SDS, 0,005% Bromophenolblau und 30 µl/ml β-Mercaptoethanol) inkubiert. Die Auftrennung der Proben erfolgte in 12% SDS-PAGE mit 30V über 60 Minuten. Nach Auftrennung der Proteinbanden auf dem Elektrophoresegel fand eine Übertragung auf eine Methanol-aktivierte PVDF-Membran mit dem BioRad semi-dry blotting System statt.

Zum Nachweis einer erfolgreichen Proteinübertragung und der Bestimmung der Lage des Markers (peqGOLD protein marker, PeqLab) wurde die Membran anschließend mit Ponceaulösung (0,5% Ponceau-Lösung in 1% Essigsäure) für 10 Minuten gefärbt. Die Entfärbung erfolgte mit Wasser. Danach wurde die Membran mit 5% Magermilch in TBS-Puffer 1 Stunde lang geblockt. Die Blockierlösung wurde danach wieder entfernt und die Membran zunächst 5 Minuten lang mit TBS-T (150mM NaCl, 10mM TRIS, 1mM NaN₃, 0,05% Tween-20, pH 8,0) gewaschen. Danach wurde nochmals 5 Minuten gewaschen, jedoch mit TBS. Die Membran wurde danach über Nacht mit dem Erstantikörper (Cardif, Alexis Biochemicals) mit einer Verdünnung von 1:2 000 in TBS bei 4°C inkubiert und dabei vorsichtig geschüttelt. Am nächsten Tag wurde die Membran 3-mal mit TBST jeweils 10 Minuten lang gewaschen, danach nochmals 10 Minuten in TBS. Nun wurde der Zweitantikörper (donkey anti-rabbit HRP, GE Healthcare) mit einer Verdünnung von 1:10 000 in 3% Magermilch 1 Stunde auf der Membran inkubiert. Die Lösung wurde danach von der Membran abgekippt und die Membran erneut 3-malig mit TBST jeweils 10 Minuten lang gewaschen. Es folgten 2 Waschschriffe mit TBS zu je 5 Minuten. Nach dem 2. Waschschriff wurde die Membran lichtgeschützt in einen Dunkelraum zur Analyse gebracht. Dabei wurde eine luminiszente Substratlösung (enhanced chemiluminescence, ECL; Amersham Pharmacia Biotech Europe) zur Membran gegeben und durch den HRP-konjugierten Antikörper aktiviert.

2.6. Konfokale Mikroskopie

Zellen der Tubuluszelllinie wurden wie oben beschrieben in 12- well Platten kultiviert und mit dem dsDNA Liganden large T-Ag mit einer Konzentration von 10 µg/ml für 18 Stunden inkubiert, die entweder mit oder ohne kationische Lipide wie vorbeschrieben vorbehandelt wurden. Der Ligand selbst wurde mit dem Farbstoff Rhodamine- Maleimide markiert um seine Verteilung innerhalb der Zellkompartimente veranschaulichen zu können.

Der Überstand wurde aus den einzelnen Wells abgesaugt und die Zellen mit EDTA durch sanftes auf- und abpipettieren von der Platte gelöst. Die gewonnenen Zellsuspensionen wurden entsprechend ihrer Gruppenzugehörigkeit in 15 ml Falcons pipettiert. Anschließend wurden die Zellen bei 1200 U/min für 3 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend verworfen und das Zellpalett mit PBS auf etwa 5×10^5 Zellen/ml resuspendiert. Dabei wurde die Zellzahl mit der Trypanblaufärbung wie oben beschrieben bestimmt. 200 µl dieser Zellsuspension wurden auf sterile Deckgläschen gegeben und 30 Minuten lang inkubiert. Danach wurden die Objektträger 2-mal mit PBS gewaschen. Nachdem das PBS erneut entfernt wurde, wurden die Zellen sofort mit jeweils 200 µl Pikrinsäure und Formaldehyd (10 ml dieses Gemisches enthalten: 0,2 g Paraformaldehyd, 3,5 ml H₂O, 4-6 Tropfen 2M NaOH, 5 ml 20mM PIPES- Puffer mit pH 6,0, 1,5 ml Pikrinsäurelösung, 0,2 g Sucrose) für 30 Minuten fixiert. Die Fixationslösung wurde anschließend wieder entfernt und die Objektträger zunächst mit 10mM PIPES- Puffer gewaschen. Danach erfolgten 2 Waschschrte mit in PBS gelöstem 100 mM Glycin. Als nächstes wurden die Objektträger erneut in 2 Waschschrten jeweils 15 Minuten mit PBG (PBS mit 0,5% BSA und 0,045% steriler Fischgelatine) gewaschen.

Nun wurde der Primärantikörper entsprechend der Herstellerempfehlungen hinzugegeben (anti- Rab5, Sigma) und 3 Stunden zum einwirken auf den Objektträgern gelassen. Nach 6 maligem waschen mit PBG wurde der Zweitantikörper (FITC-konjugierter anti-Hasen IgG Antikörper, Sigma) hinzugegeben und für 1 Stunde im dunklen inkubiert. Es folgten 2 Waschschrte zu je 5 Minuten mit PBG und 3 weitere zu je 5 Minuten mit PBS. Anschließend wurde noch ein letztes Mal mit destilliertem Wasser gewaschen und die Proben in Gelvatol eingebettet. Zum trocknen wurden die Proben bei 4°C im dunklen aufbewahrt. Die Proben wurden schließlich mit dem Mikroskop Model Axiovert 200 M von Carl Zeiss mikroskopiert. Dabei wurde die Software LSM 5.10 für die Bildaufnahme und die selektive Darstellung der verschiedenen Farbkanäle verwendet.

2.7. Statistische Analyse

Die angegebenen Daten sind als Mittelwert mit Standardabweichung (SD) angegeben. Die jeweiligen Daten sind aus mehreren unabhängigen Experimenten gemittelt.

Die Signifikanzberechnung erfolgte mittels zweiseitigem Student's t-Test für unpaarige Stichproben. Das Signifikanzniveau wurde für $p < 0,05$ bzw. $p < 0,01$ festgelegt und mit „*“ bzw. „**“ gekennzeichnet. Die Berechnungen und graphischen Darstellungen wurden mittels GraphPad Prism 5.0 und Microsoft Excel durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1. Induktion proinflammatorischer Zytokine

3.1.1. Zytokinproduktion in Wildtyp Tubulusepithelzellen

Unsere Hypothese ist, dass von BK- Viren befallene Tubulusepithelzellen in der Lage sind Virusbestandteile, insbesondere Fragmente des dsDNA- Genoms, zu erkennen. Um eine solche Pathogenerkennung nachzuweisen, haben wir die Überstände von stimulierten Tubulusepithelzellen auf ihren Gehalt an proinflammatorischen Zytokinen untersucht. Hierbei entschieden wir uns für Interleukin- 6, dem eine besondere Bedeutung bei der Verbindung von angeborener und erworbener Immunantwort zukommt (182). Es ist bekannt, dass Tubuluszellen bei adäquater Stimulation in der Lage sind proinflammatorische Mediatoren zu produzieren (183). Sollten Tubuluszellen über zytosolische dsDNA Rezeptoren verfügen, wäre ein signifikanter Anstieg des Interleukin-6 nach Stimulation mit unseren Liganden zu erwarten. Wir verwendeten 2 Oligonukleotide mit Sequenzen einer Länge von 40bp aus den Genbereichen von large T- Antigen (T- Ag) und VP1 des BK- Virus Genoms (s. Methoden). Da wir eine zytosolische Ligandenerkennung nachweisen wollen, haben wir die Liganden für eine effektivere Transfektion ins zytosolische Kompartiment mit kationischen Lipiden (Lipofectamine 2000, Invitrogen) vorbehandelt und mit unbehandelten Liganden verglichen. Die Kontrolle der erfolgreichen Transfektion erfolgte mittels konfokaler Mikroskopie (s. Abschnitt 3.9.). In den Abbildungen 13 und 14 sind die Ergebnisse der IL-6 Bestimmungen nach Stimulation zusammengefasst.

Wir wollten ebenfalls eine Dosisabhängigkeit der Zytokinantwort untersuchen und ermitteln unter welchen Bedingungen ein Maximum erreicht wird. Wir verwendeten folgende Negativkontrollen: komplett unstimulierte, im Nährmedium belassene TECs, oder nur mit dem Transfektionsvektor ohne dsDNA Liganden behandelte TECs. Damit wollten wir sicherstellen, dass sich erstens die Zytokinantwort auf eine Stimulation vom Basisexpressionslevel unterscheidet und zweitens der Transfektionsvektor nicht selbst eine signifikante Antwort auslösen kann. Eine weitere Kontrollgruppe, in der die Oligonukleotidliganden zuvor mit DNase I angedaut und ebenfalls mit kationischen Lipiden in die Zelle transfiziert wurden, diente ebenfalls zur Sicherung des kausalen Zusammenhangs, zwischen transfizierten Oligonukleotiden und erhöhter Zytokinexpression. Hiermit wollten wir nachweisen, dass verdaute DNA nicht mehr in der Lage ist IL-6 zu induzieren. Somit müssen die dsDNA Liganden in ihrem Ausgangszustand für eine Zytokininduktion verantwortlich sein. Tubulusepithelzellen exprimieren keinen TLR9 (184) und sollten somit keine messbare Antwort auf endosomale dsDNA initiieren. Wir überprüften diese Tatsache, indem wir TECs mit CpG-Oligonukleotiden stimulierten, die über TLR9 eine Zytokinproduktion induzieren. Hiermit sollte ausgeschlossen werden, dass eine Stimulation über endosomal aufgenommene dsDNA stattfindet.

In unseren Experimenten bestätigte sich, dass Stimulation mit CpG- Oligonukleotiden zu keiner signifikanten IL-6 Produktion führt (s. Abbildung 13). TLR3 wird hingegen in Tubulusepithelzellen exprimiert und wurde von uns als Positivkontrollgruppe verwendet. Durch Stimulation mit pIC (poly Inosin- Cytosin dsRNA), dem Liganden von TLR3, wollten wir sicherstellen, dass TECs generell in der Lage sind eine signifikante Zytokinantwort auf proinflammatorische Reize einzuleiten. Interleukin-6 kann auf verschiedene Arten durch pIC induziert werden. Zum einen durch die Erkennung von pIC auf endosomal gelegenen TLR3 (wenn ohne Lipofectamine behandelt) oder über zytosolische Rezeptoren, wie MDA5 (mit Lipofectamine vorbehandelt). Wenn nicht anders erwähnt, wurde pIC in der Regel mit Lipofectamine behandelt, da dies zu einer stärkeren IL-6 Produktion in unseren Experimenten geführt hat und somit günstigere Eigenschaften für eine Positivkontrolle hat.

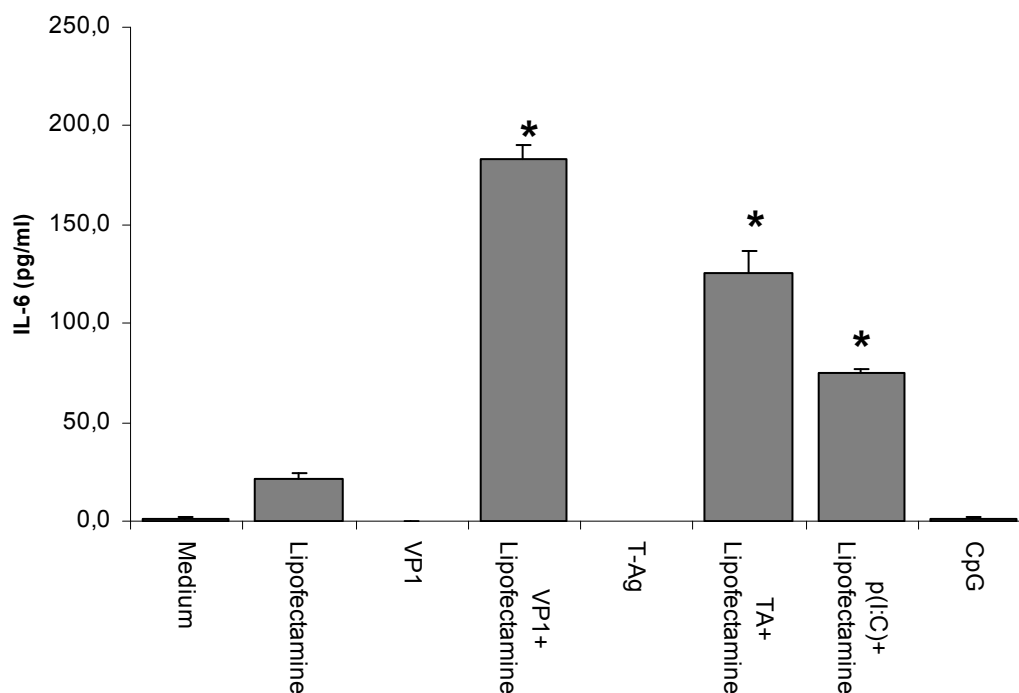


Abbildung 13: IL-6 Produktion nach Stimulation von Wildtyp- Tubulusepithelzellen der Zelllinie MCT (s. Methoden) mit Oligonukleotidliganden. Die Tubulusepithelzellen der verschiedenen Gruppen wurden für 24 Stunden mit den entsprechenden Liganden (VP1 10 µg/ml, T-Ag 10 µg/ml, p(I:C) 1 µg/ml, CpG 3 µg/ml) stimuliert. IL-6 wurde mittels ELISA aus dem Zellüberstand bestimmt. Das Diagramm stellt die Ergebnisse mehrerer unabhängiger Experimente als Mittelwert mit Standardabweichung dar. * $p < 0,05$ versus Lipofectamine.

Die Tubulusepithelzellen der MCT- Zelllinie zeigten eine signifikant erhöhte Produktion von Interleukin-6 in den Gruppen, die mit dsDNA Oligonukleotiden und kationischen Lipiden stimuliert wurden. Dabei zeigte sich die stärkste Antwort bei 10 µg/ml dsDNA bei beiden dsDNA Liganden.

Bei darüber hinaus steigenden Ligandenkonzentrationen war die Zytokinantwort wieder rückläufig. In den Gruppen in denen dsDNA ohne Lipofectamine zur Stimulation verwendet wurde, kam es zu keiner signifikanten IL-6 Produktion.

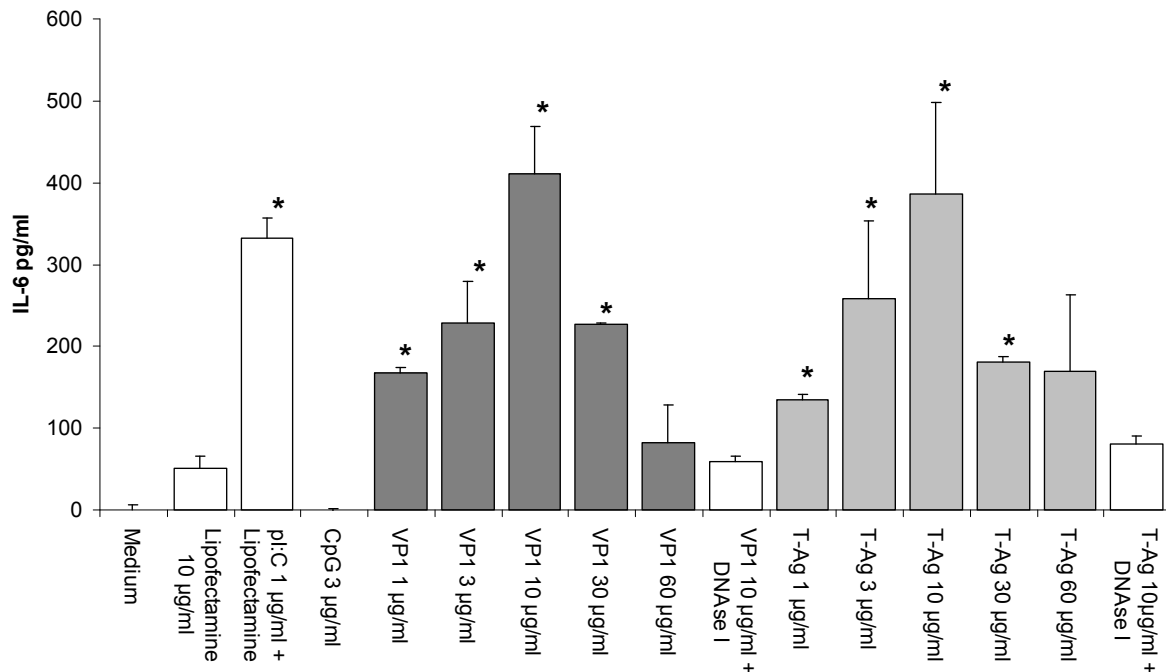


Abbildung 14: Tubulusepithelzellen aus der MCT-Zelllinie wurden mit verschiedenen Konzentrationen (1, 3, 10, 30 und 60 µg/ml) der Liganden VP1(dunkelgrau) und T-Ag(hellgrau) über 24 Stunden stimuliert. Die Bestimmung der IL-6 Konzentration in den Überständen erfolgte mittels ELISA. Die Kontrollgruppen sind in weiß dargestellt. * $p < 0,05$ versus Lipofectamine

In den Negativkontrollgruppen blieb eine relevante Antwort aus. Somit kann weitgehend ausgeschlossen werden, dass der Transfektionsvektor oder Spaltprodukte der Oligonukleotide eine ähnlich starke Expressionsantwort bewirken können, wie die verwendeten Oligonukleotidliganden. Zusätzlich besteht keine Aktivierung über Rezeptoren für endosomale DNA. Die Positivkontrolle mit pI:C führte zu einer deutlichen Induktion von IL-6, sodass bestätigt wurde, dass die verwendeten Zellen in der Lage sind adäquat Zytokine zu produzieren. Zusammenfassend kann geschlussfolgert werden, dass die dsDNA Liganden eine IL-6 Zytokinantwort auslösen, wenn sie mit kationischen Lipiden in die Zellen transfiziert werden. Diese Antwort ist dosisabhängig und wird durch dsDNA Liganden ausgelöst. Die Antwort erfolgt auch in Abwesenheit von TLR9 und wird nicht durch das Transfektionsagens bedingt. Sie erreicht ein Maximum bei 10 µg/ml und sinkt bei höheren Konzentrationen wieder ab. Somit ist also dsDNA in der Lage eine proinflammatorische Zytokinantwort in Tubulusepithelzellen zu induzieren.

3.1.2. Zytokinantwort in MyD88^{-/-} und TRIF^{-/-} Tubulusepithelzellen

Um zu überprüfen, dass die Interleukin-6 Induktion tatsächlich nicht durch die Aktivierung von Toll-like Rezeptoren induziert wurde, haben wir das Experiment unter den gleichen Bedingungen in primären murinen TECs durchgeführt, bei denen die Genkopien für die Adaptormoleküle des TLR- Systems, MyD88 oder TRIF, nicht vorhanden sind. Hierzu wurden die Tubulusepithelzellen aus den Nieren von Mäusen mit den Genotypen TRIF^{-/-} bzw. MyD88^{-/-} isoliert (s. Methoden), in denen die entsprechenden Rezeptoren nicht exprimiert werden. Durch den Nachweis einer signifikant erhöhten IL-6 Ausschüttung in Abwesenheit der Adaptormoleküle wollten wir beweisen, dass ein TLR- unabhängiger Mechanismus vorhanden sein muss.

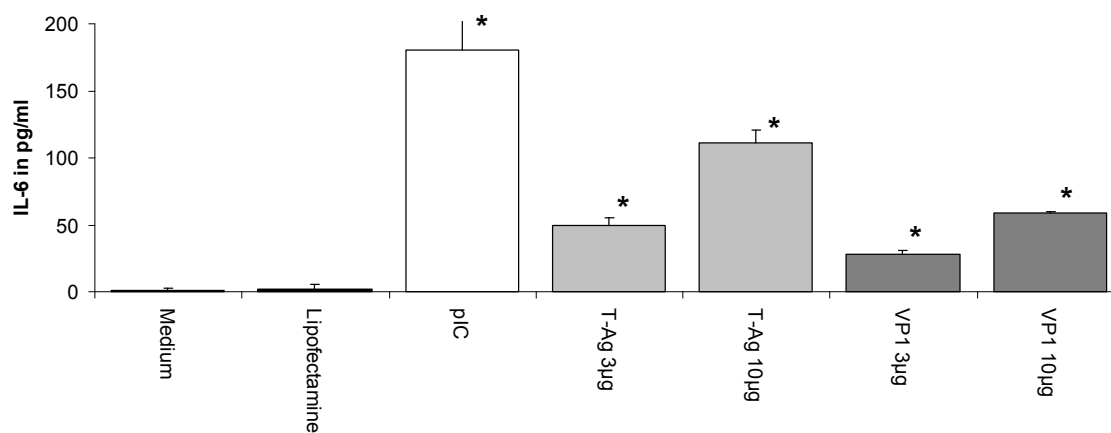


Abbildung 15a: Primäre Tubulusepithelzellen wurden aus Mäusen des Genotyps TRIF^{-/-} isoliert und mit Lipofectamine 5 mg/ml, pIC 1 µg/ml, T-Ag (3, 10 µg/ml) und VP1 (3, 10 µg/ml) über 24 Stunden stimuliert. Die Interleukin-6 Konzentration in den Überständen wurde mittels Zytokin ELISA bestimmt. * p<0,05 versus Lipofectamine

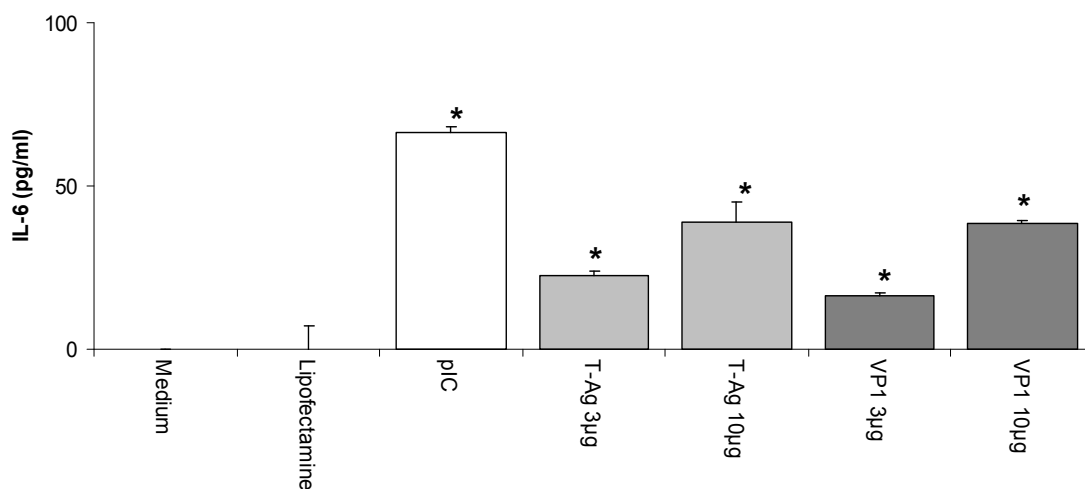


Abbildung 15b: Primäre Tubulusepithelzellen wurden aus Mäusen des Genotyps MyD88^{-/-} isoliert. Die Stimulation fand analog zu dem in Abb. 15a dargestellten Experiment statt. * p<0,05 versus Lipofectamine

In den Abbildungen 15a und b ist zu erkennen, dass mit kationischen Lipiden vorbehandelte dsDNA Oligonukleotide, wie bereits vorher an der Zelllinie, eine im Vergleich zu den Kontrollgruppen signifikante Induktion von Interleukin 6 bewirken. Erneut zeigte sich eine Dosisabhängigkeit mit Maximum in der Gruppe, die mit 10 µg/ml der dsDNA Liganden stimuliert wurde. Insgesamt war die durchschnittliche Menge an sezerniertem IL-6 in den Zellen vom Genotyp MyD88 -/- signifikant niedriger als in der Gruppe TRIF -/-. Somit scheint ein Teil der Produktion von IL-6 in Wildtypzellen auf MyD88 abhängige Prozesse zurückzuführen zu sein. Die Tatsache, dass Tubulusepithelzellen nach Stimulation mit dsDNA Oligonukleotiden in der Lage sind Zytokine zu produzieren, obwohl sie nicht über die entscheidenden Signalproteine des Toll-like Rezeptorsystems verfügen lässt vermuten, dass alternative Mechanismen der dsDNA Erkennung vorliegen. Somit bestätigten sich die zuvor in der Zelllinie ermittelten Ergebnisse und eine relevante Toll-like Rezeptorbeteiligung konnte ausgeschlossen werden. Die Zytokinproduktion wird spezifisch durch zytosolisch vorliegende Liganden, die aus dsDNA bestehen und eine bestimmte Länge haben, ausgelöst. Mit DNase verdaute Oligonukleotide waren nicht mehr in der Lage die Zytokinproduktion einzuleiten, sodass kleinere dsDNA Fragmente, ssDNA und einzelne Nukleotide keine vergleichbare Wirkung auf die Zytokinexpression zu haben scheinen. Diese Spezifität der auslösenden Oligonukleotide, lässt ein Rezeptorsystem vermuten, dass in der Lage sein sollte eine entsprechende spezifische Antwort gegen das wahrscheinliche Pathogen, in diesem Fall dsDNA Viren, zu initiieren. Die wahrscheinlich zuständigen Rezeptoren wurden mehrere Monate nach Fertigstellung der Experimente entdeckt und veröffentlicht, sodass wir diese leider nicht im Rahmen dieser Arbeit untersuchen konnten (s. Diskussion).

Zur Weiterentwicklung der antiviralen Immunantwort ist die Rekrutierung spezialisierter Immunzellen an den Ort des Stimulus, sowie nach Möglichkeit die Produktion virushemmender Substanzen nötig. Diese Überlegungen brachten uns als nächstes dazu zu untersuchen, ob Tubulusepithelzellen unter den beschriebenen Stimulationsbedingungen ebenfalls chemotaktische Proteine zur Anlockung von Immunzellen in das betroffene Zielgewebe sezernieren können. Ebenfalls wollten wir nachweisen, inwiefern Hemmstoffe der Virusreplikation, insbesondere Interferone, von den Tubulusepithelzellen produziert werden. Die zusätzlich geplanten Experimente an Tubulusepithelzellen, die aus Mäusen mit dem Genotyp MyD88 und TRIF Doppel-knockout isoliert wurden, konnten aufgrund der aufwändigen Zuchtbedingungen nicht innerhalb des angedachten Zeitrahmens erfolgen.

3.2. Produktion chemotaktischer Proteine

Zur weiteren Charakterisierung der Immunantwort, die durch unsere dsDNA Liganden ausgelöst wird, überprüften wir, ob Tubulusepithelzellen vom Wildtyp nach entsprechender Stimulation Proteine produzieren, die immunkompetente Zellen zur effektiveren Viruselimination in das infizierte Gewebe locken. Hierbei entschieden wir uns die Produktion von MCP1, einem Chemokin der Gruppe mit C-C Motiv, und IP10 als Vertreter der Chemokinfamilie mit CXC Motiv als 2 der wichtigsten allgemeinen chemotaktischen Proteine zu untersuchen. Eine signifikante Erhöhung der MCP1 und IP10 Sekretion legt nahe, dass die dsDNA Liganden Tubulusepithelzellen zur Anlockung extrarenaler immunologischer Effektorzellen stimulieren und somit zu einer über die Niere hinausgehenden Immunantwort führen können.

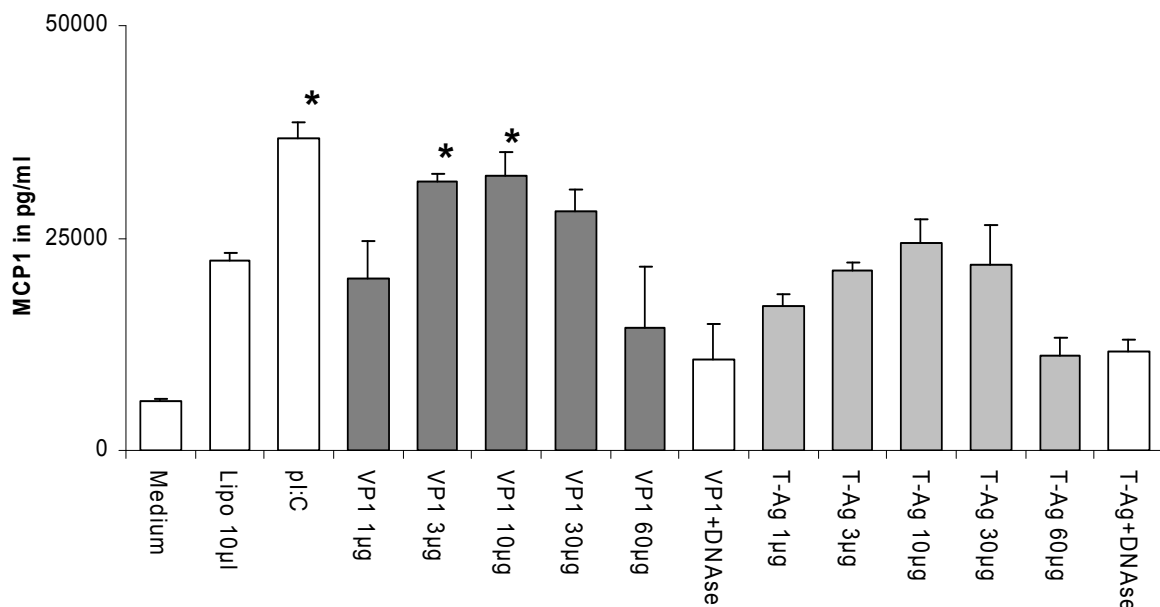


Abbildung 16: Tubulusepithelzellen vom Wildtyp wurden mit VP1 (1, 3, 10, 30, 60 µg/ml), T-Ag (1, 3, 10, 30, 60 µg/ml), p(I:C) (1 µg/ml) und Lipofectamine über 24 Stunden stimuliert. In 2 Gruppen wurden DNase verdaute Liganden VP1 (10 µg/ml) bzw. T-Ag (10 µg/ml) zur Kontrolle verwendet. Die Zellüberstände wurden mittels MCP1 ELISA analysiert. * $p < 0,05$ versus Lipofectamine

Zur MCP1 Bestimmung wurden die Überstände der stimulierten Tubulusepithelzellen mittels ELISA analysiert. Die Stimulation erfolgte analog zu den Vorexperimenten zur Zytokinbestimmung. Tatsächlich kommt es zu einer potenten MCP 1 Antwort im Vergleich zu unstimulierten Zellen, jedoch geht ein Teil der MCP1 Produktion auch auf die kationischen Lipide zurück. Diese induzieren ebenfalls eine signifikante MCP1 Expression. Da die DNase behandelten Liganden ebenfalls mit Lipofectamine behandelt wurden, könnte die erhöhte MCP 1 Antwort darauf zurückzuführen sein.

Die Induktion von MCP1 war ähnlich wie bei Interleukin-6 von der zur Stimulation verwendeten Ligandenkonzentration abhängig und zeigte ein Maximum bei 10 µg/ml dsDNA. Eine signifikante Steigerung der MCP1 Expression im Vergleich zur mit Lipofectamine behandelten Gruppe ließ sich nur in den Gruppen nachweisen, die mit VP1 (3 oder 10 µg/ml) oder p(I:C) behandelt wurden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 16 zusammengefaßt.

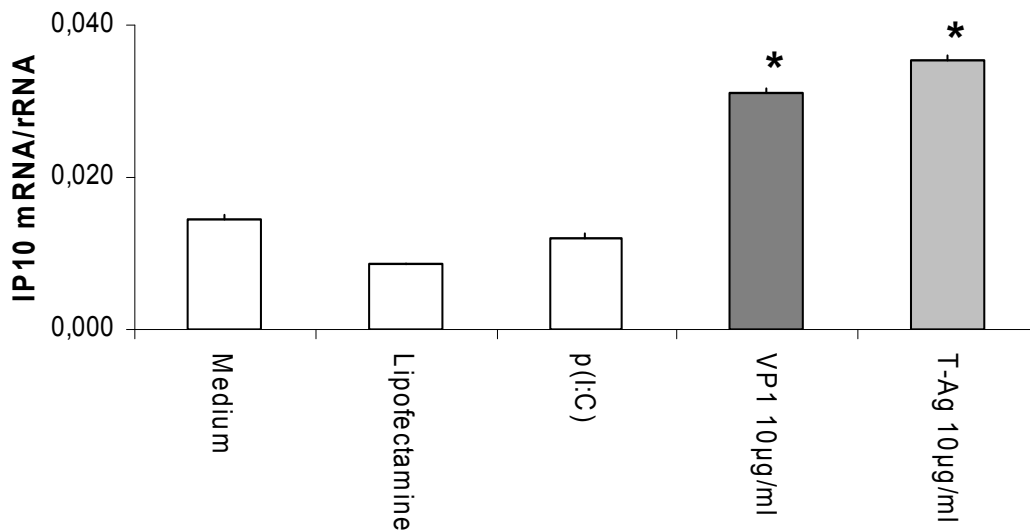


Abbildung 17a: Tubulusepithelzellen wurden mit VP1 10 µg/ml oder T-Ag 10 µg/ml über 24 Stunden stimuliert. Die Positivkontrollgruppe wurde mit p(I:C) 1 µg/ml, die Negativkontrollgruppen mit 10 µg/ml Lipofectamine behandelt oder unverändert in Medium belassen. Die Zellen wurden lysiert und das Lysat auf den Gehalt an IP10 mRNA mittels TaqMan realtime PCR untersucht. * $p < 0,05$ versus Medium.

Die Produktion von IP10 untersuchten wir sowohl auf mRNA als auch Proteinebene. IP10, auch CXCL10, wird auf mRNA Ebene von VP1- und T-Ag- dsDNA im Vergleich zu den Kontrollgruppen signifikant induziert, während pI:C kaum einen Effekt hatte. Die Ergebnisse sind in Abbildung 17a veranschaulicht. Auf Proteinebene zeigte sich im IP10 ELISA eine gesteigerte Antwort auf die Liganden im Vergleich zu den Kontrollgruppen, jedoch war diese mit steigender Konzentration sinkend. Die IP10 Expression ist für T-Ag in den Konzentrationen 3 und 10µg/ml signifikant gesteigert im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Als Positivkontrolle verwendeten wir TECs, die mit Interferon-β stimuliert wurden. Es ist bekannt, dass Interferon-β ein potenter Induktor von IP10 ist. Das ebenfalls zur Positivkontrolle verwendete pI:C zeigte auf Proteinebene eine ausgeprägte Steigerung der IP10 Expression. Die Ergebnisse sind in Abbildung 17b dargestellt. Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass sowohl MCP-1 als wichtiger Vertreter der C-C Chemokine, als auch IP10 als Vertreter der CXC- Chemokine durch die Oligonukleotidliganden VP1 und T-Ag auf mRNA- und Proteinebene signifikant induziert werden können.

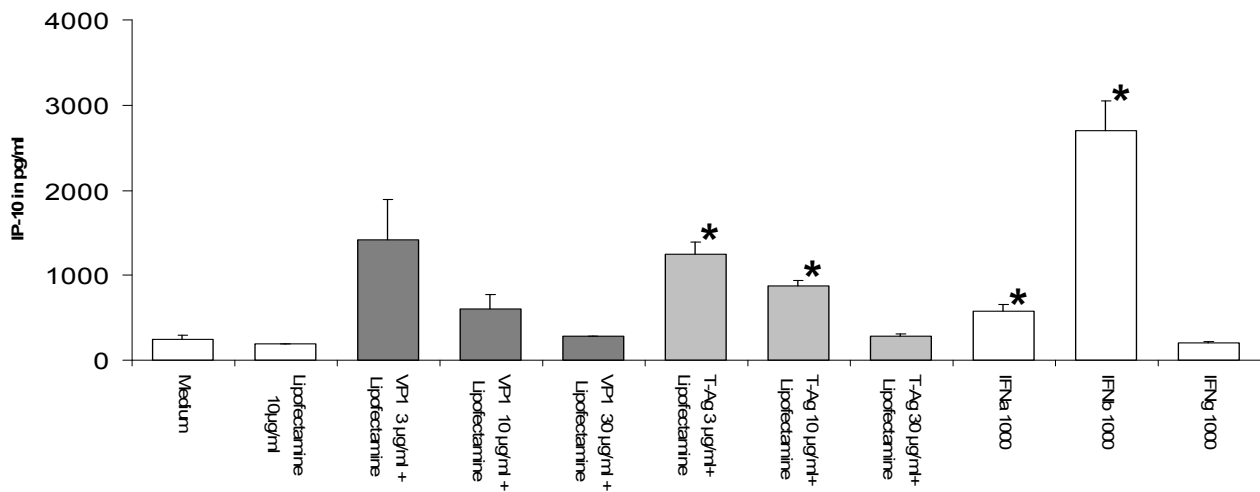


Abbildung 17b: Tubulusepithelzellen wurden mit VP1 bzw. T-Ag mit Konzentrationen von 3, 10 und 30 µg/ml oder 1.000 U/ml Interferon alpha, beta oder gamma über 24 Stunden stimuliert. Die Überstände wurden mittels IP-10 ELISA analysiert. Die Kontrollgruppen wurden entweder nur mit Lipofectamine vorbehandelt oder unverändert im Nährmedium belassen.

* $p < 0,05$ versus Medium

3.3. Zeitlicher Verlauf der Zytokinantwort

Als nächstes gingen wir der Fragestellung nach, in welchem Zeitraum nach erfolgter Stimulation die beschriebene Induktion von Interleukin-6 ihr Maximum erreicht. Dazu wurden erneut Tubulusepithelzellen mit VP1, T-Ag und p(I:C) über 6, 12 oder 24 Stunden stimuliert. Danach wurde die mRNA aus den Zellen extrahiert und auf den Gehalt an IL-6 mRNA mittels TaqMan realtime PCR untersucht. Wir verwendeten die mRNA von IL-6 zur Analyse, da IL-6 auf Proteinniveau eine signifikante Induktion durch die von uns verwendeten Oligonukleotide gezeigt hat. Es zeigte sich, dass die Reaktion innerhalb der ersten 6 Stunden einsetzt, ihr Maximum erreicht und innerhalb von 24 Stunden wieder abgeklungen ist. Nach 6 Stunden Stimulation ist es schon zu einer starken Transkription von IL-6 mRNA gekommen. Bereits 6 Stunden später ist das mRNA Niveau deutlich reduziert, was jedoch keine Rückschlüsse auf die Proteinproduktion erlaubt. Die Ursache könnte darin liegen, dass bis zu diesem Zeitpunkt spezialisierte Immunzellen bereits aktiviert sind und diese die Produktion der antiviralen Proteine in größeren Mengen übernehmen.

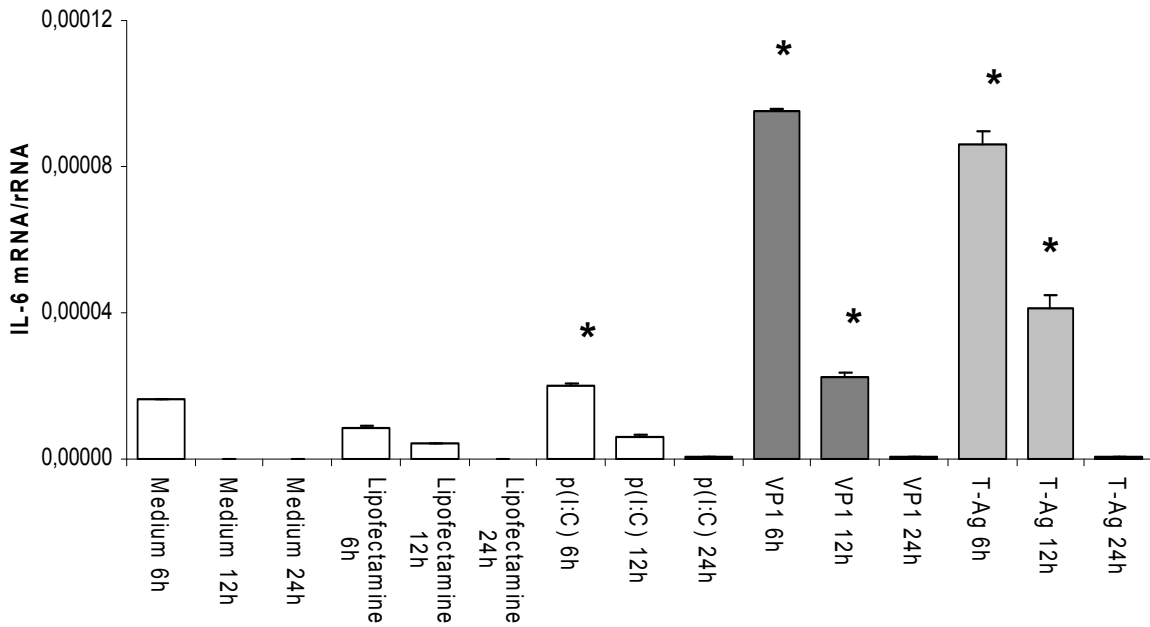


Abbildung 18: Murine Tubulusepithelzellen wurden für 6, 12 oder 24 Stunden mit 10 µg/ml Lipofectamine, VP1, T-Ag oder 1 µg/ml p(i:C) stimuliert. Die Zellen wurden anschließend lysiert und das Lysat auf den Gehalt an IL-6 mRNA mittels TaqMan realtime PCR analysiert.

* $p < 0,05$ versus Medium für 6h, * $p < 0,05$ versus Lipofectamine für 12h und 24h.

3. 4. Produktion antiviraler Proteine

Da es sich bei der von uns untersuchten Immunantwort um einen Mechanismus der angeborenen Immunantwort handelt, die auch von einzelligen Organismen genutzt werden, ist zu erwarten, dass auch Tubulusepithelzellen selbst in gewissem Maß antivirale Proteine exprimieren könnten.

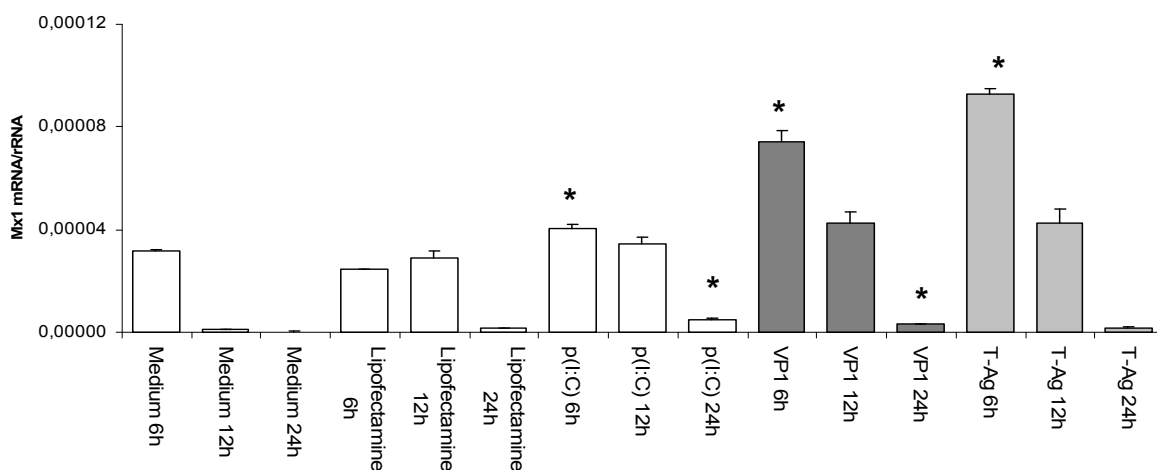


Abbildung 19: Murine Tubulusepithelzellen wurden über 6, 12 oder 24 Stunden mit 10 µg/ml VP1 oder T-Ag inkubiert. Als Negativkontrolle dienten Gruppen die nur mit dem Transfektionsvektor Lipofectamine inkubiert wurden (5 µg/ml). Zusätzlich wurde p(i:C) (1 µg/ml) als Positivkontrolle verwendet. Die Zellen wurden anschließend lysiert und das Lysat auf den Gehalt an Mx-1 mRNA mittels TaqMan realtime PCR analysiert. * $p < 0,05$ versus Lipofectamine (6,12,24h) .

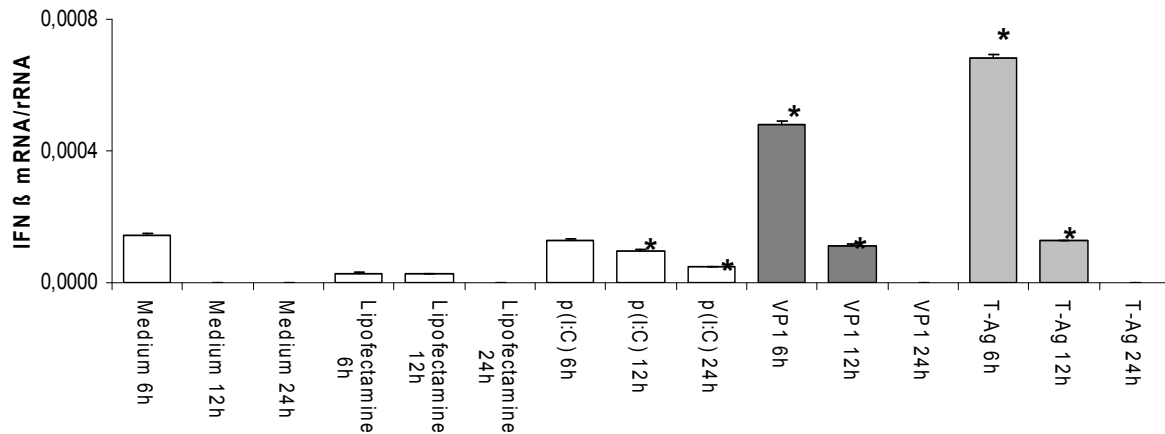


Abbildung 20: Murine Tubulusepithelzellen wurden analog der in Abbildung 19 angegebenen Bedingungen inkubiert. Die Abbildung zeigt die Ergebnisse der IFN β Bestimmung mittels TaqMan realtime PCR. * $p < 0,05$ versus Lipofectamine.

Dabei sind die Interferone aufgrund ihrer Bedeutung in der antiviralen Immunantwort ein interessantes Ziel für weitere Untersuchungen. Wir untersuchten die Produktion von Mx1, einem antiviralen Protein, das von Typ I Interferonen induziert wird, sowie von Interferon- β mittels rtPCR auf mRNA Ebene. Zusätzlich bestimmten wir Interferon-gamma mittels ELISA auf Proteinebene um nachzuweisen, dass keine Lymphozytenreaktion vorliegt. Bei negativem IFN-gamma ist nicht von einer lymphozytenbedingten Interferonproduktion auszugehen. In den Diagrammen 19 und 20 ist zu erkennen, dass sowohl Mx1, als auch Interferon- β durch Ligandenstimulation mit 10 $\mu\text{g/ml}$ stark induziert werden. Interferon-gamma hingegen wurde unter unseren Versuchsbedingungen nicht produziert (Abbildung 21).

Insgesamt konnte somit gezeigt werden, dass Tubuluszellen in der Lage sind, eigenständig antiviral wirksame Proteine zu produzieren und somit lokal der Erregerausbreitung entgegenzuwirken. Es konnte sowohl direkt Interferon- β nachgewiesen werden, als auch interferoninduzierte Proteine wie Mx1. Die zytosolisch vorliegenden DNA- Fragmente lösen eine Signalkaskade aus, die zu einer Produktion von antiviralen Effektorproteinen durch Tubulusepithelzellen führt. Interferon-gamma als lymphozytäres Interferon ließ sich nicht nachweisen.

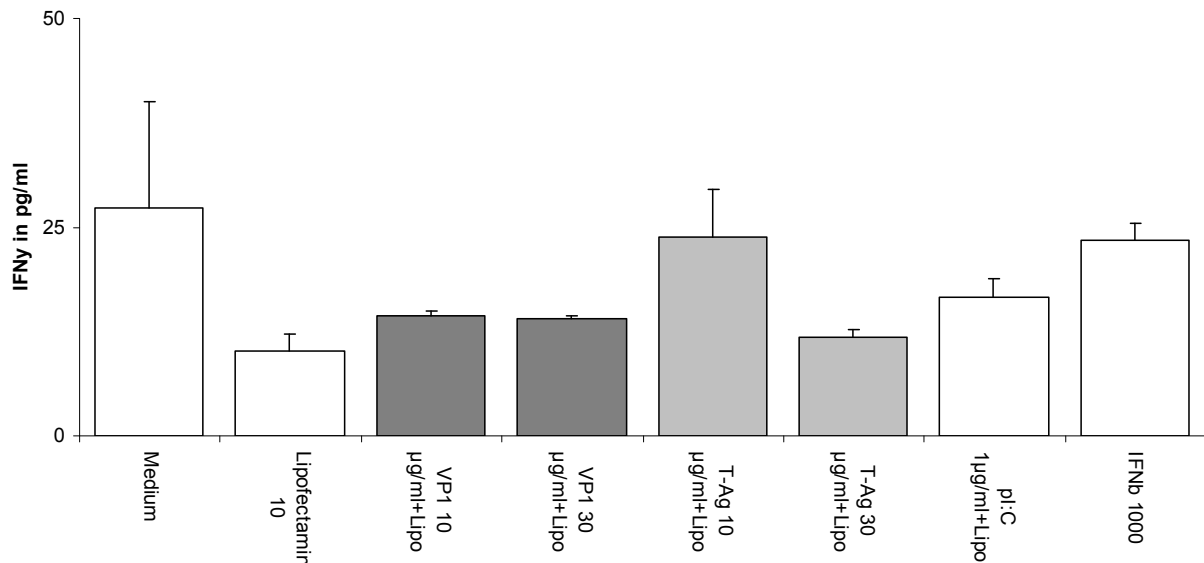


Abbildung 21: Murine Tubulusepithelzellen vom Wildtyp wurden mit den Oligonukleotidliganden VP1 und T-Ag in den Konzentrationen 10 und 30 µg/ml stimuliert und nach 24 Stunden mittels ELISA auf ihren Gehalt an Interferon gamma untersucht. Als Negativkontrolle wurde eine mit 10 µg/ml Lipofectamine behandelte Gruppe verwendet. Die Positivkontrollen sind Gruppen, die mit 1.000 U/ml Interferon beta oder pl:C 1µg/ml behandelt wurden. * $p < 0,05$ versus Medium.

3.5. Stimulierbarkeit von TECs durch Interferone

Wir konnten bisher nachweisen, dass die von den dsDNA Liganden bewirkte Zellantwort unter anderem Interferonproduktion zur Folge hat. Diese Interferone könnten zusätzlich autokrin und parakrin zu einer weiteren Steigerung der lokalen Immunreaktion führen, falls Tubulusepithelzellen über Rezeptoren verfügen, durch die sie auf die selbst sezernierten Interferone reagieren. Wir haben deswegen analysiert, welche Folgen IFN-alpha, beta und gamma auf Tubuluszellen in Bezug auf die Zytokinproduktion haben. Wie in den Experimenten zuvor wurde hierzu IL-6 bestimmt. Wir haben Interferon alpha, beta und gamma in den Konzentrationen 500, 1000 und 2000 U/ml zu den Zellen für 18 Stunden zur Stimulation gegeben. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Tubulusepithelzellen in Nährmedium.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 22 zusammengefasst. Es zeigte sich, dass Interferon alpha und beta in TECs zu einer signifikanten Steigerung der Interleukin-6 Expression führen. Auf Interferon gamma hingegen zeigten die Tubulusepithelzellen keine messbare Produktion von Interleukin-6. Somit ist wahrscheinlich, dass die lokalen Tubulusepithelzellen durch autokrine und parakrine Stimulation durch die zuvor selbst sezernierten Interferone eine Verstärkung der eigenen Zytokinproduktion und gegebenenfalls benachbarter immunkompetenter Zellen bewirken können. Das für Lymphozyten bedeutsame Interferon gamma führt zu keiner gesteigerten IL-6 Produktion in Tubulusepithelzellen.

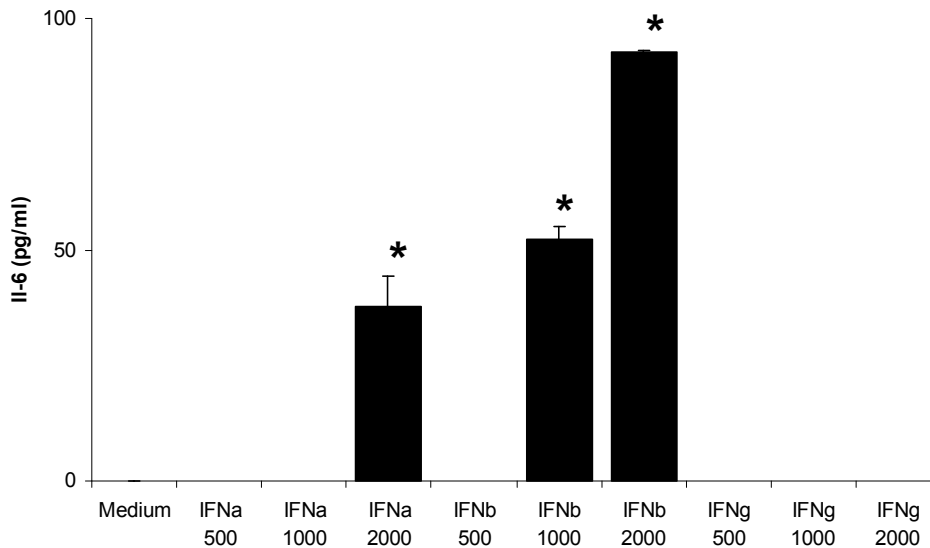


Abbildung 22: Die Tubulusepithelzellen wurden über 24 Stunden mit 500, 1000 oder 2000 Einheiten von Interferon alpha, beta oder gamma stimuliert. Die Überstände wurde im Anschluss mittels ELISA auf ihren Gehalt an IL-6 untersucht. * $p < 0,05$ versus Medium.

3.6. Zytokinantwort in renalen dendritischen Zellen

In den letzten Jahren konnte eine Subgruppe von dendritischen Zellen nachgewiesen werden, die sich im Nierenparenchym ansiedeln und eine wichtige Rolle in der Verbindung zwischen angeborener und erworbener Immunität in der Niere zu spielen scheinen. Dendritische Zellen sind in der Lage nach Kontakt mit Antigenen in peripheren Geweben und Kontakt mit stimulierenden Zytokinen aktivierende Corezeptoren an ihrer Oberfläche zu exprimieren. Hierüber können sie in den sekundären Lymphorganen zu einer Aktivierung spezifischer Lymphozyten führen und somit aus einer angeborenen zu einer adaptiven Immunreaktion führen. Durch die unmittelbare Nachbarschaft zu den Tubulusepithelzellen ist eine gegenseitige Interaktion durch die Vielzahl von sezernierten Botenstoffen wahrscheinlich. Zusätzlich ist zu erwarten, dass auch renale dendritische Zellen, als immunkompetente Zellen, analog zu den Tubulusepithelzellen in der Lage sind dsDNA Liganden zu erkennen. Wie in den Experimenten zuvor wurde IL-6 als Aktivierungsparameter für die dendritischen Zellen bestimmt.

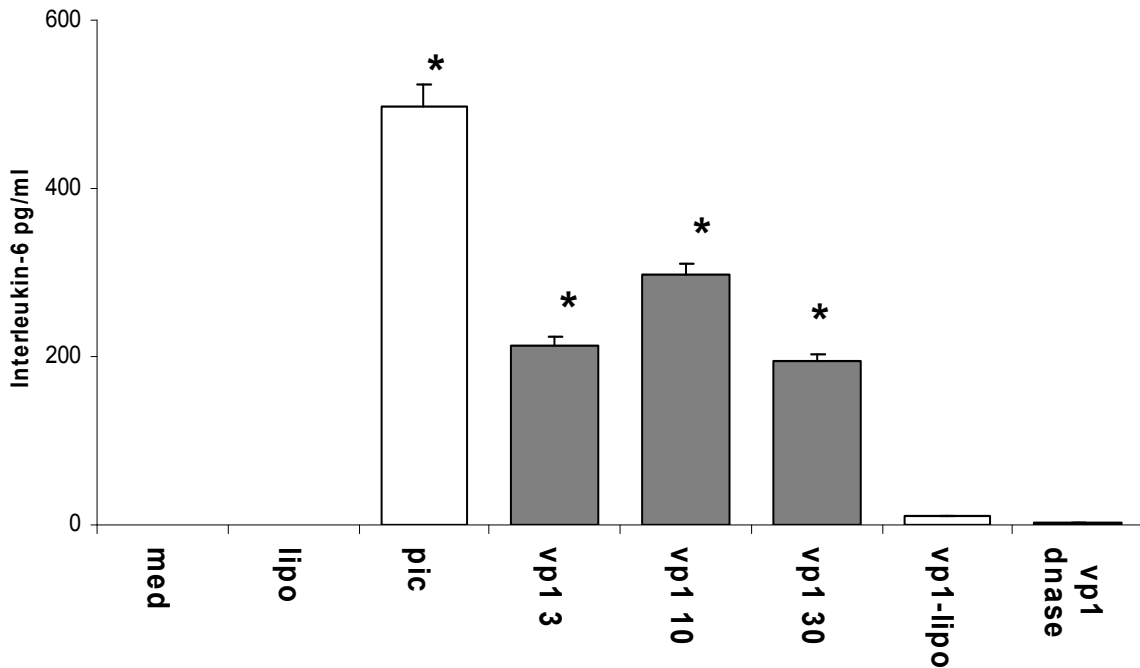


Abbildung 23: Nach Isolation wurden die Primärzellen über 18 Stunden mit VP1 in verschiedenen Konzentrationen (3, 10, oder 30 $\mu\text{g/ml}$) stimuliert. Als Positivkontrolle wurde pIC 3 $\mu\text{g/ml}$ verwendet. Die Negativkontrollen wurden entweder mit DNase vorbehandelt oder nicht mit Lipofectamine komplexiert. Die Überstände wurden mittels ELISA auf den Gehalt an Interleukin-6 analysiert. * $p < 0,05$ versus Medium.

In Abbildung 23 zeigt sich, dass auch renale dendritische Zellen nach Stimulation mit dsDNA in erhöhtem Maße proinflammatorische Zytokine sezernieren. Somit werden die Oligonukleotide VP1 und T-Ag durch unterschiedliche Zellgruppen unabhängig voneinander erkannt. Da die dendritischen Zellen an der Schnittstelle zwischen angeborener und erworbener Immunität agieren, kommt Ihnen eine besondere Bedeutung als mögliches Therapieziel zu. Durch einen Eingriff in die Rezeptorkaskaden der dendritischen Zellen könnte sowohl stimulierend als auch inhibitorisch eingegriffen werden und somit eine unzureichende Immunantwort verstärkt oder eine überschüssige Entzündungsreaktion gemildert werden.

3.7. Auswirkungen auf die Zellproliferation

Virale Infektionen führen in der Regel zu verminderten Replikationsraten der betroffenen Zellen. Diese reduzierte Proliferation hat eine Verlangsamung der Virusreplikation und –ausbreitung zur Folge. Zum Teil sind hieran auch interferoninduzierte Gene beteiligt.

Wir untersuchten im Folgenden, ob das Vorliegen zytoplasmatischer dsDNA zu einer verminderten Proliferation in Tubulusepithelzellen führt. Wir vermuten, dass die beteiligten Rezeptorsysteme über eine Proliferationshemmung einen protektiven Effekt hinsichtlich weiterer Virusreplikation ausüben. Die Ergebnisse sind in Abbildung 24 dargestellt.

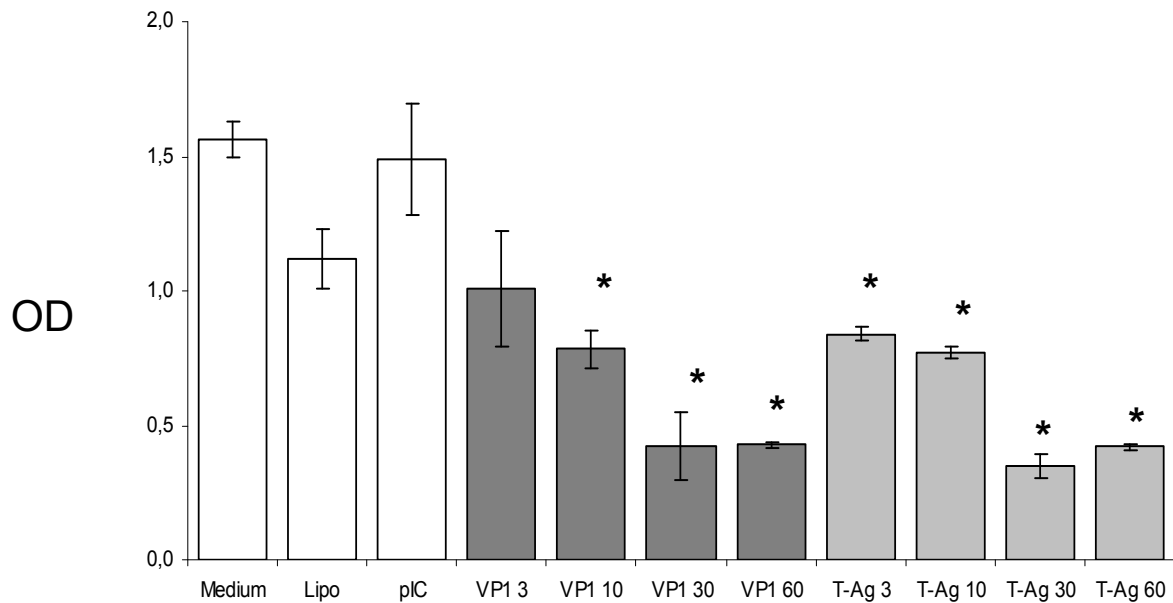


Abbildung 24: Tubulusepithelzellen wurden nach 24 stündiger Vorbehandlung in Hungermedium (D-MEM ohne FCS) für 24 Stunden in Normalmedium mit VP1 und T-Ag in verschiedenen Konzentrationen (3, 10, 30 und 60 µg/ml) stimuliert. Als Kontrollgruppe wurden Zellen verwendet, die lediglich mit Lipofectamine behandelt wurden. OD=optische Dichte. * $p < 0,05$ versus Lipofectamine.

In den Proliferationsexperimenten mit verschiedenen Konzentrationen von dsDNA-Oligonukleotiden zeigte sich, dass mit steigenden Konzentrationen von VP1 und T-Ag die Proliferationsrate der Tubulusepithelzellen sinkt. Dieser Effekt ist zum Teil auch durch die kationischen Lipide bedingt, die ebenfalls antiproliferative Wirkung zeigten. Daher wurden die stimulierten Gruppen mit einer Kontrollgruppe auf Signifikanz verglichen, die nur mit dem Transfektionsvektor inkubiert wurde. Unabhängig von den sezernierten proinflammatorischen Mediatoren und den induzierten antiviralen Proteinen, könnte zusätzlich durch eine reduzierte Proliferationsrate eine Reduktion der Virusausbreitung gefördert werden.

3.8. Autokrine Stimulation durch Typ-I Interferone

Wir konnten bisher zeigen, dass Tubulusepithelzellen in der Lage sind viele bedeutende Signalmoleküle (IL-6, IFN β , MCP1, IP10) der angeborenen Immunantwort zu produzieren, wenn sie mit dsDNA Oligonukleotiden stimuliert wurden. Insbesondere die Expression von Interferonen ist in der Bekämpfung einer viralen Infektion von Bedeutung. Wir untersuchten, ob die Tubulusepithelzellen zusätzlich über Interferonrezeptoren verfügen und inwiefern diese zu einer Verstärkung der Expression proinflammatorischer Zytokine, im Sinne einer autokrinen Stimulation, führen. Zunächst bestimmten wir die Expression von Interferonrezeptor-1 (IFNAR-1) mRNA mittels rtPCR in Tubulusepithelzellen von Wildtypmäusen und verglichen diese mit der Expression in Zellen von IFNAR-1 knockout Mäusen. Hierbei ließ sich nachweisen, dass eine signifikante Expression von IFNAR-1 in

Wildtyp- Tubulusepithelzellen vorliegt (s. Abbildung 25). Somit verfügen Tubuluszellen über Rezeptoren für die von ihnen selbst sezernierten Typ-I Interferone. Hierdurch ist es sehr wahrscheinlich, dass es zu einer auto- und parakrinen Stimulation der Tubulusepithelzellen kommt.

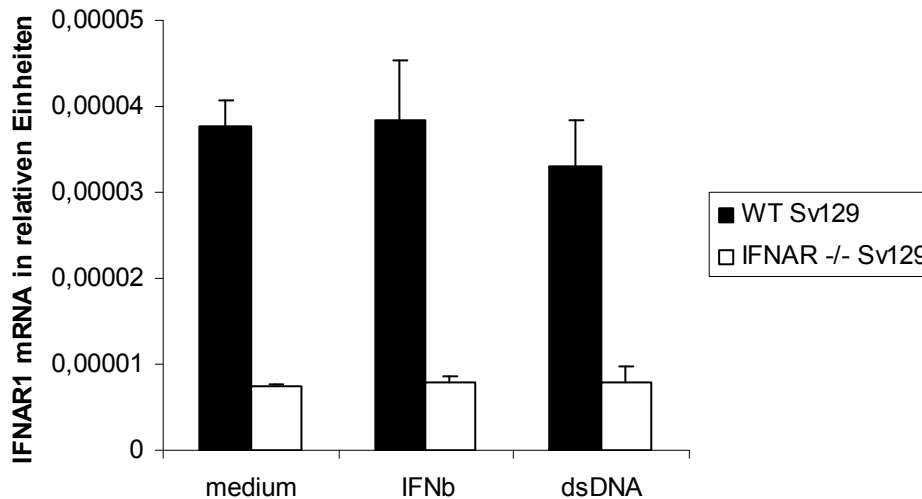


Abbildung 25: Primäre Tubulusepithelzellen aus Mäusen mit den Genotypen Wildtyp (WT) und Interferonrezeptor 1 knockout (IFNAR1 -/-) aus Sv129 Hintergrund wurden isoliert und für 18 Stunden mit 1.000 IE/ml IFN-β oder 10 µg/ml dsDNA stimuliert, oder unstimuliert in Medium belassen. Anschließend wurden die Zellysate auf ihren Gehalt an IFNAR1 mRNA mittels TaqMan rtPCR analysiert.

Zunächst konnten wir bestätigen, dass IFNAR-1 auf Wildtyp- Tubulusepithelzellen signifikant höher exprimiert wird, als in IFNAR-/- Tubulusepithelzellen. Da die Expression durch IFN beta und dsDNA Liganden nicht erhöht wurde, scheint sie konstitutiv zu sein. Im Folgenden wollten wir auf funktioneller Ebene untersuchen in welchem Ausmaß die Produktion von Interleukin-6 durch Vorhandensein bzw. Abwesenheit von IFNAR-1 beeinflusst wird.

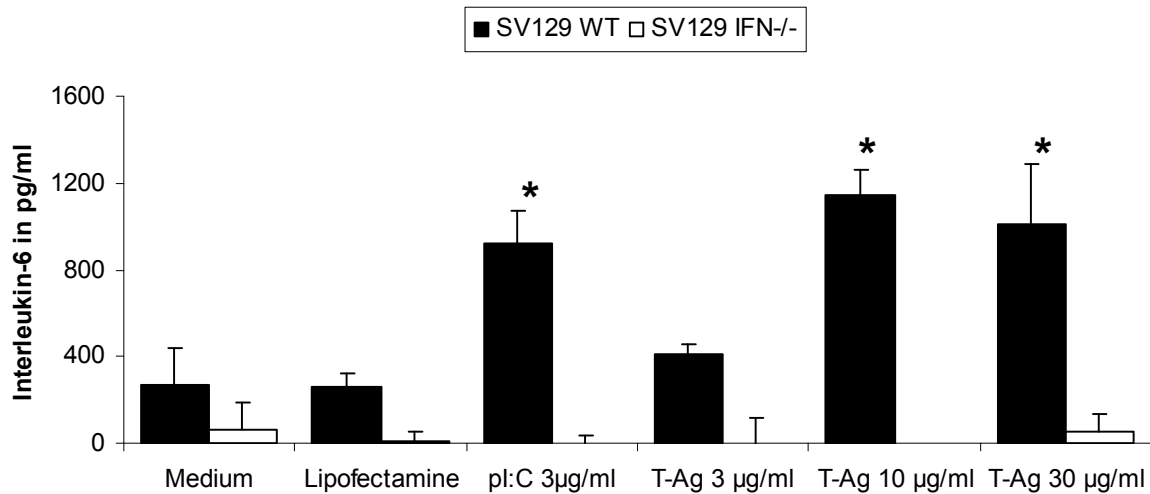


Abbildung 26: Primäre murine Tubulusepithelzellen aus Wildtyp oder IFNAR^{-/-} Sv129 Mäusen wurden über 18 Stunden mit Medium, Lipofectamine, pIC (3 µg/ml), oder T-Ag (3, 10, 30 µg/ml) inkubiert. Anschließend wurde in den Überständen die Konzentration von Interleukin-6 ermittelt. * p<0,05 versus Medium.

Wir stimulierten IFNAR-1 defiziente Tubulusepithelzellen mit unseren Oligonukleotidsequenzen und untersuchten die Zellüberstände mittels ELISA auf ihren Gehalt an Interleukin-6. Hierbei zeigte sich eine signifikant reduzierte Interleukin-6 Produktion in den IFNAR1^{-/-} Zellen im Vergleich zu Wildtypzellen. Dieser Unterschied könnte durch einen selbstverstärkenden autokrinen bzw. parakrinen Effekt, der durch die dsDNA induzierten Interferone über die Zelleigenen IFNAR1 Rezeptoren vermittelt wird, erklärt werden.

3.9. Konfokale Mikroskopie

Zum mikroskopischen Nachweis der korrekten Verteilung unserer Liganden in den intrazellulären Kompartimenten führten wir eine konfokale Mikroskopie fixierter Tubulusepithelzellen durch. Zur Bestätigung der erfolgreichen Transfektion der Liganden in das Zellinnere wurden Oligonukleotidliganden und zytosolisch gelegene Strukturen mit fluoreszenten Farbstoffen markiert und nach Stimulation mit den markierten Liganden mikroskopisch dargestellt. Abbildung 27 zeigt Aufnahmen aus der Fluoreszenzmikroskopie. Die Oligonukleotidliganden wurden mit Rhodamin- Maleimide markiert und sind anhand roter Fluoreszenz zu erkennen. Mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) markiert und somit grün dargestellt, ist Rab5, ein Marker früher Endosomen. Die Aufnahmen sind in einzelne Kanäle aufgetrennt, die jeweils eine der markierten Strukturen darstellen. Das Summationsbild ist daneben dargestellt. Dabei zeigte sich, dass die mit kationischen Lipiden behandelten Liganden erfolgreich in das Zellinnere transportiert werden konnten, während die Liganden ohne Lipofectamine mikroskopisch nicht im Zellinneren nachzuweisen sind.

Somit zeigt sich, dass unsere Liganden tatsächlich in das von uns gewünschte Kompartiment gelangt sind.

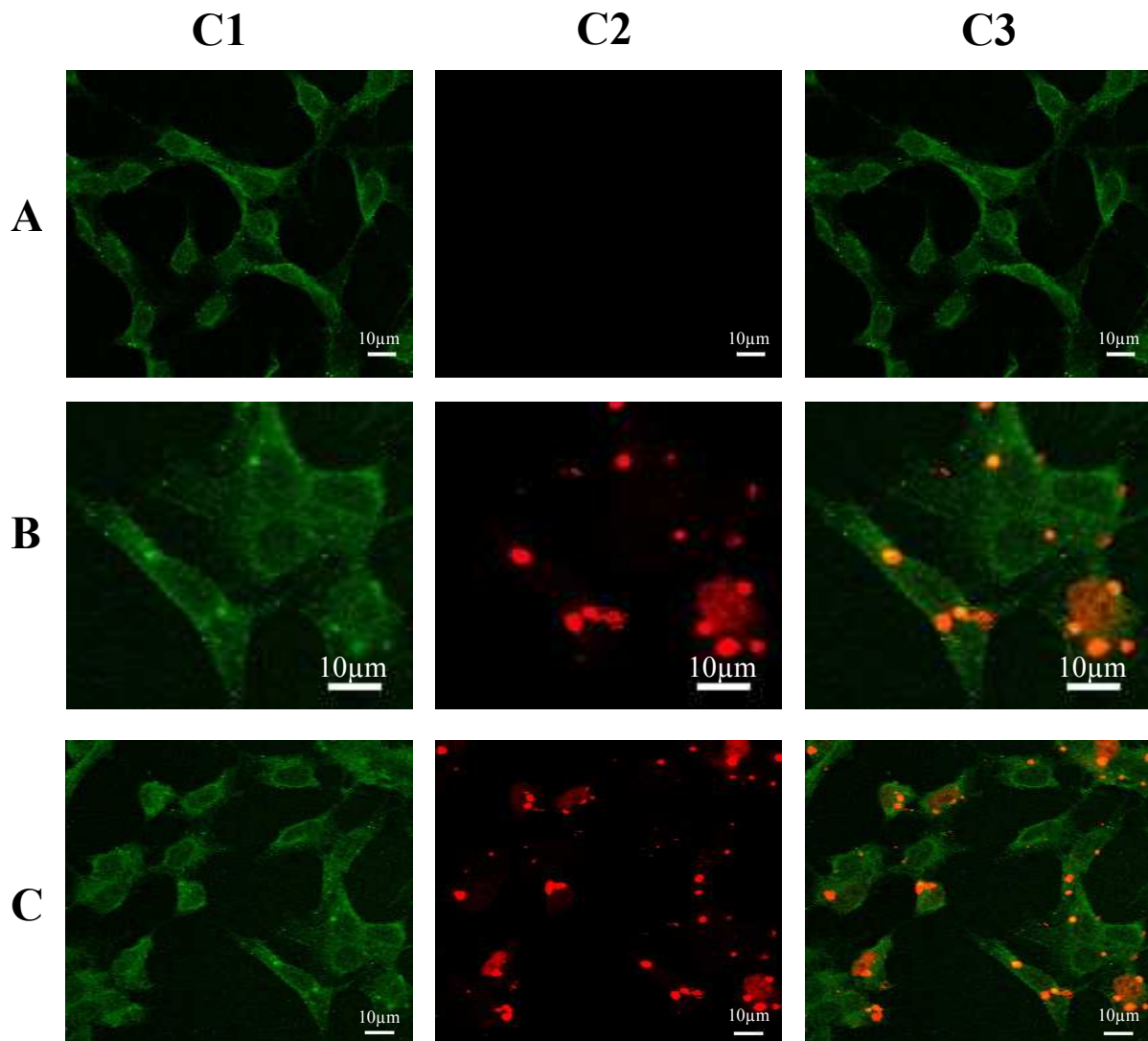


Abbildung 27: Primäre murine Tubulusepithelzellen wurden analog zu den bisher beschriebenen Stimulationsexperimenten mit T-Ag 10 µg/ml und Lipofectamine inkubiert. Das Oligonukleotid wurde zuvor mit Rhodamine-Maleimide markiert. Zusätzlich wurde mit Rab5-spezifischen Antikörpern, die mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) markiert wurden, behandelt. Anschließend wurden die fixierten Proben mittels konfokaler Mikroskopie analysiert. C1 zeigt den Aufnahmekanal für FITC markierte Strukturen, C2 stelle Rhodamine- positive Anteile dar. In C3 sind C1 und C2 zur besseren Veranschaulichung überlagert. A zeigt die Gruppe, die nicht mit Lipofectamine behandelt wurde. B stellt die Lipofectamine- behandelte Gruppe dar. C stellt die Aufnahme aus B in geringer Vergrößerung dar.

3. 10. Auswirkungen auf das Apoptoseverhalten von Tubulusepithelzellen

Da Viren auf den Proliferationszyklus Einfluß nehmen, besteht ein wichtiger Anteil der antiviralen Antwort in der Produktion zellzyklusregulierender Proteine die Proliferation und Apoptose beeinflussen sollen. Daher ist es interessant, wie die Tubulusepithelzellen ihr Apoptoseverhalten nach Stimulation mit dsDNA Liganden verändern. Es zeigte sich, dass die Oligonukleotide bei einer Konzentration von 10 µg/ml eine signifikant erhöhte Prozentzahl an spätapoptotischen (ax+, PI+) Zellen im Vergleich zu den Kontrollgruppen induzieren.

Interessanterweise war die Anzahl spätapoptotischer Zellen in TECs die mit einem Caspase-8 Inhibitor behandelt wurden, nicht erhöht. Diese Ergebnisse legen nahe, dass zytosolisch gelegene DNA zu gesteigerter Apoptose führt und dass Caspase-8 zur Apoptoseinduktion beitragen könnte. Es ist davon auszugehen, dass eine Vernetzung zwischen antiviraler Antwort und Apoptoseinduktion besteht. Ähnlich der Vernetzung der Signalwege der RLHs mit FADD und somit einem Apoptosemediator könnten die Signalwege der DNA-Erkennung ebenfalls eine Vernetzung zu Regulatorproteinen der Apoptose haben. Eine erhöhte Apoptoserate infizierter Zellen könnte in vivo zu einer reduzierten Proliferation der Virenpartikel führen und somit der Infektionsausbreitung entgegenwirken.

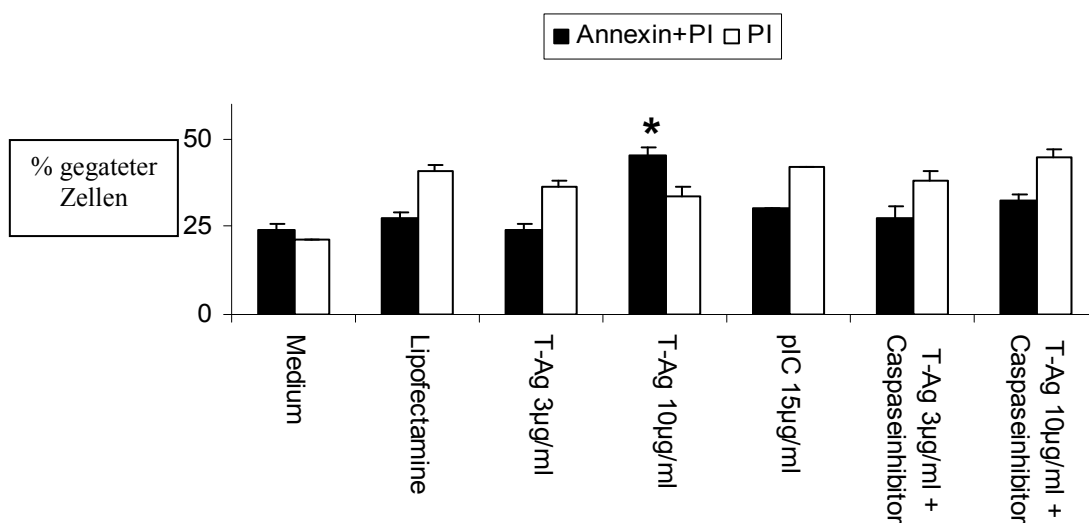


Abbildung 28: Tubulusepithelzellen wurden nach Stimulation mit T-Ag (3, 10 µg/ml) +/- Caspase 8 Inhibitor mittels Durchflußzytometrie auf ihre Färbbarkeit mit FITC-Annexin V Antikörpern und Propidiumiodid untersucht. Als Negativgruppen dienten Gruppen die nur mit Medium oder Lipofectamine behandelt wurden. pIC diente als Positivkontrolle. Die Graphen stellen die Prozentzahl der jeweiligen Gruppen an der Gesamtzahl gateder Zellen dar. * $p < 0,05$ versus Lipofectamine.

3.11. IPS1- Western Blot

IPS1 ist ein wichtiges Adaptorprotein für die RLHs. Wir untersuchten, ob durch Stimulation mit Oligonukleotiden eine Induktion von IPS1 erreicht wird. Sollte es zu einer verstärkten Expression von IPS1 kommen, ist eine Beteiligung an der Signalweiterleitung von DNA-Erkennungsrezeptoren zu vermuten. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass dieses Adaptorprotein nicht direkt an der dsDNA Erkennung mitwirkt, sondern sekundär zur verstärkten Erkennung von zytosolischer RNA durch RLHs hochreguliert wird.

Zum Nachweis von intrazellulärem IPS1 führten wir einen Western Blot durch. Als Positivkontrolle diente das Lysat von CHO-Zellen. Das Protein lässt sich nach elektrophoretischer Auftrennung bei ca. 75 kDa nachweisen.

Im Western Blot zeigte sich, dass IPS1 in TECs exprimiert wird. Zellen die mit 30 µg/ml stimuliert wurden, zeigten überraschenderweise eine deutlich weniger intensive Bande.

Möglicherweise ist das durch einen zytotoxischen Effekt bei hohen Konzentrationen von Oligonukleotiden und kationischen Lipiden bedingt. Alternativ könnte ein negativer Kontrollmechanismus induziert worden sein. Eine gesteigerte Expression innerhalb der Gruppen, die mit weniger als 30 µg/ml T-Ag stimuliert wurden, lässt sich nicht erkennen. Zusammenfassend konnten wir IPS1 in TECs nachweisen. Eine gesteigerte Expression scheint im semiquantitativen Western Blot nicht vorzuliegen, lässt sich aber nicht sicher ausschliessen. Die Aufnahmen der Elektrophoresebanden sind in Abbildung 29 dargestellt.

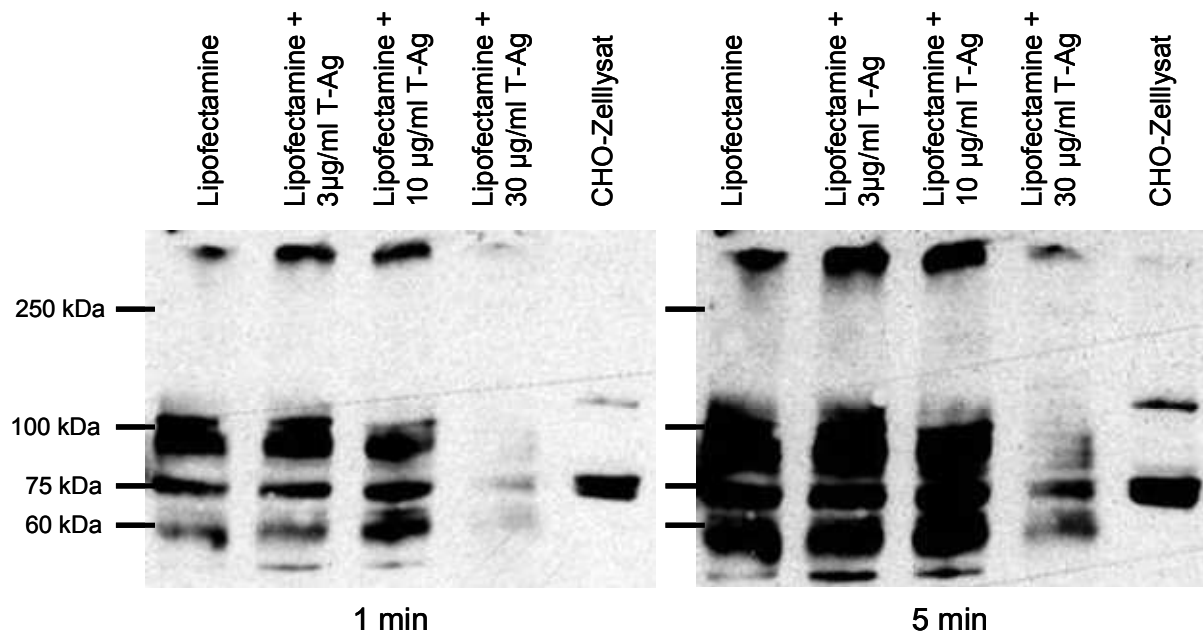


Abbildung 29: *IPS1 Western Blot. TECs wurden mit Lipofectamine + der angegebenen Konzentration an T-Ag stimuliert und anschließend lysiert. Die Lysate wurden elektrophoretisch aufgetrennt und mit IPS1 Antikörpern markiert. Als Positivkontrolle wurden Lysate von CHO- Zellen verwendet. Die Elektrophoresebanden nach 1min (links) und 5 min (rechts) Auftrennung sind dargestellt.*

4. Diskussion

4.1. Zytosolische Oligonukleotide als Auslöser einer proinflammatorischen Reaktion in murinen Tubulusepithelzellen.

Die Hypothese unserer Arbeit ist, dass murine Tubulusepithelzellen über Mechanismen des angeborenen Immunsystems an der Pathogenese der BKVN mitwirken. Die BKVN wird durch ein dsDNA Virus ausgelöst und betrifft TECs. Dieser Zelltyp verfügt aber über keinen TLR9 und somit auch über keinen bisher bekannten Pathogenerkennungsrezeptor für DNA. Vor wenigen Jahren konnte gezeigt werden, dass zytoplasmatische dsDNA auch unabhängig von TLR9 zu einer proinflammatorischen Antwort führen kann (135). Weitere Forschungsarbeiten auf diesem Gebiet kamen zu dem Erkenntnis, dass Oligonukleotide zu einer Aktivierung von Toll-like Rezeptoren und RIG-like Helikasen führen (97). Diese binden virale RNA in Endo-/ Lysosomen und DNA in Lysosomen. Mechanismen der Erkennung zytosolisch vorliegender DNA sind erst seit kurzem bekannt und werden derzeit genauer charakterisiert (136, 143, 148).

Wir vermuteten, dass TECs über einen solchen Mechanismus bei Infektion mit dsDNA-Viren, wie z.B. dem BK- Virus, zu einer proinflammatorischen Immunantwort beitragen und somit zu einer Aggravierung der Nephritis führen können. Ein tiefgehendes Verständnis der zugrundeliegenden pathophysiologischen Mechanismen soll Ansatzpunkte für künftige Therapien ausfindig machen. Im Rahmen einer überschiessenden destruktiven Entzündungsreaktion wäre z.B. eine möglichst selektive Inhibition des Entzündungsprozesses wünschenswert.

In unseren Experimenten führten dsDNA- Oligonukleotide von ca. 40 bps Länge nach zytosolischer Transfektion zur Induktion von proinflammatorischen Zytokinen (IL-6), Chemokinen (MCP1, IP10), Typ-I Interferonen und zu sekundär dadurch induzierten Effektorproteinen wie Mx1. Die korrekte zytosolische Lokalisation bestätigten wir mittels konfokaler Mikroskopie mit markierten Oligonukleotiden. Bei dsDNA- Konzentrationen von 10µg/ml war ein Maximum der Induktion von Effektormolekülen zu erkennen. Bei weiter steigenden Konzentrationen kommt es zu einer deutlichen Reduktion der proinflammatorischen Reaktion. Mögliche Gründe sind zum einen zytotoxische Effekte durch die ebenfalls steigende Dosis an kationischen Lipiden oder die Induktion von negativen Regulatormechanismen. Die Reaktion erreicht innerhalb von 3 Stunden ein Maximum und bildet sich danach graduell zurück. Wir vermuten, dass negative Regulatormechanismen bei längerer Stimulation der Pathogenerkennungsrezeptoren hochreguliert werden.

Zum Nachweis der Unabhängigkeit der proinflammatorischen Reaktion auf zytosolische dsDNA von TLRs, führten wir die Experimente an TRIF- bzw. MyD88- knockout Mäusen durch und konnten zeigen, dass die Reaktion auch in Abwesenheit dieser Adaptorproteine

nachweisbar ist. Wir versuchten Mäuse zu züchten, die gleichzeitig für beide Gene defizient sind, jedoch gelang uns dies nicht innerhalb des angedachten zeitlichen Rahmens, aufgrund des sehr anfälligen Phänotyps dieser Mäuse.

Wir wollten ebenfalls die Effekte unserer Oligonukleotide auf Apoptose und Proliferation charakterisieren. Die Ergebnisse unserer Experimente zeigen eine reduzierte Proliferationsrate in Zellen, die mit Oligonukleotiden transfiziert wurden. Die Apoptoserate wurde nur bei der Optimalkonzentration der dsDNA Liganden von 10 µg/ml leicht erhöht und dieser Effekt war nach Behandlung mit einem Caspase-8 Inhibitor nicht mehr nachweisbar.

Wir gehen davon aus, dass die beschriebenen Effekte nicht sequenzspezifisch sind. Daher sollten bei Infektionen mit anderen dsDNA- Viren ähnliche Immunreaktionen zu beobachten sein. Wir entschieden uns für Sequenzen, die in Genen für essentielle Virusproteine enthalten sind, da diese während einer Infektion in den infizierten Zellen vorkommen müssen. Da die Bestandteile des Kapsids zusätzliche Rezeptoren aktivieren können und somit die Übersichtlichkeit verringern und die Interpretation erschweren würden, verwendeten wir kein komplettes Virus. In vivo tragen diese vielfältigen Interaktionen zur Komplexität der Pathogenese bei. Da in unseren Experimenten somit eine deutliche Vereinfachung der realen Situation wiedergegeben wird, können die Ergebnisse nicht auf die Situation in vivo übertragen werden. Ein komplettes Genom zu transfizieren, hätte durch die verwendete Methode der Transfektion mit kationischen Lipiden zu erheblicher unspezifischer Aktivierung geführt, sodass wir uns stattdessen für Oligonukleotide von etwa 40 bps entschieden. Da jedoch die Oligonukleotide eine signifikant höhere Zytokinantwort als die Kontrollgruppen mit Lipofectamine induzieren, vermuten wir, dass der Effekt direkt durch die Oligonukleotide bedingt ist.

Der Zusammenhang zwischen zytosolisch gelegenen dsDNA Oligonukleotiden und Inflammation ist auch bei nicht- infektiösen Erkrankungen von Bedeutung. So ist z.B. bei der im Rahmen des systemischen Lupus erythematoses auftretenden Lupusnephritis gezeigt worden, dass eine verminderte DNase Aktivität im weiteren Verlauf zu einer Aggravierung des Krankheitsbildes führt (185, 186). Eine verminderte Aktivität verlangsamt den Abbau zytosolischer DNA und kann somit im Verlauf über einen ähnlichen Mechanismus wie dem, der in dieser Arbeit untersucht wurde, zu einer proinflammatorischen Antwort führen.

Eine Beteiligung des Signalproteins IPS-1, das als Adaptorprotein für die RLHs eine wichtige Rolle spielt, konnten wir in unseren Experimenten nicht feststellen. Wir beschränkten uns jedoch auf den semiquantitativen Nachweis mittels Western Blot. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass IPS1 durch Konformationsänderung aktiviert wird und direkt oder indirekt an der Signalweiterleitung der DNA-Erkennungsrezeptoren beteiligt ist.

Zusätzlich kann sich die Signalweiterleitung im humanen System vom murinen hierin unterscheiden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden auch renale dendritische Zellen isoliert und mit den dsDNA Oligonukleotiden stimuliert. Die Effekte von renalen dendritischen Zellen im Rahmen anderer inflammatorischer Nierenerkrankungen sind beschrieben (187). Den renalen dendritischen Zellen kommt die Bedeutung zu, nach einer entsprechenden Aktivierung Antigene aus der Umgebung aufzunehmen, in sekundäre Lymphorgane zu transportieren und dort eine adaptive Immunantwort zu initiieren (173). Renale dendritische Zellen zeigten ebenfalls eine Reaktion auf zytosolische Oligonukleotide, sodass zu vermuten ist, dass sie durch diese zusätzlich aktiviert werden. Durch ihre Interaktion mit Lymphozyten in ihrer Rolle als antigenpräsentierende Zellen, stellen die rDCs ein Bindeglied zwischen angeborener und erworbener Immunität dar.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass Mechanismen der angeborenen Immunität zu einer komplexen proinflammatorischen Expressionsantwort in Tubulusepithelzellen führen. Diese beinhaltet zahlreiche Effektormoleküle, die sezerniert werden um weitere Effektorzellen zu rekrutieren. Auslöser sind Oligonukleotide, die z.B. bei viralen Infektionen, Enzymdefekten und Autoimmunerkrankungen in erhöhter Konzentration im Zytosol auftreten können. Dieser Mechanismus könnte die progressive Nierenparenchymschädigung im Rahmen einer BKV-Nephritis fördern und stellt somit ein potenzielles Therapieziel dar. Unsere in vitro Experimente lassen vermuten, dass im Rahmen viraler Erkrankungen in vivo, ähnliche Mechanismen wirken könnten.

4.2. Bedeutung für die Pathogenese der BK- Virusnephritis

Die Tatsache, dass bisher kein Mechanismus zur Erkennung von dsDNA im Zytosol beschrieben und charakterisiert ist, sowie die wachsende klinische Relevanz der BK- Virus-assoziierten Nephropathie, die gerade einen solchen Mechanismus erfordern könnte, waren in Kombination ausschlaggebend für die Durchführung dieser Arbeit. Die hohe Rate an Transplantatorganverlusten und die eingeschränkten therapeutischen Möglichkeiten machen ein besseres Verständnis der Pathomechanismen zur Planung zukünftiger Therapiekonzepte dringend erforderlich.

In Abbildung 30 ist ein mögliches Pathogenesekonzept dargestellt, das unsere Ergebnisse beinhaltet. Das Virus muss zur effektiven Replikation sein dsDNA Genom in die Zelle schleusen. Dabei können RNA und DNA von Rezeptoren gebunden werden, die pathogen-assoziierte molekulare Muster erkennen. Das führt zur Aktivierung von NF κ B und IRF3, die zur gesteigerten Expression proinflammatorischer Zytokine, der Chemokine IP10 und MCP1, sowie von Typ-I Interferonen führen. Die produzierten Chemokine können immunkompetente Zellen, wie Makrophagen, T- Lymphozyten und dendritische Zellen ins Gewebe locken,

sowie residente renale dendritische Zellen aktivieren (188, 189). Da dendritische Zellen ihrerseits zu einer Aktivierung der adaptiven Immunantwort führen, kann man die Aktivierung der Tubulusepithelzellen als einen ersten Schritt in einer Aktivierungskaskade verstehen.

Zusätzlich konnten wir zeigen, dass Typ-I Interferone und davon abhängige Genprodukte (ISGs) induziert werden. Diese führen autokrin zu einer weiteren Verstärkung der Sekretion proinflammatorischer Effektormoleküle. Unter diesen Bedingungen können Lymphozyten durch die Chemokine in das infizierte Gewebe gelockt werden und treffen dort auf ein proinflammatorisches Zytokinmilieu. Dieses führt zu einer Aktivierung, u.a. auch von zytotoxischen T-Lymphozyten, die bei übermäßiger Aktivierung zu deutlichen Gewebsschaden führen können.

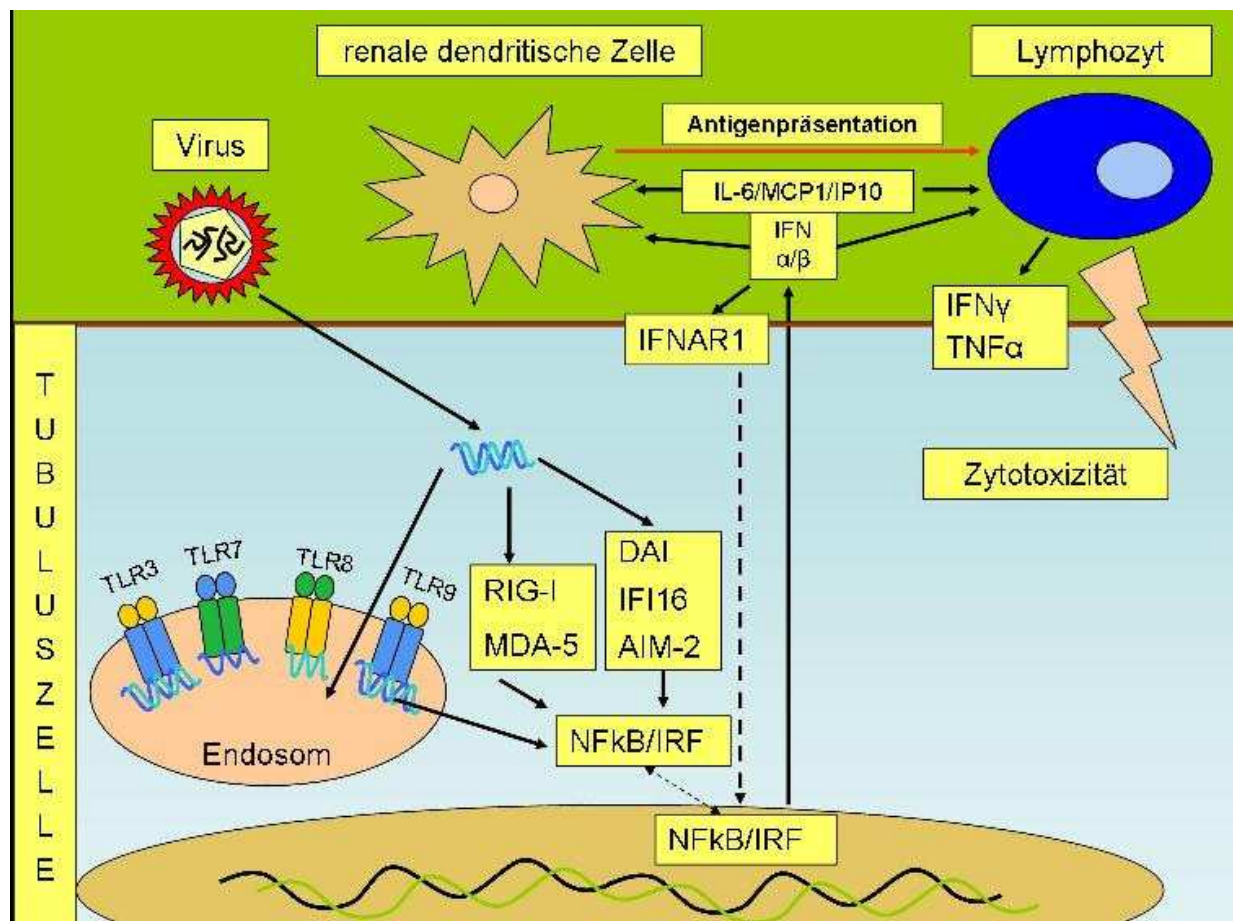


Abbildung 30: Pathogenesemodell der BKVN.

Der direkte zytopathische Effekt des BKV ist eher gering. Somit sind das eigene Immunsystem und die hierdurch bedingte Entzündungsreaktion von entscheidender Bedeutung für die Schädigung des Nierenparenchyms. Es wäre denkbar, dass Therapien die die lokale Freisetzung von Entzündungsmediatoren reduzieren, erfolgversprechend sind. Dies wäre unter anderem durch eine Blockade der beteiligten Rezeptoren möglich. Hierdurch

könnte durch eine Reduktion der Zytokin- und Chemokinkonzentration im Nierenparenchym die Zahl an rekrutierten T- Lymphozyten, Makrophagen und weiteren Effektorzellen reduziert werden, die die Entzündung aufrecht erhalten. Da die beteiligten Mechanismen derzeit noch charakterisiert werden müssen, wird es noch intensiver weiterer Forschung bedürfen, bis eine entsprechende Therapie für das humane System geprüft werden kann. Bis dahin muss versucht werden, die bestehenden immunsuppressiven Therapiekonzepte möglichst genau und individuell anzupassen.

Für die weitere Erforschung dieser Mechanismen, wäre es interessant, die Experimente an murinen Modellen der BKVN anzuwenden. Eines dieser Modelle wurde von Larsen et al. etabliert. Hierbei handelt es sich um ein murines Modell der BKVN nach Nierentransplantation, das einen vergleichbaren klinischen Verlauf wie nach einer Transplantation im humanen System zeigte. C57BL/6 (H-2b) bzw. C3H/HeJ (H-2k) Mäuse wurden als Organspender bzw. –empfänger verwendet. Die Transplantation vaskularisierter Nieren erfolgte in der 8-10 Lebenswoche bei männlichen Mäusen. Hiernach wurden die Mäuse mit dem murinen Polyomavirusstamm A2 infiziert (190). Der Vorteil dieses Modells ist, dass es in der Lage ist das beschleunigte Nierenversagen bei BKVN zu simulieren. Zusätzlich ist in akut infizierten Mäusen eine verstärkte alloreaktive CD8 Antwort zu erkennen.

4.3. Technisch- experimentelle Limitationen

Wir führten die Experimente an murinen Zellen durch, da humanes Nierengewebe schwer in ausreichender Quantität zugänglich ist. Ausserdem hatten wir vorgesehen, die TLR-Unabhängigkeit dieser Reaktion für die Genotypen MyD88^{-/-}, TRIF^{-/-} und IFNAR1^{-/-} zu bestimmen, für die kein menschliches Gewebe erhältlich ist. Für diese Untersuchungen waren wir auf Gewebe aus knockout Mäusen angewiesen. Das hat zur Folge, dass die Ergebnisse für menschliches Gewebe noch bestätigt werden müssen.

Für die Proliferationsexperimente verwendeten wir Zellen aus der MTC-Zelllinie (178). Diese ist mit sv40 zur Immortalisation infiziert. Sv40 kodiert unter anderem auch ein homologes T-Ag zum BK-Virus und kann den Zellzyklus und somit die Zellproliferation über Interaktion mit p53 beeinflussen (191). Wir entschieden uns gegen die Verwendung primärer Tubuluszellen für die Proliferationsexperimente, da diese ein mit Wachstumshormonen (Insulin, T3, EGF) angereichertes Medium zum Überleben benötigen. Diese Faktoren würden jedoch die Proliferationsraten beeinflussen und somit Rückschlüsse auf die in vivo Situation unmöglich machen. In Vorexperimenten zeigten sich in der MTC-Zelllinie gut reproduzierbare Ergebnisse. Die Ergebnisse sind aber nicht auf eine tatsächliche BKV-Infektion übertragbar. Zum einen liegt keine echte Virusinfektion vor. Zum anderen wurden die TECs in Abwesenheit anderer Zellen stimuliert, sodass das komplexe Verhalten in realen

entzündeten Nierengewebe mit Makrophagen, dendritischen Zellen usw. nicht adäquat wiedergegeben werden kann.

Leider sind an unserem Labor Arbeiten mit murinem Polyomavirus aus Sicherheitsgründen nicht möglich gewesen, obwohl entsprechende in vivo Experimente die Aussagekraft unserer Arbeit deutlich verstärken könnten.

Die kationischen Lipide, die zur Transfektion der Oligonukleotide verwendet wurden, haben einen proapoptotischen Effekt (192) und führten unter anderem auch ohne Oligonukleotide zu einer signifikanten Induktion von MCP1. Um eine Aussage über die tatsächliche Effektivität der verwendeten dsDNA Oligonukleotide machen zu können, wurden die Gruppen gegen Lipofectamine- behandelte Gruppen auf Signifikanz überprüft und nicht gegen unbehandelte Gruppen in Nährmedium, um einem falsch positiven Ergebnis entgegenzuwirken. Andererseits kann ein Teil des Effekts durch Lipofectamine verdeckt sein. Wir entschieden uns aufgrund von Vorarbeiten an unserem Labor, die unterschiedliche Transfektionsmethoden miteinander verglichen haben (z.B. Transfektion mit DOTAP, Elektroporation), Lipofectamine zu verwenden, da es die wenigsten Nebeneffekte gezeigt hat.

Wir untersuchten inwiefern die Induktion der Effektormoleküle durch eine höhere Dosis an Lipofectamine bedingt ist. Es war kein signifikanter Unterschied in Experimenten zu erkennen, in denen wir Konzentrationen von 1-30 µl/ml verwendeten. Wir entschieden uns deshalb, wenn nicht anders erwähnt, als Kontrolle eine Dosis von 3 µg/ml zu verwenden. Lipofectamine zeigte zusätzlich eine hemmende Wirkung auf die Zellproliferation und induziert wie bereits erwähnt zu einem gewissen Ausmaß Apoptose, sodass auch in den Proliferations- und Apoptoseversuchen Lipofectamine- behandelte Zellen als Kontrolle verwendet wurden und nicht unbehandelte Zellen in Medium, wie in den restlichen Versuchen.

Soweit möglich wurde versucht, die durch Oligonukleotide induzierten Faktoren auf Proteinebene nachzuweisen. Da nicht für alle Faktoren die Möglichkeit bestand den Nachweis mittels ELISA durchzuführen, erfolgte alternativ die Bestimmung des mRNA Gehalts. Für IP10 erfolgte der Nachweis sowohl für mRNA als auch für Protein, da hier ein IP10 ELISA-kit im Verlauf des Projekts erhältlich gewesen ist.

Da sich in den Experimenten keine auffälligen Unterschiede zwischen den verschiedenen DNA- Sequenzen zeigten und wir nicht davon ausgehen, dass die Effekte von der DNA- Sequenz abhängig sind, entschieden wir uns für einige Experimente auch aus

Kostengründen nur eine der Sequenzen einzusetzen. Unterschiede im Verhalten der beiden Liganden können jedoch nicht sicher ausgeschlossen werden.

Unsere Arbeit zeigt, dass virale dsDNA im Rahmen viraler Nephropathien ein Verstärker proinflammatorischer Reaktionen sein kann. Die hierfür verantwortlichen Rezeptoren und Signalwege stellen potentielle Therapieziele dar. Eine Übertragung unserer Ergebnisse auf das humane System ist jedoch nicht möglich. Hierzu müssen weitere Experimente durchgeführt werden, die sich stufenweise der realen Situation annähern. Auf dem Weg dorthin müssen vereinfachte Systeme genutzt werden, um eine erste Übersicht gewinnen zu können.

5. Zusammenfassung

Die BK- Virus Nephropathie ist ein Krankheitsbild, das in den letzten Jahren durch den breiteren Einsatz potenter immunsuppressiver Regimes in der Transplantationsmedizin immer mehr an Relevanz gewonnen hat. Während die BKV- Infektion unter Normalbedingungen latent verläuft, führt ausgeprägte Immunsuppression zur Reaktivierung mit folgender interstitieller Nephritis und fortschreitendem Organversagen. Das Virus selbst ist nicht zytopathogen, sodass der Gewebsschaden am ehesten durch eine fehlgeleitete Immunantwort resultiert. Diese beruht auf komplexen Interaktionen der beteiligten Zellen und wird über eine Vielzahl von Botenstoffen reguliert. Der Ausgangspunkt ist die Erkennung von pathogenassoziierten Molekülstrukturen. Hierzu verfügen auch nicht- Immunzellen über ein breites Spektrum unterschiedlicher Rezeptoren des angeborenen Immunsystems, die über intrazelluläre Signalkaskaden zur Produktion und Sekretion immunmodulierender Proteine führen. Eine wichtige Gruppe angeborener Pathogenerkennungsrezeptoren sind die membrangebundenen Toll- like Rezeptoren. Diese sind in der Lage verschiedene bakterielle und virale Bestandteile zu erkennen, u.a. auch virale dsDNA. Da diese Rezeptorgruppe jedoch membrangebunden ist, ist sie nicht für die Erkennung zytosolisch gelegener pathogener Strukturen geeignet. Im Falle der Reaktivierung einer BK- Virusinfektion wird zunehmend dsDNA, in der das Virusgenom kodiert ist, im Zytosol von Tubulusepithelzellen repliziert. Diese sind die wichtigsten Wirtszellen des BK- Virus.

Die Tubulusepithelzellen sind nach Stimulation mit pathogenassoziierten Molekülstrukturen in der Lage Zytokine, Chemokine und Interferone zu produzieren. Somit stellen sie einen wichtigen Baustein in der Einleitung einer antiviralen Immunreaktion dar und tragen dazu bei, dass eine spezifische Immunantwort über Zellen der erworbenen Immunität erfolgen kann. Es ist bisher nicht bekannt, welche Strukturen des BK- Virus die Tubulusepithelzellen aktivieren. Ein Kandidat ist die dsDNA des Virus, die im Rahmen der Reaktivierung in großer Menge im Zytosol vorliegt. Jedoch exprimieren Tubulusepithelzellen keine Toll-like Rezeptoren, die dsDNA erkennen können.

Vor wenigen Jahren konnten zytosolische Rezeptoren der angeborenen Immunität identifiziert werden, die in der Lage sind RNA zu erkennen. Diese Rezeptoren, MDA-5 und RIG-I, spielen eine wichtige Rolle bei der Erkennung von RNA- Viren. Es bestehen Hinweise, dass entsprechende Rezeptoren zur DNA Erkennung im Zytoplasma der Zelle existieren. Ein Kandidatprotein ist DAI, welches beim Vorliegen zytosolisch lokalisierter DNA die Interferonproduktion steigert. Zusätzliche Rezeptoren sind seit kurzem identifiziert worden. Die Hypothese dieser Arbeit ist, dass Tubulusepithelzellen unabhängig von TLRs in der Lage sind zytosolisch gelegene dsDNA zu erkennen und an der Initiierung der Immunantwort gegen eine BK-Virusinfektion teilnehmen.

Wir wählten 2 Oligonukleotide von etwa 40bp Sequenzlänge aus den Genen von VP1 und T-Ag des BK Virus aus um das Vorliegen von viralen dsDNA Fragmenten im Zytosol zu simulieren. Die Transfektion ins Zytosol erfolgte mittels kationischen Lipiden. Die korrekte Lokalisation unserer Liganden wurde mittels konfokaler Mikroskopie verifiziert. Zunächst untersuchten wir die Produktion inflammatorischer Zytokine (IL-6) in einer Tubuluszelllinie nach Stimulation mit unseren dsDNA- Sequenzen. Nach Isolation von primären murinen Tubuluszellen wurden die Experimente an diesen kontrolliert. Zum Ausschluss einer Interaktion mit dem TLR- Rezeptorsystem wurden die Experimente an Primärzellen der Genotypen TRIF- und MyD88 -/- durchgeführt. Die Produktion von IL-6 wurde genauer charakterisiert hinsichtlich dem zeitlichen Verlauf und der Abhängigkeit von der Dosis an dsDNA- Oligonukleotiden. Zusätzlich untersuchten wir die stimulierten Zellen auf Produktion von Chemokinen. Diese sind für die Rekrutierung von Effektorzellen des Immunsystems von Bedeutung. Wir wählten hierfür IP10 als Vertreter der CXC Chemokine, die hauptsächlich auf polymorphkernige Zellen wirken und MCP-1 als Vertreter der CC Chemokine die chemotaktisch auf Monozyten wirken.

Als nächstes wollten wir nachweisen, dass auch Tubuluszellen Typ I Interferone und antivirale Proteine produzieren können. Hierüber können sie eigenständig die Virusreplikation hemmen. In weiteren Experimenten wurde das Proliferations- und Apoptoseverhalten unter Stimulation mit unseren Liganden charakterisiert. Abschließend stimulierten wir ebenfalls murine renale dendritische Zellen, seit kurzem identifizierte lokale Immuneffektorzellen, die im Kontext der BKV- Nephritis wahrscheinlich eng mit den Tubulusepithelzellen kooperieren.

In den durchgeführten Experimenten konnte bestätigt werden, dass Tubuluszellen proinflammatorische Zytokine, Chemokine und direkt antivirale Proteine auf Stimulation mit zytoplasmatischer dsDNA produzieren. Diese Stimulation erfolgt unabhängig vom Toll-like Rezeptor System. Somit kommt den Tubulusepithelzellen eine bedeutende Rolle in der Einleitung und Koordination einer antiviralen Immunantwort gegen dsDNA Viren wie dem BK- Virus zu. Sie locken immunologische Effektorzellen in das infizierte Gewebe und hemmen die virale Replikation. Die Ergebnisse sprechen für das Vorliegen zytoplasmatischer dsDNA Rezeptoren in Tubulusepithelzellen. Diese wären immunologisch eine sinnvolle Ergänzung zu den bisher beschriebenen Toll-like Rezeptoren und RIG-like Helikasen. Durch ihre Fähigkeit pathogene Strukturen zu erkennen und eine Immunantwort auszulösen, stellen die Tubuluszellen einen Angriffspunkt für pharmakologische Therapie dar. Durch eine Blockade der Rezeptoren ließe sich eine ungewünschte lokale Inflammation reduzieren. Auf der Gegenseite könnten Agonisten genutzt werden für eine verstärkte antivirale Antwort oder als potentielle Adjuvantien zur Vakzinierung.

Eine weitere Charakterisierung dieser Rezeptoren wäre nicht nur aus infektiologischer Sicht interessant. Erkrankungen aus dem rheumatologischen Formenkreis könnten ebenfalls über zytosolische DNA und einer Rezeptordysregulation beeinflusst werden, wie bereits an einem Modell der chronischen Polyarthritits gezeigt werden konnte (186, 193).

Trotz der vielversprechenden Ziele für neue Therapien der BK-Virusnephritis, aber auch vieler anderer Virus- und Autoimmunerkrankungen, ist der Weg bis zur erfolgreichen Anwendung solcher Medikamente am Menschen noch sehr weit und bedarf intensiver Forschungsarbeit um unser Wissen über die Abläufe des angeborenen Immunsystems zu erweitern.

6. Literaturverzeichnis

1. Frei U, Schober-Halstenberg HJ. Nierenersatztherapie in Deutschland. *QuaSi-Niere Jahresbericht 2006/2007*.
2. Heuer M, Frühauf NR, Treckmann J, Witzke O, Paul A, Kaiser GM. 2009. [Kidney procurement and transplantation from a surgical perspective]. *Dtsch Med Wochenschr.* 134:412-416.
3. Suthanthiran M, Strom TB. 1994. Renal transplantation. *N Engl J Med.* 331:365-376.
4. Schnuelle P, Lorenz D, Trede M, Van Der Woude FJ. 1998. Impact of renal cadaveric transplantation on survival in end-stage renal failure: evidence for reduced mortality risk compared with hemodialysis during long-term follow-up. *J Am Soc Nephrol.* 8:2135-2141.
5. Organtransplantation, D.S. 2009. DSO- Jahresbericht 2009.
6. Bowman LJ, Brennan DC. 2008. The role of tacrolimus in renal transplantation. *Expert Opin Pharmacother.* 9:635-643.
7. Knight SR, Russell NK, Barcena L, Morris PJ. 2009. Mycophenolate mofetil decreases acute rejection and may improve graft survival in renal transplant recipients when compared with azathioprine: a systematic review. *Transplantation.* 87:785-794.
8. Briggs JD. 2001. Causes of death after renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant.* 16:1545-1549.
9. Berns JS, Bloom RD. 2008. Viral nephropathies: core curriculum 2008. *Am J Kidney Dis.* 52:370-381.
10. Zhong J, Zuo Y, Ma J, Fogo AB, Jolicoeur P, Ichikawa I, Matsusaka T. 2005. Expression of HIV-1 genes in podocytes alone can lead to the full spectrum of HIV-1-associated nephropathy. *Kidney Int.* 68:1048-1060.
11. Bruggeman LA, Nelson PJ. 2009. Controversies in the pathogenesis of HIV-associated renal diseases. *Nat Rev Nephrol.* 5:574-581.
12. Kamar N, Rostaing L, Alric L. 2006. Treatment of hepatitis C-virus-related glomerulonephritis. *Kidney Int.* 69:436-439.

13. Hirsch HH. 2002. Polyomavirus BK nephropathy: a (re-)emerging complication in renal transplantation. *Am J Transplant.* 2:25-30.
14. Low J, Humes HD, Szczypka M, Imperiale M. 2004. BKV and SV40 infection of human kidney tubular epithelial cells in vitro. *Virology.* 323:182-188.
15. Moriyama T, Marquez JP, Wakatsuki T, Sorokin A. 2007. Caveolar endocytosis is critical for BK virus infection of human renal proximal tubular epithelial cells. *J Virol.* 81:8552-8562.
16. Cubitt CL. 2006. Molecular genetics of the BK virus. *Adv Exp Med Biol.* 577:85-95.
17. Felsani A, Mileo AM, Paggi MG. 2006. Retinoblastoma family proteins as key targets of the small DNA virus oncoproteins. *Oncogene.* 25:5277-5285.
18. Reploeg MD, Storch GA, Clifford DB. 2001. BK virus: A clinical review. *Clin Infect Dis.* 33:191-202.
19. Eash S, Manley K, Gasparovic M, Querbes W, Atwood WJ. 2006. The human polyomaviruses. *Cell Mol Life Sci.* 63:865-876.
20. Khalili K, White MK, Sawa H, Nagashima K, Safak M. 2005. The agnoprotein of polyomaviruses: A multifunctional auxiliary protein. *J Cell Physiol.* 204:1-7.
21. Leuenberger D, Andresen PA, Gosert R, Binggeli S, Ström EH, Bodaghi S, Rinaldo CH, Hirsch HH. 2007. Human Polyomavirus type 1 (BK virus) Agnoprotein is abundantly expressed, but immunologically ignored. *Clin Vaccine Immunol.* 14:959-968.
22. Krumbholz A, Wutzler P, Zell R. 2008. The non-coding region of BK subtype II viruses. *Virus Genes.* 36:27-29.
23. Gilbert J, Dahl J, Riney C, You J, Cui C, Holmes R, Lencer W, Benjamin T. 2005. Ganglioside GD1a restores infectibility to mouse cells lacking functional receptors for polyomavirus. *J Virol.* 79:615-618.
24. Low JA, Magnuson B, Tsai B, Imperiale MJ. 2006. Identification of gangliosides GD1b and GT1b as receptors for BK virus. *J Virol.* 80:1361-1366.
25. Dugan AS, Eash S, Atwood WJ. 2006. Update on BK virus entry and intracellular trafficking. *Transpl Infect Dis.*

26. Dugan AS, Eash S, Atwood WJ. 2005. An N-linked glycoprotein with alpha (2,3)-linked sialic acid is a receptor for BK virus. *J Virol.* 79:14442-14445.
27. Eash S, Atwood WJ. 2005. Involvement of cytoskeletal components in BK virus infectious entry. *J Virol.* 79:11734-11741.
28. Randhawa PS, Vats A, Zygmunt D, Swalsky P, Scantlebury V, Shapiro R, Finkelstein S. 2002. Quantitation of viral DNA in renal allograft tissue from patients with BK virus nephropathy. *Transplantation.* 74:485-488.
29. Flaegstad T, Rønne K, Filipe AR, Traavik T. 1989. Prevalence of anti BK virus antibody in Portugal and Norway. *Scand J Infect Dis.* 21:145-147.
30. Stolt A, Sasnauskas K, Koskela P, Lehtinen M, Dillner J. 2003. Seroepidemiology of the human polyomaviruses. *J Gen Virol.* 84:1499-1504.
31. Goudsmit J, Wertheim-van Dillen P, van Strien A, van der Noordaa J. 1982. The role of BK virus in acute respiratory tract disease and the presence of BKV DNA in tonsils. *J Med Virol.* 10:91-99.
32. Vanchiere JA, Nicome RK, Greer JM, Demmler GJ, Butel JS. 2005. Frequent detection of polyomaviruses in stool samples from hospitalized children. *J Infect Dis.* 192:658-664.
33. Bofill-Mas S, Formiga-Cruz M, Clemente-Casares P, Calafell F, Girones R. 2001. Potential transmission of human polyomaviruses through the gastrointestinal tract after exposure to virions or viral DNA. *J Virol.* 75:10290-10299.
34. Bohl DL, Storch GA, Ryschkewitsch C, Gaudreault-Keener M, Schnitzler MA, Major EO, Brennan DC. 2005. Donor origin of BK virus in renal transplantation and role of HLA C7 in susceptibility to sustained BK viremia. *Am J Transplant.* 5:2213-2221.
35. Randhawa P, Brennan DC. 2006. BK Virus Infection in Transplant Recipients: An Overview and Update. *Am J Transplant.* 6:2000-2005.
36. Eash S, Tavares R, Stopa EG, Robbins SH, Brossay L, Atwood WJ. 2004. Differential distribution of the JC virus receptor- type sialic acid in normal human tissues. *Am J Pathol.* 164:419-428.
37. Heritage J, Chesters PM, McCance DJ. 1981. The persistence of papovavirus BK DNA sequences in normal human renal tissue. *J Med Virol* 8:143-150.

38. Gorrill T, Feliciano M, Mukerjee R, Sawaya BE, Khalili K, White MK. 2006. Activation of early gene transcription in polyomavirus BK by human immunodeficiency virus type 1 Tat. *J Gen Virol.* 87:1557-1566.
39. Borgatti M, Costanzo F, Portolani M. 1979. Evidence for reactivation of persistent infection during pregnancy and lack of congenital transmission of BK virus, a human papovavirus. *Microbiologica.* 2:173-178.
40. Rosen S, Harmon W, Krensky AM, Edelson PJ, Padgett BL, Grinnell BW, Rubino MJ, Walker DL. 1983. Tubulo-interstitial nephritis associated with polyomavirus (BK type) infection. *N Engl J Med.* 308:1192-1196.
41. Chan PK, I.K., Shiu SY, Chiu EK, Wong MP, Yuen KY. 1994. Association between polyomaviruria and microscopic hematuria in bone marrow transplant recipients. *J Infect.* 29:139-146.
42. Arthur RR, Shah KV, Baust SJ, Santos GW, Saral R. 1986. Association of BK viruria with hemorrhagic cystitis in recipients of bone marrow transplants. *N Engl J Med.* 315:230-234.
43. Coleman DV, Mackenzie EF, Gardner SD, Poulding JM, Amer B, Russell WJ. 1978. Human polyomavirus (BK) infection and ureteric stenosis in renal allograft recipients. *J Clin Pathol.* 31:338-347.
44. Sandler ES, Aquino VM, Goss-Shohet E, Hinrichs S, Krisher K. 1997. BK papova virus pneumonia following hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 20:163-165.
45. Voltz R, Jäger G, Seelos K, Fuhry L, Hohlfeld R. 1996. BK virus encephalitis in an immunocompetent patient. *Arch Neurol.* 51:101-103.
46. Bratt G, Hammarin AL, Grandien M, Hedquist BG, Nennesmo I, Sundelin B, Seregard S. 1999. BK virus as the cause of meningoencephalitis, retinitis, and nephritis in a patient with AIDS. *AIDS* 13:1071-1075.
47. Hedquist BG, Bratt G, Hammarin AL, Grandien M, Nennesmo I, Sundelin B, Seregard S. 1999. Identification of BK virus in a patient with acquired immune deficiency syndrome and bilateral atypical retinitis. *Ophthalmology* 106:129-132.
48. O'Reilly RJ, Lee FK, Grossbard E, Kapoor N, Kirkpatrick D, Dinsmore R, Stutzer C, Shah KV, Nahmias AJ. 1981. Papovavirus excretion following marrow

- transplantation: incidence and association with hepatic dysfunction. *Transplant Proc.* 13:262-266.
49. Petrogiannis-Haliotis T, Sakoulas G, Kirby J, Koralnik IJ, Dvorak AM, Monahan-Earley R, DE Girolami PC, DE Girolami U, Upton M, Major EO, Pfister LA, Joseph JT. 2001. BK-related polyomavirus vasculopathy in a renaltransplant recipient. *N Engl J Med.* 345:1250-1255.
 50. Dörries K, Loeber G, Meixensberger J. 1987. Association of polyomavirus JC, SV40, and BK with human brain tumors. *Virology.* 160:268-270.
 51. Flaegstad T, Andresen PA, Johnsen JI, Asomani SK, Jørgensen GE, Vignarajan S, Kjuul A, Kogner P, Traavik T. 1999. A possible contributory role of BK virus infection in neuroblastoma development. *Cancer Res.* 59:1160-1163.
 52. Fiori M, Di Mayorca G. 1976. Occurrence of BK virus DNA in DNA obtained from certain human tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 73:4662-4666.
 53. Völter C, Hausen H, Alber D, de Villiers EM. 1997. Screening human tumor samples with a broad-spectrum polymerase chain reaction method for the detection of polyomaviruses. *Virology.* 237:389-396.
 54. Dyson N, Bernards R, Friend SH, Gooding LR, Hassell JA, Major EO, Pipas JM, Vandyke T, Harlow E. 1990. Large T antigens of many polyomaviruses are able to form complexes with the retinoblastoma protein. *J Virol.* 64:1353-1356.
 55. Harris KF, Chang E, Christensen JB, Imperiale MJ. 1998. BK virus as a potential cofactor in human cancer. *Dev Biol Stand.* 94:81-91.
 56. Nickeleit V, Singh HK, Mihatsch MJ. 2003. Polyomavirus nephropathy: morphology, pathophysiology, and clinical management. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 12:599-605.
 57. Hirsch HH, Drachenberg CB, Steiger J, Ramos E. 2006. Polyomavirus-associated nephropathy in renal transplantation: critical issues of screening and management. *Adv Exp Med Biol.* 577:160-173.
 58. Comoli P, Binggeli S, Ginevri F, Hirsch HH. 2006. Polyomavirus-associated nephropathy: update on BK virus-specific immunity. *Transpl Infect Dis.* 8:86-94.

59. Meier-Kriesche HU, Li S, Gruessner RW, Fung JJ, Bustami RT, Barr ML, Leichtman AB. 2006. Immunosuppression: evolution in practice and trends, 1994-2004. *Am J Transplant.* 6:1111-1131.
60. Dharnidharka VR, Stablein DM, Harmon WE. 2004. Post-transplant infections now exceed acute rejection as cause for hospitalization: a report of the NAPRTCS. *Am J Transplant.* 4:384-389.
61. Mengel M, Marwedel M, Radermacher J, Eden G, Schwarz A, Haller H, Kreipe H. 2003. Incidence of polyomavirus-nephropathy in renal allografts: influence of modern immunosuppressive drugs. *Nephrol Dial Transplant.* 18:1190-1196.
62. Agha I, Brennan DC. 2006. BK virus and immunosuppressive agents. *Adv Exp Med Biol.* 577:174-184.
63. Egli A, Binggeli S, Bodaghi S, Dumoulin A, Funk GA, Khanna N, Leuenberger D, Gosert R, Hirsch HH. 2007. Cytomegalovirus and polyomavirus BK posttransplant. *Nephrol Dial Transplant.* 22:72-82.
64. Gardner SD. 1973. Prevalence in England of Antibody to Human Polyomavirus (B.K.). *Br Med J.* 1:77-78.
65. Purighalla R, Shapiro R, McCauley J, Randhawa P. 1995. BK virus infection in a kidney allograft diagnosed by needle biopsy. *Am J Kidney Dis.* 26:671-673.
66. Smith JM, McDonald RA, Finn LS, Healey PJ, Davis CL, Limaye AP. 2004. Polyomavirus nephropathy in pediatric kidney transplant recipients. *Am J Transplant.* 4:2109-2117.
67. Andrews CA, Shah KV, Daniel RW, Hirsch MS, Rubin RH. 1988. A serological investigation of BK virus and JC virus infections in recipients of renal allografts. *J Infect Dis.* 158:176-181.
68. Ginevri F, De Santis R, Comoli P, Pastorino N, Rossi C, Botti G, Fontana I, Nocera A, Cardillo M, Ciardi MR, Locatelli F, Maccario R, Perfumo F, Azzi A. 2003. Polyomavirus BK infection in pediatric kidney-allograft recipients: A single-center analysis of incidence, risk factors, and novel therapeutic approaches. *Transplantation.* 75:1266-1270.

69. Hirsch HH, Knowles W, Dickenmann M, Passweg J, Klimkait T, Mihatsch MJ, Steiger J. 2002. Prospective study of polyomavirus type BK replication and nephropathy in renal-transplant recipients. *N Engl J Med.* 347:488-496.
70. Mathur VS, Olson JL, Darragh TM, Yen TS. 1997. Polyomavirus-induced interstitial nephritis in two renal transplant recipients: case reports and review of the literature. *Am J Kidney Dis* 29:754–758.
71. Atencio IA, Shadan FF, Zhou XJ, Vaziri ND, Villarreal LP. 1993. Adult mouse kidneys become permissive to acute polyomavirus infection and reactivate persistent infections in response to cellular damage and regeneration. *J Virol.* 67:1424-1432.
72. Meehan SM, Kraus MD, Kadambi PV, Chang A. 2006. Nephron segment localization of polyoma virus large T antigen in renal allografts. *Hum Pathol.* 37:1400-1406.
73. Bracamonte E, Leca N, Smith KD, Nicosia RF, Nিকেleit V, Kendrick E, Furmanczyk PS, Davis CL, Alpers CE, Kowalewska J. 2007. Tubular Basement Membrane Immune Deposits in Association with BK Polyomavirus Nephropathy *Am J Transplant.* 7:1552-1560.
74. Bohl DL, Brennan DC. 2007. BK virus nephropathy and kidney transplantation. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2:36-46.
75. Binet I, Nিকেleit V, Hirsch HH, Prince O, Dalquen P, Gudat F, Mihatsch MJ, Thiel G. 1999. Polyomavirus disease under new immunosuppressive drugs. *Transplantation* 67:918-922.
76. Nিকেleit V, Hirsch HH, Binet IF, Gudat F, Prince O, Dalquen P, Thiel G, Mihatsch MJ. 1999. Polyomavirus infection of renal allograft recipients: from latent infection to manifest disease. *J Am Soc Nephrol* 10:1080-1089.
77. Buehrig CK, Lager DJ, Stegall MD, Kreps MA, Kremers WK, Gloor JM, Schwab TR, Velosa JA, Fidler ME, Larson TS, Griffin MD. 2003. Influence of surveillance renal allograft biopsy on diagnosis and prognosis of polyomavirus-associated nephropathy. *Kidney Int.* 64:665-673.
78. Herrera GA, Veeramachaneni R, Turbat-Herrera EA. 2005. Electron Microscopy in the Diagnosis of BK-Polyoma Virus Infection in the Transplanted Kidney. *Ultrastruct Pathol.* 29:469-474.

79. Nickeleit V, Klimkait T, Binet IF, Dalquen P, Del Zenero V, Thiel G, Mihatsch MJ, Hirsch HH. 2000. Testing for polyomavirus type BK DNA in plasma to identify renal-allograft recipients with viral nephropathy. *N Engl J Med.* 342:1309-1315.
80. Drachenberg CB, Beskow CO, Cangro CB, Bourquin PM, Simsir A, Fink J, Weir MR, Klassen DK, Bartlett ST, Papadimitriou JC. 1999. Human polyoma virus in renal allograft biopsies: morphological findings and correlation with urine cytology. *Hum Pathol* 30:970-977.
81. Herzenberg AM, Gill JS, Djurdjev O, Magil AB. 2002. C4d deposition in acute rejection: an independent long-term prognostic factor. *J Am Soc Nephrol.* 13:234-241.
82. Kemény E, Hirsch HH, Eller J, Dürmüller U, Hopfer H, Mihatsch MJ. 2010. Plasma cell infiltrates in polyomavirus nephropathy. *Transpl Int.* 23:397-406.
83. Drachenberg RC, Drachenberg CB, Papadimitriou JC, Ramos E, Fink JC, Wali R, Weir MR, Cangro CB, Klassen DK, Khaled A, Cunningham R, Bartlett ST. 2001. Morphological spectrum of polyoma virus disease in renal allografts: diagnostic accuracy of urine cytology. *Am J Transplant.* 1:373-381.
84. Brennan DC, Agha I, Bohl DL, Schnitzler MA, Hardinger KL, Lockwood M, Torrence S, Schuessler R, Roby T, Gaudreault-Keener M, Storch GA. 2005. Incidence of BK with tacrolimus versus cyclosporine and impact of preemptive immunosuppression reduction. *Am J Transplant.* 5:582-594.
85. Bressollette-Bodin C, Coste-Burel M, Hourmant M, Sebillé V, Andre-Garnier E, Imbert-Marcille BM. 2005. A prospective longitudinal study of BK virus infection in 104 renal transplant recipients. *Am J Transplant.* 5:1926-1933.
86. Schaub S, Hirsch HH, Dickenmann M, Steiger J, Mihatsch MJ, Hopfer H, Mayr M. 2010. Reducing immunosuppression preserves allograft function in presumptive and definitive polyomavirus-associated nephropathy. *Am J Transplant.* 10:2615-2623.
87. Trofe J, Hirsch HH, Ramos E. 2006. Polyomavirus-associated nephropathy: update of clinical management in kidney transplant patients. *Transpl Infect Dis.* 8:76-85.
88. Bjorang O, Tveitan H, Midtvedt K, Broch LU, Scott H, Andresen PA. 2002. Treatment of polyomavirus infection with cidofovir in a renal-transplant recipient. *Nephrol Dial Transplant.* 17:2023-2025.

89. Williams JW, Javaid B, Kadambi PV, Gillen D, Harland R, Thistlewaite JR, Garfinkel M, Foster P, Atwood W, Millis JM, Meehan SM, Josephson MA. 2005. Leflunomide for polyomavirus type BK nephropathy. *N Engl J Med.* 352:1157-1158.
90. Sener A, House AA, Jevnikar AM, Boudville N, McAlister VC, Muirhead N, Rehman F, Luke PP. 2006. Intravenous immunoglobulin as a treatment for BKvirus associated nephropathy: one-year follow-up of renal allograft recipients. *Transplantation.* 81:117-120.
91. Chandraker A, Ali S, Drachenberg CB. 2004. Use of fluoroquinolones to treat BK infection in renal transplant recipients. *Am J Transplant.* 4.
92. Liacini A, Seamone ME, Muruve DA, Tibbles LA. 2010. Anti-BK Virus Mechanisms of Sirolimus and Leflunomide Alone and in Combination: Toward a New Therapy for BK Virus Infection. *Transplantation.* 90:1450-1457.
93. Hirsch HH. 2005. BK virus: opportunity makes a pathogen. *Clin Infect Dis.* 41:354-360.
94. Ginevri F, Pastorino N, De Santis R, Fontana I, Sementa A, Losurdo G, Santopietro A, Perfumo F, Locatelli F, Maccario R, Azzi A, Comoli P. 2003. Retransplantation after kidney graft loss due to polyoma BK virus nephropathy: successful outcome without original allograft nephrectomy. *Am J Kidney Dis.* 42:821-825.
95. Poduval RD, Meehan SM, Woodle ES, Thistlethwaite JR, Haas M, Cronin DC, Vats A, Josephson MA. 2002. Successful retransplantation after renal allograft loss to polyoma virus interstitial nephritis. *Transplantation.* 73:1166-1169.
96. Ramos E, Vincenti F, Lu WX, Shapiro R, Trofe J, Stratta RJ, Jonsson J, Randhawa PS, Drachenberg CB, Papadimitriou JC, Weir MR, Wali RK. 2004. Retransplantation in patients with graft loss caused by polyoma virus nephropathy. *Transplantation.* 77:131-133.
97. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.* 124:783-801.
98. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell.* 86:973-983.

99. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. 1997. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. 388:394-397.
100. Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B. 1998. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutation in *Tlr4* gene. *Science*. 282:2085-2088.
101. Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, Bazan JF. 1998. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:588-593.
102. Akira S, Takeda K. 2004. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 4:499-511.
103. Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. 2001. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-like receptor 3. *Nature*. 413:732-738.
104. Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, Lipford G, Wagner H, Bauer S. 2003. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science*. 303:1526-1529.
105. Hochrein H, Schlatter B, O'Keeffe M, Wagner C, Schmitz F, Schiemann M, Bauer S, Suter M, Wagner H. 2004. Herpes simplex virus type-1 induces IFN- α production via Toll-like receptor 9- dependent and -independent pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101:11416-11421.
106. Ahmad-Nejad P, Häcker H, Rutz M, Bauer S, Vabulas RM, Wagner H. 2002. Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. *Eur J Immunol*. 32:1958-1968.
107. Matsumoto M, Funami K, Tanabe M, Oshiumi H, Shingai M, Seto Y, Yamamoto A, Seya T. 2003. Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J Immunol*. 171:3154-3162.
108. Latz E, Schoenemeyer A, Visintin A, Fitzgerald KA, Monks BG, Knetter CF, Lien E, Nilsen NJ, Espevik T, Golenbock DT. 2004. TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat Immunol*. 5:190-198.
109. Borden EC, Sen GC, Uze G, Silverman RH, Ransohoff RM, Foster GR, Stark GR. 2007. Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine. *Nat Rev Drug Discov*. 6:975-990.

110. Adachi O, Kawai T, Takeda K, Matsumoto M, Tsutsui H, Sakagami M, Nakanishi K, Akira S. 1998. Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. *Immunity*. 9:143-150.
111. Wesche H, Henzel WJ, Shillinglaw W, Li S, Cao Z. 1997. MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity*. 7:837-847.
112. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Kopp E, Stadlen A, Chen C, Ghosh S, Janeway CA Jr. 1998. MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol Cell*. 2:253-258.
113. Yamamoto M, Sato S, Mori K, Hoshino K, Takeuchi O, Takeda K, Akira S. 2002. 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*. 169:6668-6672.
114. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H, Takeuchi O, Sugiyama M, Okabe M, Takeda K, Akira S. 2003. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent Toll-like receptor signaling pathway. *Science*. 301:640-643.
115. Takeda K, Akira S. 2005. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol*. 17:1-14.
116. Honda K, Taniguchi T. 2006. IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nat Rev Immunol*. 6:644-658.
117. Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, Shinobu N, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, Akira S, Fujita T. 2004. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol*. 5:730-737.
118. Yoneyama M, Kikuchi M, Matsumoto K, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, Foy E, Loo YM, Gale M Jr, Akira S, Yonehara S, Kato A, Fujita T. 2005. Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *J Immunol*. 175:2851-2858.
119. Rothenfusser S, Goutagny N, DiPerna G, Gong M, Monks BG, Schoenemeyer A, Yamamoto M, Akira S, Fitzgerald KA. 2005. The RNA helicase Lgp2 inhibits TLR-independent sensing of viral replication by retinoic acid-inducible gene-I. *J Immunol*. 175:5260-5268.
120. Kato H, Takeuchi O, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Matsui K, Uematsu S, Jung A, Kawai T, Ishii KJ, Yamaguchi O, Otsu K, Tsujimura T, Koh CS, Reis e Sousa C,

- Matsuura Y, Fujita T, Akira S. 2006. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature*. 441:101-105.
121. Takeuchi O, Akira S. 2008. MDA5/RIG-I and virus recognition. *Curr Opin Immunol*. 20:17-22.
122. Hornung V, Ellegast J, Kim S, Brzózka K, Jung A, Kato H, Poeck H, Akira S, Conzelmann KK, Schlee M, Endres S, Hartmann G. 2006. 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science*. 314:994-997.
123. Pichlmair A, Schulz O, Tan CP, Näslund TI, Liljeström P, Weber F, Reis e Sousa C. 2006. RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science*. 314:997-1001.
124. Gitlin L, Barchet W, Gilfillan S, Cella M, Beutler B, Flavell RA, Diamond MS, Colonna M. 2006. Essential role of mda-5 in type I IFN responses to polyriboinosinic:polyribocytidylic acid and encephalomyocarditis picornavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:8459-8464.
125. Kawai T, Takahashi K, Sato S, Coban C, Kumar H, Kato H, Ishii KJ, Takeuchi O, Akira S. 2005. IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat Immunol*. 6:981-988.
126. Seth RB, Sun L, Ea CK, Chen ZJ. 2005. Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signalling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell*. 122:669-682.
127. Xu LG, Wang YY, Han KJ, Li LY, Zhai Z, Shu HB. 2005. VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling. *Mol Cell*. 19:727-740.
128. Meylan E, Curran J, Hofmann K, Moradpour D, Binder M, Bartenschlager R, Tschopp J. 2005. Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature*. 437:1167-1172.
129. Kumar H, Kawai T, Kato H, Sato S, Takahashi K, Coban C, Yamamoto M, Uematsu S, Ishii KJ, Takeuchi O, Akira S. 2006. Essential role of IPS-1 in innate immune responses against RNA viruses. *J Exp Med*. 203:1795-1803.
130. Meylan E, Tschopp J, Karin M. 2006. Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature*. 442:39-44.

131. Jounai N, Takeshita F, Kobiyama K, Sawano A, Miyawaki A, Xin KQ, Ishii KJ, Kawai T, Akira S, Suzuki K, Okuda K. 2007. The Atg5 Atg12 conjugate associates with innate antiviral immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104:14050-14055.
132. Fitzgerald KA, McWhirter SM, Faia KL, Rowe DC, Latz E, Golenbock DT, Coyle AJ, Liao SM, Maniatis T. 2003. IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat Immunol*. 4:491-496.
133. Takahashi K, Kawai T, Kumar H, Sato S, Yonehara S, Akira S. 2006. Roles of caspase-8 and caspase-10 in innate immune responses to double-stranded RNA. *J Immunol*. 176:4520-4524.
134. Ishii KJ, Coban C, Kato H, Takahashi K, Torii Y, Takeshita F, Ludwig H, Sutter G, Suzuki K, Hemmi H, Sato S, Yamamoto M, Uematsu S, Kawai T, Takeuchi O, Akira S. 2006. A Toll-like receptor-independent antiviral response induced by double-stranded B-form DNA. *Nat Immunol*. 7:40-48.
135. Stetson DB, Medzhitov R. 2006. Recognition of Cytosolic DNA Activates an IRF3-Dependent Innate Immune Response. *Immunity* 24:93-103.
136. Takaoka A, Wang Z, Choi MK, Yanai H, Negishi H, Ban T, Lu Y, Miyagishi M, Kodama T, Honda K, Ohba Y, Taniguchi T. 2007. DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature*. 448:501-505.
137. Wang Z, Choi MK, Ban T, Yanai H, Negishi H, Lu Y, Tamura T, Takaoka A, Nishikura K, Taniguchi T. 2008. Regulation of innate immune responses by DAI (DLM-1/ZBP1) and other DNA-sensing molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105:5477-5482.
138. Paludan SR, Bowie AG, Horan KA, Fitzgerald KA. 2011. Recognition of herpesviruses by the innate immune system. *Nat Rev Immunol*. 11:143-154.
139. Yanai H, Savitsky D, Tamura T, Taniguchi T. 2009. Regulation of the cytosolic DNA-sensing system in innate immunity: a current view. *Curr Opin Immunol*. 21:17-22.
140. Kaiser WJ, Upton JW, Mocarski ES. 2008. Receptor-Interacting Protein Homotypic Interaction Motif-Dependent Control of NF- κ B Activation via the DNA-Dependent Activator of IFN Regulatory Factors1. *J Immunol*. 181:6427-6434.
141. Stetson DB, Ko JS, Heidmann T, Medzhitov R. 2008. Trex1 prevents cell-intrinsic initiation of autoimmunity. *Cell*. 134:587-598.

142. Lippmann J, Rothenburg S, Deigendesch N, Eitel J, Meixenberger K, van Laak V, Slevogt H, N'guessan PD, Hippenstiel S, Chakraborty T, Flieger A, Suttorp N, Opitz B. 2008. IFN β responses induced by intracellular bacteria or cytosolic DNA in different human cells do not require ZBP1 (DLM-1/DAI). *Cell Microbiol.* 10:2579-2588.
143. Hornung V, Ablasser A, Charrel-Dennis M, Bauernfeind F, Horvath G, Caffrey DR, Latz E, Fitzgerald KA. 2009. AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature.* 458:514-518.
144. Fernandes-Alnemri T, Yu JW, Juliana C, Solorzano L, Kang S, Wu J, Datta P, McCormick M, Huang L, McDermott E, Eisenlohr L, Landel CP, Alnemri ES. 2010. The AIM2 inflammasome is critical for innate immunity to *Francisella tularensis*. *Nat Immunol.* 11:385-393.
145. Muruve DA, Pétrilli V, Zaiss AK, White LR, Clark SA, Ross PJ, Parks RJ, Tschopp J. 2008. The inflammasome recognizes cytosolic microbial and host DNA and triggers an innate immune response. *Nature.* 452:103-107.
146. Ablasser A, Bauernfeind F, Hartmann G, Latz E, Fitzgerald KA, Hornung V. 2009. RIG-I-dependent sensing of poly(dA:dT) through the induction of an RNA polymerase III-transcribed RNA intermediate. *Nat Immunol.* 10:1065-1072.
147. Chiu YH, Macmillan JB, Chen ZJ. 2009. RNA polymerase III detects cytosolic DNA and induces type I interferons through the RIG-I pathway. *Cell.* 138:576-591.
148. Unterholzner L, Keating SE, Baran M, Horan KA, Jensen SB, Sharma S, Sirois CM, Jin T, Latz E, Xiao TS, Fitzgerald KA, Paludan SR, Bowie AG. 2010. IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA. *Nat Immunol.* 11:997-1004.
149. Koyama S, Ishii KJ, Coban C, Akira S. 2008. Innate immune response to viral infection. *Cytokine.* 43:336-341.
150. Kawai T, Akira S. 2008. Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling. *Ann N Y Acad Sci.* 1143:1-20.
151. Takeuchi O, Akira S. 2009. Innate immunity to virus infection. *Immunol Rev.* 227:75-86.
152. Pichlmair A, Reis e Sousa C. 2007. Innate recognition of viruses. *Immunity.* 27:370-383.

153. Haller O, Staeheli P, Kochs G 2007. Interferon-induced Mx proteins in antiviral host defense. *Biochimie*. 89:812–818.
154. Bieniasz PD. 2004. Intrinsic immunity: A front-line defense against viral attack. *Nat Immunol*. 5:1109-1115.
155. Berlanga JJ, Ventoso I, Harding HP, Deng J, Ron D, Sonenberg N, Carrasco L, de Haro C. 2006. Antiviral effect of the mammalian translation initiation factor 2alpha kinase GCN2 against RNA viruses. . *EMBO J*. 25:1730-1740.
156. Williams BR. 2001. Signal integration via PKR. *Sci STKE*. 89.
157. Player MR, Torrence PF. 1998. The 2–5A system: Modulation of viral and cellular processes through acceleration of RNA degradation. . *Pharmacol Ther*. 78:55-113.
158. Malathi K, Dong B, Gale M Jr, Silverman RH. 2007. Small self-RNA generated by RNase L amplifies antiviral innate immunity. *Nature*. 448:816-819.
159. Samuel CE. 2001. Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev*. 14:778-809.
160. Isaacs A, Lindenmann J 1957. Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. 147:258-267.
161. Isaacs A, Cox RA, Rotem Z. 1963. Foreign nucleic acids as the stimulus to make interferon. *Lancet*. 2:113-116.
162. Pestka S, Krause CD, Walter MR. 2004. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev*. 202:8-32.
163. Kotenko SV, Gallagher G, Baurin VV, Lewis-Antes A, Shen M, Shah NK, Langer JA, Sheikh F, Dickensheets H, Donnelly RP. 2003. IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. . *Nat Immunol*. 4:69-77.
164. Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD. 1998. How cells respond to interferons. . *Annu Rev Biochem*. 67:227-264.
165. Dupuis S, Jouanguy E, Al-Hajjar S, Fieschi C, Al-Mohsen IZ, Al-Jumaah S, Yang K, Chapgier A, Eidenschenk C, Eid P, Al Ghonaium A, Tufenkeji H, Frayha H, Al-Gazlan S, Al-Rayes H, Schreiber RD, Gresser I, Casanova JL. 2003. Impaired response to interferon-alpha/beta and lethal viral disease in human STAT1 deficiency. . *Nat Genet*. 33:388-391.

166. Durbin JE, Hackenmiller R, Simon MC, Levy DE. 1996. Targeted disruption of the mouse Stat1 gene results in compromised innate immunity to viral disease. . *Cell*. 84:443-450.
167. Le Bon A, Tough DF. 2002. Links between innate and adaptive immunity via type I interferon. . *Curr Opin Immunol*. 14:432-436.
168. Bordon Y. 2010. Prime time for monocytes. *Nat Rev Immunol*. 10:808.
169. Kaissling B, Le Hir M. 1994. Characterization and distribution of interstitial cell types in the renal cortex of rats. *Kidney Int*. 45:709-720.
170. Austyn JM, Hankins DF, Larsen CP, Morris PJ, Rao AS, Roake JA. 1994. Isolation and characterization of dendritic cells from mouse heart and kidney. *J Immunol*. 152:2401-2410.
171. Shortman K, Liu YJ. 2002. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol*. 2:151-161.
172. Fogg DK, Sibon C, Miled C, Jung S, Aucouturier P, Littman DR, Cumano A, Geissmann F. 2006. A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. *Science*. 311:83-87.
173. Krüger T, Benke D, Eitner F, Lang A, Wirtz M, Hamilton-Williams EE, Engel D, Giese B, Müller-Newen G, Floege J, Kurts C. 2004. Identification and functional characterization of dendritic cells in the healthy murine kidney and in experimental glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol*. 15:613-621.
174. Soos TJ, Sims TN, Barisoni L, Lin K, Littman DR, Dustin ML, Nelson PJ. 2006. CX3CR1+interstitial dendritic cells form a contiguous network throughout the entire kidney. *Kidney Int*. 70:591-596.
175. Dong X, Swaminathan S, Bachman LA, Croatt AJ, Nath KA, Griffin MD. 2005. Antigen presentation by dendritic cells in renal lymph nodes is linked to systemic and local injury to the kidney. *Kidney Int*. 68:1096-1108.
176. Lahiri A, Lahiri A, Das P, Vani J, Shaila MS, Chakravorty D. 2010. TLR 9 activation in dendritic cells enhances salmonella killing and antigen presentation via involvement of the reactive oxygen species. *PLoS One*. 5:13772.
177. Hugues S. 2010. Dynamics of dendritic cell-T cell interactions: a role in T cell outcome. *Semin Immunopathol*. 32:227-238.

178. Haverty TP, Kelly CJ, Hines WH, Amenta PS, Watanabe M, Harper RA, Kefalides NA, Neilson EG. 1988. Characterization of a renal tubular epithelial cell line which secretes the autologous target antigen of autoimmune experimental interstitial nephritis. *J Cell Biol.* 107:1359-1368.
179. Hoebe K, Du X, Georgel P, Janssen E, Tabet K, Kim SO, Goode J, Lin P, Mann N, Mudd S, Crozat K, Sovath S, Han J, Beutler B. 2003. Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. *Nature.* 424:743-748.
180. Engvall E, Jonsson K, Perlmann P. 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay. II. Quantitative assay of protein antigen, immunoglobulin G, by means of enzyme-labelled antigen and antibody-coated tubes. *Biochim Biophys Acta.* 251:427-434.
181. Wörnle M, Schmid H, Banas B, Merkle M, Henger A, Roeder M, Blattner S, Bock E, Kretzler M, Gröne HJ, Schlöndorff D. 2006. Novel role of toll-like receptor 3 in hepatitis C-associated glomerulonephritis. *Am J Pathol.* 168:370-385.
182. Jones SA. 2005. Directing Transition from Innate to Acquired Immunity: Defining a Role for IL-6. *J Immunol.* 175:3463-3468.
183. Daha MR, van Kooten C. 2000. Is the proximal tubular cell a proinflammatory cell? *Nephrol Dial Transplant.* 15:41-43.
184. Tsuboi N, Yoshikai Y, Matsuo S, Kikuchi T, Iwami K, Nagai Y, Takeuchi O, Akira S, Matsuguchi T. 2002. Roles of toll-like receptors in C-C chemokine production by renal tubular epithelial cells. *J Immunol.* 169:2026-2033.
185. Fenton K, Fisman S, Hedberg A, Seredkina N, Fenton C, Mortensen ES, Rekvig OP. 2009. Anti-dsDNA antibodies promote initiation, and acquired loss of renal Dnase1 promotes progression of lupus nephritis in autoimmune (NZBxNZW)F1 mice. *PLoS One.* 4:8474.
186. Zykova SN, Tveita AA, Rekvig OP. 2010. Renal Dnase1 enzyme activity and protein expression is selectively shut down in murine and human membranoproliferative lupus nephritis. *PLoS One.* 5:12096.
187. Heymann F, Meyer-Schwesinger C, Hamilton-Williams EE, Hammerich L, Panzer U, Kaden S, Quaggin SE, Floege J, Gröne HJ, Kurts C. 2009. Kidney dendritic cell activation is required for progression of renal disease in a mouse model of glomerular injury. *J Clin Invest.* 119:1286-1297.

188. Kulkarni O, Anders HJ. 2008. CCL2/MCP1: a novel target in systemic lupus erythematosus and lupus nephritis. *Z Rheumatol.* 67:220-224.
189. Lee EY, Lee ZH, Song YW. 2009. CXCL10 and autoimmune diseases. *Autoimmun Rev.* 8:379-383.
190. Han Lee ED, Kemball CC, Wang J, Dong Y, Stapler DC Jr, Hamby KM, Gangappa S, Newell KA, Pearson TC, Lukacher AE, Larsen CP. 2006. A mouse model for polyomavirus-associated nephropathy of kidney transplants. *Am J Transplant.* 6:913-922.
191. Cheng J, DeCaprio JA, Fluck MM, Schaffhausen BS. 2009. Cellular transformation by Simian Virus 40 and Murine Polyoma Virus T antigens. *Semin Cancer Biol.* 19:218-228.
192. Kongkaneramt L, Sarisuta N, Azad N, Lu Y, Iyer AK, Wang L, Rojanasakul Y. 2008. Dependence of reactive oxygen species and FLICE inhibitory protein on lipofectamine-induced apoptosis in human lung epithelial cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 325:969-977.
193. Kawane K, Ohtani M, Miwa K, Kizawa T, Kanbara Y, Yoshioka Y, Yoshikawa H, Nagata S. 2006. Chronic polyarthritis caused by mammalian DNA that escapes from degradation in macrophages. *Nature.* 443:998-1002.

7. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

7.1. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung der chronischen Niereninsuffizienz nach der NKF.

Tabelle 2: Renale Manifestation von viralen Erkrankungen

Tabelle 3: Prävalenz von BKVN und dadurch bedingter Organverlust

Tabelle 4: Histologische Einteilung der BKVN.

Tabelle 5: IRFs und ihre Bedeutung für die Immunantwort.

Tabelle 6: Viruserkennung durch Rezeptoren der angeborenen Immunität.

Tabelle 7: Interferon-stimulierte Gene (ISGs) und ihrer Wirkung.

7.2. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:** Formeln zur Einschätzung der glomerulären Filtrationsrate
- Abbildung 2:** BK- Virus Genomstruktur
- Abbildung 3:** Intrazellulärer Transport von BK- Viruspartikeln
- Abbildung 4:** Diagnostische Mikroskopie
- Abbildung 5:** Immunhistologie, interstitielle Nephritis
- Abbildung 6:** Toll-like Rezeptoren und ihre pathogenassoziierten Liganden
- Abbildung 7:** Toll-like Rezeptoren und ihre zellinternen Signalwege
- Abbildung 8:** Erkennung von intrazellulärer dsRNA
- Abbildung 9:** Erkennung von DNA- Viren
- Abbildung 10:** Angeborene antivirale Immunität
- Abbildung 11:** Proliferationsassay Standardisierungskurve
- Abbildung 12:** RNA- Integritätskontrolle
- Abbildung 13:** IL-6 Produktion nach Stimulation von WT TECs aus der Zelllinie mit Oligonukleotiden
- Abbildung 14:** IL-6 Produktion bei Stimulation mit Oligonukleotiden unterschiedlicher Konzentration
- Abbildung 15a:** IL-6 Produktion in TRIF^{-/-} TECs
- Abbildung 15b:** IL-6 Produktion in MyD88^{-/-} TECs
- Abbildung 16:** MCP-1 Produktion nach Stimulation mit T-Ag und VP1
- Abbildung 17a:** IP10 mRNA Expression nach Stimulation mit T-Ag und VP1
- Abbildung 17b:** IP10 Elisa
- Abbildung 18:** zeitlicher Verlauf der IL-6 Antwort

- Abbildung 19:** Mx1 mRNA
- Abbildung 20:** IFN β mRNA
- Abbildung 21:** IFN γ ELISA
- Abbildung 22:** Stimulierbarkeit von TECs durch Interferone
- Abbildung 23:** IL-6 Produktion in stimulierten renalen dendritischen Zellen
- Abbildung 24:** Proliferation von TECs nach Ligandenstimulation
- Abbildung 25:** IFNAR1 Expression in WT und -/- Sv129 TECs
- Abbildung 26:** IL-6 Produktion in IFNAR-/- TECs nach Ligandenstimulation
- Abbildung 27:** Konfokale Mikroskopie der intrazellulären Verteilung von T-Ag
- Abbildung 28:** Apoptoseinduktion durch Oligonukleotidliganden in TECs
- Abbildung 29:** IPS1 Western Blot
- Abbildung 30:** Pathogenese der BKVN.

8. Verwendete Abkürzungen

ADAR1	Adenosindesaminase acting on RNA
AIM-2	absent in melanoma 2
APOBEC	Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like editing Complex
ASC	apoptosis-associated speck-like protein containing CARD
BKVN	BK- Virusnephritis
BSA	bovines Serumalbumin
CARD	caspase recruitment domain
Ccl2	CC-Chemokin-Ligand 2
CD	Cluster of differentiation
cDNA	komplementäre DNA
CHO- Zellen	chinese hamster ovary
CMV	Cytomegalievirus
CT	Cycle Threshold
CX3CR1	CXC- Motiv Chemokinrezeptor 1
DAI	DNA-dependent activator of IFN regulatory factors
DC	dendritic cell
ddH2O	doppelt deionisiertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
D-MEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
dNTP	desoxy- Nukleotidtriphosphat
dsRNA	double stranded RNA, doppelsträngige RNA
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (epidermal growth factor)
eIF2 α	eukaryotischer Initiationsfaktor 2 α
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FACS	fluorescence activated cell sorting
FADD	FAS-associated death domain-containing protein
FAM	Farbstoff für die RT-PCR
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein- Isothiocyanat
FSC	forward scatter
Fv	Friend virus susceptibility
GAPDH	Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase

GCN2	general control non-derepressible -2
GFP	green fluorescent protein
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
GM-CSF	Granulozyten/Monozyten colony stimulating factor
GN	Glomerulonephritis
HBSS	Hank´s balanced salt solution
H.-E.	Hämatoxylin- Eosin Färbung
HEPES	N-2-Hydroxyethyl-Piperazin-N'-2-Ethanesulfonsäure
HRP	horse radish peroxidase, Meerrettichperoxidase
IFN	Interferon
IFNAR	Interferon A Rezeptor
IKK-i/IKKe	induzierbare IκB kinase
IL	Interleukin
IPS1	IFN-β promoter stimulator 1
IRAK	Interleukin-1-Rezeptor assoziierte Proteinkinase
IRF3	interferon regulatory factor 3
ISG	interferon stimulated genes
ISRE	IFN-stimulated response element
ITSS	Insulin-Transferrin-Sodium-Selenit
LGP2	Laboratory of Genetics and Physiology-2
LRRs	leucine rich repeats
MACS	magnetic assisted cell sorting
MCP1	monocyte chemoattractant protein-1
MDA- 5	melanoma differentiation- associated gene 5
β-ME	β-Mercaptoethanol
mRNA	messenger RNA
Mx	myxovirus resistance 1
MyD88	myeloid differentiation factor 88
NCRR	non-coding regulatory region
NFκB	nuclear factor kappa B
NK- Zellen	natürliche Killerzellen
NLR	NOD-like Rezeptor
NOD	nucleotide oligomerization domain
ORI	origin of replication, Replikationsursprung
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PGE-1	Prostaglandin E1

PI	Propidiumiodid
PKR	Proteinkinase R
poly IC	poly Inosin- Cytosin RNA
PS	Phosphatidylserin
PVAN	Polyomavirus- assoziierte Nephropathie
PVDF Membran	PVDF Membrane Filter Paper Sandwich, Invitrogen
Rb	Retinoblastom Tumorsuppressorgen
RD	repressor domain
RHIM	RIP homotypic interactionmotif
RIG-I	Retinoic acid inducible gene I
RIP	receptor-interacting protein kinase
RIPA- Puffer	radioimmunoprecipitation assay- Puffer
RLH	RIG- like Helikase
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RNase	Ribonuclease
RPMI	Zellkultur-Medium zur Anzucht humaner Leukozyten, entwickelt von Roswell Park Memorial Institute
rRNA	ribosomale RNA
rTr	reverse Transkriptase
rtPCR	Realtime PCR
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese
siRNA	small inhibitory RNA
SSC	sideward scatter
ssRNA	single stranded RNA
Stat1	signal transducer and activation of transcription 1
T3	Trijodthyronin
T-Ag / t-Ag	large/small T Antigen
TANK	TNFR-associated factor family member-associated NF-kB activator
Taq-Polymerase	Polymerase aus dem Bakterium Thermus aquaticus
TBK1	TANK-binding kinase 1
TBS- Puffer	TRIS-buffered saline
TCR	T-Zell-Rezeptor
TIRAP	TIR domain-containing adaptor protein
TIR Domäne	Toll/II-1R homology
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TRAM	TRIF-related adapter molecule

TRAF 3	TNF-receptor-associated factor 3
TRIF	TIR domain-containing adaptor inducing IFN- β
TRIM 5 α	tripartite-motif containing 5 α
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
VP1	Viral protein 1
ZBP-1	z-DNA- binding protein 1

Danksagung

Im Rahmen dieser Dissertation habe ich zum ersten Mal in meinem Leben wissenschaftlich gearbeitet und habe Erfahrungen mit den zahlreichen Herausforderungen gesammelt, die Grundlagenforschung mit sich bringt. Zunächst ist man von einer unübersichtlichen Flut an Informationen überwältigt. Daher ist es von größter Bedeutung, dass man erfahrene Ansprechpartner hat, die einem den richtigen Weg zeigen, wenn man sich zu verlaufen droht. An dieser Stelle möchte ich mich von ganzem Herzen bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Hans-Joachim Anders, für seine Unterstützung, sein Vertrauen in meine Tätigkeit und für seine gewissenhafte Betreuung bedanken. Ich danke Ihm für die anregenden Diskussionen, für die Begeisterung, die er für sein Forschungsgebiet vermittelt und für seine hilfreichen Ratschläge, auch über den Umfang dieser Dissertationsarbeit hinaus.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Ramanjaneyulu Allam, Herrn Rahul Pawar und Frau Dr.med. Julia Lichtnekert, die mir beim Einstieg in die Laborarbeit mit Rat und Tat zur Seite standen und denen ich mich freundschaftlich verbunden fühle.

Dem gesamten Laborteam danke ich für die angenehme, internationale und offene Arbeitsatmosphäre.

Herrn Prof. Stefan Endres danke ich für die Betreuung im Rahmen des Graduiertenkollegs, das mit seinen inspirierenden Vorträgen, Seminaren und der Möglichkeit gleichgesinnte Kollegen kennenzulernen, eine hervorragende Plattform für junge Doktoranden darstellt.

Meinen Eltern und meinem Bruder danke ich für die Anteilnahme und Unterstützung.

Мила мамо, мили татко, мили Стефчо, надявам се да се гордеете така с мене, както аз със вас. От цяло сърце ви поздравявам!