

Modulation von Makrophagenfunktionen durch das Murine Zytomegalievirus (MCMV)

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Dipl. Biol. Stefan Kaulfuß
aus Dresden

November 2008

angefertigt am Robert Koch-Institut Berlin, im Zentrum für biologische Sicherheit,
Abteilung mikrobielle Toxine unter der Leitung von Frau Dr. Brigitte Dorner.

1. Gutachter:

Prof. Dr. Rupert Mutzel

Freie Universität Berlin

Institut für Pflanzenphysiologie und Mikrobiologie

Königin-Luise-Str. 12-16

14195 Berlin

2. Gutachter:

PD. Dr. Roland Grunow

Robert Koch-Institut

Zentrum für biologische Sicherheit (ZBS2)

Nordufer 20

13353 Berlin

Disputation am: 20.03.2009

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| Abkürzungen..... | 5 |
| 1 Einleitung..... | 7 |
| 1.1 Monozyten und Makrophagen..... | 7 |
| 1.1.1 Die Biologie der Makrophagen im Immunsystem..... | 7 |
| 1.1.2 Aktivierung von Makrophagen..... | 8 |
| 1.1.3 Makrophagensubpopulationen in der Maus und deren Oberflächenrezeptoren..... | 11 |
| 1.1.4 Toll-like Rezeptoren und die angeborene Immunität..... | 15 |
| 1.1.5 Funktionen der Makrophagen | 21 |
| 1.1.6 Antigenpräsentation | 23 |
| 1.1.7 T-Zellantwort..... | 24 |
| 1.2 Zytokine | 26 |
| 1.2.1 Chemotaktische Zytokine (Chemokine) | 27 |
| 1.3 Übersicht der Herpesviren | 30 |
| 1.4 Das Murine Zytomegalievirus (MCMV) | 31 |
| 1.4.1 Die Biologie des Murinen Zytomegalievirus | 31 |
| 1.4.2 Pathogenese der Zytomegalievirus Infektion | 32 |
| 1.4.3 Wirtsabwehr einer viralen Infektion | 32 |
| 1.4.4 MCMV Immunevasion und -modulation | 37 |
| 1.4.5 MCMV und Monozyten/ Makrophagen..... | 38 |
| Ziel der Arbeit..... | 41 |
| | |
| 2 Material und Methoden..... | 43 |
| 2.1 Materialien | 43 |
| 2.1.1 Herkunft der verwendeten Reagenzien..... | 43 |
| 2.1.2 Herkunft der verwendeten Zelllinien..... | 46 |
| 2.1.3 Verwendete Mausstämme | 47 |
| 2.1.4 Herkunft und Eigenschaften der verwendeten Virenstammlösungen.. | 47 |
| 2.1.5 Herkunft der verwendeten Antikörper..... | 48 |
| 2.1.6 Geräte und Software | 50 |
| 2.1.7 Zusammensetzung von Medien und Lösungen..... | 50 |

| | |
|--|----|
| 2.2 Methoden | 52 |
| 2.2.1 Gewinnung von murinen Knochenmarksmakrophagen (BMM)..... | 52 |
| 2.2.2 Gewinnung von murinen peritonealen Exsudatzellen (PEC)..... | 52 |
| 2.2.3 Zellkultur | 53 |
| 2.2.4 Herstellung der Virenstammlösung | 54 |
| 2.2.5 Titration der Virenstammlösungen mittels Plaque-Assay | 56 |
| 2.2.6 In vitro Infektion..... | 57 |
| 2.2.7 In vitro Stimulation..... | 57 |
| 2.2.8 Kopplung von Antikörpern mit Digoxigenin | 58 |
| 2.2.9 Durchflusszytometrie..... | 59 |
| 2.2.10 Phagozytoseassay | 61 |
| 2.2.11 ELISA..... | 62 |
| 2.2.12 Bioplex-System (Cytometric bead assay) | 62 |
| 2.2.13 Klonierungen..... | 64 |
| 2.2.14 <i>Real time</i> PCR | 65 |
| 2.2.15 Konfokale Laserscanmikroskopie (cLSM)..... | 67 |
| 2.2.16 Transfektion von murinem TLR4..... | 68 |
| 2.2.17 Transfektionen | 72 |
| 2.2.18 Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)..... | 74 |
| 2.2.19 Immunoblot | 75 |
| | |
| 3 Ergebnisse | 77 |
| | |
| 3.1 Charakterisierung von Knochenmarksmakrophagen (BMM) und Peritonealen Exsudatzellen (PEC) | 77 |
| 3.1.1 Expression von Oberflächenmarkern auf BMM..... | 77 |
| 3.1.2 Expression von Oberflächenmarkern auf PEC..... | 80 |
| 3.1.3 Stimulation von Makrophagen mit Lipopolysaccharid (LPS) | 80 |
| 3.2 Infektion von Makrophagen mit dem Murinen Zytomegalievirus (MCMV) | 82 |
| 3.3 Einfluss der MCMV-Infektion auf die Funktionalität von Makrophagen | 84 |
| 3.3.1 MCMV verhindert die Produktion von verschiedenen proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen durch Makrophagen <i>in vitro</i> | 84 |

| | | |
|------------|---|------------|
| 3.3.2 | MCMV blockiert die Produktion von Zytokinen und Chemokinen in ruhenden und aktivierten Makrophagen. | 90 |
| 3.3.3 | MCMV blockiert die Transkription von Chemokinen in BMM | 105 |
| 3.3.4 | MCMV reguliert die Expression des Toll-like Rezeptors 4/ MD-2 Komplexes herab..... | 107 |
| 3.3.5 | Analyse von Oberflächenrezeptoren auf MCMV-infizierten BMM im Vergleich zu TLR4 | 118 |
| 3.3.6 | Analyse weiterer Funktionen von Makrophagen bei einer MCMV-Infektion..... | 121 |
| 3.3.7 | Der Einfluss der MCMV Infektion auf die Funktionalität anderer Zellen | 126 |
| 3.4 | Die Suche nach dem viralen Gen, dass für die Blockade der Chemokinproduktion verantwortlich ist..... | 128 |
| 4 | Diskussion | 133 |
| 4.1 | Makrophagen | 133 |
| 4.2 | Die Aktivierung von Makrophagen | 134 |
| 4.3 | Einfluss von MCMV auf die Makrophagenfunktionen | 135 |
| 4.3.1 | Endozytose/ Herabregulation der TLR2 und 4 | 135 |
| 4.3.2 | Die MCMV Infektion verursacht eine Verlängerung der Überlebensdauer von BMM in vitro. | 136 |
| 4.3.3 | Der Einfluss der MCMV Infektion auf die Phagozytose und die Expression von iNOS | 136 |
| 4.3.4 | Infektion von aktivierten BMM | 137 |
| 4.4 | Der Einfluss von MCMV auf andere Zelltypen | 139 |
| 4.5 | Parakrine Effekte der MCMV-Infektion auf die uninfizierten Zellen. ... | 139 |
| 4.6 | Einordnung der Ergebnisse in das immunologische Gesamtgeschehen | 141 |
| 4.6.1 | Lokale Immunsuppression durch die akute MCMV-Infektion | 141 |
| 4.6.2 | Der Einfluss von MCMV auf die weitere Ausrichtung der Immunantwort | 143 |
| 4.7 | Ausblick | 147 |
| 5 | Zusammenfassung | 149 |

| | | |
|----------|---|-----|
| 6 | summary | 151 |
| 7 | Literaturverzeichnis | 153 |
| 8 | Anhang | 167 |
| | Ausgewählte Zytokine und Wachstumsfaktoren | 167 |
| | Vektorkarten | 169 |

Abkürzungen

| | |
|-------|--|
| APC | Allophycocyanin |
| APZ | Antigen-präsentierende Zelle |
| BMM | <i>bone marrow macrophages</i> , Knochenmarksmakrophagen |
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| CD | <i>cluster of differentiation</i> |
| cLSM | konfokale Laserscanmikroskopie |
| D-MEM | <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DZ | Dendritische Zelle |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| ELISA | <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> |
| FACS | <i>fluorescence activated cell sorting</i> |
| FITC | Fluorescein |
| GFP | Grün fluoreszierendes Protein |
| HRP | <i>horseradish peroxidase</i> |
| IE | <i>immediately early</i> |
| IFN | Interferon |
| Ig | Immunglobulin |
| IL | Interleukin |
| iNOS | induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase |
| KO | <i>knockout</i> |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| MCMV | Murines Cytomegalovirus |
| MCS | <i>multiple cloning site</i> |
| M-CSF | <i>macrophage colony-stimulating factor</i> |
| MES | Mononucleäres Phagozyten System |
| MHC | <i>major histocompatibility complex</i> |
| MIP | <i>macrophage inflammatory protein</i> |
| moi | <i>multiplicity of infection</i> |
| mRNA | <i>messenger RNA</i> |
| MW | Molekulargewicht |
| MyD | <i>myeloid differentiation factor</i> |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PAMP | <i>pathogen-associated pattern</i> |
| PBS | <i>phosphate buffered saline</i> |
| PCR | Polymerasekettenreaktion |
| PE | Phycoerythrin |
| PEC | Peritoneale Exsudatzellen |
| pfu | <i>plaque forming unit</i> |
| PGN | Peptidoglycan |
| PI | Propidiumjodid |
| POD | Peroxidase |

Abkürzungen

| | |
|---------|---|
| PRR | <i>pattern recognition receptors</i> |
| PVDF | Polyvinylidenfluorid |
| qRT-PCR | quantitative <i>real time</i> PCR |
| RANTES | <i>regulated upon activation, normal T cell expressed, and secreted</i> |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RT | Raumtemperatur |
| SDS | <i>sodium dodecyl sulfate</i> |
| TLR | Toll-like Rezeptor |
| TNF | Tumor Nekrose Faktor |
| TZR | T-Zellrezeptor |
| UV | Ultraviolettstrahlung |
| WT | Wildtyp |
| YFP | Gelb (<i>yellow</i>) fluoreszierendes Protein |

1 Einleitung

1.1 Monozyten und Makrophagen

1.1.1 Die Biologie der Makrophagen im Immunsystem

Der Begriff „Makrophage“ wurde von Elie Metchnikov eingeführt, um große mononukleäre phagozytierende Zellen zu beschreiben, die er in Geweben beobachtete [1]. Makrophagen gehören zum Mononukleären Phagozyten System (MPS), zu welchem auch deren Vorläuferzellen, die Monozyten, gezählt werden [2]. Ontogenetisch stammen die Makrophagen in Säugetieren von Zellen im Knochenmark ab, das neben residenten Makrophagen auch deren Vorläuferzellen: Monozyten, Promonozyten und Monoblasten enthält.

Man geht davon aus, dass im Knochenmark neu entstandene Monozyten in den Blutkreislauf übertreten. Periphere Blutmonozyten migrieren in extravaskuläre Gewebe, wo sie sich zu Makrophagen ausdifferenzieren [3]. Im Einzelnen folgt nach der Adhärenz an das Endothelium eine Diapedese zwischen den Endothelzellen hindurch und nachfolgend die Migration durch die subendothelialen Strukturen.

Die Makrophagen in Geweben und Organen stellen keine konstante Zellpopulation dar, sondern werden durch einen ständigen Influx von neuen Makrophagen regelmäßig erneuert. Abhängig von ihrer Lokalisation werden die Zellen des MPS definiert (s. Tabelle 1.1)

Tabelle 1.1: Lokalisation und Definition der Zellen des MPS (Auszug aus [4])

| Lokalisation | Zellen/ Definitionen |
|-----------------|---|
| Knochenmark | Monoblasten Promonozyten Monozyten Makrophagen |
| Peripheres Blut | Monozyten |
| Gewebe/Organe | |
| · Leber | Kupffer Zellen |
| · Lunge | Alveolare Makrophagen |
| · Bindegewebe | Histiozyten |
| · Milz | Makrophagen der roten Pulpa: · <i>marginal zone macrophages</i> · <i>metallophilic marginal macrophages</i> |
| · Knochen | Osteoklasten |

| Lokalisation | Zellen/ Definitionen |
|------------------------|---|
| Zentrales Nervensystem | Mikroglia |
| Körperhöhlen | Pleurale Makrophagen Peritoneale Makrophagen |
| Entzündungen | Exsudat Makrophagen |

Während einer akuten Entzündungsreaktion steigt die Zahl der Blutmonozyten aufgrund einer gesteigerten Produktion von Vorläuferzellen im Knochenmark an [5].

Es ist bekannt, dass Makrophagen aus der Leber, der Lunge und dem Darm in die drainierenden Lymphknoten wandern, die sie aber nicht wieder verlassen, weswegen davon ausgegangen werden kann, dass diese dort sterben [4].

Die humorale Kontrolle der Monozyten- und Makrophagenentwicklung wird von anderen Zellen, unter ihnen Zellen des Immunsystems, als auch durch Makrophagen selbst reguliert.

Makrophagen synthetisieren und sezernieren mindestens zwei hämatopoetische Wachstumsfaktoren, den *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) [6] und den *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF) [7], welche die Produktion und Funktion von mononukleären Phagozyten stimulieren. Makrophagen produzieren und sezernieren zusätzlich Zytokine, wie IL-1 und Tumor Nekrose Faktor (TNF), die nicht-hämatopoetische Zellen, wie Fibroblasten und Endothelzellen zur Produktion von GM-CSF und M-CSF anregen. M-CSF (CSF-1) ist ein Glycoprotein, welches die Vorläuferzellen im Knochenmark stimuliert, in reife Monozyten zu differenzieren und deren Lebensdauer verlängert [8]. Es verstärkt die Expression von Differenzierungsantigenen und stimuliert die chemotaktischen und phagozytotischen Aktivitäten der Monozyten.

1.1.2 Aktivierung von Makrophagen

Der Prozess der Differenzierung von Blutmonozyten zu Gewebemakrophagen führt zu einer Reihe von strukturellen und funktionalen Änderungen in den Zellen. Im Vergleich zu Monozyten sind Makrophagen größer und ihr Zytoplasma verfügt über eine große Zahl von Granulae, Vakuolen und lysosomalen Kompartimenten. Makrophagen verfügen über eine erhöhte Anzahl von Mitochondrien und eine höhere Aktivität der mitochondrialen Enzyme.

Zusätzlich kommt es zur Expression verschiedenster Rezeptoren für Immunglobuline, Komplementproteine, Lipoproteine, Chemokine und Zytokine, wodurch Makrophagen in Interaktion mit ihrer Umgebung und den Mediatoren des Immunsystems treten. Differenzierte Makrophagen sind verstärkt phagozytotisch, haben eine erhöhte mikrobizide Wirkung durch die Produktion von Sauerstoffradikalen, sind tumorizid und nehmen an der Antigenprozessierung und -präsentation teil. Des Weiteren sezernieren sie Enzyme, Komplementkomponenten, Koagulationsfaktoren und Zytokine [9].

Abhängig vom exogenen Signal müssen verschiedene Formen von aktivierten Makrophagen unterschieden werden. Diese aktivierten Makrophagen unterscheiden sich in der Expression diverser Rezeptoren und sezernierter immunologisch relevanter Produkte (s. Tabelle 1.2). Auf dem klassischen Weg aktiviert werden Makrophagen durch Signalkaskaden, die durch IFN- γ und TNF- α ausgelöst werden.

Alternativ aktiviert werden Makrophagen, wenn sie einem IL-4 Stimulus ausgesetzt sind. Nachfolgend wird unter anderem der IL-1 Rezeptor exprimiert und IL-10 sezerniert. Diese Makrophagen sind keine Antigenpräsentierenden Zellen, haben aber eine regulatorische Funktion, indem sie eine T-Zell Proliferation und möglicherweise die klassische Aktivierung weiterer Makrophagen im Umfeld unterdrücken.

Die Bezeichnung TypII-aktivierte Makrophagen stammt von der Aktivierung der Makrophagen durch Antigen-IgG-Komplexe, die an den Fc γ -Rezeptor binden und einem zweiten Stimulus, beispielsweise über TLR- oder CD40-Ligandbindung. Auch diese Makrophagen sezernieren IL-10 und haben daher antiinflammatorische Eigenschaften, sind aber in der Lage, T_{H2}-Zytokine in T-Zellen und damit einen T_{H2}-Klassenwechsel zu induzieren.

Tabelle 1.2: Aktivierung von Makrophagen: Vergleich funktioneller Eigenschaften [10]

| | klassisch aktivierte Makrophagen | alternativ aktivierte Makrophagen | TypII-aktivierte Makrophagen |
|----------------------|--|---|---|
| aktivierende Stimuli | IFN- γ , TNF | IL-4, Glukokortikoide | TLR-Agonisten, IgG Komplexe |
| sekretierte Produkte | \uparrow TNF, \uparrow IL-12 IL-1, IL-6 | \uparrow IL-1RA, \uparrow IL-10 | \uparrow IL-10, TNF, IL-6 |
| biologische Marker | \uparrow MHCII, \uparrow CD86, \downarrow Mannoserezeptor | \uparrow Mannoserezeptor, \uparrow scavenger rezeptor, \uparrow CD23, \downarrow CD14, | \uparrow MHCII, \uparrow CD86 |
| killer molecules | NO, O ₂ ⁻ | | (NO, O ₂ ⁻) [*] |
| Chemokinproduktion | IP-10, MIP-1 α , MCP-1 | AMAC-1 (CCL18) | |

* = die gleichzeitige Sekretion von IL-10 inhibiert benachbarte Zellen *killer molecules* zu bilden. IFN = Interferon, TNF = *tumor necrosis factor*, IL = Interleukin, TLR = Toll-like Rezeptoren, IgG = Immunglobulin G, MHCII = *major histocompatibility complex class II*, IP-10 = Interferon-induzierbares Protein 10, AMAC-1 = Alternatives Makrophagenaktivierung assoziiertes CC-Chemokin -1, MIP-1 α = *macrophage inflammatory protein-1 α* , MCP-1 = *monocyte chemoattractant protein-1*

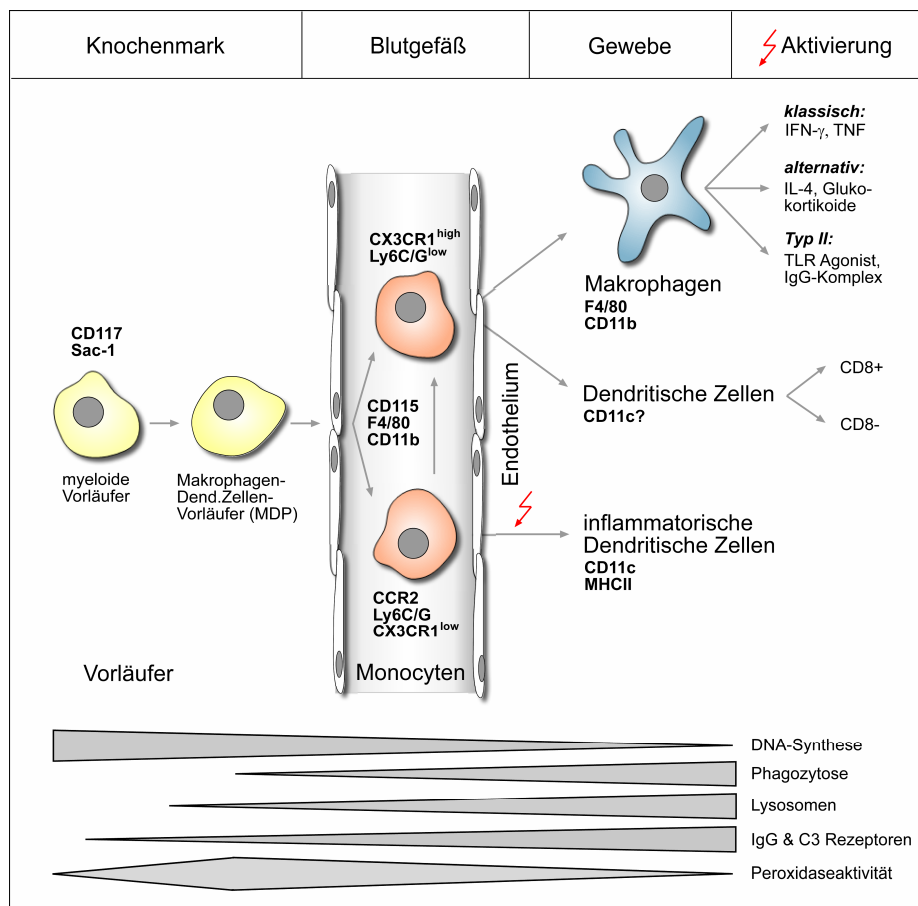


Abb. 1.1: Model der Makrophagenentwicklung (modifiziert nach [4],[11]). Makrophagen entwickeln sich aus Vorläuferzellen des Knochenmarks. Diese Vorläuferzellen differenzieren sich zu zwei zirkulierenden Monozytensubpopulationen, die durch verschiedene Marker unterscheidbar sind. Die unterschiedlichen zirkulierenden Monozyten entwickeln sich abhängig von parakrinen Signalen zu verschiedenen Endpopulationen, darunter auch die F4/80⁺/CD11b⁺ Gewebsmakrophagen.

1.1.3 Makrophagensubpopulationen in der Maus und deren Oberflächenrezeptoren

Abhängig von ihrer Entwicklungsstufe besitzen Monozyten und Makrophagen verschiedene Oberflächenrezeptoren, um spezifische Aktivitäten wie Wachstum, Differenzierung, Aktivierung, Pathogenerkennung, Endozytose, Migration und Sekretion zu kontrollieren. In nachfolgender Tabelle sind einige Rezeptortypen und deren Liganden aufgeführt. Fc-Rezeptoren sind in der Lage, den konservierten Fc-Teil von Immunglobulinen (Antikörper) zu binden. Diese Bindung kann verschiedene Funktionen wie die Endozytose von Antikörper gebundenen Antigenen oder die Freisetzung von Immunmediatoren auslösen.

Komplementrezeptoren binden bestimmte Proteine des Komplementsystems, die fremde Partikel opsonieren, die dann von den Makrophagen aufgenommen und abgebaut werden.

Das Zusammenspiel aller Zellen des Immunsystems als auch der Körperzellen beruht unter anderem auf der Kommunikation durch chemische Botenstoffe. Makrophagen besitzen ein großes Repertoire an Zytokinrezeptoren, durch deren Signalvermittlung sie im Immunsystem integriert sind. Einige dieser Zytokine wie IFN- γ , IFN- α , TNF- α , IL-2 und IL-4 sind an der Aktivierung von Makrophagen unmittelbar beteiligt.

Chemokinrezeptoren binden Chemokine, die als chemotaktische Zytokine eine Untergruppe der Zytokine darstellen und typischerweise eine Migration der Zielzellen verursachen. Die meisten Oberflächenrezeptoren von Makrophagen sind nicht zelllinienspezifisch. Oberflächenantigene, welche auf nahezu allen Makrophagentypen exprimiert werden, sind F4/80 und CD11b.

Tabelle 1.3: Verschiedene Oberflächenrezeptoren von Makrophagen

| | |
|----------------------|---|
| Fc Rezeptoren | IgG2a, IgG2b/IgG1, IgG3, IgA, IgE |
| Komplementrezeptoren | C3b, C3d, C3bi, C5a, C1q |
| Zytokinrezeptoren | IL-1R, IL-2R, IL-3R, IL-4R, IL-6R, IL-7R, IL-10R, IL-13R, IL-16R, IL-17R, IFN- α / β R, IFN- γ R <i>Colony-stimulating factors receptors</i> (GM-CSFR, CD115) |
| Chemokinrezeptoren | CCR1, CCR2, CCR5, CCR8, CCR9, CXCR1, CXCR2, CXCR4, CX3CR1 |
| TLRs | TLR1 und 2, TLR4 - 6 |
| Oberflächenantigene | MHC-I, -II, CD14, CD11b, F4/80 |

A.) CD14

Der *pattern recognition receptor* CD14 ist ein Glykosylphosphatidylinositol (GPI) verankerter Oberflächenrezeptor, der ursprünglich als das hauptsächliche LPS-Bindeprotein in Säugetieren identifiziert wurde [12], [13]. CD14 ist kein Signalrezeptor, sondern assoziiert mit TLR4, der die Signaltransduktion nach der LPS-Bindung initiiert. CD14 kann als lösliches Molekül im Serum gefunden werden und kann daher auch zur Aktivierung von Zellen beitragen, die selbst CD14 nicht exprimieren [14]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass CD14 auch Funktionen bei der Erkennung von Viren hat. So wird die Aktivierung von Zellen durch das *Respiratory syncytial virus* (RSV) über TLR4 durch CD14 verstärkt [15]. CD14 scheint aber nicht zwingend mit TLR4 assoziiert zu sein, da das Humane Zytomegalievirus (HCMV) über den TLR2 und CD14 erkannt wird [16] und CD14 auch mit TLR3 interagieren kann [17], [18].

B.) F4/80

Der Oberflächenrezeptor F4/80 ist ein *EGF-like (epidermal growth factor) module containing receptor* und ein Makrophagenmarker. Neben Makrophagen exprimieren auch Granulozyten diesen Rezeptor. Allerdings exprimieren nicht alle Makrophagensubpopulationen F4/80, wie beispielsweise die *marginal zone macrophages* (MZM) und die *marginal metallophilic macrophages* (MMM) der Milz. F4/80 wird mit der Induktion immunologischer Toleranz in Verbindung gebracht, wobei die genaue Art und Weise der Funktion noch unbekannt ist [19].

C.) CD11b/ Mac-1

Der Oberflächenrezeptor CD11b ist ein α -Integrin. Integrine bilden eine große Gruppe von Transmembranrezeptoren, die als Rezeptoren für Zelladhäsionsmoleküle dienen. Integrine sind häufig heteromere Proteine, CD11b bildet eine α -Untereinheit des β_2 -Integrins CR3 (CD11/CD18). CD11b bindet unter anderem an die Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und -2, welche auf Endothelzellen exprimiert werden. Die Expression und Funktion von CD11b auf Immunzellen dient daher der transendothelialen Migration [20].

Zusätzlich scheint CD11b auch an der antikörperabhängigen Phagozytose durch Makrophagen beteiligt zu sein [21] in dem es die Bindung von Immunglobulin A vermittelt [22], durch den Fc γ -Rezeptor mobilisiert wird [23]. Es konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass CD11b essentiell für die phagozytotische Internalisierung von *Bacillus anthracis* Sporen ist [24]. Außerdem ist CD11b als Bestandteil von CR3 an der Degradation der Interleukin-1 Rezeptor assoziierten Kinase (IRAK) 4 nach einem Toll-like Rezeptor 4 Signal beteiligt [25]. Des Weiteren könnte CD11b/CD18 ein möglicher zusätzlicher LPS-Rezeptor sein, da die Expression von CD11b/CD18 (oder CD11c/CD18) in CD14⁻ *Chinese hamster ovary* (CHO) Zellen zu einer LPS-Reaktion führte [26] und das Fehlen von CD11b zu einer deutlichen Verringerung der Neutrophilenmigration nach LPS-Inhalation in die Lunge führte [27]. Darüber hinaus konnte auch eine CD11b-abhängige T_{H17}-Suppression durch Antigenpräsentierende Zellen gezeigt werden, wodurch die Entwicklung einer peripheren, oralen Toleranz gegenüber Antigenen erleichtert wird [28]. Schließlich scheint es eine CD40-unabhängige Interaktion des CD40-Liganden mit CD11b zu geben, die damit einen alternativen Signalweg für die CD40L-abhängige Entzündungsreaktion bildet [29].

1.1.3.1 Moleküle zur Mustererkennung (*pattern recognition molecules*)

Die Oberfläche von Mikroorganismen besteht aus sich wiederholenden Strukturen von organischen Molekülen, von denen bestimmte Formen nicht auf den Zellen höherer Organismen vorkommen. Dazu gehören auch Moleküle, die in einer bestimmten Form nur innerhalb von Mikroorganismen und Viren vorkommen. Diese konservierten, pathogenassoziierten Strukturen (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) können von den meisten Zellen, darunter auch die Makrophagen eines höheren Organismus, detektiert werden. Diese Detektion wird durch Rezeptoren vermittelt, die als *pattern recognition molecules* oder *pattern recognition receptors* (PRR) bezeichnet werden. Eine Bindung des Mikroorganismus an Phagozyten über diese Rezeptoren führt zur Phagozytose und Elimination des Mikroorganismus durch die Phagozyten, letztere werden durch die Bindung eines pathogenassoziierten Moleküls aktiviert.

Zu den PAMPs gehören beispielsweise bakterielle Zellwandmoleküle, wie Lipopolysaccharide (LPS) oder Peptidoglycan (PGN), oder aber virale, unmethylierte DNA-Motive (CpG).

PRRs können in drei Klassen unterteilt werden: sekretierte, endozytische und *signaling* Rezeptoren.

A.) sezernierte PRRs

Sezernierte PRRs sind PAMPs bindende und opsonierende Proteine oder Proteinkomplexe, die von spezialisierten Zellen sezerniert werden.

B.) endozytische PRRs

Eine Bindung des Mikroorganismus an Makrophagen über diese Rezeptoren führt zur Phagozytose und Elimination des Mikroorganismus. Die Makrophagen werden durch die Bindung eines pathogenassoziierten Moleküls aktiviert. Nach der lysosomalen Degradation und der intrazellulären Prozessierung der Antigene des phagozytierten Mikroorganismus können diese den T-Zellen über die MHCII Moleküle präsentiert werden. Zu dieser Klasse von Rezeptoren gehören beispielsweise die Mannoserezeptoren, welche bestimmte repetitive Mannosemotive auf der Oberfläche von Mikroorganismen erkennen [30].

C.) *Signaling* Rezeptoren

Die Gruppe der *signaling* Rezeptoren umfasst die Mitglieder der Toll-like Rezeptoren (TLR). Durch Bindung eines pathogenassoziierten Liganden wird über eine zytoplasmatische Signaldomäne eine Signalkaskade initiiert, die zur Aktivierung verschiedenster Transkriptionsfaktoren und damit zur Expression immunologisch relevanter Gene wie inflammatorischer Zytokine und kostimulatorischer Moleküle führt. Weitere PRR sind die Familie der *nucleotide-binding oligomerization domain* (NOD), welche intrazytoplasmatische, bakterielle Peptidoglykane erkennen können [31], [32]. Sowie die Rezeptoren RIG-I (*retinoic acid-inducible gene-1*) [33] und MDA-5 (*melanoma-differentiation associated gene-5*) [34], die der Detektion von intrazellulärer doppelsträngiger RNA dienen.

1.1.4 Toll-like Rezeptoren und die angeborene Immunität

TLR sind an der Erkennung verschiedenster mikrobieller Pathogene, darunter Bakterien, Pilze, Viren und Protozoen, beteiligt [35], [36]. Der Name Toll-like ist von einem *Drosophila melanogaster* Protein abgeleitet, dem die TLR strukturell ähnlich sind. TLR sind nicht nur in allen Vertebraten zu finden, sondern auch in niedrigeren Organismen, was die Vermutung nahe legt, dass es sich hierbei um evolutionär sehr alte Strukturen handelt.

1.1.4.1 TLR und ihre Liganden

Toll-like Rezeptoren sind sowohl auf der Zelloberfläche als auch in Endosomen der Zelle lokalisiert. Dadurch ist es der Zelle möglich, sowohl extra- als auch intrazelluläre (nur endosomale) pathogenassoziierte Moleküle zu erkennen. In Säugetieren sind bisher 11 strukturell eng verwandte TLRs gefunden wurden, wobei die TLR1-9 zwischen Mäusen und Menschen konserviert sind und auch die jeweils gleiche Art PAMPs erkennen.

Tabelle 1.4: Murine TLR und ihre Liganden nach [36]

| Rezeptor | Lokalisation | Ligand (PAMP) und Rezeptor-dimerisierungen | Assoziiertes Pathogen |
|------------------|-----------------------------|---|---|
| TLR1 | Oberfläche | (Heterodimerisierung mit TLR2) | |
| TLR2 | Oberfläche | (Heterodimerisierung mit TLR1 oder TLR6 und anderen PRR) Lipoproteine/ Lipopeptide, Peptidoglykane und Lipoteichonsäuren Lipoarabinomannan, Zymosan, untypische Lipopolysaccharide | diverse Pathogene gram-positive Bakterien Mykobakterien Pilze gram-negative Bakterien |
| TLR3 | Endosomen | dsRNA | Viren |
| TLR4 | Oberfläche | (Homodimerisierung) Lipopolysaccharide (LPS) Taxol | gram-negative Bakterien <i>Taxus brevifolia</i> |
| TLR5 | Oberfläche (basolateral) | Flagellin | bakterielle Flagella |
| TLR6 | Oberfläche | (Heterodimerisierung mit TLR2) | |
| TLR7 und TLR8 | Endosomen | guanosin- und uracilreiche ssRNA (Imidazoquinoline, Loxoribin) | Viren |
| TLR9 | Endosomen | unmethylierte DNA (CpG) | bakterielle DNA Viren |
| TLR10 | Oberfläche | (Ohne Funktion) | |
| TLR11 | Oberfläche | noch nicht identifiziert | uropathogene Bakterien |

Nach der Bindung seines Liganden wird der TLR2 [37] in phagosomale Kompartimente der Zelle geleitet. Das trifft wahrscheinlich auch für den TLR4 zu, ist aber noch umstritten [38], [39]. Durch die zusätzliche endosomale Lokalisation von TLR3, TLR7 und TLR9 wird davon ausgegangen, dass phago- und endolysosomale Kompartimente die Hauptorte der Erkennung von PAMP durch TLR sind. Die Toll-like Rezeptoren der Zelloberfläche sind einerseits zur Auslösung der Signalkaskaden, die zur Expression von inflammatorischen Zytokinen und kostimulatorischen Molekülen führen und andererseits zur vollständigen Phagozytose und nachfolgender Degradation von Mikroorganismen notwendig [40].

1.1.4.2 Struktur und Signalkaskaden

Toll-like Rezeptoren gehören zur Familie der Toll/ IL-1 Rezeptorfamilie. Die Stimulation von TLR verursacht die Expression verschiedener Gene, die an der Immunantwort beteiligt sind. Die Bindung eines Liganden fördert die Dimerisierung von TLR. TLR2 kann hierbei beispielsweise mit TLR1 oder TLR6 Heterodimere bilden. TLR4 bildet nach der Ligandenbindung Homodimere. Die Dimerisierung von TLR löst die Aktivierung der nachgeschalteten Signalkaskaden aus, die ihren Ursprung in einer zytoplasmatischen Toll/ IL-1 Rezeptordomäne (TIR) Domäne haben. Der weitere Verlauf der Signalkaskaden der TLR ist divergent. Diese Divergenz ist definiert durch die Verwendung des „TIR-Domäne-enthaltenden“ Adaptermoleküls MyD88 (*myeloid differentiation factor 88*). Hierbei kann zwischen MyD88-abhängigen und MyD88-unabhängigen Signalkaskaden unterschieden werden. Der TLR3-Signalweg ist dabei MyD88-unabhängig [41], wohingegen der TLR4-Signalweg sowohl durch den MyD88-abhängigen, als auch durch den MyD88-unabhängigen führt.

1.1.4.3 Die MyD88-abhängige Signalkaskade

Nach der Bindung von MyD88 an die TIR-Domäne des TLR wird die Phosphorylierung und Aktivierung von IRAK-1 (*IL-1 receptor associated kinase-1*) durch IRAK-4 ermöglicht. IRAK-1 assoziiert daraufhin mit TRAF6 (*tumor necrosis factor receptor associated factor 6*), was zur Aktivierung von zwei verschiedenen Signalwegen führt (siehe Abbildung 1.2).

Einer dieser Signalwege führt über die Aktivierung von MAP (*mitogen-activated protein*) Kinasen zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1. Der zweite Signalweg aktiviert den TAK1/TAB (*TGFβ-activated kinase/ TAK1 binding protein*) Komplex, welcher über die Aktivierung des IKK Komplexes zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB (*nuclear factor for the induction of Ig kappa chain in B cells*) führt.

1.1.4.4 Die MyD88-unabhängige/ TRIF abhängige Signalkaskade

In MyD88-defizienten Mäusen ist die Aktivierung von NFκB verzögert [41, 42]. Das bedeutet, dass neben dem MyD88-abhängigen Signalweg ein weiterer MyD88-unabhängiger Weg existiert. Die Aktivierung des TLR führt hierbei durch die Assoziation der Adaptermoleküle TRAM (*TRIF-related adaptor molecule*) und TRIF (*TIR-domain containing adaptor inducing interferon-β*) zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors IRF-3 (*interferon regulatory factor-3*) [43] (siehe Abbildung 1.2). Das führt neben anderem zur Produktion von Interferon-β (IFN-β), welches wiederum über den IFN-α/β Rezeptor den JAK-STAT (*janus kinase/ signal transducer and activator of transcription*) Signalweg auslöst und damit den Transkriptionsfaktor STAT-1 aktiviert [44], [45].

Tabelle 1.5: Transkriptionsfaktoren im TLR-Signalweg und deren Genprodukte (Auszug)

| Transkriptionsfaktor | Signalweg | Genexpression |
|----------------------|--|---|
| NFκB | MyD88-abhängig | Inflammatorische Zytokine: TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-12, IL-8, RANTES, MIP-1β, MIP-1α |
| AP-1 | MyD88-abhängig | wie NFκB |
| IRF-3 | MyD88-unabhängig | Kostimulatoren: CD80, CD86, CD40 Inflammatorische Zytokine: IFN-α, IFN-β, IP-10, MIG |
| STAT-1 | JAK-STAT Signalweg MyD88 unabhängig | IP-10, MIG |

IL = Interleukin, RANTES = *regulated upon activation, normal T cell expressed, and secreted*, MIP = Makrophagen inflammatorisches Protein, MIG = Monokin induziert durch IFN-γ, IP-10 = Interferon-induzierbares Protein-10

1.1.4.5 TLR und das Immunsystem

Durch die frühe und strukturspezifische Erkennung von Pathogenen und pathogenassoziierten Molekülen haben die TLR im Immunsystem eine strategisch entscheidende Rolle und sind ein wesentlicher Bestandteil der angeborenen Immunität. Zellen, die über den notwendigen TLR verfügen, können schon vor der spezifischen, adaptiven Immunantwort gegen ein Pathogen aktiviert werden und antimikrobielle Funktionen starten. Zusätzlich werden über die Aktivierung von TLR und deren Signalwege die zur Einleitung einer Immunantwort notwendigen proinflammatorischen, inflammatorischen und chemotaktischen Zytokine sowie kostimulatorische Moleküle exprimiert [46]. Hierbei können beispielsweise Zellen in der Umgebung durch IFN- α und - β angeregt werden, in einen antiviralen Zustand zu wechseln [47]. Der Kontakt mit einem TLR-Liganden bei Makrophagen und Dendritischen Zellen führt neben der Expression kostimulatorischer Moleküle auch zur Verstärkung der Fähigkeit der Antigenpräsentation. Neben Kostimulatoren präsentierte Antigene aktivieren T-Zellen, die den passenden T-Zellrezeptor tragen. Die Ligandbindung und Aktivierung der TLR ist also auch ein wichtiger Schritt in der Verschaltung von angeborener und adaptiver Immunantwort [48-50].

Zusätzlich tragen aber auch B- und T-Zellen Toll-like Rezeptoren, über die sie pathogenassoziierte Moleküle registrieren und so in ihrem Verhalten in einer Immunreaktion beeinflusst zu werden. Eine TLR-Aktivierung unterstützt die Ausbildung einer T_{H1}-Antwort [51].

Eine LPS-Intoxikation des Blutsystems eines Menschen kann zu einer exzessiven und damit zerstörerischen Immunreaktion, dem septischen Schock, führen.

Andere TLR sind an der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen, chronischen Entzündungen und Infektionskrankheiten beteiligt [52], [36], [53]. Aus diesem Grund ist eine negative Regulation des TLR-Signalweges notwendig.

Tatsächlich sind vor allem bei dem TLR4-Signalweg einige inhibitorische Regulatoren gefunden worden (s. Abbildung 1.2).

1.1.4.6 TLR und virale Infektionen

Im Gegensatz zur Erkennung bakterieller und mykologischer Produkte fehlt vielen Viren die notwendige pathogenspezifische Biochemie, die eindeutig identifizierbare Zielprodukte generiert, da ihr gesamter Replikationszyklus in der Wirtszelle stattfindet. Des Weiteren können virale Proteine durch schnelle Mutationen der initialen Erkennung entgehen. Die Detektion viraler Nukleinsäuren löst dieses Problem [54]. Bisher sind fünf verschiedene Toll-like Rezeptoren bekannt, die verschiedene Formen virale Nukleinsäuren und Proteine erkennen.

Tabelle 1.7: Virale Erkennung durch Toll-like Rezeptoren [35]

| TLR | Ligand | detektierbare Viren |
|--------|-----------------------|---|
| TLR2 | virale Proteine | Herpes simplex virus Murines Zytomegalievirus (MCMV) Humanes Zytomegalievirus (HCMV) Lymphozytisches choriomeningitis virus (LCMV) |
| TLR4 | virale Proteine | <i>Respiratory syncytial</i> virus (RSV) <i>Mouse mammary tumor</i> virus (MMTV) Coxsackie Virus |
| TLR3 | dsRNA | Reovirus Picornavirus* Alphavirus* Murines Zytomegalievirus (MCMV)** |
| TLR7/8 | ssRNA | Influenza virus <i>Vesikular stomatitis</i> virus (VSV) |
| TLR9 | unmethylierte CpG DNA | Herpes simplex virus Murines Zytomegalievirus (MCMV) Humanes Zytomegalievirus (HCMV) Adenovirus |

* = die dsRNA dieser Viren entsteht durch die Replikation des positiv-strang ssRNA-Genoms und wird erkannt nach der Phagozytose von apoptotischen Zellen, ** = die Quelle für die dsRNA während der MCMV-Infektion ist unklar, es sind aber MCMV-kodierte regulatorische RNAs beschrieben [55]

Eine gemeinsame Antwort aller TLR, die Nukleinsäuren detektieren, ist die Produktion von Typ I Interferonen. Diese Familie verwandter Zytokine hat die Fähigkeit, die virale Replikation zu blockieren [56] und die Differenzierung und Effektorfunktionen von Natürlichen Killerzellen (NK Zellen) und zytotoxischen T-Zellen zu beeinflussen, dieser Einfluss ist vom konkreten TLR und damit dessen Signalweg abhängig [35].

Neben der Stimulation von TLR durch Viren konnte auch gezeigt werden, dass verschiedene Viren den TLR Signalweg unterbrechen können. So hemmen die Proteine des Vaccinia Virus A46R und A52R die TLR-abhängige Aktivierung von NF κ B [57], [58]. Das Hepatitis C Virus (HCV) exprimiert dagegen eine viral kodierte Serinprotease (NS3/4A), die spezifisch TRIF degradiert, was zur Hemmung des TLR3-Signalwegs führt [59]. Gleichfalls gegen den TLR3-Signalweg gerichtet ist das MCMV-Protein M45, welches unter anderem durch Hemmung der Ubiquitylierung von RIP-1 den Signalweg unterbrechen soll [60].

1.1.4.7 Toll-Like Rezeptor 4

Die Erkennung von bakteriellen Lipopolysaccharid (LPS), Bestandteil der Zellwand gram-negativer Bakterien, erfolgt über den Toll-like Rezeptor 4 [61]. Zur effektiven Bindung und der Aufnahme von LPS und der Auslösung der Signalkaskade sind allerdings noch weitere Moleküle notwendig. Die Bindung von freiem LPS im Serum geschieht durch das Lipid-bindende Protein (LBP). Der LBP-LPS Komplex wird von dem Oberflächenrezeptor CD14 (\rightarrow CD14) der Zelle gebunden. Zusätzlich ist ein weiteres LPS-bindendes, sezerniertes Molekül (MD-2) notwendig, um schließlich über die vermutliche Bindung des gesamten Komplexes an TLR4 und dessen Dimerisierung die Signalkaskade auszulösen. Die nach LPS-Bindung einsetzende Signalkaskade führt sowohl über MyD88, als auch über den alternativen Weg des TRAF/TRIM Komplexes. Zusätzlich zu MyD88 ist noch ein weiteres Adaptermolekül, TIRAP (*TIR domain-containing adaptor protein*, auch bekannt als MAL: *MyD88 adaptor like*) notwendig (siehe Abbildung 1.2).

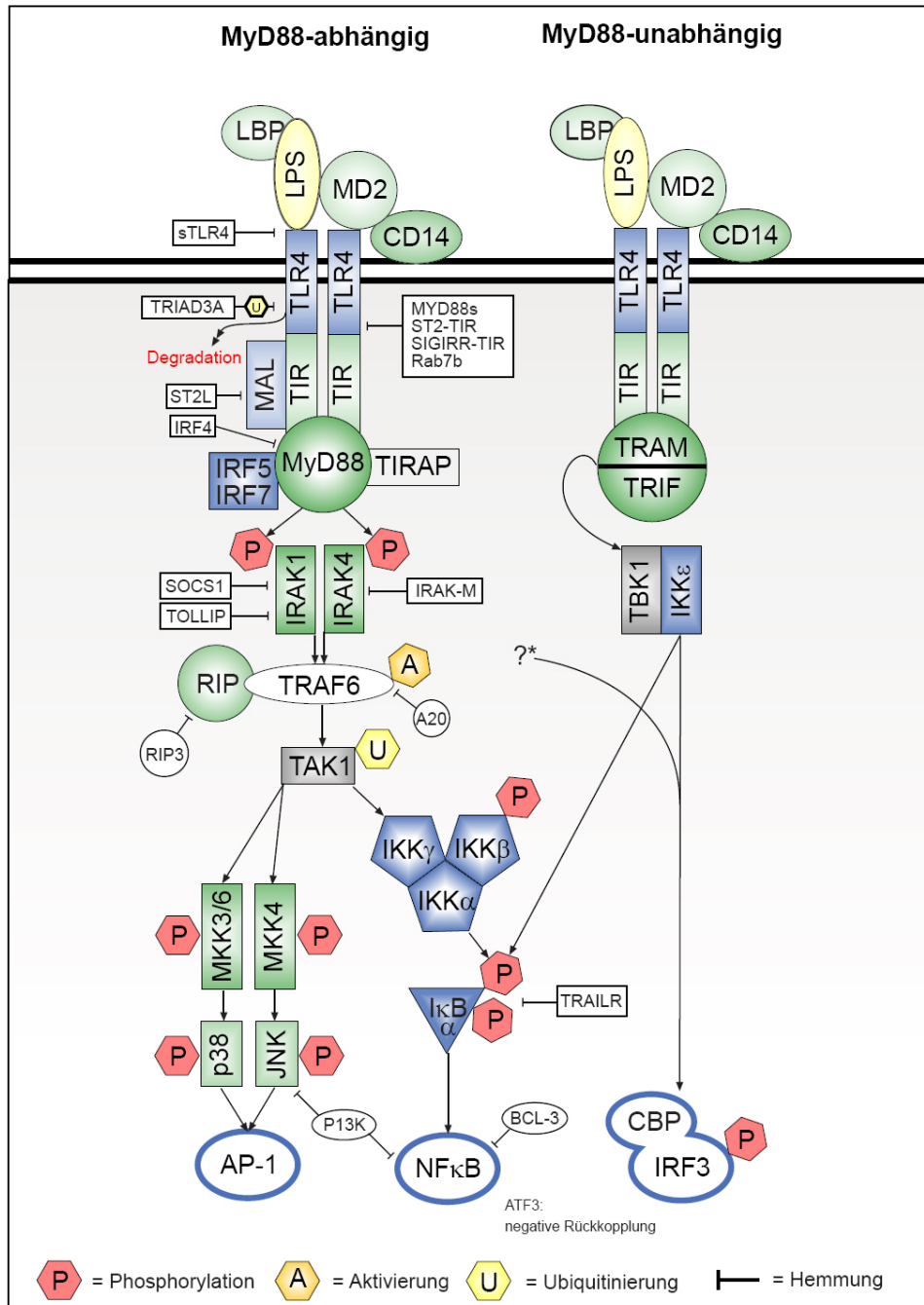


Abb. 1.2: TLR4 Signalkaskade und deren Inhibitoren [53], [45], [62]. Beschreibung siehe Text.

1.1.5 Funktionen der Makrophagen

1.1.5.1 Chemotaxis

Chemotaxis ist die gerichtete Bewegung von Zellen entlang eines Konzentrationsgradienten, eines chemotaktischen Faktors, beziehungsweise eines chemischen Lockstoffes (Chemoattraktant) oder Chemokins. Chemokine werden von den Makrophagen durch spezifische Chemokinrezeptoren erkannt.

Neben der eigenen Fähigkeit, auf chemotaktische Signale zu reagieren, produzieren aktivierte Makrophagen selbst eine Reihe von Chemokinen, die Zellen des Immunsystems anlocken.

Die Chemotaxis kann in vier Stufen unterteilt werden. Eine erste schwache Bindung der Zelle an das Endothelium wird durch Selektine vermittelt. Diese Selektine werden durch aktivierten Endothelzellen exprimiert und binden an Kohlenhydrate der Monozyten. Diese Bindung ist reversibel und kann die Zellen nicht gegen die Scherkräfte des Blutstroms verankern. Die Wirkung eines Chemokins wie MCP-1 auf die Monozyten erhöht deren Expression von Integrinen und die gleichzeitige Wirkung eines inflammatorischen Zytokins wie TNF- α verursacht die Expression von Adhäsionsmolekülen durch die Endothelzellen. Im zweiten Schritt der Chemotaxis wird dann eine engere Adhäsion durch die Bindung von Integrinen (z. B.: CD11b), an die Adhäsionsmoleküle (z. B.: ICAM-1) verursacht. Diese Bindung verankert die Monozyten am Endothelium. Die Monozyten gelangen im dritten Schritt durch eine Diapedese durch die Zwischenräume der Endothelzellen in das Gewebe (Extravasation). Die Basalmembran unter dem Endothelium wird dabei durch Matrixmetalloproteasen, die an der Oberfläche der Monozyten exprimiert sind durchbrochen. Im letzten Schritt migrieren die Monozyten innerhalb des Gewebes in Richtung der Chemokinquelle, welches üblicherweise das Zentrum einer Entzündungsreaktion ist.

Neben den Chemokinen, die in inflammatorische Reaktionen eingebunden sind, gibt es noch die homeostatischen Chemokine, die die Homeostase und Lokalisation einzelner Zellpopulationen im Ruhezustand steuern. Diese Chemokine dienen auch der Erneuerung des Bestandes an Makrophagen und Dendritischen Zellen in Geweben durch migrierende Monozyten.

1.1.5.2 Phagozytose und die Zerstörung von Mikroorganismen

Mononukleäre Phagozyten und Neutrophile stellen eine der ersten Verteidigungslinien des Organismus gegen das Eindringen und die Kolonisation durch Mikroorganismen wie Bakterien, Viren, Pilze und Protozoen dar. Hauptbestandteil dieser Abwehr ist die Phagozytose, also die zelluläre Aufnahme größerer Partikel bis hin zu ganzen Zellen.

Die Phagozytose ist wie die Pinozytose ein endozytotischer Prozess. Im Gegensatz zur Pinozytose, welche die unspezifische Aufnahme von niedermolekularen mit der Umgebungsflüssigkeit aufgenommenen Partikeln darstellt, ist die Phagozytose eine rezeptorvermittelte und damit spezifische Aufnahme. Die Phagozyten umschließen dabei den Mikroorganismus durch die Ausbildung von Zellausläufern, so genannten Pseudopodien. Der Mikroorganismus wird dabei entweder über bestimmte Rezeptoren (*pattern recognition receptors*) erkannt oder durch Proteine des Komplementsystems und/oder gebundene Antikörper opsoniert. Der Mikroorganismus wird dadurch in ein Vesikel, das Phagosom, eingeschlossen. Das Phagosom verschmilzt im Zellinneren mit Lysosomen, die hydrolytische Enzyme und Phosphatasen enthalten, das Phagolysosom wird gebildet. Die Zerstörung des Mikroorganismus erfolgt unmittelbar nach der Verschmelzung. Im Phagolysosom steigt der pH-Wert wodurch neutrale Proteasen und kationische Proteine aktiv werden, anschließend sinkt der pH-Wert wodurch saure Proteasen aktiv werden können. Unspaltbare Substanzen und Reste verbleiben als Einschlusskörperchen im Phagolysosom [63]. Die Aufnahme von Fremdanigenen führt zu einer Aktivierung der Phagozyten. Im Zuge dieser Aktivierung werden beispielsweise die Expression von MHCII und der kostimulatorische Moleküle CD80 und CD86 induziert, aber auch die Produktion und Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen. Pinozytierte Immunogene oder phagozytierte Pathogene, beziehungsweise deren zugehörige Proteine, werden prozessiert und den T-Zellen des Immunsystems präsentiert.

1.1.6 Antigenpräsentation

Neben den B-Zellen und Dendritische Zellen gehören auch die Makrophagen zu den professionellen Antigenpräsentierenden Zellen (APZ). Die professionellen APZ sind ein integraler Bestandteil des Immunsystems und besitzen sowohl MHCI, als auch MHCII zur Stimulation einer spezifischen Immunantwort. Die Unterschiede in den Funktionen zwischen den einzelnen APZ sind verantwortlich für die Bestimmung des weiteren Verlaufs einer Immunantwort.

Eine Immunantwort wird dann ausgelöst, wenn APZ Antigene gebunden an Moleküle des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) der Klassen I oder II an T-Zellen präsentieren und mindestens ein zweites kostimulatorisches, T-Zell-aktivierendes Signal angeboten wird. Eine Antigenerkennung in Abwesenheit eines Kostimulators führt zur T-Zell-Toleranz. Aktivierte T-Zellen (Effektor-T-Zellen) expandieren klonal und produzieren unter anderem immunregulatorische Zytokine. Allgemein verursacht eine MHCI-Antigenpräsentation bei gleichzeitiger Kostimulation eine Aktivierung von $CD8^+$ T-Zellen, wohingegen eine MHCII-abhängige Präsentation eine $CD4^+$ T-Zellenaktivierung verursacht. $CD8^+$ Dendritische Zellen sind in der Lage, lösliche Fremdanigene über den MHCII an $CD4^+$ T-Zellen, als auch über den MHCI an $CD8^+$ T-Zellen zu präsentieren, man spricht hier von *cross presentation*. Im Allgemeinen findet die Antigenpräsentation in den peripheren lymphatischen Geweben und Organen (beispielsweise Lymphknoten, Peyer'sche Plaques oder Milz) statt. Aktivierte APZ müssen also über die Lymphe in diese Gewebe einwandern, um auf antigenspezifische T-Zellen zu treffen und diese zu aktivieren.

1.1.7 T-Zellantwort

Peptide von endozytotisch bzw. endosomal aufgenommenen Pathogenen werden primär über MHCII präsentiert, welche von $CD4^+$ T-Zellen erkannt werden, die einen antigenspezifischen T-Zell Rezeptor (TZR) tragen. $CD4^+$ T-Zellen Antworten lassen sich bisher pauschal in vier Typen unterteilen [64] [65].

Die T-Zellantwort des Typs 1 ist hauptsächlich an der zellabhängigen Immunantwort gegen intrazelluläre Pathogene und Tumoren beteiligt. Die Typ 1-Antwort (T_{H1}) ist vor allem charakterisiert durch die Produktion der Zytokine IL-2, IFN- γ und TNF- α [66], sie aktiviert die mikrobiziden Eigenschaften von Makrophagen, führt zur Aktivierung von NK-Zellen und $CD8^+$ T-Zellen und fördert die Zytotoxizität.

Die Typ 2-T-Zellantwort (T_{H2}) wird durch die Präsentation endozytotisch aufgenommener Antigene stimuliert. Die T_{H2} -Antwort initiiert die humorale Immunantwort durch die Stimulation der Antikörperbildung von naiven B-Zellen. Sie ist charakterisiert durch die Produktion der Zytokine IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10. Diese Zytokine besitzen eine Reihe immunmodulatorischer Funktionen.

Die Typ 1-T-Zellantwort und die Typ 2-T-Zellantwort regulieren sich gegenseitig. Hierbei hemmt die Aktivität des einen Typs die Aktivität des anderen durch die Wirkung der produzierten Zytokine. So wird die Ausbildung einer T_{H1} -Antwort durch IL-12 unterstützt, welches im Gegenzug die Ausbildung der T_{H2} -Antwort unterdrückt. Das Zytokin IL-4 wirkt analog bei der T_{H2} -Antwort. Neben den beiden klassischen CD4-Antworten T_{H1} und T_{H2} sind in den letzten Jahren zwei weitere Wege beschrieben worden, die T_{H17} - und T_{reg} -Antwort (siehe Tabelle 1.7), die gegenwärtig intensiv charakterisiert werden.

Tabelle 1.8: Vereinfachte Übersicht über die Aktivitäten der verschiedenen $CD4^+$ T-Zellen, modifiziert aus: [64], [65].

| CD4+ T-Zell Untergruppe | Immunabwehr | Gefördert durch | Regulation |
|-------------------------|--|--|--|
| T_{H1} | Intrazelluläre Pathogene (Bakterien, einige Viren) | IL-12 | IFN- γ : $\downarrow T_{H2}$, $\uparrow Mp$, $\uparrow NK$, $\downarrow T_{H17}$ TNF α : $\uparrow Mp$ IL-2: $\uparrow Mp$, $\uparrow NK$ |
| T_{H2} | Helminthen, Viren, Bakterien | IL-4 | IL-10: $\downarrow T_{H1}$ $\downarrow APZ$ IL-4: $\uparrow BZ$, $\downarrow Mp$, $\downarrow T_{H17}$ IL-6: $\uparrow BZ$, $\uparrow T_{H17}$, $\downarrow T_{reg}$ |
| T_{H17} | Extrazelluläre Pathogene (Bakterien, einige Pilze) | IL-23, TGF- β | IL-6: $\uparrow BZ$, $\uparrow T_{H17}$, $\downarrow T_{reg}$ TNF α : $\uparrow Mp$ IL-17 IL-21, -22: $\downarrow T_{reg}$ |
| T_{reg} | Toleranz gegenüber körpereigenen Antigenen und Regulation der Immunantwort gegen Fremdartigene | <i>Transforming growth factor</i> - β 1 (TGF- β 1) | TGF- β : $T_{H1} \downarrow$ IL-10: $T_{reg} \uparrow$ |

\uparrow = verstärken, induzieren, \downarrow = verringern, inhibieren, Treg = regulatorische T-Zellen, Mp = Makrophagen, NK = Natürliche Killerzellen, BZ = B-Zellen, APZ = Antigenpräsentierende Zellen

Die Stimulation von $CD8^+$ T-Zellen erfolgt über die Präsentation von zumeist zytosolischen Pathogenen (bspw. Viren) über MHC I. Aktivierte $CD8^+$ T-Zellen differenzieren zu zytotoxischen T-Lymphozyten (ZTL), die infizierte Zellen eliminieren.

1.2 Zytokine

Die Kommunikation zwischen den Zellen des Immunsystems beziehungsweise zwischen den Zellen des Immunsystems und Körperzellen erfolgt über kurze Distanz mittels niedermolekularen Proteinen, den Zytokinen.

Zytokine wirken autokrin und/ oder parakrin und werden bis auf wenige Ausnahmen nach der Aktivierung von Zellen exprimiert und werden primär als Antwort auf Gefahrensignale sezerniert, die bei der Gefährdung des Wirtes, beispielsweise bei Infektionen, ausgesendet werden.

Konstitutiv exprimiert werden zum Beispiel die Zytokine *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF), Stammzelloktoren, sowie verschiedene Chemokine, wie zum Beispiel das Chemokin CXCL13, die murinen Chemokine CCL19 und 21, die zur Aufrechterhaltung der Integrität von lymphatischen Geweben wie der Milz notwendig sind [67]. Zytokine können, mit einigen Ausnahmen, von jedem einen Zellkern enthaltenden Zelltyp im Organismus produziert werden, sie sind häufig pleiotrop, regulatorische Polypeptide oder Glykoproteine (≤ 30 kDA), die auf hämatopoetische und andere Zelltypen wirken, die für die Pathogenabwehr und für Reparaturprozesse zuständig sind. Zytokine sind in fünf große Klassen unterteilbar, sie beinhalten von Lymphozyten abgegebene Faktoren (Lymphokine), von Monozyten abgegebene Faktoren (Monokine), hämatopoetische *colony stimulation factors* (CSF), Wachstumsfaktoren der Bindegewebe (*growth factors*) und chemotaktische Zytokine (Chemokine). Die Wirkung von Zytokinen an den Zielzellen wird durch Bindung an meist spezifische, selten auch promiskuitive Oberflächenrezeptoren mit hoher Affinität erzielt. Die Bindung eines Zytokins an seinen Rezeptor verursacht meistens eine Veränderung der Genexpression, damit der Funktion der Zielzelle und nicht selten einen Anstieg oder Abfall der Proliferationsrate und Änderung im Differenzierungszustand der Zelle (s. auch Tabelle 1.8).

Die Zytokinrezeptoren lassen sich aufgrund struktureller Homologien in verschiedenen Familien unterteilen, unter denen die Chemokinrezeptoren eine eigenständige Gruppe bilden [68].

Tabelle 1.9: Definitionen der Wirkung von Zytokinen [68]

| | |
|---------------------------------|--|
| Pleiotropie | Zytokine haben häufig multiple Zielzellen und Funktionen |
| Redundanz | Verschiedene Zytokine können ähnliche Funktionen haben |
| Synergie/ Antagonismus | die gleichzeitige Wirkung von mehreren Zytokinen auf eine Zielzelle kann zu qualitativ verschiedene Antworten führen |
| Zytokinkaskade | ein Zytokin kann die Produktion eines anderen Zytokins erhöhen oder verringern |
| Transmodulation eines Rezeptors | ein Zytokin kann die Produktion eines anderen Zytokinrezeptors erhöhen oder verringern |
| Trans-Signalwirkung | ein Zytokin kann die Signalwirkung eines anderen Zytokinrezeptors erhöhen oder verringern |

Ein weiteres Charakteristikum der Zytokinwirkung ist die Fähigkeit, hemmend oder stimulierend auf die Produktion anderer Zytokine zu wirken. Ein Beispiel hierfür sind die hemmenden und stimulierenden Eigenschaften verschiedener Zytokine bei der Entwicklung einer T-Helferzellantwort (T_H , s. Tabelle 1.7) [69].

T-Helferzellen des Typs 1 (T_{H1}) sezernieren IL-2, IFN- γ und Lymphotoxin- α (LT- α), T_{H2} -Zellen produzieren dagegen die Zytokine IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13. Das Zytokin IL-12 fördert die Sekretion von IFN- γ und damit die Ausprägung einer T_{H1} -Antwort vor allem zur Abwehr intrazellulärer Pathogene. IFN- γ wiederum hemmt die Ausbildung der T_{H2} -Antwort. Das Zytokin IL-4 hingegen fördert die Ausbildung einer T_{H2} -Antwort, die zu einer antikörperabhängigen Immunantwort gegen extrazelluläre Pathogene führt. IL-10 hat eine hemmende Wirkung auf die T_{H1} -Antwort und induziert T_{reg} . Die Summe der Zytokinwirkungen verursacht hier also die Polarisierung auf eine bestimmte T_H -Zellantwort [70].

Im Anhang sind in der Tabelle 8.1 die wichtigsten Zytokine und Wachstumsfaktoren, deren Produzenten und Wirkung aufgelistet.

1.2.1 Chemotaktische Zytokine (Chemokine)

Chemokine werden funktionell in homeostatische und inflammatorische Chemokine oder strukturell klassifiziert. Strukturell werden Chemokine in vier Klassen unterteilt, die durch strukturelle Homologien definiert sind. Ausschlaggebend für die Einteilung ist die Position konservierter Cysteine im Protein. Demnach werden C-, CC-, CXC- und CX₃C-Chemokine unterschieden, wobei die Hauptgruppen die CC- und die CXC-Chemokine bilden.

Die Buchstaben L oder R werden zur Unterscheidung von Ligand und Rezeptor am Ende angefügt, schließlich werden die Chemokine durchnummeriert (siehe Tabelle 1.9) [71], [72], [73].

Die Namen der Rezeptoren richten sich dabei nach dem Chemokin, welches sie binden. Der Rezeptor CCR1 ist demnach ein CC-Chemokin (CCL3, CCL5)-bindender Rezeptor.

Tabelle 1.10: Ausgewählte Chemokine [74], [75], (siehe auch: <http://cytokine.medic.kumamoto-u.ac.jp/>)

| Systematische Bezeichnung | Klassische Bezeichnung | Rezeptor | Wirkung auf |
|---------------------------|------------------------|------------------|---|
| CC Chemokine | | | |
| CCL2 | MCP-1 | CCR2 | Monozyten, T-Zellen (T _{H2}) |
| CCL3 | MIP-1 α | CCR1, CCR5 | Monozyten/ Makrophagen, T _{H1} >T _{H2} , NK-Zellen, unreife Dendritische Zellen |
| CCL4 | MIP-1 β | CCR1, CCR5 | Monozyten/ Makrophagen, T _{H1} >T _{H2} , NK-Zellen, unreife Dendritische Zellen |
| CCL5 | RANTES | CCR1, CCR3, CCR5 | Monozyten/ Makrophagen, <i>memory</i> T-Zellen, (T _{H1} >T _{H2}), NK-Zellen, unreife Dendritische Zellen |
| CXC Chemokine | | | |
| CXCL1 | KC | CXCR2 | Neutrophile, Fibroblasten |
| CXCL2 | MIP-2 | CXCR2 | Neutrophile, Fibroblasten |
| CXCL8 | IL-8 | CXCR1, CXCR2 | T-Zellen, Neutrophile |
| CXCL9 | Mig | CXCR3 | aktivierte T-Zellen |
| CXCL10 | IP-10 | CXCR3 | aktivierte T-Zellen, T _{H1} >T _{H2} |
| CX3C Chemokine | | | |
| CX3CL1 | Fraktalkin | CX3CR1 | aktivierte T-Zellen, Monozyten, Neutrophile, NK-Zellen, unreife Dendritische Zellen |

Die Familie der Chemokine umfasst bisher ca. 47 Proteine und 20 Rezeptoren. Chemokine sind sezernierte Proteine und dienen zum einen der Aufrechterhaltung der organistischen Integrität von lymphatischen Organen (homeostatische Chemokine) und zum anderen als Signalgeber der angeborenen und der adaptiven Immunantwort (inflammatorische Chemokine). Letztere, die so genannten inflammatorischen Chemokine, spielen vor allem bei der Abwehr von Infektionen eine wesentliche Rolle, in dem sie sowohl Zellen der angeborenen Immunantwort wie Makrophagen und Neutrophile aber auch Zellen der adaptiven Immunantwort wie T- und NK-Zellen an den Ort der Infektion leiten.

Eine frühe Chemokinexpression ist beispielsweise notwendig, um während einer Infektion mit dem Murinen Zytomegalievirus (MCMV) NK-Zellen in die Leber zu rekrutieren, die die virale Replikation beschränken [76].

Chemokinrezeptoren sind Rezeptoren mit 7-Transmembrandomänen, über die sie ihre Signale vermitteln, die an GTP-Bindeproteine des Gi-Typs gekoppelt sind [77]. Viele Chemokinrezeptoren binden mehr als ein bestimmtes Chemokin und die Mehrzahl der Chemokine binden gleichfalls an verschiedene Rezeptoren [72].

Chemokine wirken zumeist selektiv auf bestimmte Populationen von Leukozyten. Das primäre Resultat einer Chemokinbindung an seinen Rezeptor ist die Auslösung der Chemotaxis der betroffenen Zelle entlang eines Chemokin-konzentrationsgradienten. Sekundär können auch Signalwege, die zur weiteren Genexpression, beispielsweise zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, zur Ausschüttung von Enzymen oder zur Zellaktivierung führen, ausgelöst werden.

Die Expression von Chemokinen beziehungsweise Chemokinrezeptoren ist in Abhängigkeit vom Reifungs- und Aktivierungsstatus der Zelle komplex reguliert. Die Wirkung eines Zytokins kann die Zielzelle zur Expression bestimmter Chemokinrezeptoren anregen, beispielsweise exprimieren T-Zellen in Anwesenheit von IL-2 diverse Rezeptoren für inflammatorische Chemokine wie CCR1, CCR2, CCR5 und CXCR3 und verursachen damit auch die chemotaktische Antwort auf die zugehörigen Chemokine (CCL2/ MCP-1, CCL3/ MIP-1 α , CCL5/ RANTES und CXCL10/IP-10) [78]. Die IL-2-Effekte sind dabei reversibel. Auf dieser Entdeckung aufbauend konnte gezeigt werden, dass die Zytokine der verschiedenen T-Helferzellantworten zur Expression verschiedener Chemokinrezeptoren auf den betroffenen Zellen führen. So exprimieren T_{H1}-beziehungsweise T_{H2}-Zellen unterschiedliche Chemokinrezeptoren: die Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR3 sind spezifisch für T_{H1}-Zellen und CCR3 und CCR4 für T_{H2}-Zellen [79], [80]. Bestimmte Chemokine wie beispielsweise MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES können synergistisch mit IFN- γ die Produktion von IL-12 aktivieren und damit die T_{H1}-Antwort verstärken [81].

Tabelle 1.11: Chemokine, die die T_{H1}/ T_{H2} Polarisation beeinflussen [64]

| Chemokin | Effekt | Referenz |
|---------------|-------------------------------------|------------|
| CCL2/ MCP-1 | ↑T _{H2} | [82] |
| CCL3/ MIP-1α | ↑T _{H1} | [82] |
| CXCL10/ IP-10 | ↑T _{H1} , ↓T _{H2} | [83], [84] |

MCP-1 = *monocyte chemoattractant protein-1*, MIP = *macrophage inflammatory protein*, IP-10 = Interferon induzierbares Protein-10, ↑ = verstärken, induzieren, ↓ = verringern, inhibieren

1.3 Übersicht der Herpesviren

Die Familie der Herpesviridae ist unterteilt in α-, β- und γ-Herpesviren. Die Familienzugehörigkeit ist primär durch die ikosaedrische Kapsidarchitektur begründet. Herpesviren sind verhältnismäßig spezies-spezifisch (*in vivo*) und können eine Vielzahl von Zellen wie zum Beispiel Monozyten, Makrophagen, B-Zellen, Nervenzellen und Epithelzellen infizieren. Herpesviren haben ein Genom aus doppelsträngiger DNA (dsDNA). Des Weiteren haben alle Herpesviren einige biologische Funktionen gemeinsam:

1. Alle Herpesviren besitzen eine große Anzahl an viralen Enzymen, die der Nucleinsäuresynthese, der DNA-Synthese und der Prozessierung von viralen Proteinen dienen.
2. Die Synthese der viralen DNA und des Kapsids erfolgt im Nucleus der infizierten Zelle.
3. Die Vermehrung des Virus innerhalb der Zelle, also die Produktion von Virusnachfolgern, führt zu einer Lyse und damit zur Zerstörung der Wirtszelle.
4. Alle bisher bekannten Herpesviren haben die Fähigkeit, ihren Wirt latent zu infizieren. In den Zellen, die latent infiziert sind, liegt das virale Genom als geschlossenes zirkuläres Molekül vor und nur wenige virale Gene werden exprimiert. Der Zelltyp, der latent infiziert ist, also der Zelltropismus, unterscheidet sich unter den Herpesviren.

β-Herpesviren

Die Mitglieder der β-Herpesviren sind charakterisiert durch eine verhältnismäßig strikte Wirtsspezifität, einen langen Replikationszyklus und einer langsamen Progression der Infektion *in vitro*. Viele infizierte Zellen vergrößern sich deutlich gegenüber den nicht infizierten Zellen (Zytomegalie). β-Herpesviren können in verschiedenen Geweben, wie den Speicheldrüsen oder in Nierenzellen eine Latenz ausbilden. Die Subfamilie der β-Herpesviren beinhaltet das Zytomegalievirus (CMV) und das Roseolovirus (HHV-7).

1.4 Das Murine Zytomegalievirus (MCMV)

Das Murine Zytomegalievirus (MCMV) ist wie das Humane CMV (HCMV) ein weit verbreitetes Virus, welches vor allem als opportunistischer Erreger auffällig wird. Das bedeutet, dass eine akute Infektion hauptsächlich in immunsupprimierten und -defizienten Wirten auftritt.

1.4.1 Die Biologie des Murinen Zytomegalievirus

Das MCMV-Virion hat eine Größe von 200 – 300 nm im Durchmesser. Das Virion enthält das 125 nm große ikosaedrische Nukleokapsid, welches aus fünf Kernproteinen zusammengesetzt ist. Das Nukleokapsid umschließt das lineare, doppelsträngige DNA (dsDNA) Genom, zusammen mit einer *lytic origin of DNA replication* (oriLyT) - assoziierten RNA [85]. Das Nukleokapsid selbst ist von einem Tegument aus viruskodierten Proteinen umgeben. Das MCMV-Genom besteht aus 230 kbp dsDNA (*NCBI Genome Accession No.:* NC_004065) und kodiert für mindestens 167 Gene und 161 Proteine [86].

CMV infiziert Zellen mit myeloiden Ursprung (Monozyten, Makrophagen) [87] aber auch Endothelzellen latent. Das MCMV-Genom ist auch in den hämatopoetischen Zellen des Knochenmarks [88], in Milz- und Nierenzellen [89] nachweisbar. Durch die zusätzliche persistierende Replikation von MCMV in den glandularen Epithelzellen der Speicheldrüsen des Wirtes ist eine horizontale Übertragung zwischen den Wirtsorganismen über den Speichel wahrscheinlich [90].

Weitere Übertragungswege, die vor allem vom Humanen Zytomegalievirus bekannt sind, sind Schmierinfektionen mit virushaltigem Blut [91] oder Urin [92]; potentiell möglich ist auch eine sexuelle Übertragung, da CMV in Zervixsekret [93] und Samenflüssigkeit nachweisbar ist [94]. Eine transplazentale Transmission des Virus auf den Fötus [95] kann zu lebensbedrohlichen Schäden am Neugeborenen führen. Im Gegensatz zu HCMV ist MCMV nicht in der Lage, transplazental übertragen zu werden [96].

Durch Immunsuppressionen zum Beispiel nach Gewebs- oder Organtransplantationen oder durch immunsuppressive Infektionen wie HIV- (*human immunodeficiency virus*) oder MLV-Infektionen (*murine leukaemia virus*) kann eine latente CMV-Infektion reaktiviert werden [97], beziehungsweise eine bestehende Immunsuppression kann eine akute CMV-Pathogenese ermöglichen [98], [99].

Die vorherrschende HCMV-Prävalenz in der Weltbevölkerung liegt in Abhängigkeit von Ort, Alter und Geschlecht zwischen 52% [100] und 99% [101].

1.4.2 Pathogenese der Zytomegalievirus Infektion

Die Primärinfektion im immunkompetenten Wirt verläuft zumeist inapparent. Man geht davon aus, dass nach einer Infektion der oberen Atemwege das Virus sich in lokale lymphoide Gewebe ausbreitet und dort Lymphozyten, vor allem aber Monozyten und Makrophagen infiziert. Infizierte Zellen dienen schließlich als Träger, durch den das Virus in Lymphknoten und die Milz gelangen kann. Das Virus kann schließlich in den Speicheldrüsen, Nierenzellen, Zervix und Testis nachgewiesen werden, von wo aus es vom Wirt ausgeschieden wird, um einen neuen Wirt zu infizieren. Bei der Primärinfektion oder Reaktivierung des Virus im immunsupprimierten oder -defizienten Wirt kommt es jedoch zu einer klinischen Symptomatik. Am häufigsten ist eine interstitielle Pneumonie, es treten aber auch Hepatitiden, Kolitiden und Retinitiden auf.

1.4.3 Wirtsabwehr einer viralen Infektion

Eine Infektion der Maus mit MCMV dient als Tiermodell zur Erforschung des Humanen Zytomegalievirus, die erhaltenen Erkenntnisse lassen auf die Biologie anderer CMV-Spezies schließen [102, 103].

Das Murine Zytomegalievirus wird durch die Oberflächenrezeptoren TLR2 und CD14 von Immunzellen erkannt [104]. Die erste Abwehr gegen eine virale Infektion wird durch die betroffene Zelle selbst durchgeführt. Das Auftauchen von viralen Proteinen und genetischem Material, also von viralen Aktivitäten kann unmittelbar zur Apoptose der infizierten Zelle führen. Ohne diese „Selbstmord“ Reaktion ist der nächste und zweite Schritt die Expression und Sekretion von löslichen Immunmediatoren, wie Chemokinen, Zytokinen, antimikrobiellen Proteinen, Komplementfragmenten und Stickstoffoxid und damit die Einleitung der initialen Immunantwort. Die wesentlichen Zytokine sind die Interferone (IFN- α , - β und - γ). Im weiteren Verlauf der Immunreaktion werden Immunzellen, wie Makrophagen und NK-Zellen über die sezernierten Chemokine angelockt und durch die Zytokine aktiviert.

Die wesentliche Rolle bei der Abwehr einer primären MCMV Infektion im Wirt spielt die zelluläre Immunantwort durch Natürliche Killerzellen (NK).

Im vierten Schritt folgt die Ausbildung der adaptiven Immunantwort, wobei zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen bei einer viralen Infektion die wesentliche Rolle zukommt.

1.4.3.1 Zelluläre Abwehr einer MCMV-Infektion

Eine NK-Zell Defizienz bei einer primären MCMV Infektion bewirkt eine schwere, apparente Ausprägung der Infektion [105]. Basierend auf ihrer Empfindlichkeit gegenüber einer MCMV-Infektion können Mauslaborstämme unterschieden werden: schwarze C57BL/6-Mäuse haben durch die Expression des NK-Zellliganden Ly94H, welcher spezifisch das von MCMV auf infizierten Zellen exprimierte virale Protein m157 erkennt, eine wesentlich geringere Empfindlichkeit gegenüber MCMV als weiße BALB/c-Mäuse [106], [107].

NK-Zellen werden zusätzlich und unabhängig von Ly49H durch die Erkennung viraler DNA durch TLR3 und TLR9 in IFN-produzierenden Zellen (IPZ)¹ und der darauf folgenden Expression von IL-12 und IFN- α/β aktiviert.

In TLR9- und MyD88-defizienten Mäusen ist die Produktion dieser Zytokine und MIP-1 α während einer akuten MCMV-Infektion verzögert, wodurch die frühe NK-Zellantwort, -proliferation und die IFN- γ -Produktion verringert wird [108].

¹ u.a. Dendritische Zellen und Makrophagen

Ebenfalls aktiviert wird der MyD88-unabhängige TLR3-Signalweg, welcher auch zur Produktion von IFN- α/β führt [109].

Unabhängig von der Interferenz des Virus mit der Antigenpräsentation verursacht eine MCMV Infektion eine starke zytotoxische CD8⁺ T-Zellantwort, die im nachfolgenden Verlauf auch zur Ausbildung eines CD8⁺ T-Zellgedächtnisses führt [110], da auch während der späteren MCMV-Persistenz im Wirt der fortwährende Antigenkontakt eine große Anzahl an MCMV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen verursacht [111]. In BALB/c-Mäusen ist die Immunantwort prinzipiell abhängig von einer adäquaten CD8⁺ T-Zellantwort [112].

CD8⁺ T-Zell-depletierte Mäusen können trotzdem eine MCMV-Infektion bekämpfen, wobei anscheinend CD4⁺ T-Zellen mit Hilfe von akzessorischen Zellen wie Makrophagen die protektive Rolle übernehmen können [113].

CD4⁺ T-Zellen sind allerdings im Gegensatz zu Makrophagen nicht in der Lage, das Virus in den Speicheldrüsen zu eliminieren [114].

1.4.3.2 Das Netzwerk von Zytokinen und Chemokinen bei der antiviralen Abwehr einer MCMV-Infektion

Eine virale Infektion induziert die Expression von Zytokinen und Chemokinen, die ihrerseits immunologische Effektorzellen zum Ort der Infektion leiten und aktivieren. So verursacht die Expression von Zytokinen und Chemokinen in der frühen Phase einer Infektion mit dem Murinen Zytomegalievirus (MCMV) eine effektive Rekrutierung von Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), deren Aktivierung und damit die finale Beseitigung des Virus aus dem Organismus. Bei einer viralen Infektion spielt die Rekrutierung und Aktivierung von NK-Zellen eine besondere Rolle. NK-Zellen als Effektorzellen der angeborenen Immunantwort können sehr schnell auf Pathogene reagieren, noch bevor eine adaptive Immunantwort entstehen kann. Klassische NK-Zellen besitzen keine antigenspezifischen Rezeptoren, statt dessen verfügen sie über ein großes Repertoire an aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren. Die Bindung eines aktivierenden Rezeptors mit seinem Liganden auf infizierten Zellen verursacht eine Zytokinexpression, vor allem IFN- γ , und die Perforin-abhängige Eliminierung der infizierten Zelle [115, 116]. Zur Rekrutierung von NK-Zellen an den Ort einer Infektion ist vor allem die Expression des Chemokins CCL3/MIP-1 α notwendig.

So konnte in MCMV-infizierten Mäusen der Anstieg der MIP-1 α Sekretion in der infizierten Leber der Tiere mit einem Anstieg der NK-Zellmigration in die Leber korreliert werden [76], [117]. *In vivo* Infektionsstudien mit MIP-1 α -defizienten Mäusen zeigten das Fehlen einer NK-Zellmigration in die Leber während einer MCMV-Infektion [76], [117]. Im Gegensatz dazu war die Migration von Monozyten und Makrophagen unbeeinflusst. Zusammengefasst bedeutet das, dass nur ein koordiniertes Signal, welches zu einer Aktivierung von NK-Zellen führt, und das chemotaktische Signal durch MIP-1 α hinreichend sind, den Influx von NK-Zellen in die Leber unter einer MCMV-Infektion zu gewährleisten.

Da die NK-Zellen die Hauptquelle der frühen IFN- γ -Produktion sind, führt die MIP-1 α -abhängige Migration von NK-Zellen auch zur Ausbildung eines zu weiteren Abwehr notwendigen IFN- γ -Levels in der Leber.

Neben anderen Zytokinen der erworbenen Immunantwort werden während einer MCMV-Infektion auch die Typ 1-Interferone IFN- α und IFN- β produziert. Studien haben gezeigt, dass IFN- α/β Rezeptor-defiziente Mäuse ein wesentlich reduziertes Level an MIP-1 α während viraler Infektion ausbilden. Es konnte auch gezeigt werden, dass IFN- α und - β die Expression von MIP-1 α fördern [118].

Die Ausbildung eines IFN- γ -Levels durch die Migration von NK-Zellen in die Leber führt nachfolgend zur Induktion des Chemokins CXCL9/Mig, welches ein T-Zellchemoattraktant ist [119], [120]. Die Produktion von Mig ist in MIP-1 α -defizienten Mäusen stark reduziert [117]. Während einer MCMV-Infektion findet am 5. Tag der Infektion die erste deutliche Ausprägung einer adaptiven Immunantwort durch T-Zellen statt [121],[122].

Die Hauptquelle der MIP-1 α -Produktion sind inflammatorische Makrophagen, die durch IFN- α/β stimuliert werden und in den Infektionsort einwandern. Es konnte gezeigt werden, dass das Migrationssignal durch das Chemokin CCL2/MCP-1 ausgelöst wird [123], [124]. Ein erhöhtes MCP-1-Level geht dem Level von MIP-1 α im infizierten Organ voraus. Die IFN- α/β -Abhängigkeit des Signals konnte wiederum durch IFN- α/β Rezeptor-defiziente Mäuse und mit der Behandlung mit rekombinantem IFN- α (rIFN- α) gezeigt werden [125].

Die MCP-1-Produzenten in der Leber sind F4/80⁺ residente Makrophagen, die sehr schnell auf das durch die Infektion induzierte IFN- α/β reagieren können [125] (siehe auch Abbildung 1.3).

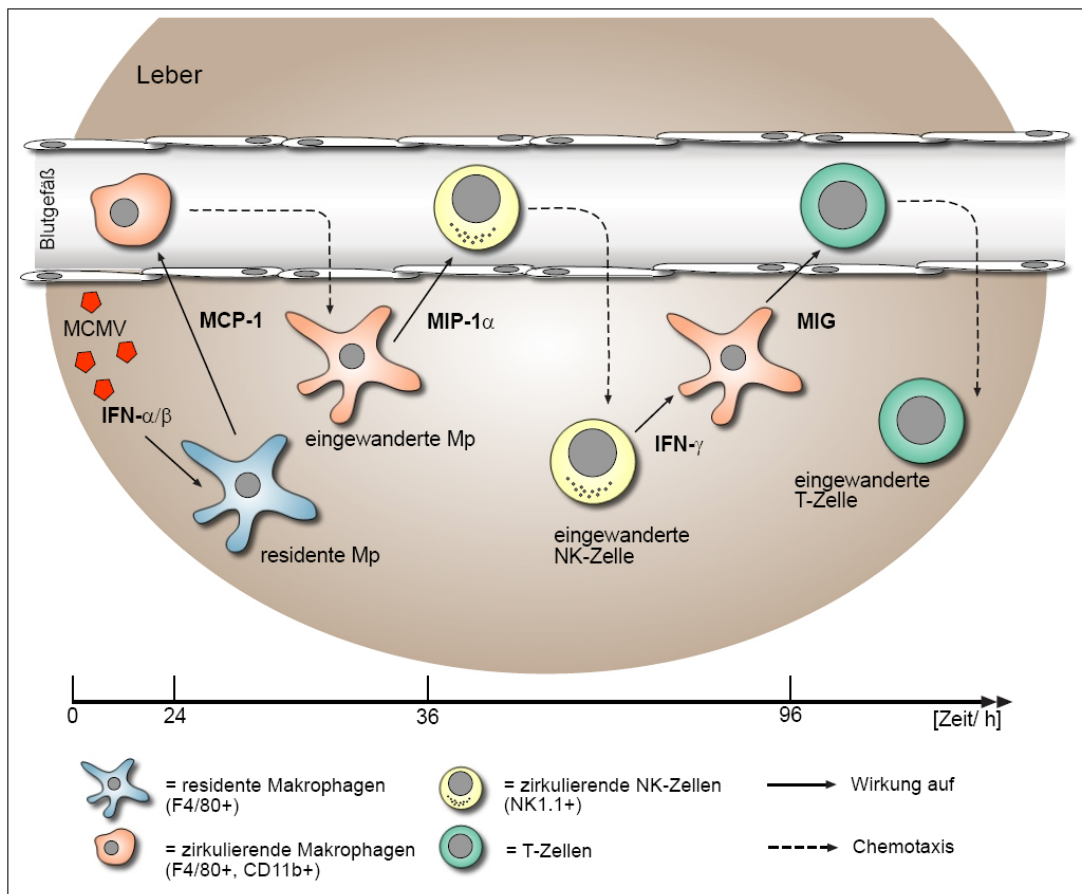


Abb. 1.3: Modell des Zytokin-Chemokin Netzwerkes zur Abwehr von MCMV in der Leber [126]. Beschreibung siehe Text.

IFN- γ und TNF- α spielen eine wesentliche Rolle bei der Ausprägung der MCMV-Pathogenese. Die Funktion dieser Zytokine variiert dabei zwischen einer protektiven [127] und einer pathogenen Rolle [128]. IFN- γ und TNF- α induzieren synergistisch den so genannten Antiviralen Zustand in den Zellen, was die Produktion infektiöser Virione reduziert und den Replikationszyklus von MCMV verlängert [129]. Zu den Proteinen des Antiviralen Zustands gehören solche, die im Proteasom die Präsentation von viralen Proteinen über MHC I und MHC II unterstützen, als auch die doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA)-abhängige-Proteinkinase (PKR) und die aktivierte RNase L, die virale RNA zerstören und damit die Genexpression in infizierten Zellen unterbrechen. Quellen der Zytokinproduktion sind sowohl NK-Zellen, als auch CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen.

1.4.4 MCMV Immunevasion und -modulation

Zur Aufrechterhaltung einer lebenslangen latenten Infektion verfügt MCMV über eine Reihe von Genen, die für immunmodulatorische Proteine kodieren. Diese Proteine nehmen direkten Einfluss auf die Fähigkeit einer infizierten Zelle, insbesondere der APZ, das Immunsystem über die Infektion zu informieren oder eigene antivirale Mechanismen wie Apoptose oder die Expression antiviraler Proteine auszuführen. Sie beeinflussen sowohl die erworbene, als auch die adaptive Immunantwort (siehe Tabelle 1.12).

Tabelle 1.12: Immunmodulatorische MCMV-kodierte Proteine

| Gen | Protein | Funktion | | Referenz |
|---------------|---------|---|---|---------------------------|
| m04 | gp34 | Immunevasion der MHC-I-abhängigen Antigenpräsentation | verringert die MHC-I-abhängige Antigenpräsentation | [130], [131] |
| m06 | gp48 | s.o. | führt MHC-I zur Degradation in Lysosomen | [132], [131] |
| m152 | gp40 | s.o. und Unterdrückung einer NK-Zellantwort | hält MHC-I im Zwischenkompartiment zwischen ER und Golgiapparat, sowie Herabregulation der Liganden für den NK-Zellrezeptor NKG2D | [133], [134], [135] |
| m147.5 | | Immunevasion der MHC-I-abhängigen Antigenpräsentation | Herabregulation des Kostimulators CD86 | [136] |
| m157 | | Unterdrückung einer NK-Zellantwort | exprimiertes MHC-I-Homolog, Ligand für NK-Zellen inhibierenden NK-Zellrezeptor Ly49I | [106] |
| m27 | | Unterdrückung des Antiviralen Zustands | selektive Bindung und Herabregulation von STAT-2 und damit Hemmung von Teilen des Interferon Signalweges | [137] |
| m138/fcr-1 | | Unterdrückung einer NK-Zellantwort und der Antigenpräsentation | Herabregulation von MULT-1 und H60 (NKG2D Liganden) und des Kostimulators CD80 | [138] |
| m155 | | Unterdrückung einer NK-Zellantwort | Herabregulation von H60 (NKG2D Ligand) | [139], [140] |
| m145 | | Unterdrückung einer NK-Zellantwort | Herabregulation von MULT-1 (NKG2D Ligand) | [141] |
| m43 | | Modulation der T _H -Antwort | vermutliche Suppression der T _{H2} -Antwort durch Hemmung der IL-4-Expression | [142] |
| m129/ m131 | | Einfluss auf die Ausbildung einer zellulären Immunantwort und Rekrutierung von Zielzellen | virales Chemokinhomolog, vermutlich ein Chemokinrezeptoragonist | [143], [144] |

| Gen | Protein | Funktion | Referenz |
|-------------|---------|---|---|
| m33 und m78 | | Einfluss auf die Ausbildung einer zellulären Immunantwort | Homolog eines Chemokinrezeptors, m33 bindet RANTES und möglicherweise MCP-1 [145], [146], [147] |

MHCI = *Major histocompatibility complex class I*, ER = Endoplasmatisches Retikulum, STAT-2 = *signal transducer and activator of transcription*, MULT-1 = *murine UL16-binding protein like transcript*, RANTES = *regulated upon activation, normal T cell expressed, and secreted*, MCP-1 = *Monocyte chemoattractant protein-1*

MCMV interferiert mit der Antigenpräsentation des Wirts, mit der Expression kostimulatorischer Moleküle und mit der Zytokinantwort.

MCMV-infizierte Zellen sind nicht in der Lage, auf Interferone zu antworten, das bedeutet, dass MCMV einen Mechanismus besitzt, mit der IFN-induzierten Gentranskription zu interferieren [127], [137].

1.4.5 MCMV und Monozyten/ Makrophagen

1.4.5.1 Makrophagentropismus des MCMV

Tropismus bedeutet, dass das Virus eine bestimmte Präferenz für die effiziente Replikation in bestimmten differenzierten Zelllinien hat. Monozyten/ Makrophagen sind neben den Endothelzellen des Wirts im Fall von MCMV die wichtigsten Zellen für das Erreichen der viralen Latenz und Persistenz [86].

Monozyten haben aber zusätzlich noch die wichtige Funktion der viralen Verbreitung im Organismus. Solange Makrophagen in Geweben nicht ausdifferenziert sind, zirkulieren sie als Monozyten im Blutkreislauf. MCMV kann daher potentiell in infizierten Monozyten und Makrophagen an jeden durch das Gefäßsystem versorgten Ort gelangen.

In erster Linie wird der Zelltropismus von MCMV durch die Verfügbarkeit von Rezeptoren und Korezeptoren für die Virusanlagerung und -penetration an und in die Zielzelle bestimmt [148], [149].

Zurzeit existieren einige Hinweise darauf, dass MCMV latent in undifferenzierten Monozyten und deren Vorläuferzellen und aktiv replizierend in ausdifferenzierten Makrophagen überlebt [150]. Bestimmt wird der Tropismus des Weiteren von viralen Genen, deren Verlust zu einer Attenuierung des Virus führt, beziehungsweise zum Verlust der Fähigkeit, Makrophagen zu infizieren.

Tabelle 1.13: MCMV Gene des Makrophagentropismus [151]

| Gen | Funktion | Tropismus | nicht notwendig* | Referenz |
|------------------------|--|--|---|--------------|
| m36 | anti-apoptotisch | J774 IC-21 | Fibroblasten | [152] |
| m45 | anti-apoptotisch | IC-21 | Fibroblasten Hepatozyten | [153] |
| m78 [#] | erleichtert die Akkumulation von IE RNA bei geringer <i>moi</i> [#] | IC-21 [#] | Fibroblasten [#] | [154] |
| m139, m140, m141 | Funktionieren im Komplex, u.a. Optimierung der viralen Replikation | IC-21 aktivierte primäre, peritoneale Makro- phagen | naive Knochenmarks- makrophagen Fibroblasten | [152], [155] |

* = nicht notwendig für die erfolgreiche Replikation in genannten Zelllinien, J774 = murine, immortalisierte, eher undifferenzierte Makrophagenzelllinie, IC-21 = murine, immortalisierte, differenzierte Makrophagenzelllinie, *moi* = *multiplicity of infection* (Virustiter), [#] = bisher keine unabhängige Reproduktion der Daten.

1.4.5.2 Einfluss der MCMV Infektion auf die Differenzierung von Makrophagen

Zurzeit existieren nur divergente Aussagen über den Einfluss von MCMV auf die Makrophagendifferenzierung. Eine Hemmung der Differenzierung von infizierten Monozyten zu Makrophagen [156] hätte den Vorteil, die virale Latenz in den Monozyten zu verlängern und somit eine weitere Ausbreitung im Organismus zu fördern. Allerdings zirkulieren Monozyten nur verhältnismäßig kurze Zeit im Blutkreislauf. Eine viral geförderte Differenzierung [157] würde die Virusreplikation verstärken und damit die Verteilung und Ausbreitung des Virus im Gewebe oder Organ erhöhen.

1.4.5.3 Einfluss der MCMV Infektion auf die Funktion der Makrophagen

Die Wirkung von MCMV auf die verschiedenen Funktionen von Makrophagen ist mit Ausnahme der Antigenpräsentation bislang nicht gut untersucht.

Zusätzlich zu den in Tabelle 1.12 genannten immunmodulatorischen Eigenschaften hemmt die MCMV-Infektion von Makrophagen die MHCII-abhängige Antigenpräsentation, die damit nur noch eingeschränkt in der Lage ist, CD4⁺ T-Zellen zu stimulieren [158], [159]. Der Einfluss der koordinierten Hemmung der MHCI-abhängigen Antigenpräsentation durch die viralen Gene *m04*, *m06* und *m152* führt zu einer vollständigen Hemmung der zytotoxischen CD8⁺ T-Zell Lyse von infizierten Makrophagen [131].

Zusätzlich werden die zur erfolgreichen Antigenpräsentation notwendigen Kostimulatoren CD80 und CD86 durch MCMV herunterreguliert [138], [136].

Im frühen Verlauf der Infektion von Makrophagen werden diese zunächst aktiviert (siehe Tabelle 1.7), was unter anderem zur Produktion von TNF- α führt [160]. TNF- α löst autokrin antivirale Aktivitäten in der infizierten Zelle aus, gleichzeitig verstärkt TNF- α die Transkription der *immediately early* (IE) Gene von MCMV. Im späteren Verlauf würde der Einfluss von TNF- α die Replikation der MCMV DNA blockieren, MCMV hemmt daher die Expression des TNF- α Rezeptors in infizierten Makrophagen [161]. Die Typ 1-Interferone IFN- α und - β , die ebenfalls von Makrophagen produziert werden, hemmen die CMV Replikation [162]. Die Hauptrolle dieser antiviralen Zytokine scheint aber die Induktion antiviraler Eigenschaften von NK-Zellen und CD8⁺ T-Zellen zu sein [118]. Im späteren Verlauf der MCMV Infektion reagieren infizierte Zellen aber nicht mehr auf IFN- α und - β , sowie auf das Typ 2-Interferon IFN- γ [137].

Bei einer systemischen Infektion mit MCMV konnte gezeigt werden, dass am 6. Tag nach der Infektion die Serumkonzentration des Chemokins *Monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) und der Zytokine IL-1 β und TNF- α reduziert ist, demgegenüber sind die Serumkonzentrationen von IL-10, IL-12 und IFN- γ erhöht [147]. Grundsätzlich ist bekannt, dass Makrophagen auf Infektionen mit einer starken Chemokinexpression antworten. Daher waren die Vorbefunde unserer Arbeitsgruppe aus *in vivo* MCMV-Infektionen bemerkenswert, die zeigten, dass am Tag 1-3 nach der MCMV-Infektion Makrophagen nur unwesentlich Chemokine produzierten, während als Hauptproduzenten der Chemokine die NK-Zellen identifiziert wurden [163]. Diese Experimente werfen die Frage auf, inwieweit MCMV in die Funktion von Markophagen eingreift und bilden den Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit.

Ziel der Arbeit

Makrophagen stellen im Rahmen einer MCMV-Infektion wichtige Zielzellen dar, die einerseits an der Disseminierung des Virus im Wirt und andererseits an der Induktion einer spezifischen Immunantwort zentral beteiligt sind. Vorarbeiten in unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass die Hauptquelle der Produktion der Chemokine MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES unter einer MCMV-Infektion *in vivo* Natürliche Killerzellen sind und vor allem MCMV-infizierte Makrophagen nicht mehr an der Produktion der genannten Chemokine teilnehmen [163]. Das primäre Ziel dieser Arbeit war die Analyse und Charakterisierung der Modulation von Wirts-Chemokinen in Makrophagen nach einer MCMV-Infektion. Hierbei sollte die Zellspezifität und der Umfang der Chemokinblockade bei einem breiteren Spektrum von Chemokinen und Zytokinen untersucht werden.

Außerdem sollte der molekulare Mechanismus der Chemokinregulation durch MCMV durch Analysen der transkriptionellen Ebene der Chemokine und der auslösenden Signalkaskade aufgeklärt werden.

Des Weiteren sollten die viralen Komponenten, die in die Regulation der Chemokine involviert sind, identifiziert werden, vor allem hinsichtlich der Beteiligung von *immediate-early*, *early* und *late* Genen, sowie durch die Untersuchung von MCMV-Deletionsmutanten, in denen nicht-essentielle Gene fehlten.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Herkunft der verwendeten Reagenzien

2.1.1.1 Lokalisationen der Hersteller

Tabelle 2.1: Lokalisation der Firmen und Hersteller, von denen Materialien und Reagenzien erworben wurden

| Firma/ Hersteller | Lokalisation |
|---|---|
| Abcam | Cambridge, MA, USA |
| Agilent | Santa Clara, CA, USA |
| American Type culture collection (ATCC)/ LGC Promochem | Manassas, VA, USA/ Teddington, Middlesex, UK |
| Applied Biosystems | Foster City, CA, USA |
| Becton Dickinson (BD) | Franklin Lakes, NJ, USA |
| Biochrom | Berlin |
| Biometra | Göttingen |
| BioRad | Hercules, CA, USA |
| Biosource/ Invitrogen | |
| Carl Zeiss | Jena |
| Chemicon | Temecula, California, USA |
| Coley Pharmaceutical Group/ Pfizer | Düsseldorf |
| Cryotherm | Kirchen |
| DAKO | Glostrup, DK |
| Dianova | Hamburg |
| Difco/ Becton Dickinson | |
| eBioscience | San Diego, CA, USA |
| Fermentas | Burlington, CDN |
| Imgenex | San Diego, CA, USA |
| Invitrogen | Carlsbad, CA, USA |
| Invivogen | San Diego, CA, USA |
| Merck | Darmstadt |
| Molecular probes/ Invitrogen | |
| New England Biolabs (NEB) | Ipswich, MA, USA |
| Nordic | Tilburg, NL |
| Nunc GmbH | Wiesbaden |
| Peprotech Inc. | Rocky Hill, NJ, USA |
| Pierce | Milwaukee, WI, USA |
| Plano GmbH | Wetzlar |
| Promega | Madison, WI, USA |
| Qiagen | Hilden |
| R&D Systems | Minneapolis, MN, USA |
| Roche Applied Science | Mannheim |
| Roth | Karlsruhe |

| Firma/ Hersteller | Lokalisation |
|--------------------------|---------------------|
| Santa Cruz | Santa Cruz, CA, USA |
| Sigma-Aldrich | Seelze |
| Stratagene | La Jolla, CA, USA |
| Tecan | Männedorf, CH |
| Thermo Fisher Scientific | Waltham, MA, USA |

2.1.1.2 Reagenzien

Alle nicht aufgeführten Chemikalien und Reagenzien wurden von den Firmen Sigma-Aldrich, Merck oder Roth bezogen.

Tabelle 2.2: Auflistung verwendeter Reagenzien und deren Bezugsquellen

| Reagenz | Herkunft |
|---|-------------------------|
| Actinomycin D | Sigma-Aldrich |
| Citifluor | Plano GmbH |
| Cycloheximid | Sigma-Aldrich |
| Dextran-FITC (40 kDa) | Sigma-Aldrich |
| Digoxigenin-NHS | Roche |
| D-MEM | Biochrom |
| Donor Pferdeserum (HS) für Zellkultur | Biochrom |
| Fötale Kälberserum (FKS) | Biochrom |
| Fötale Kälberserum (FKS) für Zellkultur | Invitrogen |
| Ganciclovir | Invitrogen |
| Jodacetamid | Sigma-Aldrich |
| Kälberserum von Neugeborenen (NKS) | Biochrom |
| L-Glutamin | Biochrom |
| MEM | Biochrom |
| Methylzellulose (Methocel MC) | Sigma-Aldrich |
| PAA | Sigma-Aldrich |
| Penicillin/ Streptomycin | Invitrogen |
| Ratten-IgG | Nordic, Tilburg |
| RPMI 1640 | Biochrom |
| Thioglycollate broth | Difco/ Becton Dickinson |
| Toto-3-jodid | Molecular probes |
| Trypsin/EDTA | Biochrom |

2.1.1.3 Kommerzielle Systemlösungen

Tabelle 2.3: Auflistung der verwendeten kommerziellen Systemlösungen, deren Bezugsquellen und Katalog- bzw. Bestellnummern

| Name | Hersteller | Kat. Nr. |
|--|-----------------------|----------------|
| ABsolute QPCR ROX Mix | Abcam | #AB-1138/a |
| ABsolute SYBR Green ROX Mix | Abcam | #AB-1162/a |
| BCA Protein Assay Kit | Pierce | #23227 |
| BioRad Protein Assay | BioRad | #500-0006 |
| CloneJet PCR cloning kit | Fermentas | #K1231 |
| Complete Protease Inhibitor Cocktail | Roche | #11697498001 |
| FuGENE 6 Transfection Reagent | Roche | #11815091001 |
| Lipofectamin | Invitrogen | SKU# 18324-012 |
| MEM-Per Eukaryotic Membrane Protein Extraction Reagent Kit | Pierce | #89826 |
| MIP-1 α ELISA Kit | Biosource/ Invitrogen | #KMC2201 |
| Plasmid Midi Kit | Qiagen | #12143 |
| Plasmid Mini Kit | Qiagen | #12123 |
| QIAquick gel extraction kit | Qiagen | #28704 |
| QIAquick PCR purification Kit | Qiagen | # 28104 |
| QIAshredder | Qiagen | #79654 |
| ReBlot Plus strong antibody stripping solution | Chemicon | #2504 |
| Reverse Transcription System | Promega | #A2500 |
| RNeasy Mini Kit | Qiagen | #74104 |
| SCS110 competent <i>E.coli</i> | Stratagene | #200247 |
| TOPO TA cloning kit | Invitrogen | #45-0641 |
| Tyramide amplification system | Molecular Probes | #T30955 |
| Western Blotting Substrate | Pierce | #32109 |

2.1.1.4 Vektoren

In nachfolgender Tabelle sind diejenigen Vektoren aufgeführt, die bisher nicht genannt worden sind, weil sie separat erworben worden sind.

Tabelle 2.4: Auflistung der verwendeten Vektoren, die separat erworben worden sind

| Vektorbezeichnung | Hersteller/ Quelle |
|----------------------|----------------------------|
| pBlueskript SK+ /SK- | Stratagene |
| pcDNA-YFP | Michael Schäfer, FU Berlin |
| pDUO-mTLR4/mMD2 | Invivogen |
| pMono-blast | Invivogen |

2.1.1.5 DNA modifizierende Enzyme

Alle verwendeten Restriktionsendonukleasen, DNA-Polymerasen und Ligasen stammen von den Firmen Fermentas, New England Biolabs oder Roche.

2.1.2 Herkunft der verwendeten Zelllinien

Tabelle 2.5: Auflistung der verwendeten eukaryotischen Zelllinien

| Name | Spezies | Typ | Herkunft/ Referenz |
|-------------------------|---|--|---|
| 3T12-3 | Maus, BALB/c | s.o | ATCC, #CCL-164, [164] |
| CHO | Chinesischer Hamster, <i>Cricetulus griseus</i> | immortalisierte Epithelzellen | ATCC, #CCL-61, [165] |
| HEK293 | Human | humane embryonale Tumorzellen aus dem Nierenepithel | ATCC, #CRL-1573, [166] |
| HEK293-mTLR4 | Human | humane embryonale Tumorzellen aus dem Nierenepithel, stabil mit mTLR4 transfiziert | Invivogen #293-mtlr4 |
| HEK293-mTLR4/mMD2/mCD14 | Human | humane embryonale Tumorzellen aus dem Nierenepithel, stabil mit mTLR4, mMD2 und mCD14 transfiziert | Invivogen #293-mtlr4md2cd14 |
| IC-21 | Maus, C57BL/6 | murine peritoneale SV40 transformierte Makrophagen | ATCC, #TIB-186, [167] |
| J774A.1 | Maus, BALB/c | murine immortalisierte Makrophagen | ATCC, #TIB-67, [168] |
| MHEC | Maus | murine immortalisierte Endothelzellen des Myocards | Endothelzellen aus dem Herzmuskel von Mäusen; J. Plendl, Institut für Veterinär-anatomie, FU Berlin |
| NIH/3T3 | Maus, BALB/c | murine immortalisierte Fibroblasten | ATCC, #CRL-1658, [169] |
| SVEC4-10 | Maus, C3H/HeJ | murine SV-40 transformierte, vaskuläre Endothelzellen | ATCC, #CRL-2181, [170] |

2.1.3 Verwendete Mausstämme

Alle Tiere stammten aus einer SPF-Zucht und wurden vorübergehend in einem konventionellen Tierstall des Robert Koch-Institutes gehalten. Bei Verwendung waren die Mäuse 6 bis 12 Wochen alt.

Tabelle 2.6: Auflistung der verwendeten Mausstämme

| Stamm | Herkunft/ Zucht | Referenz |
|------------------------|--|----------|
| C57BL/6 Wildtyp | Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), Berlin | [171] |
| C57BL/6 TLR4-defizient | s.o. | [61] |
| C57BL/6 TLR2-defizient | s.o. | [172] |

2.1.4 Herkunft und Eigenschaften der verwendeten Virenstammlösungen

Alle Virenstammlösungen wurden in 3T12-Zellen vermehrt. Die Bestimmung des Virustiters erfolgte ebenfalls mit 3T12-Zellen.

Tabelle 2.7: Auflistung der verwendeten Viren

| Virusstammlsg. | Stamm | Eigenschaften/ Deletion | <i>pfu/ml</i> | Herkunft |
|----------------|-----------------------------------|---|--------------------|--|
| MCMV-GFP* | Smith | GFP-Expression in infizierten Zellen Insertion von GFP an die Stelle von IE2 | $3,8 \times 10^8$ | Labor Wayne Yokoyama, St. Louis, MO, USA [173] |
| d6-MCMV | MW97.01 | Deletion von m144-m158 | $28,9 \times 10^8$ | M Wagner, Max von Pettenkofer-Institut, München |
| d7-MCMV | MW97.01 | Deletion von m159-m170 | $21,1 \times 10^8$ | s.o. |
| d8-MCMV | MW97.01 | Deletion von m01-m22 | $4,8 \times 10^8$ | s.o. |
| d20-MCMV | MW97.01 | Deletion von m128-m139 | $0,06 \times 10^8$ | s.o. |
| dIE1-MCMV | MW97.01 | Deletion von IE1 | 1×10^8 | Ana Angulo, Barcelona, Spanien [174] |
| C3xwt | MC96.73/ Smith BAC (pSM3fr) | Wildtyp | $1,44 \times 10^8$ | Markus Wagner, Max von Pettenkofer-Institut, München [175] |

*= Ausgangsstock: Speicheldrüsen-Stammlösung

2.1.5 Herkunft der verwendeten Antikörper

Tabelle 2.8: Auflistung der detektierten Antigene, die Klonbezeichnung der Antikörper, der Antikörperisotyp und Spenderspezies, gekoppelte Fluorochrome, sowie deren Bezugsquellen. Geordnet nach der Methode bei der sie eingesetzt wurden.

| Name (Antigen) | Konjugate | Klon | Spezies/ Isotyp | Herkunft/ Quelle |
|--|------------------|---------------|---|--|
| Durchflusszytometrische Bestimmung von Oberflächenantigenen: | | | | |
| CD115 | PE | AFS98 | monoklonal, Ratte (B-Zelle), IgG2a | eBioscience |
| CD11b | FITC, A647 | 5C6 | monoklonal, Ratte (B-Zelle), IgG2b | ATCC, #CRL-1969 |
| CD11c | FITC, A647, PacB | N418 | monoklonal, arm. Hamster (B-Zelle), IgG | ATCC, #HB-224 |
| CD14 | PE | Sa2-8 | monoklonal, Ratte (B-Zelle), IgG2a | eBioscience |
| CD16/32 | - | 2.4G2 | | Nordic |
| CD29 | PE | HMb1-1 | monoklonal, arm. Hamster (B-Zelle), IgG | eBioscience |
| CD80 | A647 | 16-10A1 | monoklonal, Hamster (B-Zelle), IgG | ATCC, #HB-301 |
| CD86 | A647 | GL1 | monoklonal, Ratte (B-Zelle), IgG2a | ATCC, #HB-253 |
| CD95 | Bio | Jo2 | monoklonal, arm. Hamster (B-Zelle), IgG2 | BD |
| F4/80 | Bio, APC | | monoklonal, Ratte (B-Zelle), IgG2a | eBioscience |
| IgG2-Isotyp | Bio | | | |
| IL-10R | PE | 1B1.3a | monoklonal, Ratte (B-Zelle), IgG1 | BD |
| MHCI-H2D ^b | Bio | 28-14-8 | monoklonal, Maus, IgG2a | BD |
| MHCI-H2K ^b | Bio | AF6-88.5.3 | monoklonal, Maus, IgG2a | BD |
| MHCII | FITC, PE | M5/ 114.15.2 | monoklonal, Ratte (B-Zelle), IgG2b | eBioscience |
| TLR2 | Bio, PE | 6C2 | monoklonal, Ratte (B-Zelle) IgG2b | eBioscience |
| TLR4/MD2 | Bio, PE | MTS510 | monoklonal, Ratte (B-Zelle), IgG2a | eBioscience |
| Durchflusszytometrische Bestimmung von intrazellulären Molekülen: | | | | |
| IL-12 | PE | C17.8 + C15.6 | monoklonal, Ratte (B-Zelle), IgG2a + IgG1 | eBioscience |
| iNOS/ NOS Type II | FITC | 6 | monoklonal, Maus, IgG2a | BD |
| MCMV pp89 (IE1) | Cy5 | Croma101 | monoklonal, Maus, IgG1 | Stipan Jonjic, Universität, Rijeka, Kroatien |

| Name (Antigen) | Konjugate | Klon | Spezies/ Isotyp | Herkunft/ Quelle |
|-------------------------|-----------|-----------|--|--|
| MCP-1 | PE | 2H5 | monoklonal, arm. Hamster (B-Zelle), IgG1 | BD |
| MIP-1 α | Dig | AF-450-NA | polyklonal, Ziege, IgG | R&D Systems |
| MIP-1 β | Dig | AF-451-NA | polyklonal, Ziege, IgG | R&D Systems |
| RANTES | Dig | AF478 | polyklonal, Ziege, IgG | R&D Systems |
| TNF- α | PE | MP6-XT22 | monoklonal, Ratte (B-Zelle), IgG1 | eBioscience |
| Westernblot/ IP: | | | | |
| MCMV (E1) | - | Croma103 | monoklonal, Maus, IgG1 | Stipan Jonjic, Universität, Rijeka, Kroatien |
| TLR4 | - | - | polyklonal, Kaninchen, IgG | eBioscience, #24-9004 |
| TLR4 | - | - | polyklonal, Kaninchen, IgG | Imgenex, #IMG-577 |
| TLR4 | - | - | polyklonal, Kaninchen, IgG | Imgenex, #IMG-578A |
| TLR4 | - | - | polyklonal, Kaninchen, IgG | Imgenex, #IMG-579A |
| TLR4 | - | - | polyklonal, Ziege, IgG | Santa Cruz, #M16 |
| β -Aktin | | AC-15 | monoklonal, Maus, | Sigma-Aldrich |

Sekundäre Antikörper

Tabelle 2.9: Auflistung der Sekundärantikörper und Detektionsreagenzien

| Name | Hersteller |
|---------------------------|-----------------|
| goat α Rabbit-HRP | Dianova |
| rabbit α Mouse-HRP | DAKO |
| Streptavidin -APC | eBioscience |
| Streptavidin -HRP | Dianova |
| Streptavidin -PE | eBioscience |
| Streptavidin-FITC | eBioscience |
| α Dig-Alexa647 | eigene Kopplung |
| α Mouse-bio | eBioscience |

2.1.6 Geräte und Software

Aufgelistet werden nur spezielle Geräte, die nicht zur Standardeinrichtung eines molekularbiologischen Labors gehören.

Tabelle 2.10: Auflistung spezieller verwendeter Geräte

| Name | Hersteller | Software (Steuerung und Auswertung) |
|------------------------------------|--------------------------|--|
| ABI 7000 Sequence Detection System | Applied Biosystems | ABI Prism 7000 SDS Software |
| Bioanalyzer 2100 | Agilent | 2100 Expert |
| Bioplex-System | BioRad | Bioplex Manager |
| FACS Calibur | BD Biosciences | Cell Quest Pro, FlowJo |
| cLSM Zeiss 510 Meta | Carl Zeiss | LSM Image Browser |
| LSRII | BD Biosciences | Diva, FlowJo |
| Nanodrop 1000 | Thermo Fisher Scientific | ND-1000 |

2.1.7 Zusammensetzung von Medien und Lösungen

2.1.7.1 Zellkulturmedien

Tabelle 2.11: Auflistung der Zusammensetzung der Zellkulturmedien

| Bezeichnung | Zusammensetzung* |
|-----------------------|---|
| 3T12-Medium | in 500 ml D-MEM: 10 % NKS, 2 mM L-Glutamin, 100 µg/ml Pen/Strep 1 mM HEPES |
| 3T3-Medium | in 500 ml D-MEM: 10 % FKS, 2 mM L-Glutamin, 100 µg/ml Pen/Strep |
| BMM-Medium | in 500 ml D-MEM: 10 % FKS, 5 % HS, 1 mM Na-Pyruvat, 2 mM L-Glutamin, 100 µg/ml Pen/ Strep, 30 ng/ml rmM-CSF |
| Einfriermedium | 80 % FKS; 20 % DMSO |
| IC-21/J774-Medium | in 500 ml RPMI 1640: 10 % FKS, 100 µg/ml Pen/Strep, 2 mM L-Glutamin, 1mM HEPES |
| Methylzellulosemedium | 2,5 g/l (w/v) Methylzellulose in H ₂ O, 1 x MEM, 5 % FKS, 2 mM L-Glutamin, 100 µg/ml Pen/ Strep, 2,75 g/l NaHCO ₃ |
| MHEC/ SVEC-Medium | in 500 ml D-MEM: 5 % FKS, 2 mM L-Glutamin, 100 µg/ml Pen/ Strep, 10 mM HEPES |
| PEC-Medium | in 500 ml RPMI1640: 10 % FKS, 50 µM β-Mercaptoethanol, 100 µg/ml Pen/Strep, 2 mM L-Glutamin |

* = Prozentuale Angabe von festen Stoffen beziehen sich immer auf das Verhältnis Gewicht zu Volumen (w/v) in dem der betreffende Stoff gelöst wurde und prozentuale Angaben von Flüssigkeiten beziehen sich auf das Verhältnis von Volumen zu Volumen (v/v).

2.1.7.2 Medien für die Anzucht von *E. coli*

Tabelle 2.12: Auflistung der Medien, die zur Anzucht von *E. coli* verwendet wurden

| Bezeichnung | Zusammensetzung |
|----------------------------------|--|
| LB-Medium (Luria-Bertani broth) | je Liter: 10 g Bacto-Tryptone, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, 0,195 g NaOH, Festmedium: zsl. 2 % Bacto-Agar |
| SOC-Medium | je 100 ml: 2 g Bacto-Trypton, 0,5 g Bacto Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 20 mM Mg ²⁺ Stammlösung, 20 mM Glucose |
| Selektionsmedien (Zusätze): | |
| Fast-Media Blas agar (Invivogen) | 100 µg/ml Ampicillin in LB-Medium |
| Fast-Media Blas TB (Invivogen) | Blasticidin |

2.1.7.3 Lösungen

Tabelle 2.13: Auflistung der Zusammensetzung der verwendeten Lösungen

| Bezeichnung | Zusammensetzung* |
|-----------------------------------|--|
| 10 x Fc-Blockadelösung | 1 mg/ml anti-CD16/CD32, 0,5 mg/ml Ratten IgG |
| 4 x Probenpuffer (Lämmli) | 100 mM Tris/HCl, pH 6,8, 4 % SDS, 20 % Glycerol, 0,2 % Bromphenolblau, 200 mM DTT |
| Blockadepuffer (Western Blot) | in PBS-T: 2 % Milchpulver, alternativ: 2 % BSA oder 2 % FKS |
| Boratpuffer, pH 8,5 | 0,1 M Borsäure, 0,025 M Na ₂ B ₄ O ₇ , 75 mM NaCl, pH ad 8,5 mit 4N NaOH |
| Elektrophoresepuffer | 25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1 % SDS |
| FACS-PBS | in PBS: 2,5 % FKS, 0,1 % NaN ₃ |
| iFACS-PBS | in FACS-PBS: 1 % Saponin |
| Lösungen für die Erythrozytenlyse | Lösung A: 185 mM NH ₄ Cl, Lösung B: 0,17 M Tris/HCl, pH 7.2 (vor der Verwendung werden 9 Teile der Lösung A mit 1 Teil der Lösung B gemischt.) |
| Lysepuffer (Western Blot) | 50 mM Tris (pH 8), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, Roche <i>complete protease inhibitor cocktail</i> , 1 % NP-40 oder 1 % Triton X-100, |
| Mg ²⁺ Stammlösung | je 100 ml: 20,33 g MgCl ₂ • 6 H ₂ O, 24,65 g MgSO ₄ • 7 H ₂ O |
| PAGE Sammelgel | für 6 ml 3 % Sammelgel: 0,6 ml Acrylamid/Bisacrylamid (30 %/0,8 %), 1,5 ml 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8, 0,06 ml 10 % SDS, 3,8 ml bidestilliertes Wasser, 0,06 ml 10 % APS, 0,006 ml TEMED |
| PAGE Trenngel | für 15 ml 10 % Trenngel: 5 ml Acrylamid/Bisacrylamid (30 %/0,8 %), 3,75 ml 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8, 0,15 ml 10 % SDS, 6 ml bidestilliertes Wasser, 0,15 ml 10 % APS, 0,015 ml TEMED |
| PBS | 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 Na ₂ HPO ₄ × 2H ₂ O, 1,5 KH ₂ PO ₄ |
| PBS-T | 0,1 % Tween20 in PBS |
| Propidiumjodid-Stammlösung | 1 mg/ml Propidiumjodid in PBS |
| Transferpuffer | 48 mM Tris, 39 mM Glycin, 0,037 % SDS, 20 % Methanol |
| VBS-Puffer | 50 mM Tris/HCl pH 7,8, 10 mM KCl, 5 mM EDTA |

* = Prozentuale Angabe von festen Stoffen beziehen sich immer auf das Verhältnis Gewicht zu Volumen (w/v) in dem der betreffende Stoff gelöst wurde und prozentuale Angaben von Flüssigkeiten beziehen sich auf das Verhältnis von Volumen zu Volumen (v/v).

2.2 Methoden

2.2.1 Gewinnung von murinen Knochenmarksmakrophagen (BMM)

Eine C57BL/6 Maus wurde durch Inhalation von Isofluran anästhesiert und durch zervikale Dislokation getötet. Die Oberschenkelknochen wurden freigelegt und inklusive Knie entnommen. In sterilen Petrischalen wurden die Oberschenkelknochen mit Sezierbesteck gesäubert, in eine Pinzette gespannt und der Knochen mit warmen PBS in ein steriles 15 ml Zentrifugationsröhrchen ausgespült. Das erhaltene Knochenmark wurde resuspendiert und die Suspension zentrifugiert (350 x g, 6 min, 20° C). Anschließend wurde der Überstand verworfen und die Zellen in BMM-Medium aufgenommen. Die Zellen wurden zu gleichen Teilen in 10 ml Volumen in sterile Petrischalen ausgesät und dem Zellmedium wurde 30 ng/ml murines, rekombinantes M-CSF zugesetzt. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 5 % CO₂ kultiviert.

Am 6. Tag nach der Aussaat wurde der Überstand entfernt und die adhärennten Zellen mit warmen PBS gespült. Durch 20minütige Inkubation im Kühlschrank mit 7 ml sterilem 2 mM EDTA/ PBS wurden die Zellen abgelöst. Danach wurden sie zentrifugiert, in frischem BMM-Medium aufgenommen, zu gleichen Teilen in 6 sterile Petrischalen ausgesät, mit 30 ng/ml M-CSF versetzt und wieder im Brutschrank kultiviert [176].

Am 11. Tag nach der Präparation wurden die Zellen wie beschrieben eingesammelt, ausgezählt und zur weiteren Verwendung in unbeschichteten 6-Kavitäten-Platten, 1 x 10⁶ Zellen/ Kavität in 2 ml BMM-Medium ohne M-CSF, ausgesät und 24 h später stimuliert oder infiziert.

2.2.2 Gewinnung von murinen peritonealen Exsudatzellen (PEC)

Zur Gewinnung von peritonealen Exsudatzellen wird durch 3 % Thioglycollate-Lösung *intraperitoneal* (i.p.) eine Peritonitis verursacht und 3 Tage später durch eine Peritoneallavage die eingewanderten Zellen (PEC) eingesammelt.

Eine C57BL/6 Maus wurde am ersten Tag mit 500 µl 3 % Thioglycollate broth *i.p.* gespritzt. Am vierten Tag wurde die Maus durch Inhalation von Isofluran anästhesiert und durch eine zervikale Dislokation getötet. Anschließend wurde das Peritoneum ohne es zu verletzen unter einer Sterilbank zugänglich gemacht.

Die Peritoneallavage wurde mit einer Spritze und 6 ml warmen PBS durchgeführt. Die erhaltene Zellsuspension wurde zentrifugiert (350 x g, 6 min, 20° C) und der Überstand wurde abgesaugt. Waren im Zellsediment noch Erythrozyten enthalten, wurde eine Erythrozytenlyse durchgeführt, mit PBS gespült und erneut zentrifugiert. Die abschließend in PEC-Medium aufgenommenen Zellen wurden gezählt und in nicht beschichtete Zellkulturschalen oder in sterile Petrischalen (Sterilin) ausgesät. Zur Anreicherung der Makrophagen und weiteren Verwendung wurden diese Zellen 24 h über Nacht im Brutschrank kultiviert und am nächsten Tag wurden durch Absaugen die nicht adhärenen Zellen entfernt [177].

2.2.3 Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer Sterilbank durchgeführt. Die verwendeten Lösungen und Materialien waren steril. Die Zellen wurden ausnahmslos in einem Brutschrank mit 5 % CO₂ und 98 % rel. Luftfeuchte bei 37°C kultiviert. Die verbliebenen Proteine des Komplementsystems in allen verwendeten Seren wurden bei 56°C 1 h im Wasserbad hitzeinaktiviert. Zellkulturmedien wurden immer im Wasserbad auf 37°C vor der Verwendung aufgewärmt. Adhärenente Zellen wurden grundsätzlich, nach Entnahme des Mediums und Ausspülen des Restmediums mit erwärmten PBS und mit Trypsin/EDTA vom Boden der Zellkulturflaschen abgelöst, in Zellmedium resuspendiert und durch Zentrifugation (350 x g, 6 min, 20°C) sedimentiert. Die primären Zelllinien BMM und PEC wurden in unbeschichtete Zellkulturflaschen oder sterile 9 mm-Petrischalen (Sterilin) ausgesät und nach Abnahme des Mediums mit kaltem 2 mM EDTA in PBS abgelöst.

2.2.3.1 Quantifizierung vitaler Zellen

Zur Bestimmung der Zelldichte (Zellen/ ml) und der Vitalität der Zellen wurde der Trypanblautest nach einer modifizierten Methode von Phillips und Terryberry [178] durchgeführt.

Hierbei wurde ein Volumenteil der Zellsuspension mit 0,1 % Trypanblau in PBS 1:2 verdünnt, 2 min inkubiert und innerhalb von 10 min mit einer Neubauer Zählkammer unter einem Durchlichtmikroskop ausgezählt. Tote Zellen färbten sich wesentlich schneller als lebende blau.

2.2.3.2 Kryokonservierung von eukaryotischen Zellen und Bakterien

A.) Eukaryotische Zellen

Zur Konservierung von Zellen wurde eine in Medium kultivierte Zellsuspension zentrifugiert (350 × g, 6 min, 20°C). Das Zellsediment wurde auf Eis mit 900 µl zellspezifischem Medium (4°C) resuspendiert, mit 900 µl Einfriermedium (4°C) versetzt, in ein 1,8 ml Einfrierröhrchen (Nunc) überführt, langsam auf -80°C heruntergekühlt und nach 1 d bis 7 d in einen Stickstoff-Lagerbehälter (Biosafe, Cryotherm) für eine Langzeitlagerung bei -196°C in flüssigem N₂ überführt.

Da das DMSO des Einfriermediums zellschädigend ist, wurde auf ein zügiges Auftauen geachtet. Hierfür wurden die gefrorenen Zellen schnell bei 37°C in einem Wasserbad aufgetaut, sofort in 10 ml zellspezifisches Medium (4°C) überführt und zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in dem Medium resuspendiert und kultiviert.

B.) *E. coli*

Zur Langzeitlagerung von *E. coli*-Stämmen wurde ein Glycerolkultur hergestellt. Hierzu wurde eine Kolonie des betreffenden *E. coli* Stammes in 500 µl 1,5 % Bacto-Pepton gelöst und anschließend 500 µl 87 % Glycerol zugegeben, gemischt und bei -80°C gelagert.

Zur Wiederverwendung wurde direkt mit einer sterilen Öse Material aus der Glycerolkultur entnommen. Die *E. coli* Kultur wurde dann entweder auf festen oder in flüssigen Nährmedien ausgebracht.

2.2.4 Herstellung der Virenstammlösung

Ex vivo hergestellte Virenstammlösungen wie beispielsweise MCMV aus den Speicheldrüsen infizierter Mäuse haben eine höhere Virulenz, sind aber vor allem nicht angepasst an ein bestimmtes *in vitro* System.

Eine Attenuierung bedeutet den Verlust wesentlicher Pathogenitätsfaktoren des Virus, da in der Zellkultur kein Selektionsdruck durch das Immunsystem ausgeübt wird.

Um die Virulenz eines Virusstocks zu erhalten, wurde zur Herstellung einer Virusstammlösung aus der Zellkultur daher von einer *ex vivo* gewonnenen Virusstammlösung aus der Speicheldrüse ausgegangen.

2.2.4.1 Herstellung einer Speicheldrüsenstammlösung

Zur Herstellung ein einer Speicheldrüsenstammlösung, als Ausgangslösung für die Generierung von Zellkulturstammlösungen wurden BALB/c Mäuse intraperitoneal mit 10^4 pfu des MCMV-GFP Smith Stamm infiziert. Vierzehn Tage nach der Infektion wurden die Speicheldrüsen der Tiere entnommen, zerkleinert und in 3 ml D-MEM/ 10 % FKS mit einem Douncer (Wheaton, USA) homogenisiert. Das Homogenat wurde zentrifugiert ($950 \times g$, 10 min, 4°C), der Überstand abgenommen und aufbewahrt (4°C), das verbliebene Sediment wurde in 3 ml D-MEM/ 10 % FKS resuspendiert und erneut im Douncer aufgeschlossen. Das Homogenat wurde wieder zentrifugiert, der Überstand wurde abgenommen und mit dem aufbewahrten Überstand des ersten Zentrifugationsschrittes vereinigt. Die vereinigten Überstände wurden durch ein Sieb (Durchmesser $70 \mu\text{m}$) gegeben, gut gemischt und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend aliquotiert bei -80°C aufbewahrt [179].

2.2.4.2 Herstellung und Aufreinigung einer Virenstammlösung aus einer 3T12-Kultur

Zur Herstellung einer Virenstammlösung aus der Zellkultur wurden 3T12-Zellen in 175 cm^2 Zellkulturflaschen bis zu einer Konfluenz von ca. 80 % expandiert und mit MCMV aus der Speicheldrüsen-Stammlösung (außer bei den MCMV Deletionsmutanten) mit einer *moi* von ca. 0,01 - 0,05 in 4 - 5 ml 3T12 Medium mit lediglich 2 % NKS infiziert. Hierzu wurden mit diesem Minimalvolumen die Zellkulturflaschen alle 15 min kurz geschwenkt und zur gleichmäßigen Benetzung in einer anderen Orientierung zurück in den Brutschrank gestellt. Nach 1,5 h wurde jede Zellkulturflasche mit ca. 25 ml 3T12/ 2 % NKS Medium aufgefüllt. Sobald ein maximaler zytopathischer Effekt der Virusinfektion auf die Zellen zu beobachten war (nach 5 bis 7 Tagen), wurden die verbliebenen Zellen mit einem Zellschaber abgenommen und inklusive Medium in 500 ml Zentrifugationsröhrchen überführt und zentrifugiert ($6000 \times g$, 20 min, 4°C).

Alle weiteren Arbeiten erfolgten auf Eis. Der Überstand wurde bis auf ca. 5 ml entnommen und in neue Zentrifugationsröhrchen überführt und diese bei 4°C aufbewahrt. Das Sediment wurde in den verbliebenen 5 ml Medium resuspendiert, in einem Douncer homogenisiert und erneut zentrifugiert (17000 x g, 20 min, 4°C). Der Überstand wurde mit dem gelagerten Überstand der ersten Zentrifugation vereinigt und zentrifugiert (27000 x g, 3 h, 4°C). Der erhaltene Überstand wurde bis auf ca. 6 ml verworfen. Das Sediment wurde bedeckt vom restlichen Überstand über Nacht auf Eis im Kühlraum gelagert. Am nächsten Tag wurde das Sediment mit dem verbliebenen Überstand im Douncer resuspendiert. Die erhaltene Suspension wurde in Polyallomerröhrchen auf 15 % Sucrose/ VBS-Puffer geschichtet und in der Ultrazentrifuge zentrifugiert (131000 x g, 1,5 h, 4°C). Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Virusediment in VBS-Puffer resuspendiert, aliquotiert und bei -80°C gelagert [180].

2.2.5 Titration der Virenstammlösungen mittels Plaque-Assay

Zur Berechnung der *plaque forming unit* (pfu) der Virenstammlösungen wurden diese auf 3T12 Zellen titriert. In einer 48-Kavitäten-Platte wurden 3T12-Zellen ausgesät und bis zu einer Konfluenz von ca. 90 % expandiert. Je 450 µl einer Verdünnungsreihe (in Triplikaten) der Virenstammlösung, verdünnt in 3T12/ 2 % NKS-Medium, wurden zu den Zellen gegeben. Die Infektion erfolgte durch zweimalige Zentrifugation in einem Ausschwingrotor (300 x g, 15 min, 4°C) der Platten, wobei zum zweiten Durchlauf die Platten um 180° horizontal gedreht wurden. Anschließend wurden die Platten für 2 h im Brutschrank inkubiert und nachfolgend der Überstand abgesaugt. Die Zellen wurden daraufhin mit ca. 250 µl Methylzellulose-Medium überschichtet. Nach vier bis fünf Tagen erfolgte die Auszählung der gebildeten Plaques unter dem Mikroskop (im Fall von MCMV-GFP unter dem Fluoreszenzmikroskop).

2.2.6 In vitro Infektion

Zur *in vitro* Infektion wurden abhängig von den verwendeten Zellkulturflaschen und Zellkulturplatten zwei verschiedene Strategien verwendet. Infektionen in Zellkulturflaschen wurden 1,5 Stunden mit Minimalvolumen im Brutschrank bei 15-minütiger Änderung der Orientierung inkubiert und abschließend mit zellspezifischem Medium aufgefüllt.

Infektionen in Zellkulturplatten wurden durch zweimaliges Zentrifugieren im Ausschwingrotor (300 x g, 30 min, 4°C) mit Änderung der horizontalen Orientierung um 180° durchgeführt. Bei allen Zellen, außer den PEC und BMM, enthielt das Medium lediglich 2 % Serum, um eine weitere Expansion der Zellen zu minimieren.

2.2.7 In vitro Stimulation

Die Zellen wurden mit verschiedenen Agenzien stimuliert. Die Stimulation erfolgte stets direkt im Zellkulturmedium, die verwendeten finalen Konzentrationen der einzelnen Agenzien sind in nachfolgender Tabelle 2.14 aufgeführt. Alle Zytokine und Wachstumsfaktoren sind laut Herstellerangaben murine, rekombinant hergestellte Proteine.

Tabelle 2.14: Auflistung der verwendeten Stimulanzen, Zytokine und Wachstumsfaktoren

| Agens | finale Konzentration | Hersteller | Kat.Nr. |
|----------------------------------|----------------------|----------------------------|-------------|
| CpG | 20 µg/ml | Coley Pharmaceutical Group | #10103 |
| IFN-β | 100 U/ml | R&D Systems | #12400-1 |
| IFN-γ | 20 µg/ml | R&D Systems | #485-MI-100 |
| Loxoribin | 100 µg/ml | Invivogen | #tlrl-lox |
| LPS O55:B5 (<i>E. coli</i>) | 2 µg/ml | Sigma-Aldrich | #L6529 |
| M-CSF | 100 ng/ml | R&D Systems | #416-ML-050 |
| PGN (<i>S. aureus</i>) | 10 µg/ml | Invivogen | #tlrl-pgnsa |
| polyI:C | 25 µg/ml | Invivogen | #tlrl-pic |
| TNF-α | 10 ng/ml | Peptotech Inc. | #315-01A |

2.2.8 Kopplung von Antikörpern mit Digoxigenin

Zum Einsatz kommerzieller polyklonaler Antikörper gegen die Chemokine MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES wurden diese mit Digoxigenin gekoppelt. Die Prozedur erfolgte modifiziert nach der von J.W. Goding beschriebenen Methode [181]. Verwendet wurde Digoxigenin-3-O-methylcarbonyl- ϵ -aminocaprinsäure-N-hydroxysuccinimidester (Dig-NHS, MW=658,8 g/mol), von dem 5 g in 566 μ l wasserfreiem DMSO (13,4 mM, Dig-NHS-Stammlösung) gelöst und aliquotiert wurden. Die kovalente Bindung zwischen Antikörper und Digoxigenin kommt durch einen nukleophilen Angriff einer primären Aminogruppe des zu koppelnden Antikörpers auf den Carbonyl-Kohlenstoff des Aminocaprinsäureesters unter Abgang des Succinimids zustande. 50 μ g des lyophilisierten, kommerziellen Antikörpers wurde in 100 μ l Boratpuffer gelöst. Hinzugefügt wurden 1,25 μ l der Dig-NHS Stammlösung, was einem molaren Kopplungsverhältnis zwischen polyklonalem Antikörper und Dig-NHS von 1:50 entsprach. Diese Mischung wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurde jeweils eine Sephadex G-25 Gelfiltrationssäule mit 3 x 5 ml PBS äquilibriert. Anschließend wurden zur Erhöhung des Volumens weitere 100 μ l des Boratpuffers zur Antikörper-Dig-NHS Mischung zugegeben und auf die Säule aufgetragen. Das Eluat wurde in 200 μ l Schritten aufgefangen und je 5 μ l wurden davon mit 5 μ l des BioRad Reagenz aus dem *BioRad Protein Assay* auf einem Parafilm getropft und gemischt. Alle 200 μ l Fraktionen wurden zusammengefasst, die einen bläulichen Farbumschlag zeigten, welcher ein Maß für den Proteingehalt ist. Zur Stabilisierung der Proteinlösung wurde schließlich eine 10 %ige BSA-Lösung im Verhältnis 1:50 zugegeben [182]. Die gekoppelten Antikörper wurden abschließend im Durchflusszytometer (iFACS) titriert um die optimale Konzentration für eine Färbung zu bestimmen, dann passend aliquotiert und im Kühlschrank gelagert.

2.2.9 Durchflusszytometrie

In der Durchflusszytometrie (FACS = *Fluorescence activated cell sorting*) [183] kann das Vorhandensein von Antigenen auf Einzelzellebene gemessen werden und zwar grundsätzlich sobald ein antigenspezifische Antikörper vorliegt, der mit einem zweiten beispielsweise spezies- oder isotypspezifischen fluoreszenzmarkierten Antikörper nachgewiesen werden kann [184], [185], [186]. Um mehrere Antigene in oder auf der Oberfläche einer Zelle nachzuweisen, können diese Antikörper auch direkt mit Fluorochromen oder Pigmenten, die chromophore Gruppen enthalten, konjugiert werden.

Der Typ des Fluorochroms, genauer die spezifische Absorptions- und Emissionswellenlänge, der zum Einsatz kommen kann, sowie die Anzahl der gleichzeitig einsetzbaren verschiedenen Fluorochrome ist abhängig von der Ausstattung des Durchflusszytometers. Alle Antikörper wurden vor der Verwendung auf jeweils 5×10^5 Zellen titriert, um durch den Einsatz der richtigen Konzentration optimale Färbeergebnisse zu erlangen. Um die Spezifität der Antikörperbindung an sein Antigen zu überprüfen, kann die Färbung des Antigens mit dem Fluorochrom gekoppelten Antikörper durch Vorinkubation mit demselben ungekoppelten Antikörper blockiert werden. Hierfür wurden die Zellen mindestens 5 min mit dem ungekoppelten Antikörper im 100 fachen Überschuss zum gekoppelten Antikörper vorinkubiert.

Eine andere Möglichkeit ist die so genannte „kalte Blockade“, bei der der zu überprüfende Antikörper mit seinem löslichen, beispielsweise rekombinanten, Antigen vorinkubiert und damit die Bindungsstelle spezifisch blockiert wird.

Eine weitere notwendige Überprüfung der Spezifität des einzusetzenden monoklonalen Antikörpers ist die Verwendung von Isotypkontrollen, also der Einsatz von Antikörpern gleichen Isotyps und aus der gleichen Spezies stammend, die in oder auf den Zellen keine Epitope erkennen. Zusätzlich ist zu beachten, dass vor allem Zellen des Immunsystems, insbesondere B-Zellen, aber auch Makrophagen über verschiedene Fc-Rezeptoren verfügen. Diese binden unspezifisch Antikörper über deren konservierten Fc-Teil. Aus diesem Grund werden diese Zellen vor der Antikörperinkubation mit einer Fc-Blockierungslösung vorinkubiert.

2.2.9.1 Durchflusszytometrische Messung von Oberflächenmarkern

Die durchflusszytometrische Färbung von Oberflächenmarkern auf lebenden Zellen erfolgte grundsätzlich auf Eis. Sobald Antikörper eingesetzt wurden, die mit einem Fluorochrom konjugiert waren, wurde darauf geachtet das so wenig wie möglich Licht die Proben erreichen konnte. Durch die Energieaufnahme des Chromophors und durch Reaktion der Doppelbindungen des konjugierten π -Systems mit anderen Molekülen neigt ein Großteil der Fluorochrome dazu „auszubleichen“.

Zur durchflusszytometrischen Bestimmung einer bestimmten Proteinexpression auf der Oberfläche von Zellen wurden bis zu 1×10^6 Zellen in die Kavität einer 96-Kavitäten-Platte mit Rundboden zentrifugiert ($350 \times g$, 5 min, 4°C).

Zwischen allen Schritten zur Bindung der eingesetzten Antikörper wurden die Zellen zweimal mit FACS-PBS gespült und wieder abzentrifugiert. Zur Blockade von unspezifischen Bindungen der Antikörper an vorhandene Fc-Rezeptoren der Zelle wurden die Zellen 20 min mit einer Fc-block Lösung inkubiert. Anschließend folgten die Inkubationen mit den antigenspezifischen Antikörpern (je 20 min). Nach dem Abschluss aller Inkubationsschritte wurden die Zellen in $200 \mu\text{l}$ FACS-PBS resuspendiert und in spezielle Röhrchen (*cluster tubes*) überführt. Diese Röhrchen wurden in die passenden Trägerröhrchen gestellt. Da die Antikörper auch unspezifisch an tote Zellen binden können, wurden die Proben kurz vor der Messung mit Propidiumjodidlösung (PI) versetzt. Propidiumjodid interkaliert in die bei toten Zellen zugängliche DNA und hat ein typisches Emissionsspektrum im Bereich von 675 nm. Die Messungen erfolgten bei bis zu zwei verschiedenen Fluorochromen mit dem FACS Calibur im Fluoreszenzkanal (FL) 1 mit GFP oder FITC und im FL4 mit A647, APC oder Cy5, sowie PI im FL3 [187]. Bei Messungen mit mehr als zwei Fluorochromen erfolgte die Messung im LSR II. Die Auswertung erfolgte in beiden Fällen mit der Software FlowJo in regelmäßig aktualisierten Versionen. Hierbei wurde neben der Darstellung zweier Fluoreszenzkanäle gegeneinander in einem 2-dimensionalen Streudiagramm auch die softwareeigene Berechnung des geometrischen Mittels der Fluoreszenzintensität verwendet.

2.2.9.2 Durchflusszytometrische Messung von intrazellulären Marken

Die Messung von intrazellulären Zytokinen und Chemokinen unterscheidet sich von der Durchführung im Vergleich zur Messung der Oberflächenmarker nur in wenigen grundlegenden Schritten in der Durchführung der Probenaufbereitung [188], [189].

Zum Einen wurde 3 h vor Ende einer Stimulation oder Infektion der Zellen *in vitro* die Sekretion der produzierten Zytokine und Chemokine durch die Zugabe von Brefeldin A (2 µg/ml in DMSO) blockiert. Brefeldin A (aus *Eupenicillium brefeldianum*) greift reversibel in den Mechanismus, der zur Trennung des Golgi-Apparates vom Endoplasmatischen Retikulum führt, in Säugetierzellen ein und hemmt dadurch den intrazellulären Proteintransport und die damit verbundenen Sekretion der Proteine [190], [191].

Zum Anderen wurden die Zellen unmittelbar nach der Ernte mit 2 % Formaldehyd 20 min bei Raumtemperatur fixiert. Außerdem wurde das zum Spülen und zur Inkubation mit den Antikörpern verwendete FACS-PBS mit 1 % Saponin versetzt. Das Detergenz Saponin permeabilisiert reversibel die Zellmembranen der fixierten Zellen, so dass die Antikörper in diese diffundieren können [192]. Ab den Zeitpunkt der Fixierung war es nicht mehr notwendig, die weiteren Schritte der Antikörperinkubation auf Eis durchzuführen.

Eine gleichzeitig zur intrazellulären Färbung durchgeführte Oberflächenfärbung wurde anhängig von der Sensibilität der Oberflächenepitope oder der Fluorochrome gegenüber der Formaldehydfixierung vor oder nach der Fixierung durchgeführt.

Die Sensibilität wurde in Vorversuchen ermittelt, die Daten werden in dieser Arbeit nicht gezeigt.

2.2.10 Phagozytoseassay

Zur Überprüfung der Phagozytosefähigkeit der BMM wurde Dextran-FITC (40 kDa) verwendet. Dextran-FITC (40 kDa) wird über den Rezeptor SIGNR3 phagozytiert [30]. Dem Zellmedium der BMM wurden in einer Endkonzentration von 10 µg/ml Dextran-FITC (gelöst in PBS) zugegeben und die Zellen wurden damit 2 h inkubiert.

Neben unbehandelten BMM wurden 24 h sowie 48 h mit LPS voraktivierte Zellen und voraktivierte und nachträglich 24 h vollständig mit MCMV infizierte Zellen verwendet. Die Inkubation mit Dextran-FITC erfolgte parallel jeweils bei 37°C oder 4°C in Duplikaten.

Nach dem Ende der Inkubation mit Dextran-FITC wurden die Zellen zur Unterbrechung der Phagozytose mit kaltem FACS-PBS gespült. Ab diesem Zeitpunkt wurden die Zellen ständig auf Eis bearbeitet. Nach dem Ablösen der Zellen wurde eine Hälfte sofort und lebendig zur Detektion von aufgenommenen Dextran-FITC durchflusszytometrisch vermessen (entsprechend dem Protokoll für die Oberflächenmarker, s. o.). Die andere Hälfte wurde entsprechend dem Protokoll für die Detektion von intrazellulären Markern bearbeitet, um die Infektionseffizienz zu überprüfen. Die Infektionseffizienz wurde durch den Nachweis des MCMV-Proteins pp89 durch Verwendung des Croma101-Cy5 Antikörpers durch eine intrazelluläre Durchflusszytometrie nachgewiesen. Die Trennung der durchflusszytometrischen Analysen war erforderlich, da das aufgenommene Dextran-FITC nicht fixierungsresistent war.

2.2.11 ELISA

In dieser Arbeit wurde ein ELISA-Kit der Firma Biosource zur Detektion von MIP-1 α in Zellüberständen verwendet. Die Zellüberstände sind mit denen, die für weitere Messung mit dem Bioplex System verwendet wurden identisch. Die MIP-1 α Detektion diente als Vortest. Der ELISA wurde wie vom Protokoll des Herstellers gefordert durchgeführt. Als Leerkontrolle fand das zellspezifische Medium Verwendung.

2.2.12 Bioplex-System (Cytometric bead assay)

Das Bioplex-System der Firma BioRad basiert auf der xMAP-Technologie der Firma Luminex (Austin, TX, USA). Diese Technologie basiert wiederum auf verschiedenartig fluoreszenzmarkierten Polystyrenkugeln (*beads*) mit einem Durchmesser von 5,5 μm . Die Kugeln sind intern mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen in verschiedenen Mischungsverhältnissen gefärbt, daraus ergeben sich verschieden Kugelklassen. Jede Kugelklasse dient als Träger eines antigenspezifischen Antikörpers (Fängerantikörper).

Zur Detektion des „eingefangenen“ Antigens, beispielsweise des Zytokins, wird ein weiterer antigenspezifischer, biotinylierter Antikörper (Detektionsantikörper), der ein anderes Epitop des Antigens erkennt, verwendet. Der Detektionsantikörper wird wiederum mit Phycoerythrin-gekoppeltem Streptavidin (SA-PE, Reporterfarbstoff) nachgewiesen. Das Bioplex-System ist prinzipiell eine modifizierte Durchflusszytometrie, die anstelle von Zellen die genannten Polystyrenkugeln misst. Zum Einsatz kommen zwei unterschiedliche Laser, die gleichzeitig zwei Messungen ermöglichen. Ein 635 nm Laser regt die Fluorochrome der antigenspezifischen Kugeln an, die sich durch das spezifische Mischungsverhältnis der Fluorochrome unterscheiden lassen. Der zweite 523 nm Laser regt das Phycoerythrin an, wodurch einer bestimmten, detektierten und antigenspezifischen Kugelklasse der korrespondierende Detektionsantikörper zugewiesen werden kann. Durch standardisierte Antikörperkonzentrationen, die innerhalb eines Versuches als Standardreihe dienen, kann zusätzlich die Konzentration eines Antigens in der Probe bestimmt werden.

Verwendet wurden *x-Plex Assay Kits* für murine Zytokine, die entsprechend den Herstellerangaben kombiniert wurden. Die einzelnen gemessenen Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren sind in nachfolgender Tabelle aufgeführt.

Tabelle 2.15: Auflistung der gemessenen murinen, löslichen Mediatoren im Bioplex-System

| Zytokine | Chemokine | Wachstumsfaktoren |
|---------------|----------------|-------------------|
| IL-1 β | MCP-1 | FGF-basic |
| IL-2 | MIP-1 α | LIF |
| IL-4 | MIP-1 β | M-CSF |
| IL-6 | RANTES | VEGF |
| IL-12 (p70) | MIP-2 | PDGF-BB |
| IL-15 | MIG | |
| IL-18 | KC | |
| TNF- α | | |
| IFN- γ | | |

Die weitere Vorgehensweise entsprach dem Protokoll des Herstellers. Gemessen wurde der sterilfiltrierte und bei -80°C gelagerte Überstand von stimulierten und/ oder infizierten Zellen. Als Leerkontrolle wurde das entsprechende Zellmedium verwendet.

2.2.13 Klonierungen

Zur Quantifizierung der Chemokin- bzw. Zytokintranskripte und der TLR4-Transkripte in der quantitativen *real time* PCR war es notwendig, Vektoren herzustellen oder zu erwerben, in die die entsprechende spezifische Sequenz inseriert war.

Die Vorgehensweisen entsprachen, wenn nicht anders beschrieben, den Angaben des Herstellers. Vektorkarten befinden sich im Anhang.

A.) Klonierung von MIP-1 β und RANTES in pBlueskript SK+

Ausgehend von Gesamt-RNA, gewonnen aus LPS aktivierten BMM von C57BL/6 Mäusen und durch Verwendung des *RNeasy mini kit*, wurde cDNA durch eine reverse Transkriptionsreaktion mit oligo-dT Primern unter Benutzung des *reverse transcription system* hergestellt. Anhand der untenstehenden Primer (Tabelle 2.16) wurde durch eine PCR-Reaktion ein Teil der chemokin- bzw. zytokinspezifischen Sequenz amplifiziert und dabei Restriktionsschnittstellen für die Restriktionsenzyme BamHI und EcoRI angefügt. Die PCR-Produkte wurden durch eine Gelextraktion mit dem *QIAquick gel extraction kit* isoliert und aufgereinigt. Diese PCR-Produkte wurden mit den genannten Restriktionsenzymen entsprechend den Herstellerangaben verdaut und jeweils in den gleichfalls verdauten Vektor pBlueskript SK+ mit einer T4 Ligase eingefügt [193]. Die Ligation fand über Nacht bei 7°C statt.

2 μ l der Ligationsansätze wurden ebenfalls entsprechend Herstellerangaben zu den chemisch kompetenten *E. coli* TOP10 gegeben und die Bakterien durch einen Hitzeschock transformiert [194]. Selektioniert wurden die Transformanten über die durch den Vektor vermittelte Ampicillinresistenz. Durch eine Kolonie-PCR mit den vektorspezifischen T3- und T7-Primern wurde die erfolgreiche Transformation einzelner Klone überprüft. Chemokin- bzw. zytokinpositive Klone wurden am Robert Koch-Institut sequenziert. Erfolgreich sequenzierte Klone wurden zur Isolierung der chemokin- bzw. zytokinkodierenden Vektoren vermehrt. Die Vektoren wurden durch eine Plasmidpräparation mit dem *Plasmid midi kit* gewonnen und aufgereinigt.

Die Konzentration der Vektoren wurde photometrisch im NanoDrop bestimmt und anhand dieser Konzentration und der errechneten Molmasse (inklusive Insert) des jeweiligen Vektors konnte die Anzahl der Kopien je Mikroliter bestimmt werden.

B.) MIP-1 α

Der Vektor pBlueskript SK- mit der MIP-1 α Sequenz wurde als *I.M.A.G.E.* Klon von Invitrogen erworben. Der Vektor und die Sequenz wurden durch Restriktionsverdau und Sequenzierung überprüft. Analog zur Herstellung der anderen Vektoren wurde die Transformanten vermehrt und der Vektor aufgereinigt.

C.) β -Aktin

Der Vektor, der die murine β -Aktinsequenz trägt, wurde von Herrn Dr. Ellerbrock aus dem Robert Koch-Institut zur Verfügung gestellt.

D.) TLR4

Der TLR4-tragende Vektor stammt von der Firma Invivogen (Expressionsvektor pDUO-mTLR4/mMD2). Dieser Vektor vermittelt eine Blasticidinresistenz. Das blasticidinhaltige Selektionsmedium für Agarplatten und Flüssigmedium stammte ebenfalls von der Firma Invivogen.

2.2.14 **Real time PCR**

Die Proben für die *real time* PCR wurden aus mindestens 2×10^6 BMM aus C57BL/6 Mäusen vorbereitet. Die Frequenz infizierter (GFP⁺) Zellen bzw. chemokinproduzierender Zellen wurde auf Proteinebene in einem Teil der behandelten Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Die Gesamt-RNA wurde unter Verwendung des *RNeasy Kit* der Firma Qiagen gewonnen. Die Konzentration der RNA und deren Integrität wurden im Bioanalyzer (RNA Nano Chip) und mit dem Nanodrop bestimmt.

Die cDNA wurde durch oligo-dT Primer bei IL-1 β und den Chemokinen sowie durch Zufallsprimer für den TLR4 mit dem *reverse transcription system* hergestellt. Als Negativkontrolle für die Messung der TLR4-Transkripte wurden BMM von C57BL/6 TLR4-defizienten Mäusen verwendet. Die Messung der β -Aktin-Transkripte erfolgte zur Normalisierung der Proben zueinander. Für die Chemokine, TLR4 und β -Aktin wurden genspezifische Primer und Sonden mit dem Programm PrimerExpress ermittelt und bei der Firma TibMolBiol (Berlin) bestellt. Die *real time* PCR wurde mit dem *Absolute QPCR Rox Mix* nach Herstellerangaben ausgeführt. Die Detektion der Amplifikation erfolgte über eine Sonde mit FAM-TAMRA, wobei TAMRA der Quencher und FAM der Reporter ist. Solange der Quencher in räumlicher Nähe zum Reporter steht, wird dieser keine Quanten emittieren. Durch die 3' Exonukleaseaktivität der verwendeten Taq-Polymerase wird die an der homologen Sequenz zwischen den Primern gebundene Sonde abgebaut, dadurch wird der Reporter vom Einfluss des Quenchers befreit und kann angeregt durch einen Laser mit der Wellenlänge $\lambda = 494$ nm, Quanten mit der Wellenlänge $\lambda = 518$ nm emittieren. Diese Emission wird gemessen und ist ein Maß für die Anzahl der entstehenden Amplika und damit für die Anzahl der gesuchten ursprünglichen Transkripte.

Tabelle 2.16: Auflistung der verwendeten Klonierungs- und PCR-Primer

| Primerbezeichnung | Nukleotidsequenz 5' \rightarrow 3' Richtung | Verwendung |
|-------------------------|---|----------------|
| MIP1 α Taq-for | TTT TGA AAC CAG CAG CCT TTG | RT-PCR |
| MIP1 α Taq-pro | 6FAM-TCC CAG CCA GGT GTC ATT TTC CTG AXT | RT-PCR (Sonde) |
| MIP1 α Taq-rev | TTG GAG TCA GCG CAG ATC TG | RT-PCR |
| MIP-1 β /BamH for | TGC GGA TCC -AGC TCT GTG CAA ACC TAA CC | PCR |
| MIP-1 β /EcoR rev | CCG GAA TTC -ACA ATA GCA GAG TTT CAG CAA TGG | PCR |
| MIP1 β -pro | 6FAM-CAG ATC TGT GCT AAC CCC AGT GAG CCC XT | RT-PCR (Sonde) |
| MIP1 β Taq-for | TCC AAG CCA GCT GTG GTA TTC | RT-PCR |
| MIP1 β Taq-rev | GTT CAA CTC CAA GTC ACT CAT GTA CTC | RT-PCR |
| pJetfor | GCC TGA ACA CCA TAT CCA TCC | Seq.-PCR |
| pJetrev | GCA GCT GAG AAT ATT GTA GGA GAT C | Seq.-PCR |
| RANTaq-for | TCC AAT CTT GCA GTC GTG TTT G | RT-PCR |
| RANTaq-pro | 6FAM-TGC CAA CCC AGA GAA GAA GTG GGT TCA XT | RT-PCR (Sonde) |
| RANTaq-rev | CAA GAA ACC CTC TAT CCT AGC TCA TC | RT-PCR |
| RANTES/BamH for | TGC GGA TCC -GCG GGT ACC ATG AAG ATC TCT G | PCR |
| RANTES/EcoR rev | CCG GAA TTC -AAT GCT GAT TTC TTG GGT TTC G | PCR |

| Primerbezeichnung | Nukleotidsequenz 5' → 3' Richtung | Verwendung |
|-------------------|--|----------------|
| T3 | AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG | Seq.-PCR |
| T7 | TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG | Seq.-PCR |
| TLR4 for | TGT AGC CAT TGC TGC CAA CA | RT-PCR |
| TLR4 probe | 6FAM-AAC ATG GCA GTT TCT GAG CAG CCG CXT | RT-PCR (Sonde) |
| TLR4 rev | CCT CCC ATT CCA GGT AGG TGT | RT-PCR |
| βAktinTaq-for | TCA CCC ACA CTG TGC CCA TCT ACG A | RT-PCR |
| βAktinTaq-pro | 6FAM-TAT GCT CXT CCC TCA CGC CAG CCT GCG T | RT-PCR (Sonde) |
| βAktinTaq-rev | GGA TGC CAC AGG ATT CCA TAC CCA | RT-PCR |

X = Position von TAMRA, Fettdruck = Restriktionsschnittstelle, Seq.-PCR = Sequenzier-PCR

2.2.15 Konfokale Laserscanmikroskopie (cLSM)

Die Detektion der TLR4-Expression auf Knochenmarksmakrophagen wurde mit einem *Tyramide Signal Amplification* (TSA) Kit durchgeführt [195]. Die TSA ist eine Methode, bei der durch das Enzym *horseradish peroxidase* (HRP), das an einen sekundären Antikörper konjugiert ist, multiple Kopien von farbstofftragenden Tyramidderivaten aktiviert werden, wodurch kurzlebige Tyramidradikale in unmittelbarer Nähe zur Bindungsstelle des primären Antikörpers an nukleophile Reste gebunden werden [196]. Dadurch wird eine Signalverstärkung erreicht. Die Zellen wurden lebend gefärbt (entsprechend der durchflusszytometrischen Messung von Oberflächenmarkern) und als primärer Antikörper wurde MTS510-bio verwendet. Der Sekundärantikörper war Streptavidin-HRP und als Farbstoff, der an das Tyramid gekoppelt ist, wurde Alexa555 gewählt. Als Kontrollen wurden Zellen von TLR4-defizienten Mäusen und ein Antikörperisotyp benutzt. Ungefähr 50 % der Knochenmarksmakrophagen wurden 24 h mit MCMV-GFP (moi = 0,02) infiziert, nach der Färbung in 2 % Formaldehyd fixiert und die DNA mit dem DNA-bindenden Farbstoff Toto-3 gegen gefärbt [197]. Anschließend wurden die Zellen in Citifluor resuspendiert auf Objektträger aufgetragen und der Deckel an den Rändern zum Schutz vor Verdunstung mit Nagellack versiegelt. Die Messung erfolgte an einem konfokalen Mikroskop der Firma Zeiss (LSM 510 Meta).

Tabelle 2.17: Filtereinstellung zur Messung am cLSM:

| Farbstoff | Anregung λ = nm | Emission λ = nm | Filter |
|-----------|-------------------------|-------------------------|---------------|
| Alexa555 | 555 | 565 | BP 560-615 nm |
| GFP | 495 | 510/20 | BP 505-530 nm |
| Toto-3 | 642 | 660 | LP 650 nm |

BP = *Bandpass*, LP = *Longpass*

2.2.16 Transfektion von murinem TLR4

2.2.16.1 Herstellung eines TLR4-YFP-, eines YFP- und eines MD2-Expressionsvektors

In allen im Folgenden beschriebenen Klonierungen wurde die cDNA vor dem Restriktionsverdau durch Gelextraktion (*QIAquick gel extraction kit*, Qiagen) aufgereinigt. Der DNA-Gehalt wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von $\lambda=260$ nm (Nanodrop) bestimmt. Nach der Transformation von kompetenten *E. coli* und deren Selektion auf Selektionsmedium wurde eine Kolonie-PCR mit genspezifischen Primern (s. Tabelle 2.18) durchgeführt. Positive *E. coli*-Klone wurden in 5 ml bzw. 25 ml LB/ Selektionsmedium vermehrt und die Vektoren durch Plasmidpräparationen (*Qiagen Plasmid Mini Kit* bzw. *Qiagen Plasmid Midi Kit*) entsprechend den Herstellerangaben gewonnen und aufgereinigt. Nach der Überprüfung durch Sequenzanalysen im Sequenzierlabor des Robert Koch-Instituts wurden Glycerolstocks von Einzelkolonien angefertigt und bei -80°C gelagert.

A.) YFP-Expressionsvektor

Als Kontrollvektor für die Transfektion des TLR4-YFP-Fusionsproteins wurde ein YFP (*yellow fluorescent protein*)-Expressionsvektor hergestellt. Ausgehend von dem Vektor pcDNA-YFP wurde durch eine PCR mit den Primern MetYFPsense und YFPantisense ein YFP-Fragment mit flankierenden BamHI- und Sall-Restriktionsschnittstellen erzeugt. Zusätzlich wurde über den MetYFPsense-Primer eine Kozaksequenz, ein nachfolgendes Startcodon und eine ClaI-Schnittstelle eingefügt. Der Restriktionsverdau mit den Enzymen BamHI und Sall des PCR-Fragmentes als auch des Expressionsvektors pMono-Blast (Invivogen) ermöglichte die nachfolgende unidirektionale Ligation mit einer T4-Ligase (siehe Abbildung 2.1). Der Ligationsansatz wurde entsprechend den Herstellerangaben in kompetente *E. coli* (TOP10, Invitrogen) transformiert und mit Blastocidin selektioniert. Die blastocidinresistenten *E.coli*-Kolonien wurden durch die Verwendung der Primer pMono-sense und pMono-antisense durch eine PCR überprüft.

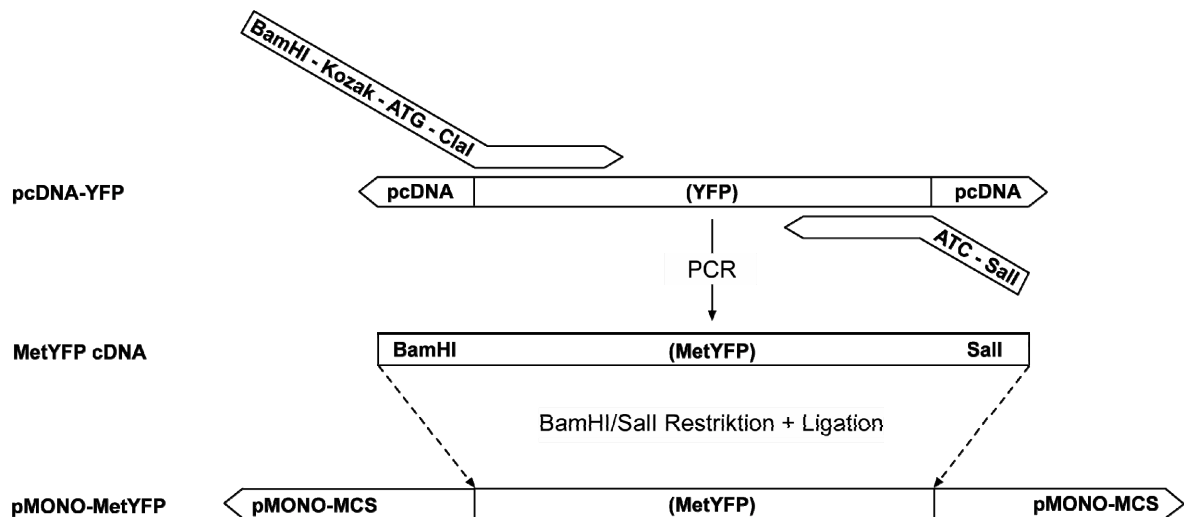


Abb. 2.1: Schematische Darstellung der Herstellung des YFP-Expressionsvektors pMono-MetYFP. Verwendet wurden die Primer MetYFPsense und YFPantisense, die ausgehend von dem Vektor pcDNA-YFP neben der Amplifikation von YFP die beschriebenen Restriktionsschnittstellen, sowie Start-, Stoppcodon und die Kozaksequenz einfügten. Der Zielvektor des MetYFP-Fragments war pMono-Blast.

B.) TLR4-YFP-Expressionsvektor

Zur Darstellung des TLR4 unabhängig von spezifischen Antikörpern in der konfokalen Laserscanmikroskopie wurde ein Expressionsvektor mit murinen TLR4 an das Reporterprotein YFP gekoppelt.

Da im späteren Verlauf das *dam*-methylierungssensitive Enzym Clal verwendet werden sollte und durch das unmittelbar vor der Clal-Erkennungssequenz eingeführte Startcodon eine *dam*-Methylierungsstelle (GATC; methyliert wird das Adenosin) erzeugt wurde², wurde pMono-Met-YFP in einen nicht methylierenden (*dam*⁻, *dcm*⁻) *E. coli*-Stamm (SCS110, Stratagene) transformiert.

Ausgehend von dem kommerziellen Vektor pDUO-mTLR4/mMD2 wurde mit TLR4-spezifischen Primern, die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme Clal und BamHI (inklusive Startcodon und Kozaksequenz) einfügen, die TLR4-cDNA durch eine PCR hergestellt. Zusätzlich wurde das Stoppcodon des TLR4-Gens durch eine Überbrückung mit dem Primer TLR4antisense entfernt.

Anschließend wurde die TLR4-cDNA und der Vektor pMono-MetYFP (siehe oben) mit den Restriktionsenzymen BamHI und Clal verdaut. Dieser Verdau entfernte gleichzeitig das Startcodon von YFP (siehe Abbildung 2.2).

² durch Verwendung des Primers MetYFPsense

Der linearisierte Vektor und die TLR4-cDNA wurden mit einer T4-Ligase vereinigt. Mit einem Teil des Ligationsansatzes wurden entsprechend den Herstellerangaben kompetente E. coli (TOP10, Invitrogen) transformiert. Die Transformation wurde durch eine Kolonie-PCR mit den TLR4- und YFP-spezifischen Primern überprüft (s. Tabelle 2.18).

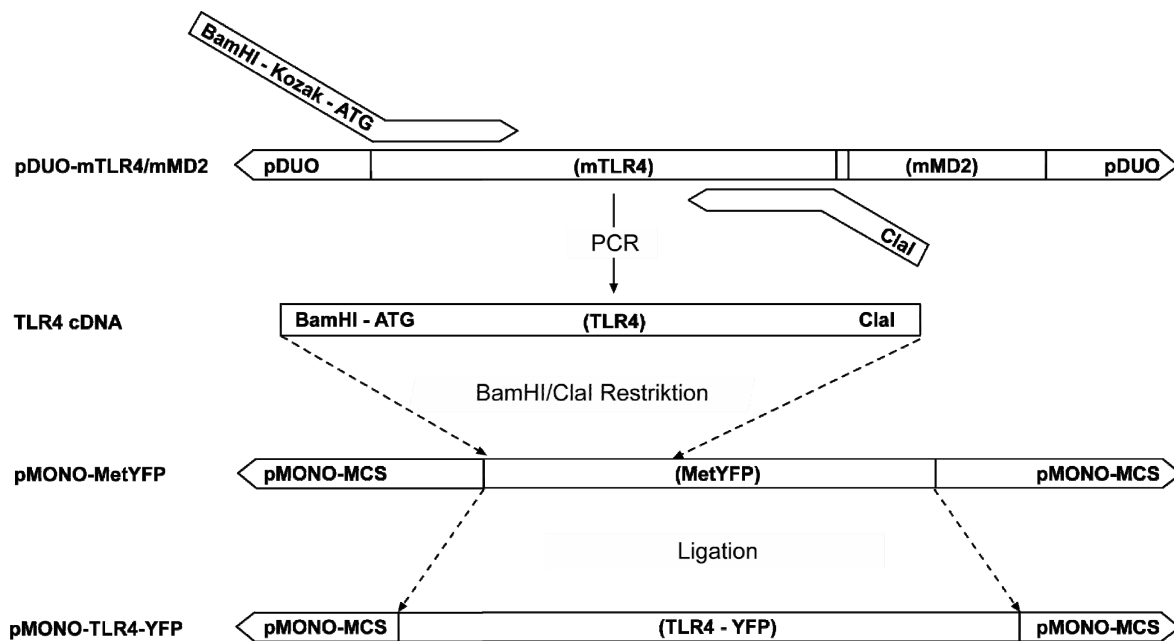


Abb. 2.2: Schematische Darstellung der Herstellung des TLR4-YFP-Expressionsvektors pMono-TLR4-YFP. Verwendet wurden die Primer TLR4sense und TLR4antisense, die ausgehend von dem Vektor pDUO-mTLR4/mMD2 neben der Amplifikation von TLR4 die beschriebenen Restriktionsschnittstellen, sowie Startcodon und die Kozaksequenz einfügten. Der Zielvektor des TLR4-Fragments war pMono-MetYFP.

Tabelle 2.18: Auflistung der verwendeten Klonierungs- und PCR-Primer

| Primer | Nukleotidsequenz 5' → 3' Richtung |
|----------------------------------|--|
| MetYFPsense (Kontrollplasmid) | TGC GGATCC T <u>CCACC</u> atg ATCGAT GTGAGCAAGGGCGAGGAGC |
| pMono-antisense | GTGTTACCCCTCTAGACCTG |
| pMono-sense | GCTTCTTAGCGGTTCAAAGG |
| TLR4antisense | ATGC ATCGAT GGTCCAAGTT GCCGTTTC |
| TLR4sense | TTAG GGATCC <u>CCACC</u> atg ATGCCTCCCT |
| YFPantisense | AGTC GTCGAC cta GCATTTAGGTGACAC |
| YFPsense | GTAC ATCGAT GTGAGCAAGG GCGAGGAG |
| MD2-for | CTCGGGCTTCTTAGCGGTTTC |
| MD2-rev | CTGGAAAGACCAGGCGGAG |

kursiv: Überhänge, die zur Bindung des Restriktionsenzym notwendig sind, fett: Erkennungsequenzen (inklusive Schnittstellen) der Restriktionsenzyme, unterstrichen: Kozaksequenz, atg = Startcodon, cta = Stoppcodon

C.) MD2-Expressionsvektor

Zur Darstellung der Oberflächenexpression von TLR4-YFP im Durchflusszytometer war es durch die Verwendung des TLR4/MD2-spezifischen Antikörpers MTS510 der Firma eBioscience notwendig, neben der TLR4-YFP-Transfektion auch MD2 zu kotransfizieren. Aus diesem Grund wurde ein MD2-Expressionsvektor hergestellt.

Hierzu wurde aus dem kommerziellen Vektor pDUO-mTLR4/mMD2 das Gen für TLR4 mit den Restriktionsenzymen NheI und DraIII ausgeschnitten und die überhängenden Nukleotide der Schnittstellen (*sticky ends*) mit einer T4-DNA-Polymerase aufgefüllt (*blunt ends*). Nach der Aufreinigung der DNA wurden anschließend die Enden wieder mit einer T4-Ligase zusammengefügt (s. Abbildung 2.3). Ein Teil des Ligationsansatzes wurde wieder in *E. coli* TOP10 transformiert und die erhaltenen Klone anhand von MD2-spezifischen Primern sowie mit TLR4-spezifischen Primern als Negativkontrolle (s. Tabelle 2.18) und durch Sequenzierungen überprüft. Der Vektor bekam die Bezeichnung pDUO-mMD2.

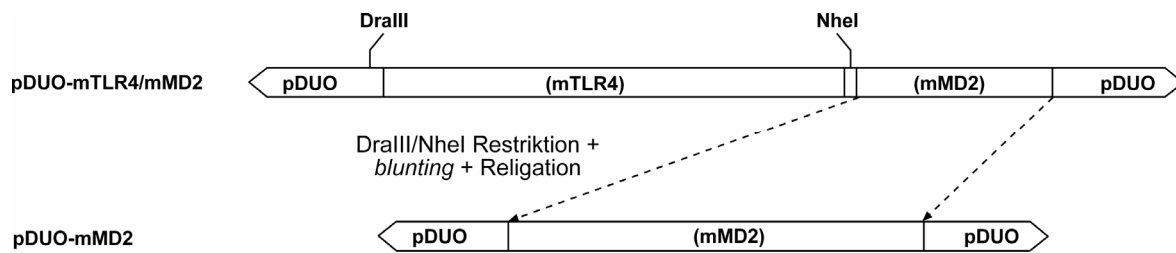


Abb. 2.3: Schematische Darstellung der Herstellung des MD2-Expressionsvektors pDUO-MD2. Das TLR4-Gen wurde durch eine Restriktion mit den Enzymen DraIII und NheI aus dem Vektor pDUO-mTLR4/mMD2 ausgeschnitten. Die überhängenden 5'-Enden nach dem Verdau wurden mit einer T4-DNA-Polymerase aufgefüllt und der linearisierte Vektor wurde anschließend wieder durch Ligation der Enden mit der T4-Ligase geschlossen.

2.2.17 Transfektionen

A.) Sensitivitätstest

Um nach einer erfolgreichen Transfektion die nicht transfizierten Zellen zu entfernen, wurden Selektionsmedien abhängig von der vektorvermittelten Resistenz eingesetzt. Die letale Konzentration des verwendeten Selektionsreagens wurde zuvor durch eine Titration auf den zu transfizierenden Zellen getestet.

Entsprechend den Herstellerangaben wurden Verdünnungsreihen des Reagens in zellspezifischem Medium zu den Zellen in 6-Kavitäten Zellkulturplatten gegeben. Hierzu wurden in zwei Ansätzen jeweils $0,125 \times 10^6$ bzw. $0,25 \times 10^6$ Zellen je Kavität ausgesät. Die Zellen wurden daraufhin bis zum Eintritt des toxischen Effektes des Reagens beobachtet.

Tabelle 2.19: Ermittelte und eingesetzte Konzentration des Antibiotikums Blasticidin

| Zellspezies | Endkonzentration |
|-------------|------------------|
| 3T12 | 10 µg/ml |
| 3T3 | 20 µg/ml |
| CHO | 10 µg/ml |

B.) Durchführung der Transfektion

Transfiziert wurden die Zelllinien 3T3, 3T12 und CHO. Zur Transfektion wurden zwei verschiedene kommerzielle Transfektionsreagenzien verwendet, Lipofectamin und Fugene 6. Die Funktion von Lipofectamin beruht auf der Lipofektion, bei der die negativ geladenen Vektoren an positiv geladenen Liposomen gebunden werden (kationische Lipide) und diese mit der Zellmembran der Zielzelle fusionieren. Dadurch wird die genetische Information in das Innere der Zelle eingeschleust. Fugene 6 ist eine nicht im Detail beschriebene, proprietäre Methode, die vermutlich auf kationischen Polymeren wie PEI (Polyethylenimin) beruht, für die auch der hohe Ethanolgehalt (~80 %) der Lösung spricht [198], [199].

Die Transfektionen fanden in 24-Kavitäten-Platten statt, direkt im spezifischen Zellmedium ohne Antibiotikazusatz. Die weitere Durchführung entsprach den Herstellerangaben. Bei jeder neuen Etablierung einer Transfektion wurden verschiedene Mischungsverhältnisse von DNA zu Transfektionsreagenz parallel getestet und das Mischungsverhältnis, welches die höchste Transfektionseffizienz ergab, wurde in Folgetransfektionen verwendet. 48 Stunden nach der Transfektion wurde das Zellmedium ausgetauscht und durch das passende Selektionsmedium ersetzt, welches die zuvor ermittelte Konzentration an Selektionsreagenz enthielt.

Zur Etablierung von stabil transfizierten Zelllinien wurden die transfizierten Zellen soweit verdünnt und in eine 96-Kavitäten-Platte ausgesät, dass rechnerisch nur eine Zelle in jede Kavität gelangte. Unter ständigem Selektionsdruck waren nur erfolgreich transfizierte Zellen in der Lage, Kolonien zu bilden. Sobald diese Kolonien eine >50 % Konfluenz erreicht hatten, wurden sie in Zellkulturplatten mit der nächst größeren Fläche überführt und ein Teil von Ihnen in der Durchflusszytometrie auf das Vorhandensein und die Stärke der Expression von TLR4 überprüft. Sobald die Anzahl der Zellen einer Kolonie die Fläche von 6-Kavitäten Zellkulturplatten erreicht hatte, wurde ein Teil kryokonserviert.

2.2.18 Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Zur Darstellung der TLR4-Expression in Abhängigkeit von einer Infektion mit MCMV wurde ein Western Blot mit verschiedenen kommerziellen TLR4-spezifischen Antikörpern (siehe Tabelle 2.8) durchgeführt.

Aufgrund der verhältnismäßig geringen Expression von TLR4 wurden hierzu 5×10^6 Knochenmarksmakrophagen oder Peritoneale Exsudatzellen in verschiedenen Lysepuffern lysiert und homogenisiert. Als Positivkontrolle diente neben den Makrophagen aus der Maus auch stabile 3T3-TLR4- und 3T12-TLR4-Transfektanten, als Negativkontrolle wurden Makrophagen von TLR4-defizienten Mäusen, sowie 3T12 Zellen, welche keine endogene TLR4-Expression zeigen, verwendet. Zur Normalisierung wurde das konstitutiv exprimierte β -Aktin dargestellt und als Nachweis der MCMV-Infektion das virale Protein pp89.

Nach der Stimulation und/ oder Infektion der Zellen wurde ein geringer Teil durchflusszytometrisch auf die erfolgreiche Infektion und die An- oder Abwesenheit einer TLR4 Oberflächenexpression untersucht. Der andere Teil der Zellen wurde auf Eis mit Lysepuffer mindestens 30 min schüttelnd lysiert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration der Lysate wurde in Triplikaten mit dem *BCA Proteinassay Kit* vorgenommen und mit einem ELISA Mikrotiterplattenphotometer (Tecan) vermessen. Die Menge an Zelllysat wurde so angepasst, dass gleiche Proteinkonzentrationen für die Gelelektrophorese verwendet wurden, während nicht sofort eingesetzte Lysate aliquotiert und bei -80°C gelagert wurden. Die Auftrennung der Proteine erfolgte durch eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) modifiziert nach Laemmli [200].

Die SDS-PAGE wurde mit dem *Mini Protean II System* der Firma BioRad durchgeführt und entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Zur Auftrennung der Proteine wurden 6- bis 10-prozentige Trenngele und 3- bis 5-prozentige Sammelgele gegossen und dabei 1,5 mm Abstandshalter und Kammdicken benutzt. Die Lysate wurden mit 4 x Probenpuffer versetzt und, außer bei der Verwendung von Jodacetamid, 5 Minuten im Heizblock bei 95°C denaturiert und auf Eis abgekühlt.

Zur Entfernung etwaiger Präzipitate wurden die Proben zentrifugiert (13000 x g, 1 min) und bis zu 35 µl davon wurden in die Taschen des Sammelgels aufgetragen. Zusätzlich wurde ein Proteinstandardmarker zur Größenbestimmung verwendet.

Die Auftrennung der Proteine erfolgte initial bei 50 V; nachdem die Lauffront der Proteine das Trenngel erreicht hatte, wurde die Spannung auf 120 V erhöht. Das Gel wurde unmittelbar nach der Elektrophorese für einen Immunoblot verwendet.

2.2.19 Immunoblot

Die durch die Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurden in einem „*semi-dry*“ Verfahren durch die Wirkung eines elektrischen Feldes senkrecht zum Gel auf eine proteinbindende PVDF-Membran übertragen (*western blot*) [201], [202]. Verwendet wurde eine Blotapparatur der Firma Biometra. Die passend zum Gel zurechtgeschnittene PVDF-Membran (PVDF-Membran Immobilon P, 0,45 µm, Millipore) wurde zuvor mit 10 % Methanol aktiviert und anschließend 20 min schüttelnd mit Transferpuffer äquilibriert. Anschließend wurden das Gel und die PVDF-Membran zwischen transferpufferbenetzten Filterpapieren (Whatmann 3MM) eingebettet und dieses Paket wurde zwischen die Graphitelektroden der Blotapparatur gelegt. Der Transfer der 1,5 mm dicken Gele mit einer Fläche von 43 cm² erfolgte bei 72 mA/Gel für 1 h.

Nach der Durchführung des Blots wurden potenziell unspezifische Antikörperbindungsstellen auf der Membran durch einen Blockadepuffer geblockt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen des primären TLR4-spezifischen Antikörper in Blockadepuffer für 1 h (RT) schüttelnd. Danach folgten, wie nach jeder weiteren Inkubation, jeweils drei Waschschriffe mit Blockadepuffer für je 5 min, ebenfalls schüttelnd. Der nachfolgende Sekundärantikörper (goat αRabbit-HRP) wurde 30 min, bei RT und schüttelnd inkubiert.

Die Membran wurde nun mit PBS-T gewaschen (6 x 5 min) und entsprechend den Herstellerangaben das Substrat der ECL-Lösung (*Western Blotting Substrate*) umgesetzt. Nach dem Trocknen des Blots wurde dieser in Klarsichtfolie eingelegt und durch Belichtung eines Kodak XOMatAR Films die durch den Antikörper detektierten Proteine sichtbar gemacht.

3 Ergebnisse

Das Murine Zytomegalievirus (MCMV) infiziert Monozyten und Makrophagen. Infizierte Monozyten dienen dem Virus zur Verbreitung im Wirtsorganismus [87], [203]. In Vorexperimenten unserer Arbeitsgruppe mit *in vivo* MCMV-Infektionen ergab sich, dass am Tag 1-3 nach der MCMV-Infektion Makrophagen, im Gegensatz zur bestehenden Theorie, nur unwesentlich Chemokine produzierten. Als Hauptproduzenten der Chemokine wurden die NK-Zellen identifiziert. Damit wurde die Frage aufgeworfen, inwieweit MCMV die Funktionen von Makrophagen beeinflusst. In den folgenden Experimenten wurden daher murine Knochenmarksmakrophagen (BMM) und Makrophagen aus dem Peritoneum (Peritoneale Exsudatzellen, PEC) von C57BL/6-Mäusen verwendet und der Einfluss einer MCMV-Infektion auf die Funktionalität dieser Zellen überprüft.

3.1 Charakterisierung von Knochenmarksmakrophagen (BMM) und Peritonealen Exsudatzellen (PEC)

3.1.1 Expression von Oberflächenmarkern auf BMM

Vor der Verwendung der Zellen wurden diese auf die Expression verschiedener Oberflächenmarker hin untersucht. Das ermöglichte eine genaue Charakterisierung und Differenzierung der Zellen.

Ein Großteil aller Makrophagen ist über die konstitutive Expression der Oberflächenmarker F4/80 (Emr1, Ly71) und CD11b (Integrin α , Mac-1, CD11b/CD18) definierbar. Anhand von durchflusszytometrischen Messungen können diese und andere Oberflächenmarker zur Differenzierung der Makrophagen gemessen werden. Hierzu wurden jeweils ca. 5×10^5 Zellen mit monoklonalen Antikörpern gegen CD11b bzw. F4/80 inkubiert. An beide Antikörper waren Fluorochrome gekoppelt, die eine direkte durchflusszytometrische Messung am (FACS Calibur, BD Bioscience) ermöglichten. Zum Ausschluss von toten Zellen wurden die Zellen 10 min vor der Messung mit Propidiumjodid versetzt. Propidiumjodid kann in die DNA von toten Zellen interkalieren und besitzt ein spezifisches Emissionsspektrum bei der Durchflusszytometrie.

Der Hauptbestandteil (~ 95 %) aller durch M-CSF aus dem Knochenmark proliferierten und differenzierten Knochenmarksmakrophagen sind F4/80-, CD11b-positive (s. Abb. 3.1) und CD11c-negative Zellen (nicht gezeigt).

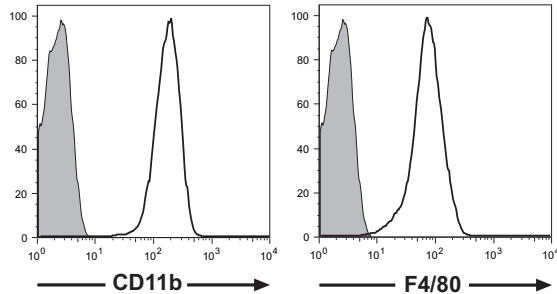


Abb. 3.1: Expression von CD11b und F4/80 auf Knochenmarksmakrophagen. Aus dem Knochenmark von C57BL/6-Mäusen durch rekombinantes murines M-CSF erzeugte Knochenmarksmakrophagen. Oberflächenfärbung der lebenden Zellen und durchflusszytometrisch bestimmter Expression von F4/80 und CD11b. (schwarz = gefärbte Zellen, grau = ungefärbte Zellen)

Neben diesen zur Identifizierung verwendeten spezifischen Oberflächenmarkern CD11b und F4/80 konnten weitere Marker dargestellt werden. Hierzu wurden ebenfalls spezifische, monoklonale Antikörper verwendet, die entweder direkt an Fluorochrome gekoppelt oder an Biotin gebunden waren. Biotin-gebundene Antikörper wurden mit Streptavidin, an welches das Fluorochrom gekoppelt war, detektiert. Knochenmarksmakrophagen exprimieren zusätzlich MHC I (Histokompatibilitätskomplex Klasse 1, H2K^b), CD14 (Rezeptor für den LPS-LBP Komplex), CD29 (Integrin β 1) und CD115 (M-CSF Rezeptor). Lediglich schwach exprimiert waren dagegen die Kostimulatoren CD80 und CD86; MHC II (Histokompatibilitätskomplex Klasse 2, H2^b) und IL-10R (IL-10 Rezeptor) wurden nicht exprimiert (s. Abb. 3.2).

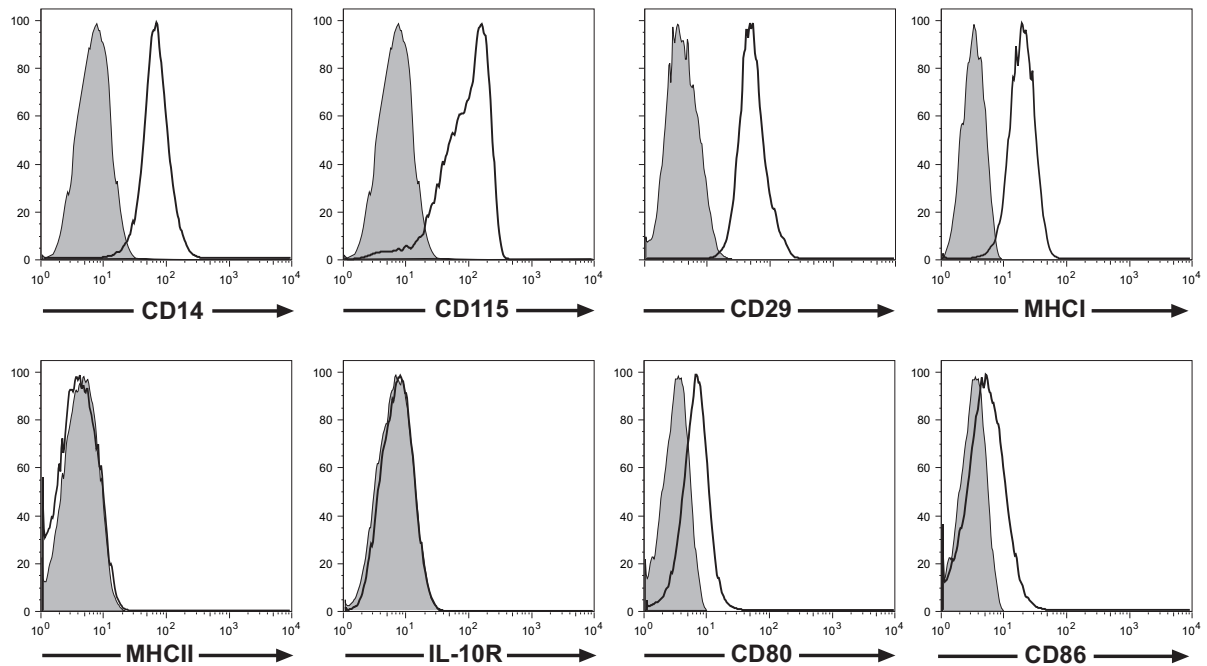


Abb. 3.2: Expression von diversen Oberflächenmarkern auf Knochenmarksmakrophagen. Durchflusszytometrische Bestimmung der Oberflächenmarker CD14, CD29, CD115, MHC I, MHC II und IL-10R, sowie CD80 und CD86 auf ruhenden, unbehandelten BMM. BMM exprimierten CD14, CD115, CD29 und MHC I, sowie schwach CD80 und CD86. Nicht exprimiert wurden MHC II und IL-10R. Dargestellt sind jeweils die ungefärbten Zellen (graue Histogramme) und die gefärbten Zellen (schwarz umrandete Histogramme).

Zu den Hauptaufgaben von Makrophagen gehört dieusterspezifische Erkennung von Strukturen, die von Pathogenen gebildet werden. Die hierfür prominentesten Rezeptoren sind die Toll-like Rezeptoren (TLR) 2 und 4 [36]. Zur Überprüfung der Oberflächenexpression der verwendeten Makrophagen wurde ebenfalls durch eine durchflusszytometrische Messung die Expression von TLR2 und TLR4 untersucht. Hierzu wurden ca. 5×10^5 Zellen mit spezifischen, monoklonalen Antikörpern gegen TLR4 bzw. TLR2, die jeweils direkt an Fluorochrome gekoppelt waren inkubiert. Die Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen erfolgte durch Propidiumjodid.

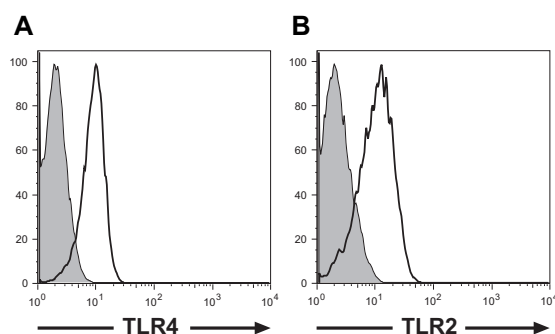


Abb. 3.3: Expression von TLR2 und TLR4 durch BMM. Durchflusszytometrische Bestimmung der Expression der Toll-like Rezeptoren 2 und 4 (TLR2 und TLR4) auf der Zelloberfläche ruhender Knochenmarksmakrophagen. **(A)** TLR4-defiziente BMM (grau) und Wildtyp-BMM (schwarz). **(B)** TLR2-defiziente BMM (grau) und Wildtyp-BMM (schwarz).

3.1.2 Expression von Oberflächenmarkern auf PEC

Peritoneale Exsudatzellen, die durch eine Peritonitis induziert werden und in das Peritoneum der Maus einwandern, bestehen zum Großteil aus Makrophagen. PEC sind im Vergleich zu den *in vitro* aus hämatopoetischen Stammzellen durch rekombinantes M-CSF differenzierten Knochenmarksmakrophagen echte primäre und authentische Makrophagen der murinen Physiologie.

Ebenfalls durchflusszytometrisch bestimmt wurde die Makrophagenpopulation in PEC anhand der Oberflächenmarker F4/80 und CD11b sowie deren TLR4-Expression.

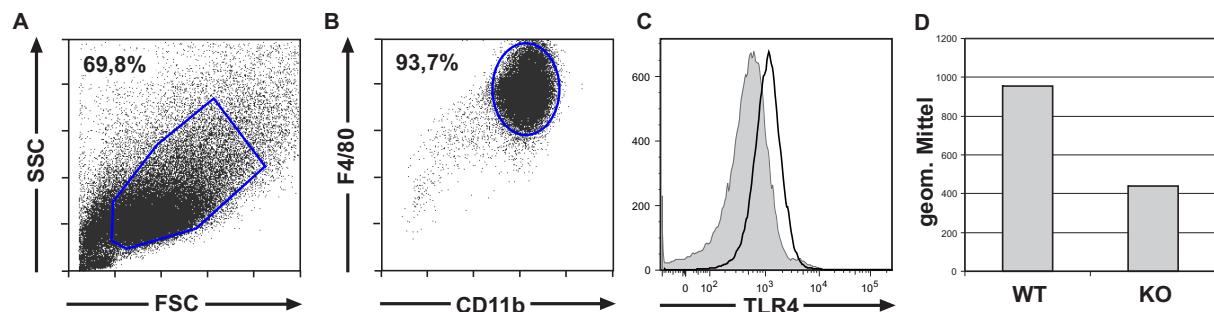


Abb. 3.4: Messung der Expression der Oberflächenmarker von Makrophagen in peritonealen Exsudatzellen (PEC). (A) Größenauftrennung in der Vorwärts- (FSC) und Seitwärtsstreuung (SSC), 69,8% vitale PEC. (B) Darstellung der zu 93,7% F4/80 und CD11b positiven PEC-Population (Makrophagenpopulation). (C) Expression des Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) durch die F4/80⁺ CD11b⁺ Makrophagen (schwarz: Wildtyp, grau: Zellen aus TLR4-defizienten Tieren [KO]). (D) Geometrisches Mittel der Fluoreszenzintensitäten der TLR4-Messung von PEC von TLR4-Wildtyptieren (WT) und von TLR4-defizienten Tieren (KO) aus Abbildung (C).

3.1.3 Stimulation von Makrophagen mit Lipopolysaccharid (LPS)

Im Folgenden wurde die Modulation von Zytokinen und Chemokinen anhand von ruhenden (unbehandelten) und aktivierten Makrophagen im Rahmen einer MCMV-Infektion analysiert. Vergleichend wurden für alle wesentlichen Experimente Knochenmarksmakrophagen (BMM) und Peritoneale Exsudatzellen (PEC) verwendet. Die Aktivierung von Makrophagen erfolgte zunächst über Lipopolysaccharid (LPS) als Bestandteil von gram-negativen Bakterien. Die Stimulation von Makrophagen mit LPS führt zu deren Aktivierung über den Toll-like Rezeptor 4 [61].

Aktiviert Makrophagen produzieren eine Reihe von Zytokinen und Chemokinen [10]. Die Fähigkeit von Makrophagen, Chemokine und Zytokine zu bilden kann mittels intrazellulärer Durchflusszytometrie überprüft werden [204], [189].

Zur Messung der Zytokin- und Chemokinproduktion wurden jeweils 1×10^6 Zellen mit $2 \mu\text{g/ml}$ LPS stimuliert. Die Sezernierung der Proteine wurde 3 h vor dem Ende der Stimulation mit Brefeldin A blockiert. Als Negativkontrollen dienten LPS-unstimulierte (unbehandelte) Zellen, die ebenfalls mit Brefeldin A behandelt wurden.

Abbildung 3.5 zeigt, dass LPS-aktivierte Makrophagen im Vergleich zu unbehandelten Zellen zu 100 % $\text{TNF-}\alpha$, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES und zu 16,5 % IL-12 produzieren. Ähnliche Daten wurden nach einer LPS-Stimulation auch von PEC erhalten (Daten nicht gezeigt).

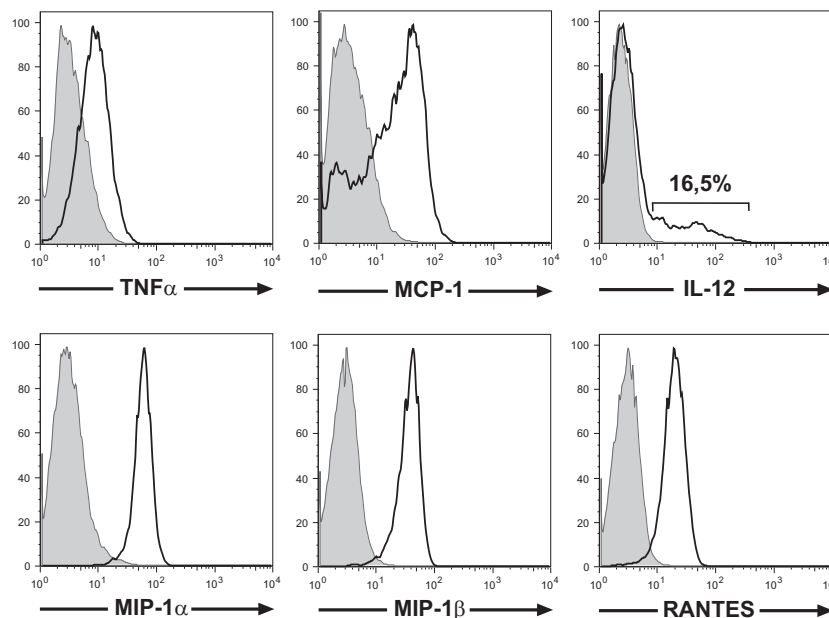


Abb. 3.5: Darstellung der Aktivierung von Knochenmarksmakrophagen anhand einiger inflammatorischer Zytokine und Chemokine. Darstellung der Fluoreszenzintensität im Vergleich un behandelter (grau) und mit LPS für 5 h stimulierter (schwarz) Knochenmarksmakrophagen, gemessen durch eine intrazelluläre Durchflusszytometrie. $\text{TNF}\alpha$ (Tumor Nekrose Faktor α), MCP-1 (CCL2, *Monocyte chemoattractant protein-1*), IL-12 (Interleukin-12), MIP-1 α , - β (CCL3, CCL4, *macrophage-inflammatory protein α , β*) und RANTES (CCL5, *Regulated upon activation, normal T cell expressed, and secreted*).

3.2 Infektion von Makrophagen mit dem Murinen Zytomegalievirus (MCMV)

Das Murine Zytomegalievirus verursacht eine akute Infektion, der eine lebenslange Latenz im infizierten Wirt folgt. MCMV infiziert unter anderen Zellen der myeloiden Linie, darunter Monozyten und Makrophagen [205]. Durch die Verwendung eines GFP-exprimierenden MCMV-Stammes lässt sich diese Infektion auf Einzelzellebene durchflusszytometrisch darstellen. Das gleiche ist durch die Verwendung spezifischer Antikörper gegen früh exprimierte virale Proteine, wie IE1 (*immediately early 1*) und E1 (*early 1*) möglich. Während einer akuten Infektion ist die prozentuale Anzahl an infizierten Zellen zu einem bestimmten Zeitpunkt abhängig von der eingesetzten Höhe der *moi* (*multiplicity of infection*), die sich wiederum aus der *pfu* (*plaque forming unit*) der Virusstammlösung ergibt. Diese Abhängigkeit ist in der Abbildung 3.6 dargestellt. Hierzu wurden jeweils 1×10^6 BMM mit unterschiedlichen *moi* der Virusstammlösung eines GFP-exprimierenden Virus für 24 h *in vitro* infiziert und durchflusszytometrisch analysiert.

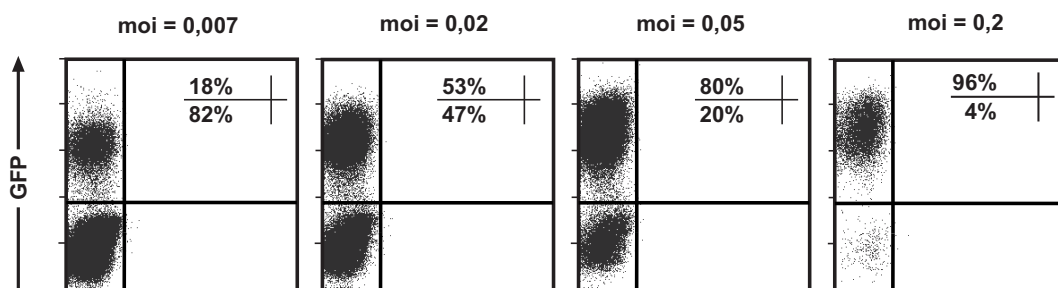


Abb. 3.6: Darstellung der GFP Expression von infizierten BMM. Infektion von jeweils 1×10^6 Knochenmarksmakrophagen 24 h *in vitro* mit verschiedenen *moi* der MCMV-GFP-Virusstammlösung (1×10^7 pfu/ml). Die Anzahl der infizierten (GFP⁺) BMM wurde durchflusszytometrisch ermittelt.

Eine *moi* von 0,007 verursachte die Infektion von 18 % der vitalen BMM, eine *moi* von 0,02 ergab 53 % und eine *moi* von 0,05 ergab 80 % infizierte und GFP-exprimierende BMM. Zum Erreichen einer maximalen Anzahl von infizierten Zellen wurde eine *moi* von 0,2 gewählt. Für alle folgenden Experimente wurden die Makrophagen entweder so infiziert, dass ca. 50 % infizierte Zellen neben uninfizierten Zellen in einer Zellkulturschale vorlagen (*moi* = 0,02; z. B.: zur Untersuchung von Zytokinen auf Einzelzellebene) oder es wurde eine vollständige Infektion (> 95 % GFP⁺ Zellen) durchgeführt (*moi* = 0,2).

Im Fall von Knochenmarksmakrophagen, die mit LPS voraktiviert wurden, verhielt sich Abhängigkeit der Anzahl der infizierten Zellen von der eingesetzten *moi* der Virenstammlösung anders als bei der Infektion von unbehandelten BMM. Zur Ermittlung dieser Abhängigkeit wurde die Infektionseffizienz der Virenstammlösung von GFP-exprimierenden MCMV zwischen unbehandelten und LPS-voraktivierten Zellen bei gleicher *moi* durchflusszytometrisch überprüft (s. Abbildung 3.7). Hierfür wurden jeweils 1×10^6 unbehandelte oder mit LPS (2 $\mu\text{g/ml}$) aktivierte BMM mit MCMV für 24 Stunden infiziert.

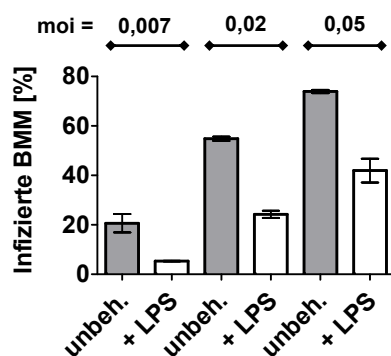


Abb. 3.7: Darstellung der unterschiedlichen Infektionseffizienz bei unbehandelten und mit LPS voraktivierten BMM. Jeweils 1×10^6 unbehandelte (graue Balken) bzw. 5 h mit LPS voraktivierte (weiße Balken) BMM wurden mit den $moi = 0,007$, $0,02$ und $0,05$ der MCMV-Virusstammlösung infiziert. 24 Stunden nach der Infektion wurde die prozentuale Anzahl der infizierten BMM durchflusszytometrisch bestimmt.

Aus der Abbildung 3.7 geht deutlich hervor, dass BMM, die 5 Stunden mit LPS aktiviert worden sind wesentlich schlechter mit MCMV infizierbar waren als die unbehandelten BMM bei der gleichen eingesetzten *moi* der Virusstammlösung.

Im folgenden Experiment wurde der Einfluss einer LPS-Aktivierung oder MCMV-Infektion auf das Überleben von BMM untersucht. Hierzu wurden jeweils $0,6 \times 10^6$ BMM in nicht beschichtete 6-Kavitätenplatten ausgesät (Tag 0). Nach 24 h wurde ein Teil dieser Zellen mit LPS aktiviert (2 $\mu\text{g/ml}$) oder mit MCMV vollständig ($moi = 0,2$) infiziert (Tag 1). Ab Tag 3 wurden die Zellen eingesammelt (inklusive der nicht adhärenen Zellen) und durchflusszytometrisch wurde die Anzahl der lebenden Zellen bestimmt. Zur Unterscheidung von toten und lebenden Zellen wurde den Zellen Propidiumjodid zugesetzt. Die Messung erfolgte in regelmäßigen Abständen bis zum Tag 21.

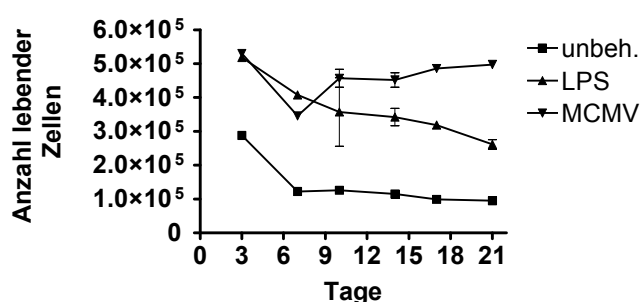


Abb. 3.8: Darstellung der Anzahl der überlebenden unbehandelten, mit LPS aktivierten oder mit MCMV infizierten BMM. Jeweils $0,6 \times 10^6$ BMM wurden unbehandelt, mit LPS (2 $\mu\text{g/ml}$) aktiviert oder mit MCMV ($moi = 0,2$) infiziert. Die Anzahl der verbliebenen lebenden Zellen wurde an verschiedenen Tagen durchflusszytometrisch bestimmt.

Aus der Abbildung 3.8 geht deutlich hervor, dass bereits am dritten Tag nur noch ca. 30 % der unbehandelten BMM lebendig waren. LPS-aktivierte BMM zeigten eine verlängerte Überlebenszeit, so dass erst am 21. Tag nur noch ca. 30 % der Zellen am Leben waren. Im Gegensatz dazu führte die Infektion der BMM mit MCMV nach einem initialen Abfall der überlebenden Zellen bis ca. Tag 9 nach der Infektion zu einer Stabilisierung der Anzahl der überlebenden Zellen bis zum Tag 21.

3.3 Einfluss der MCMV-Infektion auf die Funktionalität von Makrophagen

3.3.1 MCMV verhindert die Produktion von verschiedenen proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen durch Makrophagen *in vitro*.

Die Aktivierung von Makrophagen durch LPS führt wie in Abschnitt 3.1.3 beschrieben zur Expression und damit auch zur Sezernierung verschiedener proinflammatorischer Zytokine und Chemokine. Um zu erfassen, welche löslichen Mediatoren durch MCMV reguliert werden, wurde das Bioplex-System der Firma BioRad verwendet. Mit diesem System konnten die Konzentrationen von 23 Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren in Zellkulturüberständen unterschiedlich behandelte Zellen ermittelt werden.

Hierzu wurden die Zellüberstände von jeweils 1×10^6 BMM und PEC verglichen, die folgendermaßen behandelt worden sind:

- a.) unbehandelt
- b.) 5 h LPS-Stimulation
- c.) 24 h vollständige MCMV-Infektion
- d.) 24 h vollständige MCMV-Infektion und nachfolgende 5 h LPS-Stimulation

Die PEC wurden zusätzlich folgendermaßen behandelt:

- e.) 29 h LPS-Stimulation
- f.) 5 h LPS-Stimulation und 24 h vollständige MCMV-Infektion

Die eingesetzte LPS-Konzentration zur Stimulation der Zellen betrug $2 \mu\text{g/ml}$ und zur maximalen Infektion der Zellen wurde eine *moi* von 0,2 der Virusstammlösung zur Infektion eingesetzt. Die Überstände wurden nach der Behandlung gesammelt, filtriert ($0,45 \mu\text{m}$) und bis zur Durchführung der notwendigen Schritte zur Messung im Bioplex-System bei -80°C gelagert.

Die Auswertung der Messwerte inklusive aller Standardreihen für das jeweilige Zytokin erfolgte anhand der Software des Bioplex-Systems. Zusätzlich wurden die Zellen gesammelt und durchflusszytometrisch die Infektionseffizienz überprüft (analog zu Abbildung 3.6, $moi = 0,2$).

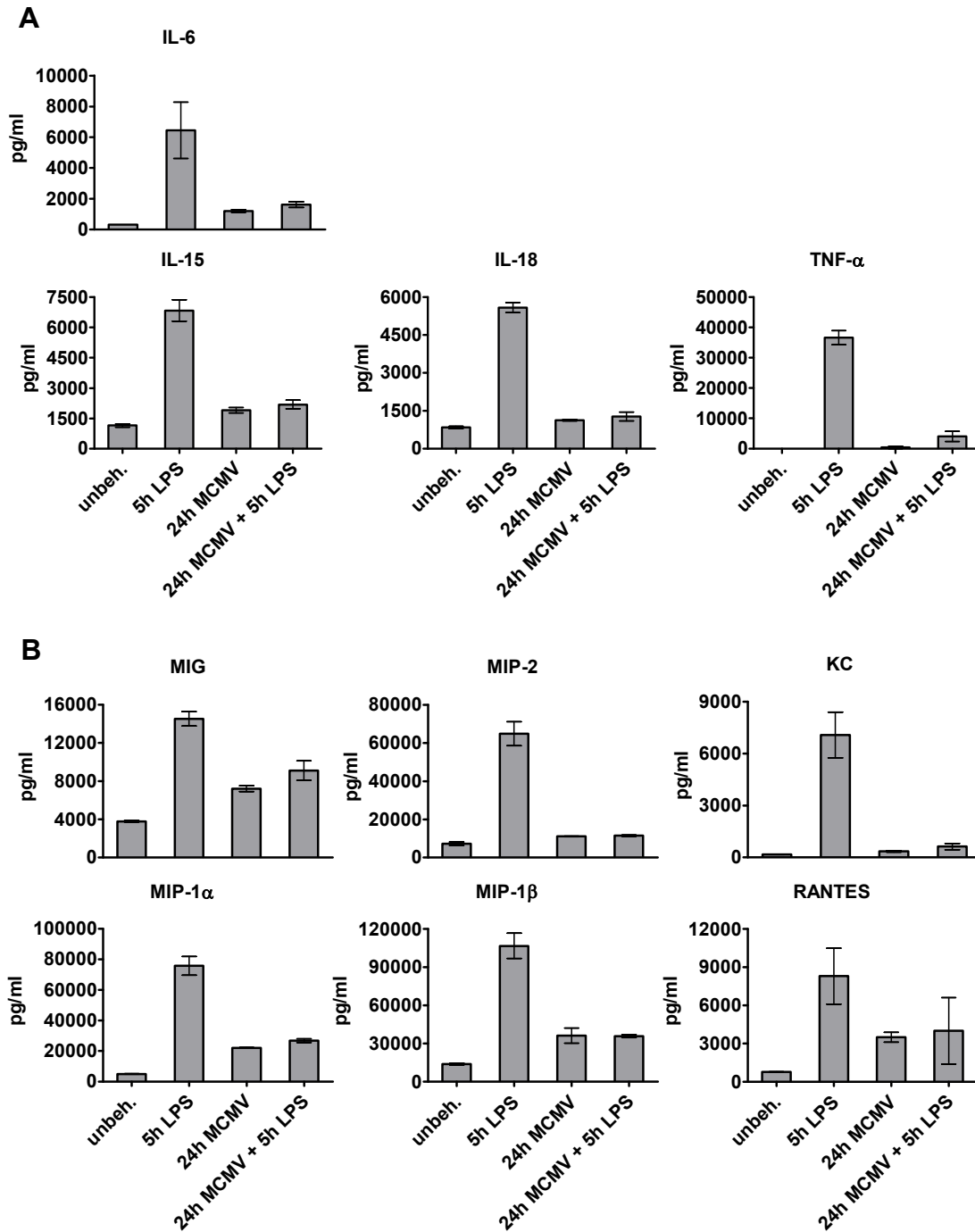


Abb. 3.9: Darstellung der Konzentration ausgewählter Zytokine im Überstand von BMM. Zellüberstände wurden mit dem x-Plex Assay Kit für murine Zytokine der Firma BioRad vermessen. Dargestellt sind die Zytokine, bei denen eine signifikante Konzentration im Überstand messbar war. **(A)** Zytokine, **(B)** Chemokine. Die Zellüberstände stammen von jeweils 1×10^6 Zellen, die folgendermaßen behandelt wurden (Balken von links nach rechts): 1. unbehandelte Zellen, 2. Zellen, die 5 h mit LPS stimuliert wurden, 3. 24 h voll infizierte Zellen (siehe Abb. 3.6) und 4. 24 h voll infizierte Zellen, die nachfolgend 5 h mit LPS stimuliert wurden. Zu Beachten ist die unterschiedliche Skalierung für die jeweiligen Mediatoren. Die Messung wurde in Duplikaten durchgeführt.

Die gewählten Bedingungen für die Stimulation und Infektion der Makrophagen ermöglichten es, mehrere Aussagen gleichzeitig zu treffen.

Die Abbildung 3.9 zeigt, dass unbehandelte Makrophagen sehr geringe Mengen an IL-15, IL-18, MIG, MIP-2, MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES sezernierten. TNF- α und KC waren dagegen nicht nachweisbar. Eine Aktivierung der BMM durch eine LPS-Stimulation (5 h) führte zur Sezernierung von allen gezeigten Zytokinen und Chemokinen. Quantitativ am stärksten sezerniert wurden die Chemokine MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, MIP-2 und MIG sowie das Zytokin TNF- α (jeweils 10.000 bis 100.000 pg/ml).

BMM, die vollständig mit MCMV infiziert worden waren, zeigten eine erhöhte Sezernierung der Chemokine MIG, MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Die Produktion der MCMV-infizierten Zellen war aber um Faktor 2 (MIG und RANTES) und Faktor 4 (MIP-1 α und MIP-1 β) geringer als die Produktion durch die LPS-stimulierten Zellen. Die Produktion der anderen Mediatoren war auf einem vergleichbaren Niveau wie die der unbehandelten Zellen. Interessanterweise reagierten vollständig MCMV-infizierte BMM nicht mehr auf die LPS-Stimulation. Besonders deutlich wurde dies bei TNF- α , IL-6, IL-15, IL-18, MIP-2, KC sowie MIP-1 α und MIP-1 β , bei denen sich die gemessene Produktion um mindestens Faktor 3 im Vergleich zu den uninfizierten, LPS-stimulierten Zellen verringerte.

Insgesamt zeigten diese Experimente, dass eine vollständige MCMV-Infektion die Induktion einer breiten Palette an Zytokinen und Chemokinen durch LPS verhinderte.

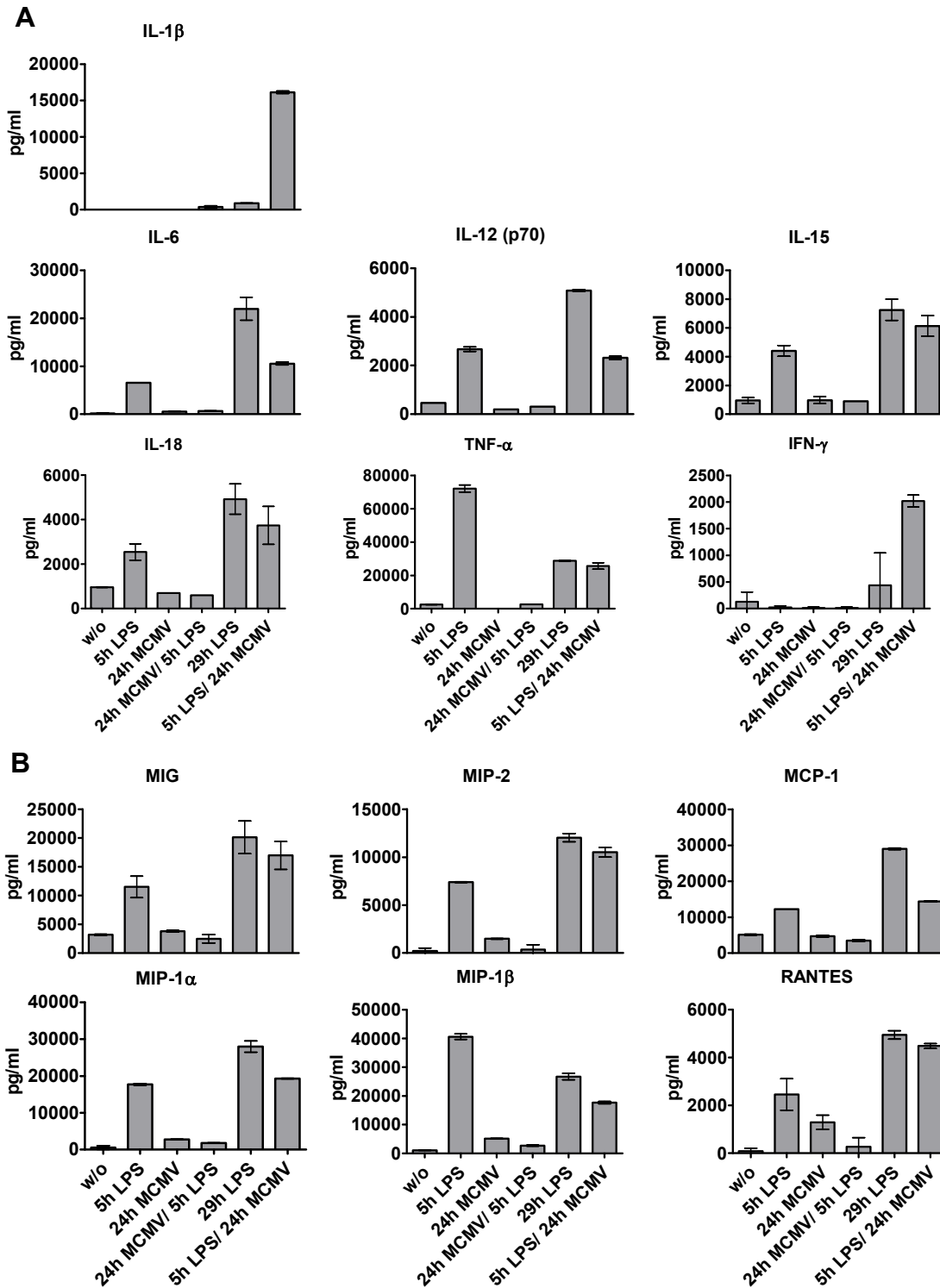


Abb. 3.10: Darstellung der Konzentration ausgewählter Zytokine im Überstand von PEC. Zellüberstände wurden mit dem x-Plex Assay Kit für murine Zytokine der Firma BioRad vermessen. Dargestellt sind die Zytokine, bei denen eine signifikante Konzentration im Überstand messbar war. **(A)** Zytokine, **(B)** Chemokine. Die Zellüberstände stammen von jeweils 1×10^6 Zellen, die folgendermaßen behandelt wurden (Balken von links nach rechts): 1. unbehandelte Zellen, 2. Zellen, die 5 h mit LPS stimuliert wurden, 3. 24 h voll infizierte Zellen, 4. 24 h voll infizierte Zellen, die nachfolgend 5 h mit LPS stimuliert wurden, 5. Zellen, die 29 h mit LPS stimuliert wurden und 6. LPS-stimulierte Zellen (5 h), die nachfolgend 24 h mit MCMV voll infiziert wurden. Zu Beachten ist die unterschiedliche Skalierung für die jeweiligen Mediatoren. Die Messung wurde in Duplikaten durchgeführt.

In Abbildung 3.10 wird deutlich, dass unbehandelte PEC kein IL-1 β und IL-6 sowie nur geringe Mengen an IL-12, IL-15, IL-18, TNF- α , IFN- γ , MIG, MIP-2, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES sezernierten.

Wie bei den BMM führte eine 5 h LPS-Stimulation zu einer deutlichen Sezernierung der Mediatoren IL-6, IL-12, IL-15, TNF- α , MIG, MIP-2, MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES. IL-1 β und IFN- γ wurden dagegen von diesen Zellen nicht produziert. Vollständig mit MCMV-infizierte (24 h) Zellen zeigten nur eine geringe Verstärkung der Produktion von MIP-2, MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Analog zu den BMM zeigten die vollständig MCMV-infizierten (24 h) und nachfolgend mit LPS-stimulierten (5 h) Zellen keinen Anstieg der Sezernierung der Mediatoren. Demnach blockierte MCMV auch in den PEC die LPS-induzierte Produktion von Zytokinen und Chemokinen.

Eine 29 h LPS-Stimulation der PEC führte mit wenigen Ausnahmen zu einer erhöhten Konzentration, durch Akkumulation der Mediatoren in den Zellüberständen über die Zeit. Die Konzentration von TNF- α und MIP-1 β verringerte sich im Vergleich zur 5 h LPS-Stimulation. Im Gegensatz dazu wurde nach 29 h LPS-Stimulation eine deutliche Sezernierung von IFN- γ gemessen. Eine IL-1 β -Produktion wurde nicht beobachtet.

PEC, die 5 h mit LPS stimuliert worden sind und nachfolgend vollständig mit MCMV infiziert wurden (24 h) sezernierten erstmals eine deutliche Menge von IL-1 β und eine erhöhte Menge von IFN- γ . Im Vergleich zu den 29 h LPS-stimulierten Zellen war die ermittelte Konzentration von IL-15, TNF- α , MIG, MIP-2 und RANTES gleich bleibend und außer für TNF- α im Vergleich zu der 5 h LPS-Stimulation auch gleich bleibend erhöht. Deutlich geringer konzentriert im Vergleich zur 29 h LPS-Stimulation waren IL-12, IL-18, MCP-1, MIP-1 α und MIP-1 β .

Durch die Einführung weiterer Zeitpunkte für die Stimulation mit LPS und der Infektion zuvor stimulierter Zellen ließen sich zusätzliche Aussagen zum Einfluss der MCMV-Infektion auf die Aktivierung von Makrophagen treffen.

Der Wert für die 29 h LPS-Stimulation ermöglichte im direkten Vergleich zum 5 h-Wert eine Aussage über die Haltbarkeit bzw. die Dauer der Sezernierung der Zytokine.

Hier wurde deutlich, dass sowohl TNF- α , als auch MIP-1 β eine wesentlich geringere Haltbarkeit im Medium besaßen oder aber kurzfristiger als alle anderen Zytokine sezerniert wurden, die eine höhere Konzentration nach 29 h-Stimulation erlangten.

Die Zytokine IL-2 und IL-4 wurden erwartungsgemäß zu keinem Zeitpunkt von BMM oder PEC sezerniert (Daten nicht gezeigt).

3.3.2 MCMV blockiert die Produktion von Zytokinen und Chemokinen in ruhenden und aktivierten Makrophagen.

Die durch das Bioplex-System erhaltenen Informationen wurden für ausgewählte Zytokine auf Einzelzellebene durch intrazelluläre durchflusszytometrische Messungen überprüft.

A.) LPS-stimulierte Makrophagen und die Produktion von MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES bei einer MCMV-Infektion

Die Chemokine MIP-1 α , MIP-1 β (CCL3, CCL4, *macrophage-inflammatory protein*) und RANTES (CCL5, *Regulated upon activation, normal T cell expressed, and secreted*) bilden mit anderen Chemokinen und Zytokinen eine funktionelle Gruppe zur Abwehr einer MCMV-Infektion *in vitro* und *in vivo* [163]. Die drei Chemokine werden wie in Abb. 3.5 gezeigt von LPS-aktivierten Makrophagen in großen Mengen produziert. Durch durchflusszytometrische Analysen konnten Aussagen über die Kinetik der Sezernierung während einer LPS-Stimulation bzw. einer MCMV-Infektion gemacht werden (Abbildung 3.11).

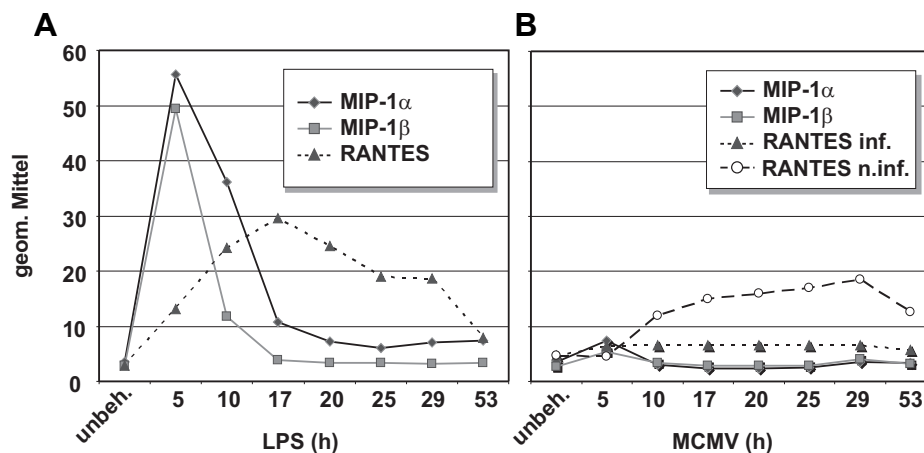


Abb. 3.11: Kinetik der Produktion der Chemokine MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES nach LPS-Stimulation oder MCMV-Infektion von BMM *in vitro*. (A) 1×10^6 BMM wurden bis zu 53 h mit 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS stimuliert und die Frequenz Chemokin-produzierender Zellen bestimmt. (B) Die BMM wurden mit MCMV-GFP mit einer *moi* von 0,02 (ca. 50 % infizierte Zellen) bis zu 53 h infiziert. Bei der Produktion von RANTES konnte zwischen infizierten (inf.) und uninfizierten (n.inf.) Zellen unterschieden werden. Da es keinen Unterschied bei der Produktion von MIP-1 α und MIP-1 β zwischen infizierten und uninfizierten Makrophagen gibt, wurde der durchschnittliche Wert des geometrischen Mittels gebildet. Aufgetragen ist das geometrische Mittel der Fluoreszenzintensität der intrazellulären durchflusszytometrischen Bestimmung.

In Abbildung 3.11 wird eine enge zeitliche Kinetik für die Produktion der Chemokine MIP-1 α und MIP-1 β deutlich, die ihr Maximum im Bereich von 5-10 h nach LPS-Stimulation hat. Im Gegensatz dazu war die Kinetik von RANTES verzögert und hat ihr Maximum im Bereich von 17-20 h nach der Stimulation mit LPS. Eine Infektion mit MCMV führte bei den Knochenmarksmakrophagen zu keiner nennenswerten Expression von MIP-1 α und MIP-1 β bis 53 h nach der Infektion. Im Gegensatz dazu reichte die Anwesenheit von MCMV-infizierten Knochenmarksmakrophagen aus, um in den uninfizierten Makrophagen der Kultur die Sezernierung von RANTES zu stimulieren (siehe auch Abb. 3.12).

Um den Einfluss von MCMV auf die Chemokinproduktion auf Einzelzellebene zu untersuchen, wurden im folgenden Experiment BMM *in vitro* so infiziert (*moi* = 0,02), dass nach 24 h ca. 50 – 70 % aller Zellen der Kultur infiziert waren, also GFP exprimierten. Diese partiell infizierte Kultur wurde dann mit dem bakteriellen Stimulus LPS für 5 h behandelt und die Zytokinproduktion in infizierten und uninfizierten Zellen verglichen.

Umgekehrt wurde untersucht, welchen Einfluss eine MCMV-Infektion auf vollständig mit LPS aktivierte Makrophagen hat, die bereits zu 100 % MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES produzieren (Abbildung 3.11). Die Zellen wurden im Detail folgendermaßen behandelt:

- a.) unbehandelt
- b.) mit LPS (2 μ g/ml) stimuliert (5 h)
- c.) mit MCMV (moi = 0,02) infiziert (24 h)
- d.) mit LPS stimuliert (5 h) und nachfolgend mit MCMV infiziert (24 h)
- e.) mit MCMV infiziert (24 h) und nachfolgend mit LPS stimuliert (5 h)

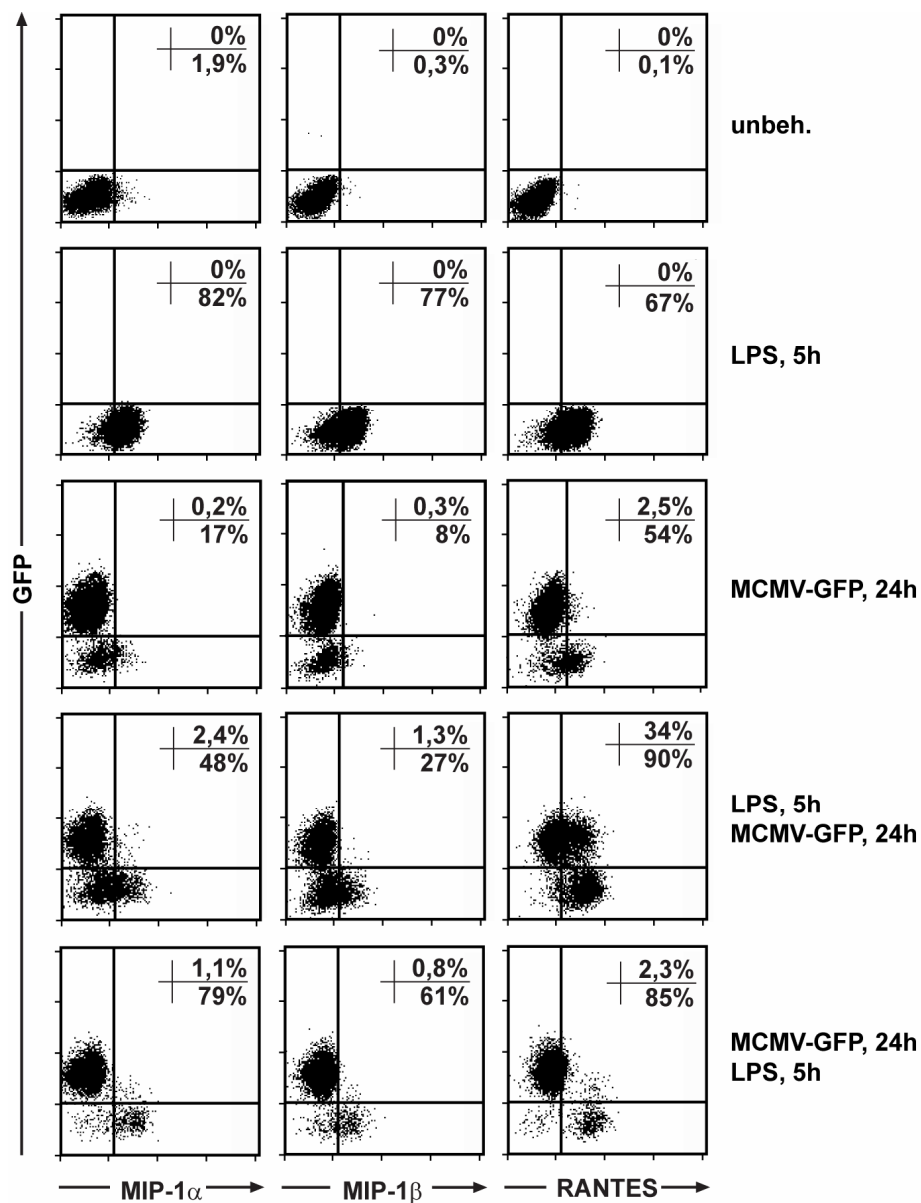


Abb. 3.12: Darstellung der durchflusszytometrischen Messung der Chemokinproduktion in BMM. Jeweils 1×10^6 BMM wurden *in vitro* folgendermaßen behandelt: 1.) unbehandelt, 2.) 5 h mit LPS stimuliert, 3.) 24 h mit MCMV infiziert, 4.) 5 h mit LPS stimuliert und nachträglich 24 h mit MCMV infiziert und 5.) 24 h mit MCMV infiziert und nachträglich 5 h mit LPS stimuliert. Die Produktion der Chemokine MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES wurde intrazellulär durchflusszytometrisch bestimmt. Die Infektion der Zellen erfolgte mit einer *moi* von 0,02. In Prozent angegeben sind die Zellen, die noch Chemokin produzieren, wobei zwischen infizierten (Zahl oben) und uninfizierten (Zahl unten) unterschieden wird.

In Abbildung 3.12 ist zu erkennen, dass alle BMM durch eine LPS-Stimulation (5 h) die Chemokine MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES produzierten. Eine MCMV-Infektion (24 h) verursachte in den uninfizierten Zellen eine geringe Produktion von MIP-1 α und MIP-1 β , wohingegen RANTES deutlich (54 %) von der uninfizierten Population gebildet wurde.

Es zeigte sich, dass in LPS-aktivierten BMM die Produktion der Chemokine in den infizierten Zellen (24 h) herunterreguliert wurde. Das gilt vor allem für MIP-1 α (2,4 % in infizierten Zellen zu 48 % in den uninfizierten Zellen) und MIP-1 β (1,3 % in infizierten Zellen zu 27 % in den uninfizierten Zellen). Die uninfizierten Zellen produzierten also weiterhin die genannten Chemokine.

Zuvor MCMV-infizierte (24 h) BMM konnten nicht mehr durch die Stimulation mit LPS (5 h) zur Expression der Chemokine gebracht werden.

Diese Ergebnisse zeigten, dass BMM grundsätzlich die Chemokine MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES nach einer LPS-Stimulation produzieren können, die Expression aber nach einer MCMV-Infektion herunterreguliert wurde und einmal MCMV-infizierte BMM nicht mehr in der Lage sind, die Chemokine nach einer LPS-Stimulation zu produzieren.

Um die Chemokinblockade durch die MCMV-Infektion mit einer primären Makrophagenpopulation zu verifizieren, wurde das selbe Experiment wie in Abbildung 3.11 mit Peritonealen Exsudatzellen (PEC) wiederholt. Ca. 93,7 % der vitalen PEC sind CD11b⁺ und F4/80⁺ Makrophagen (siehe Abbildung 3.4B). Diese Zellen sind mit MCMV infizierbar.

Analog zum vorherigen Experiment wurden jeweils 1×10^6 PEC 24 h nach ihrer Gewinnung aus der Maus verwendet. Die Zellen wurden jeweils mit LPS stimuliert (5 h) oder mit MCMV-GFP infiziert (24 h). Zusätzlich wurden andere nach einer Stimulation mit LPS (5 h) mit MCMV-GFP infiziert (24 h) oder nach einer MCMV-Infektion (24 h) mit LPS stimuliert (5 h). Anschließend wurde die Produktion der Chemokine durchflusszytometrisch gemessen (Abbildung 3.13).

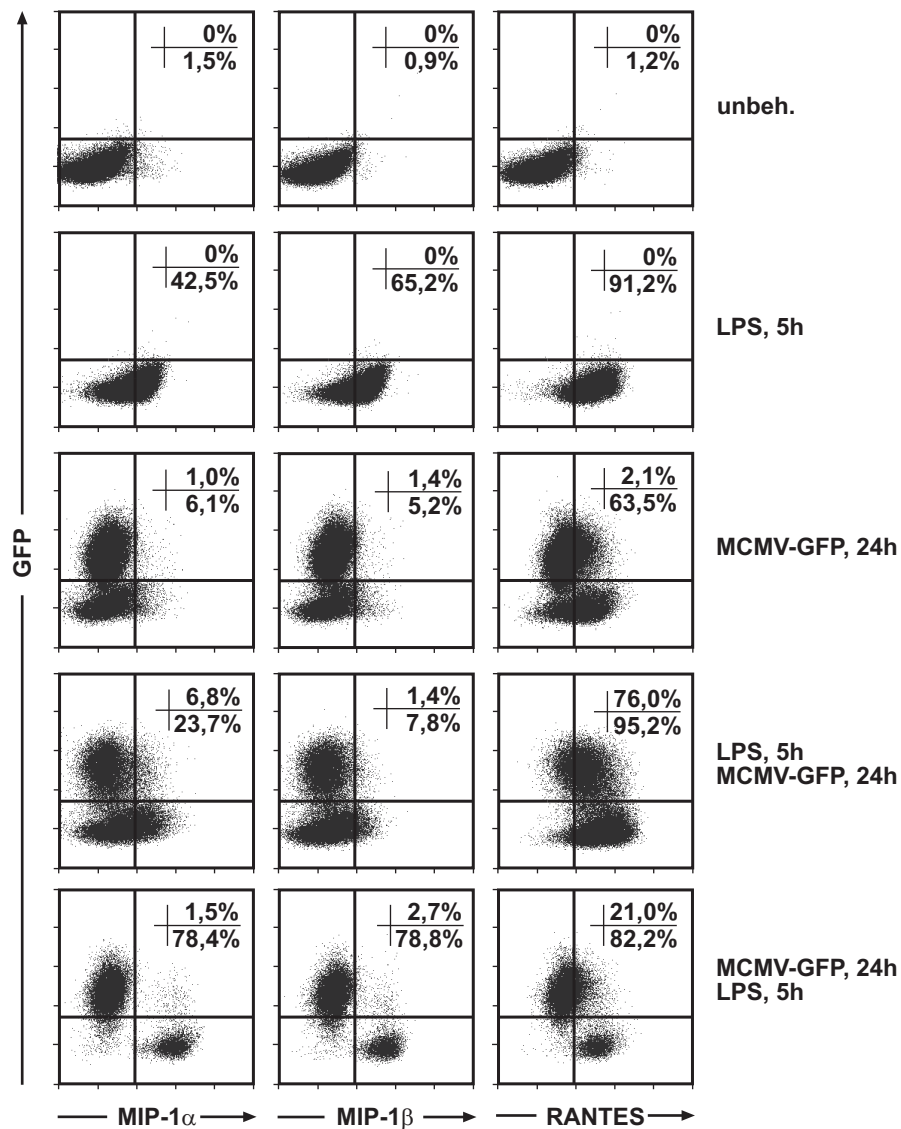


Abb. 3.13: Darstellung der durchflusszytometrische Messung der Chemokinproduktion in PEC. Jeweils 1×10^6 PEC wurden *in vitro* folgendermaßen behandelt: 1.) unbehandelt, 2.) 5 h mit LPS stimuliert, 3.) 24 h mit MCMV-GFP infiziert, 4.) 5 h mit LPS stimuliert und nachträglich 24 h mit MCMV-GFP infiziert und 5.) 24 h mit MCMV-GFP infiziert und nachträglich 5 h mit LPS stimuliert. Die Produktion der Chemokine MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES wurde intrazellulär durchflusszytometrisch bestimmt. Die Infektion der Zellen erfolgte mit einer *moi* von 0,02. In Prozent angegeben sind die Zellen, die noch Chemokin produzieren, wobei zwischen infizierten (Zahl oben) und uninfizierten (Zahl unten) unterschieden wird.

Die Ergebnisse entsprechen denen der BMM in den Abbildungen 3.12. Demnach produzierten ruhende CD11b⁺ und F4/80⁺ PEC keine der gemessenen Chemokine, eine 5 h-Stimulation mit LPS induzierte die Chemokinproduktion. Die Chemokinproduktion wurde in allen LPS-voraktivierten Zellen durch eine 24 h-Infektion mit MCMV herabreguliert. MIP-1 α und MIP-1 β schienen dabei wesentlich stärker betroffen zu sein als RANTES.

Wie im Fall der BMM ließen sich infizierte PEC nicht mehr zur Chemokinproduktion mit LPS stimulieren, während die uninfizierten PEC in derselben Kultur nach der LPS-Stimulation große Mengen an MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES produzierten. Das gleiche Bild des Einflusses von MCMV auf die Produktion der Chemokine in Makrophagen wurde mit den immortalisierten Makrophagenlinien J774 und IC-21 erhalten (nicht gezeigt).

Da offensichtlich die Grundbeobachtung der Chemokinblockade gleichermaßen für *in vitro* differenzierte BMM und *ex vivo* präparierte PEC galt, wurden alle weiteren Experimente stellvertretend mit BMM durchgeführt.

In einem weiteren Versuch wurde durch eine durchflusszytometrische Messung bestimmt, zu welchem Zeitpunkt nach einer MCMV-Infektion in den LPS-stimulierten Makrophagen die Chemokinproduktion zum Erliegen kommt. Hierzu wurden jeweils 1×10^6 BMM *in vitro* 5 h mit LPS (2 $\mu\text{g/ml}$) stimuliert und nachfolgend mit MCMV (*moi* = 0,02) infiziert. 5 h, 14 h, 24 h und 48 h nach der Infektion wurde die Produktion der Chemokine gemessen (Abbildung 3.14).

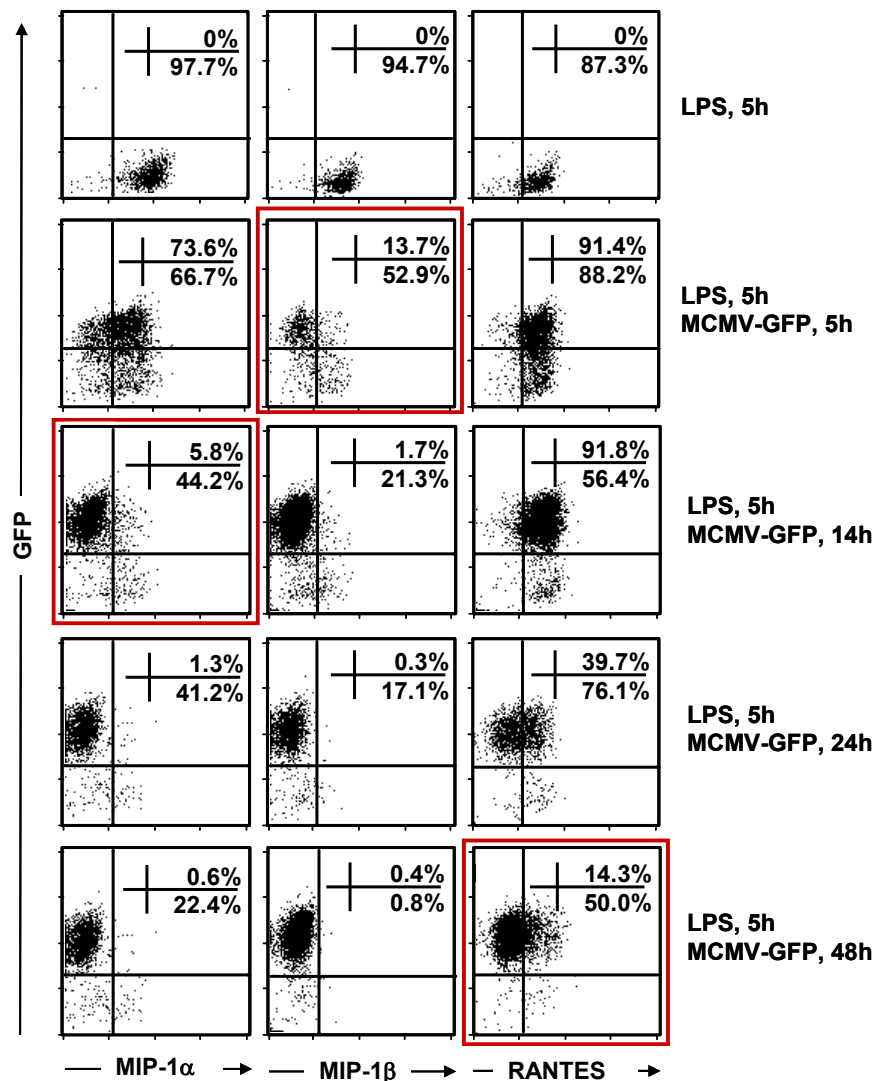


Abb. 3.14: LPS-aktivierte BMM regulieren die Produktion von MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES nach einer MCMV-Infektion zu verschiedenen Zeitpunkten herunter. Jeweils 1×10^6 BMM wurden *in vitro* 5 h mit LPS stimuliert, nachfolgend wurden die LPS-stimulierten Zellen mit MCMV ($moi = 0,02$) infiziert und die Produktion von MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES 5 h, 14 h, 24 h und 48 h nach der Infektion durchflusszytometrisch gemessen. In Prozent angegeben sind die Zellen, die noch Chemokin produzieren, wobei zwischen infizierten (Zahl oben) und uninfizierten (Zahl unten) unterschieden wird. Rot umrahmt sind die Zeitpunkte, zu denen bereits ein eindeutiges Erliegen der Chemokinproduktion im Vergleich zu den uninfizierten Zellen sichtbar ist.

In Abbildung 3.14 ist zu erkennen, dass bereits 5 h nach einer Infektion mit MCMV die Produktion von MIP-1 β in den LPS-voraktivierten Zellen zum Erliegen kam. Die Produktion von MIP-1 α wurde 14 h nach der MCMV-Infektion eingestellt. Die Produktion von RANTES war erst 24 h nach der Infektion deutlich verringert und kam auch nach 48 h nicht vollständig zum Erliegen.

Die Produktion des Chemokins MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*, CCL2) war ebenfalls durch LPS stimulierbar (s. Abb. 3.5). MCP-1 ist ein Chemokin, welches zirkulierende Monozyten in das Gewebe leiten soll, in dem es unter anderem durch Makrophagen produziert wird, die beispielsweise durch eine Infektion vor Ort aktiviert worden sind. Die eingewanderten Monozyten differenzieren daraufhin zu Makrophagen und nehmen an der Elimination der Infektion teil [126].

Zur Untersuchung des Einfluss von MCMV auf die MCP-1-Produktion von LPS-stimulierten Makrophagen, wurden je 1×10^6 BMM *in vitro* 5 h mit LPS (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) stimuliert und nachfolgend mit MCMV-GFP (*moi* = 0,02) infiziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion (5 h, 14 h, 24 h) wurde durchflusszytometrisch die Produktion des Chemokins MCP-1 untersucht (vergl. Abb. 3.14).

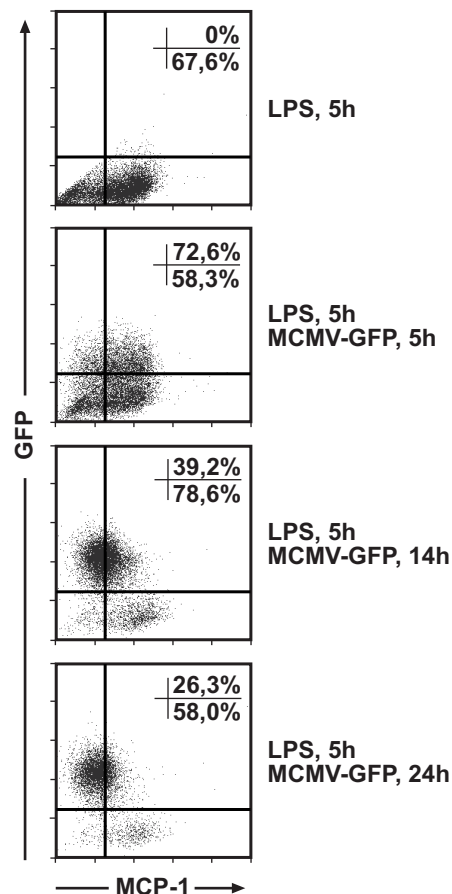


Abb. 3.15: MCMV reguliert die Produktion von MCP-1 in LPS-stimulierten BMM herab. Die Zellen wurden jeweils 5 Stunden mit LPS stimuliert, mit MCMV-GFP (*moi* = 0,02) infiziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion wurde die Produktion von MCP-1 durchflusszytometrisch gemessen. In Prozent angegeben sind die Zellen, die MCP-1 produzieren, wobei zwischen infizierten (Zahl oben) und uninfizierten (Zahl unten) unterschieden wird.

In Abbildung 3.15 ist deutlich zu erkennen, dass die durch LPS-Inkubation stimulierte MCP-1-Produktion der Knochenmarksmakrophagen durch MCMV in den infizierten Zellen 14 h nach Infektion herunterreguliert wurde. Diese Kinetik entsprach damit der Kinetik der Herunterregulation von MIP-1 α (Abb. 3.14). Da die MCP-1-Produktion bereits 24 Stunden nach einem alleinigen LPS-Stimulus zum Erliegen kommt (Daten sind hier nicht gezeigt), war auffällig, dass in den Zellen der Kultur, die nicht mit MCMV infiziert waren, die MCP-1-Produktion über 24 Stunden hinaus aufrecht erhalten wurde. Das bedeutet, dass neben LPS noch ein weiterer Stimulus durch die Infektion mit MCMV aufgetreten ist.

Interleukin-12 ist bei einer MCMV-Infektion erforderlich für die Stimulation der IFN- γ -Sekretion durch Natürlichen Killerzellen, welche im Rahmen der frühen Immunantwort gegen MCMV eine zentrale Rolle spielen (s. Einleitung) [206]. Die IL-12-Produktion durch Knochenmarksmakrophagen ist durch LPS stimulierbar (s. Abb. 3.5). Es wurde untersucht, inwieweit die IL-12-Produktion der Makrophagen durch eine MCMV-Infektion beeinflusst wird. Hierzu wurden je 1×10^6 BMM *in vitro* 5 h mit LPS (2 $\mu\text{g/ml}$) stimuliert und nachfolgend mit MCMV-GFP ($moi = 0,02$) infiziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion (5 h, 14 h, 24 h) wurde durchflusszytometrisch die Produktion des Zytokins IL-12 untersucht (Abb. 3.16).

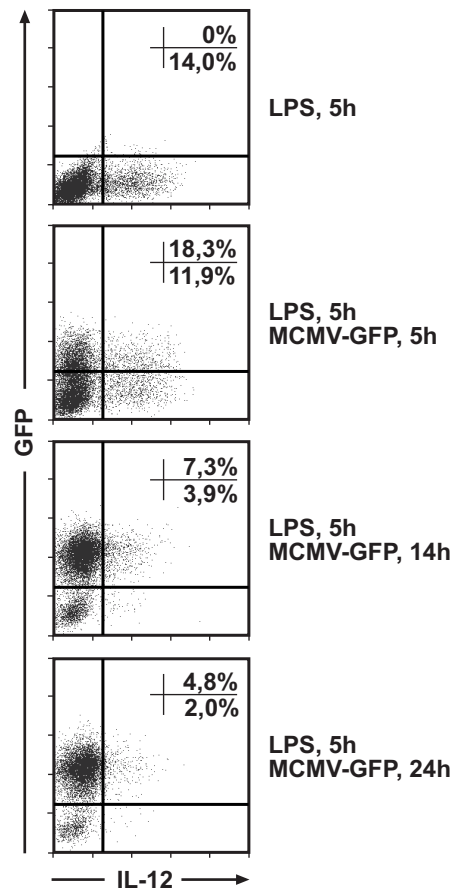


Abb. 3.16: LPS-aktivierte BMM produzieren nach einer MCMV-Infektion weiterhin das Zytokin IL-12. Die Zellen wurden jeweils 5 Stunden mit LPS stimuliert, mit MCMV-GFP (*moi* = 0,02) infiziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion wurde die Produktion von IL-12 durchflusszytometrisch gemessen. In Prozent angegeben sind die Zellen, die IL-12 produzieren, wobei zwischen infizierten (Zahl oben) und uninfizierten (Zahl unten) unterschieden wird.

Interleukin-12 wurde ebenfalls wie MCP-1 nach einem kurzzeitigen LPS-Stimulus (s. Abb. 3.5) durch die Knochenmarksmakrophagen produziert. Die durchflusszytometrische Messung auf Einzelzellebene zeigte, dass nur ca. 14 % aller BMM IL-12 produzierte (aber 70-100 % die Chemokine MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES und MCP-1). Im Gegensatz zu den genannten Chemokinen erfuhr die Produktion von IL-12 keine Herabregulation in den MCMV-infizierten Knochenmarksmakrophagen. Stattdessen wurde sie sowohl in infizierten, als auch uninfizierten Zellen aufrecht erhalten und nahm im Verlauf der 24 h MCMV-Infektion in beiden Populationen ab. Diese Ergebnisse entsprechen denen der Zytokinmessung bei BMM durch das Bioplex-System in Abbildung 3.8A. (Anmerkung: in PEC wurde IL-12 jedoch präferentiell in infizierten Zellen herunterreguliert, vgl. Abbildung 3.10A).

Das Ergebnis ist ein weiterer Hinweis, dass Makrophagen prinzipiell auch unter einer MCMV-Infektion lösliche Mediatoren produzieren können, dass aber die Produktion ausgewählter Chemokine und Zytokine (s. Abb. 3.9) selektiv im Rahmen der MCMV-Infektion unterdrückt wird.

B.) Untersuchung des Umfangs der Chemokinblockade: Zytokin-aktivierte Makrophagen

Unter dem Einfluss einer MCMV-Infektion produzieren infizierte Zellen oder Immunzellen, die infizierte Zellen erkannt haben, verschiedene Zytokine, wie die Typ-1 Interferone (IFN- α und IFN- β), sowie Interferon γ (IFN- γ), als auch den Tumor Nekrose Faktor α (TNF- α). IFN- α/β ist notwendig, um den Antiviralen Zustand in allen Zielzellen und die Blastogenese und Zytotoxizität von Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) zu induzieren [206]. Aktivierte NK-Zellen, die infizierte Zellen erkennen, produzieren TNF- α und IFN- γ , welche Makrophagen aktivieren [207]. Die bisherigen Experimente haben gezeigt, dass MCMV mit der Produktion von Chemokinen ausgehend von ruhenden und LPS-aktivierten Makrophagen interferiert. Im Rahmen der MCMV-Infektion führte ein nachfolgender, völlig andersartiger Stimulus wie LPS nicht zur Expression der untersuchten Chemokine.

Es sollte aufbauend auf diesen Experimenten überprüft werden, ob andere lösliche Mediatoren, die im Verlauf einer MCMV-Infektion produziert werden (wie IFN- β und TNF- α), die Chemokinproduktion in MCMV-infizierten Makrophagen induzieren können. Hierzu wurden jeweils 1×10^6 BMM *in vitro* folgendermaßen behandelt:

- a.) unbehandelt
- b.) 5 h mit IFN- β (100 U/ml) stimuliert
- c.) 29 h mit IFN- β stimuliert
- d.) 5 h mit IFN- β stimuliert und nachfolgend 24 h mit MCMV-GFP (*moi* = 0,02) infiziert
- e.) 24 h mit MCMV-GFP infiziert und nachfolgend 5 h mit IFN- β stimuliert
- f.) 24 h mit MCMV-GFP infiziert

Die Infektion mit MCMV-GFP mit einer *moi* = 0,02 bewirkt, dass ca. 50% der Zellen infiziert werden und eine Kokultur mit uninfizierten Zellen bilden.

Nach den jeweiligen Zeitpunkten wurde die Produktion der Chemokine MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES durchflusszytometrisch gemessen (s. Abb. 3.17).

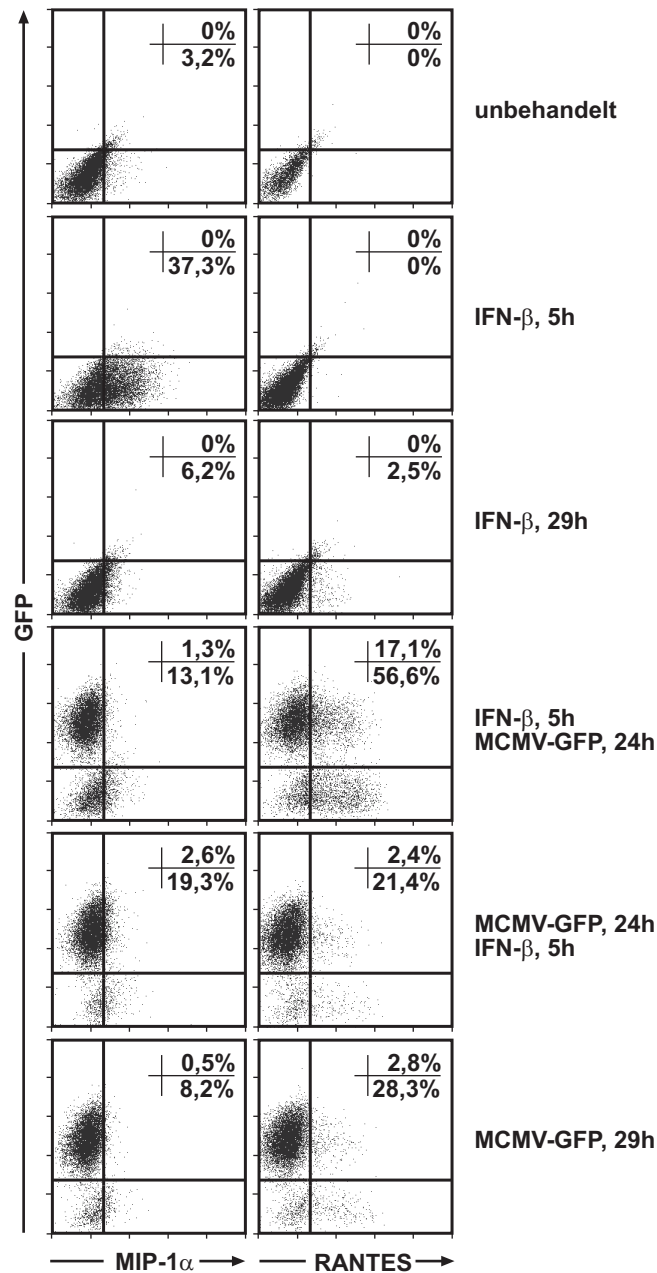


Abb. 3.17: MCMV reguliert die IFN- β -induzierte Chemokinproduktion herunter. Jeweils 1×10^6 BMM wurden in vitro mit IFN- β (100 U/ml) stimuliert und/ oder mit MCMV (*moi* = 0,02) infiziert. Die Produktion der Chemokine MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES wurde durchflusszytometrisch gemessen. In Prozent angegeben sind die Zellen, die Chemokin produzieren, wobei zwischen infizierten (Zahl oben) und uninfizierten (Zahl unten) unterschieden wird. Nicht aufgeführt sind die Ergebnisse für MIP-1 β , die denen für MIP-1 α entsprechen.

In Abbildung 3.17 ist zu erkennen, dass unterschiedliche Bedingungen zur Sezernierung von MIP-1 α oder RANTES durch die Knochenmarksmakrophagen führten. Auffällig war die schnelle (nach 5 h Stimulation), aber kurzzeitige (bis 29 h Stimulation) Sezernierung von MIP-1 α durch den IFN- β -Stimulus.

Die RANTES-Produktion war offenbar von einem weiteren Stimulus abhängig, der durch den Einfluss der MCMV-Infektion zu Stande gekommen ist. Beide Chemokine wurden aber in infizierten Zellen entweder herabreguliert oder konnten durch den IFN- β -Stimulus nicht mehr induziert werden. Dies entspricht der Situation, wie sie für LPS-aktivierte Makrophagen gezeigt wurde (Abbildung 3.12).

C.) Untersuchung des Umfangs der Chemokinblockade: andere TLR-Agonisten

LPS, als Bestandteil der Zellwand von gram-negativen Bakterien, wird neben der Vermittlung durch CD14, MD-2 und LBP (Lipid-bindendes Protein) über den Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) durch die Makrophagen detektiert. Neben dem TLR4 verfügt die Zelle über einige andere TLR, die für die Erkennung anderer pathogenassoziierter Strukturen verantwortlich sind. Eine Stimulation dieser TLR, beispielsweise der Toll-like Rezeptoren 3, 7 und 9, lässt sich *in vitro* durch TLR-Agonisten nachstellen. Hierzu wurden jeweils 1×10^6 BMM 24 h mit MCMV-GFP (*moi* = 0,02) infiziert oder 5 h mit dem TLR-Agonisten stimuliert. Als Agonist für TLR3 diente PolyI:C, Loxoribin für TLR7 und CpG als TLR9-Agonist.

Zusätzlich wurden über TLR-Agonisten stimulierte (5 h) BMM mit MCMV-GFP infiziert (24 h) beziehungsweise 24 h MCMV-infizierte nachfolgend mit einem TLR-Agonisten (5 h) stimuliert. Anschließend wurde die Produktion der Chemokine MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES durchflusszytometrisch bestimmt (Abbildung 3.18).

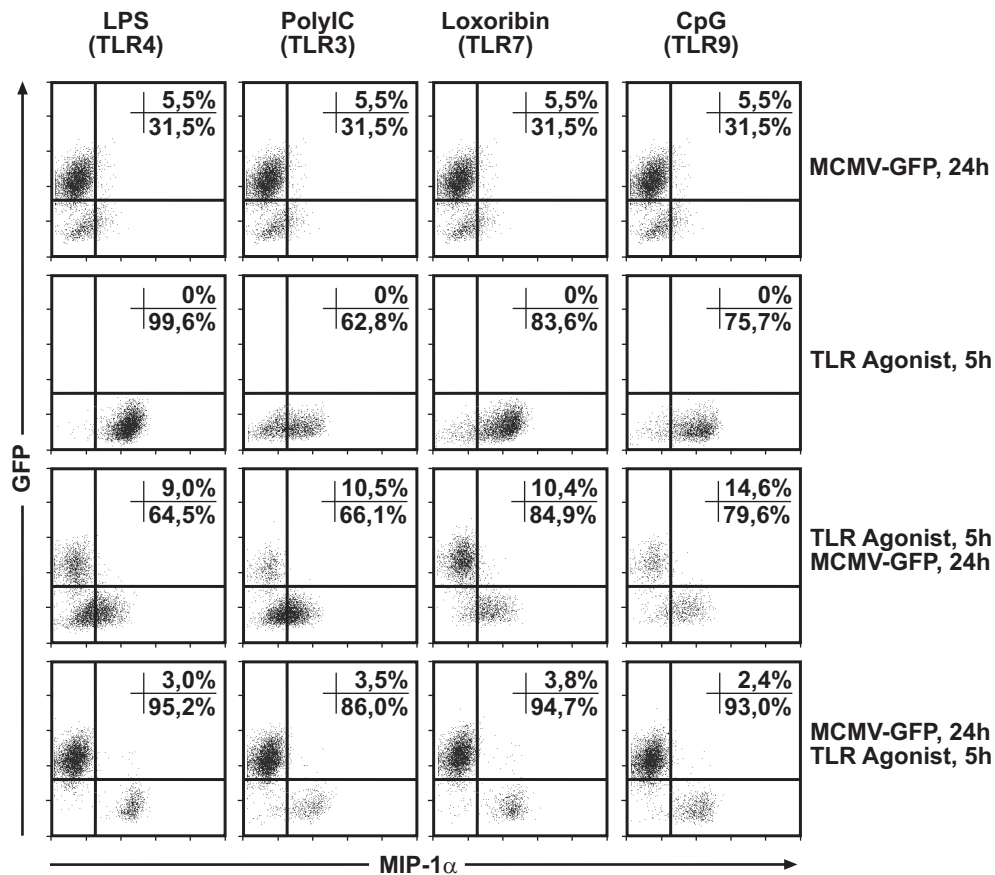


Abb. 3.18: Stimulation von BMM mit Agonisten der Toll-like Rezeptoren 3, 4, 7 und 9 bei einer MCMV-Infektion. Jeweils 1×10^6 BMM wurden mit folgendermaßen behandelt: 1. mit MCMV-GFP (*moi* = 0,02) infiziert (24 h), 2. mit LPS (TLR4-Agonist), PolyI:C (TLR3-Agonist), Loxoribin (TLR7-Agonist) und CpG (TLR9-Agonist) stimuliert (5 h), 3. 5 h mit den genannten TLR-Agonisten stimuliert und nachfolgend mit MCMV-GFP infiziert (24 h) oder 4. 24 h mit MCMV-GFP infiziert und danach 5 h mit den genannten TLR-Agonisten stimuliert. Die Produktion des Chemokins MIP-1 α wurde durchflusszytometrisch bestimmt. In Prozent angegeben sind die Zellen, die Chemokin produzieren, wobei zwischen infizierten (Zahl oben) und uninfizierten (Zahl unten) unterschieden wird.

Die Stimulation der Knochenmarksmakrophagen neben LPS durch PolyI:C als Agonist von TLR3, Loxoribin als Agonist von TLR7 beziehungsweise CpG als TLR9-Agonist führte ebenfalls zu deren Aktivierung und der Produktion von MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES. Die Infektion mit MCMV verhinderte die TLR-induzierte Chemokinproduktion. In TLR-aktivierten Makrophagen wurde die Produktion der Chemokine durch die Makrophagen analog zu den Abbildungen 3.12 herabreguliert (die Daten für MIP-1 β und RANTES entsprechen denen für MIP-1 α und werden daher hier nicht gezeigt).

Insgesamt bedeutet dies, dass MCMV-infizierte Makrophagen bezüglich einer Reihe von TLR-Signalen nicht mehr in der Lage sind, mit einer Produktion der Chemokine MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES zu reagieren.

Die MCMV-infizierten Makrophagen sind hinsichtlich eines TLR-Signals offenbar paralytisch.

3.3.3 MCMV blockiert die Transkription von Chemokinen in BMM

Mechanistisch gesehen kann die Blockade der Chemokinproduktion durch MCMV auf unterschiedlichen Wegen erfolgen:

1. Die Chemokinproduktion in Makrophagen könnte auf Transkriptionsebene herunterreguliert werden
2. Die Stabilität der mRNA-Transkripte der Chemokine könnte beeinflusst werden
3. Die Stabilität der Chemokinproteine könnte beeinflusst werden
4. MCMV könnte ein Protein kodieren, das intrazellulär die Chemokine bindet.

Um den zugrunde liegenden Mechanismus zu klären, wurde zunächst die Transkriptionsebene der Chemokine untersucht.

Das Bioplex-System und die Durchflusszytometrie können quantitative und qualitative Aussagen über die Produktion bzw. Sekretion von Zytokinen liefern. Die Frage, ob die Reduktion einer Proteinkonzentration durch eine Reduktion des zugrunde liegenden RNA-Transkripts zustande kommt, kann durch eine quantitative *real time* PCR (qRT-PCR) beantwortet werden. Um die Transkripte für MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES und β -Aktin mittels einer qRT-PCR quantifizieren zu können, wurden jeweils chemokinspezifische Plasmide (s. Anhang) kloniert und in Standardverdünnungen eingesetzt. Über diese Standardverdünnungen und spezifischen Primern und Sonden wurden die einzelnen qRT-PCR Reaktionen etabliert. Das endogene mRNA-Level von β -Aktin wurde zur Normalisierung der einzelnen Proben verwendet. Die cDNA-Sequenz von RANTES der BMM aus den C57BL/6-Mäusen erwies sich dabei nach mehrmaligen Sequenzierungen als abweichend von den publizierten Sequenzen und wurde unter der *accession number* AY722103 bei NCBI veröffentlicht.

Für die qRT-PCR wurde nach der Stimulation mit LPS (5 h) oder vollständigen Infektion (> 95%) mit MCMV-GFP (24 h) der Zellen ein Teil dieser Zellen verwendet, um deren RNA zu gewinnen. Durch eine reverse Transkription wurde diese RNA in cDNA umgeschrieben und wurde anschließend mit chemokinspezifischen Primern und Sonden amplifiziert. Für das folgende Experiment wurden jeweils 5×10^6 BMM *in vitro* mit LPS (2 $\mu\text{g/ml}$) stimuliert oder vollständig mit MCMV-GFP infiziert (29 h, *moi* = 0,2). Zusätzlich wurden vollständig MCMV-infizierte (24 h) BMM nachfolgend mit LPS stimuliert (5 h) und jeweils 5×10^6 BMM wurden mit UV-inaktiviertem MCMV-GFP inkubiert (24 h) und danach mit LPS stimuliert (5 h). Die MCMV-Infektion und die erfolgreiche UV-Inaktivierung wurde anhand eines Teils der Zellen durchflusszytometrisch überprüft.

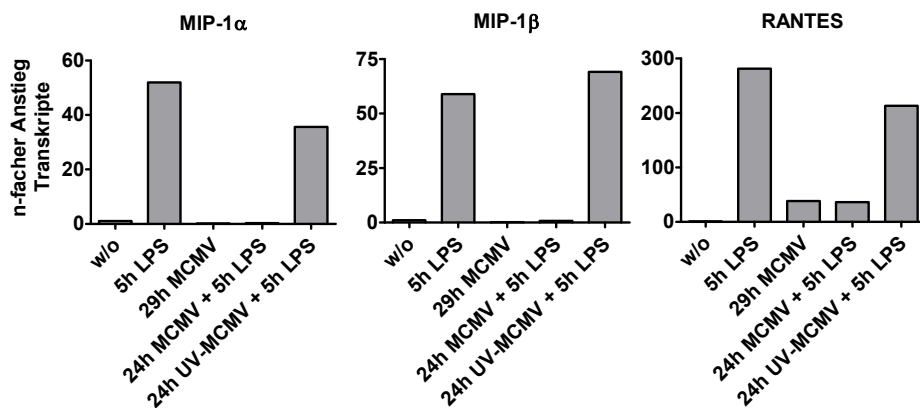


Abb. 3.19: MCMV blockiert die LPS-induzierte Transkription der Chemokine MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES. Durch eine qRT-PCR mit MIP-1 α -, MIP-1 β - und RANTES-spezifischen Primerpaaren und Sonden wurde in Zellen die Anzahl der Chemokintranskripte bestimmt. Je 5×10^6 Zellen wurden folgendermaßen behandelt: 1. unbehandelt (w/o), 2. mit LPS stimuliert (5 h), 3. mit MCMV-GFP infiziert (29 h), 4. mit MCMV-GFP infiziert (24 h) und nachfolgend mit LPS stimuliert (5 h), 5. mit UV-inaktiviertem MCMV-GFP inkubiert (24 h) und nachfolgend mit LPS stimuliert (5 h). Durch die gleichzeitige Messung der konstitutiv exprimierten β -Aktintranskripte in den Zellen und durch Bildung des Quotienten aus den Transkripten für die Chemokine und den Transkripten von β -Aktin wurden die erhaltenen Werte normalisiert. Der n-fache Anstieg der Transkriptzahl wurde im Vergleich mit der Transkriptzahl der unbehandelten Zellen errechnet. Der n-fache Anstieg ist demnach für die unbehandelten Zellen immer 1.

Wie aus den Ergebnissen der Abbildung 3.19 hervor geht, induzierte eine Stimulation mit LPS die Transkription der jeweiligen Chemokine. Des Weiteren verhinderte eine vollständige Infektion der Makrophagen mit MCMV die Transkription durch einen LPS-Stimulus bei den Chemokinen MIP-1 α und MIP-1 β und verringerte die RANTES-Transkripte deutlich (ca. 10-fache Verringerung).

Diese Blockade der Transkription war außerdem von einem replikationsfähigen Virus abhängig, wie die Transkriptionsinduktion in den Makrophagen, die mit UV-inaktivierten MCMV inkubiert und mit LPS stimuliert wurden, zeigt.

3.3.4 MCMV reguliert die Expression des Toll-like Rezeptors 4/ MD-2 Komplexes herab.

Wie die bisherigen Ergebnisse zeigen, gelang es nicht mehr, MCMV-infizierte Makrophagen mit LPS oder anderen TLR-Agonisten zu aktivieren, beziehungsweise zur Produktion von diversen Zytokinen und Chemokinen anzuregen. Zusätzlich zeigt die Abbildung 3.19, dass im Fall der Chemokine der Effekt durch eine Blockade der Transkription zurückzuführen ist.

Da der Signalweg, der zur Produktion der Chemokine nach einer LPS-Stimulation führt, durch die Bindung von LPS an CD14 und danach an TLR4/ MD2 angeregt wird, wurde im Folgenden die Expression der Rezeptoren TLR4 und CD14 in MCMV-infizierten Makrophagen untersucht. Hierzu wurden jeweils 1×10^6 BMM *in vitro* unbehandelt, 24 h mit MCMV-GFP infiziert oder 5 h mit LPS stimuliert. Anschließend wurde die CD14-Expression auf der Oberfläche der vitalen Zellen durchflusszytometrisch ermittelt.

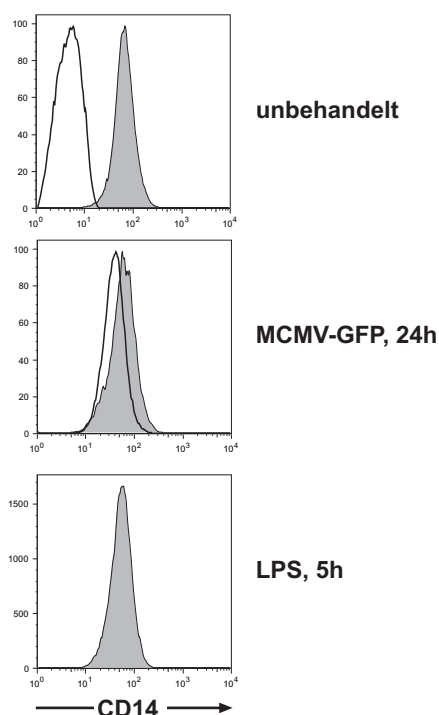


Abb. 3.20: Durchflusszytometrische Messung von CD14 auf der Oberfläche von BMM. Je 1×10^6 BMM wurden *in vitro* mit LPS (5 h) stimuliert oder mit MCMV-GFP (24 h, $moi = 0,02$) infiziert; „unbehandelt“: schwarz = ungefärbt (geom.M.: 4,4), grau = CD14-Expression (geom.M.: 66,2) „MCMV-GFP“: schwarz = infizierte Zellen (geom.M.: 37,7), grau = uninfizierte Zellen (geom. M.: 56,2), „LPS“: grau = LPS-stimulierte Zellen (geom. M.: 53,1) Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität des fluorochrom-gekoppelten CD14 Antikörpers.

Die Infektion von BMM führte zu einer geringen Reduktion der Oberflächenexpression von CD14 (geometrisches Mittel der infizierten Zellen: 37,7 und der uninfizierten Zellen: 56,2). Das gilt auch für die Einwirkung von LPS, für dessen Erkennung CD14 ein Rezeptor ist und offensichtlich nicht nach der Bindung an den LPS-LBP Komplex und der Bindung an TLR4 und MD-2 endozytotisch aufgenommen wurde.

Der nächste Schritt der LPS-Erkennung durch die Makrophagen ist die Bindung an den TLR4/MD2-Rezeptorkomplex. Zur Untersuchung der TLR/MD2-Expression wurden ca. 50% 1×10^6 BMM *in vitro* mit MCMV-GFP (*moi* = 0,02, 24 h) infiziert und durchflusszytometrisch analysiert.

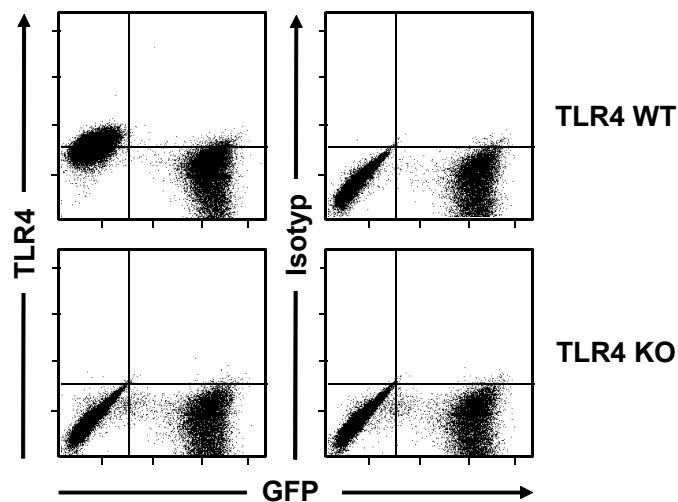


Abb. 3.21: TLR4 Expression auf MCMV infizierten und uninfizierten BMM. Dargestellt ist eine durchflusszytometrische Messung der Oberflächenexpression von TLR4/MD2 auf ruhenden BMM (WT) und TLR4-defizienten BMM (KO) bei Infektion mit einem GFP exprimierenden MCMV. Das geometrische Mittel des TLR4-Signals betrug 8,61 und das der MCMV-infizierten Zellen 4,36. Des Weiteren ist als Kontrolle der spezifischen Detektion von TLR4 durch den TLR4-Antikörper ein Antikörperisotyp verwendet worden.

Da das Expressionslevel von TLR4/MD2 auf Makrophagen bekanntermaßen sehr niedrig ist, wurde das Experiment zur Detektion der TLR4/MD2-Oberflächenexpression sorgfältig kontrolliert: um die Spezifität der TLR4/MD2-Färbung zu dokumentieren, wurden parallel BMM aus TLR4-defizienten Tieren gefärbt sowie durchflusszytometrische Färbungen mit einem Antikörperisotyp auf TLR4-Wildtyp- und TLR4-defizienten Tieren durchgeführt. Die Abbildung 3.21 zeigt, dass in uninfizierten (GFP^-) Zellen ein spezifisches TLR4/MD2-Signal detektiert werden konnte, welches in MCMV-infizierten (GFP^+) Zellen fehlte. Das bedeutet, dass TLR4/MD2 innerhalb der 24 h Infektion mit MCMV herabreguliert wurde.

Um das Ergebnis mit einer unabhängigen Methode zu verifizieren, wurde eine konfokale Laserscanmikroskopie (cLSM) von MCMV-infizierten und uninfizierten BMM nach der Färbung von TLR4/MD2 durchgeführt.

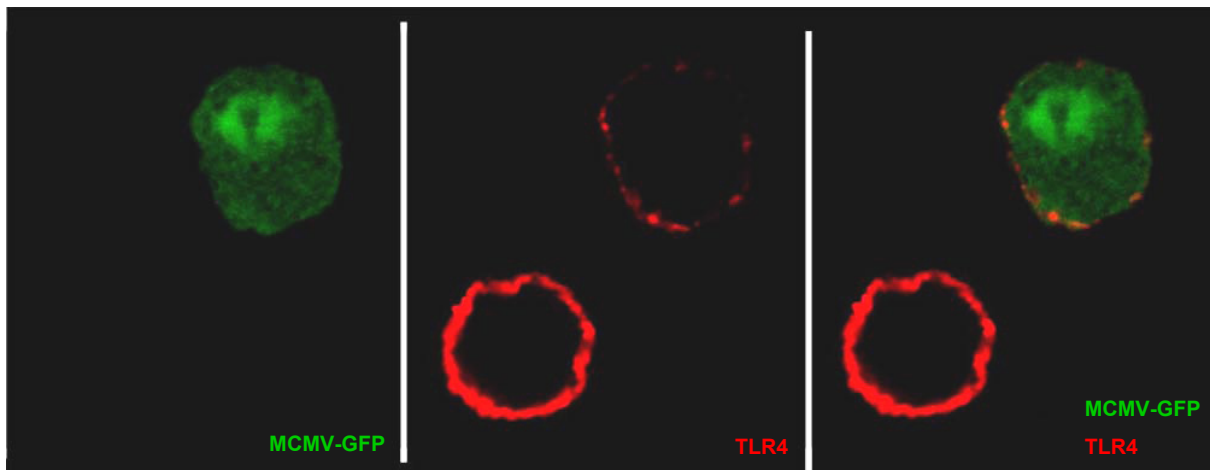


Abb. 3.22: Darstellung der TLR4 Expression bei der Infektion mit MCMV-GFP. BMM wurden so 24 h mit MCMV-GFP infiziert, dass ca. 50% aller Zellen infiziert waren (GFP^+ , grün, $\text{moi} = 0,02$) anschließend wurden die Zellen einem TLR4-spezifischen Biotin-gekoppelten Antikörper inkubiert, welcher nachfolgend durch Streptavidin-HRP und Tyramid-Alexa555 (rot) nachgewiesen wurde.

In Abbildung 3.22 wird deutlich, dass auf MCMV-infizierten Zellen kein TLR4/ MD-2 mehr exprimiert wurde. So wurde auf uninfizierten Zellen (GFP^-) der TLR4/MD2-Komplex hell und auf den MCMV-infizierten (GFP^+) Zellen außerordentlich schwach exprimiert. Damit konnte eindeutig gezeigt werden, dass der TLR4/MD2-Komplex durch die MCMV-Infektion auf der Oberfläche herabreguliert wird.

Eine analog zu den Experimenten in Abbildung 3.21 durchgeführte Färbung von TLR4/MD2 auf PEC ergab ein identisches Bild: in MCMV-infizierten PEC wird der TLR4/MD2-Komplex von der Oberfläche herunterreguliert (s. Abbildung 3.21). Hierzu wurden 1×10^6 PEC *in vitro* mit MCMV-GFP infiziert ($\text{moi} = 0,02$) und die TLR4/MD2-Expression durchflusszytometrisch gemessen.

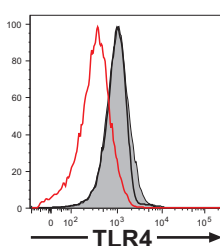


Abb. 3.23: TLR4/MD2 Herabregulation in PEC durch MCMV. Ca. 50 % $\text{F4/80}^+/\text{CD11b}^+$ Makrophagen wurden mit MCMV-GFP ($\text{moi} = 0,02$, 24 h) infiziert und die Oberflächenexpression von TLR4/MD2 durchflusszytometrisch gemessen. (grau) = unbehandelte Zellen, (schwarz) = uninfizierte Zellen, (rot) = TLR4/MD2-Expression der MCMV-infizierten Zellen

Wie in den Knochenmarksmakrophagen führte also auch die Infektion von F4/80+/CD11b+ Makrophagen in den Peritonealen Exsudatzellen zu einer Herabregulation der TLR4/ MD-2 Expression.

3.3.4.1 Der Einfluss der Stimulation durch TLR-Agonisten auf die TLR4-Expression

Um die Bedeutung der Herabregulation von TLR4/MD2 durch MCMV in einem größeren Kontext insbesondere im Hinblick auf die Spezifität des Effekts einordnen zu können, wurde untersucht, inwieweit die TLR4/MD2-Expression nach der Stimulation mit TLR-Agonisten reguliert wird. Es war hier bereits bekannt, dass die Stimulation von Makrophagen mit LPS zu einer transienten Herabregulation des TLR4/MD-2-Komplexes und damit zu einer vorübergehenden LPS-Resistenz (*LPS hyporesponsiveness*) führt [208].

Außerdem gibt es im Feld der TLR-Rezeptoren Hinweise auf eine Trans-Regulation der TLR-Rezeptoren untereinander, das heißt, dass die Stimulation des einen TLR die Expression eines anderen TLR herabregulieren kann [209], [210]. Für MCMV ist insbesondere bekannt, dass TLR3 und TLR9 eine Rolle bei der Viruserkennung spielen. Nach dem Eintritt von MCMV in die Zelle wird über den TLR9 die virale (unmethylierte) DNA und vermutlich auch über den TLR3 virale RNA (deren Strukturmotiv noch unbekannt ist) erkannt, was zu einer Aktivierung der infizierten Zelle führt [35], [109].

Zusätzlich könnte es einen Zusammenhang zwischen MCMV und den TLR2 geben, da die Anwesenheit von humanen CMV von den Zellen durch den humanen TLR2 und möglicherweise CD14 durch die Erkennung der viralen Hüllglykoproteine H und B detektiert wird [16], [211]. Es ist daher nicht auszuschließen, dass das auch für die Detektion von MCMV gilt.

Die mögliche Herabregulation des TLR4 in Makrophagen durch die Stimulation von TLR2 und TLR9 oder TLR3 durch virale Produkte lässt sich *in vitro* durch TLR-Agonisten nachstellen. Hierzu wurden jeweils 1×10^6 BMM mit dem TLR9-Agonisten CpG, mit LPS und UV-inaktiviertem MCMV (UV-MCMV) sowie mit einer Kombination aus CpG und UV-MCMV jeweils 5 h, 24 h und 48 h stimuliert. Parallel dazu wurden 1×10^6 BMM mit MCMV-GFP (*moi* = 0,02) infiziert. Von allen Ansätzen wurde durchflusszytometrisch die Expression von TLR4/MD2 überprüft (Abbildung 3.24)

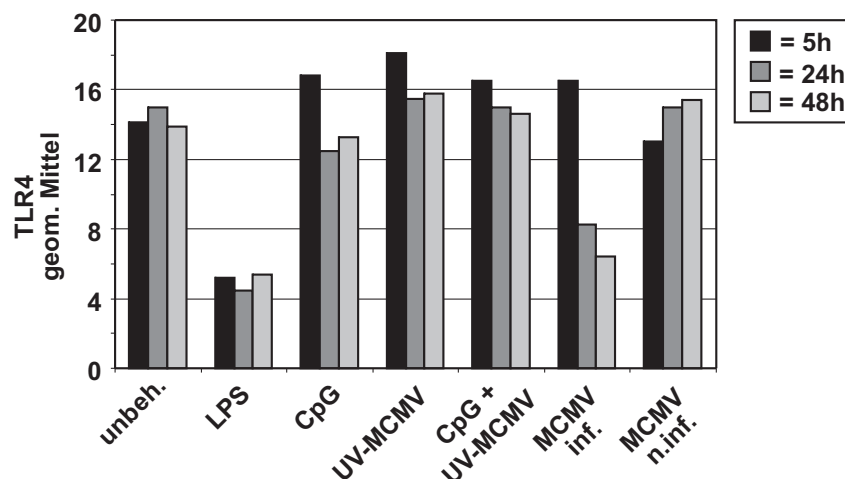


Abb. 3.24: Einfluss der Stimulation durch Viruspartikel und CpG (TLR9) auf die Expression von TLR4/MD2. BMM wurden mit LPS, UV-MCMV und/ oder dem TLR9-Agonisten CpG stimuliert und die Expression des TLR4/MD2 nach 5, 24 und 48 Stunden auf der Oberfläche verfolgt. Als Vergleich diente die Infektion mit MCMV-GFP ($moi = 0,02$), wobei hier zwischen der TLR4/MD2-Expression auf infizierten und uninfizierten Zellen unterschieden werden kann. Aufgetragen ist das geometrische Mittel der Fluoreszenzintensität bei der durchflusszytometrischen Messung des TLR4/MD2. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von 3.

In Abbildung 3.24 wird deutlich, dass bei einer Stimulation mit LPS bereits nach 5 h die TLR4/MD2-Expression an der Oberfläche verschwunden war. Die MCMV-Infektion bewirkte in den infizierten Zellen eine Herabregulation von TLR/MD2 nach 24 Stunden. Weder die uninfizierten Zellen noch die Zellen, die mit CpG als TLR9-Agonist und/ oder UV-MCMV behandelt worden sind, zeigten eine deutliche Veränderung in der TLR4/MD2-Expression. Ähnliche Daten wurden für die gleichzeitige Stimulation von BMM mit UV-MCMV und PolyI:C als TLR3-Agonist bzw. für UV-MCMV und Peptidoglykan (PGN) als TLR2-Agonist erhalten (Daten nicht gezeigt). Daher ist die MCMV-induzierte Reduktion der TLR4/MD2-Expression vermutlich nicht auf die multiple Stimulation der TLR2, TLR3 und TLR9 zurückzuführen. Es gibt also keinen Hinweis auf eine Transregulation der TLR-Rezeptoren.

Die Bindung von LPS an TLR4 führt zu einer Herabregulation des Rezeptors durch dessen Endozytose [61], [39]. Der fehlende TLR4 an der Zelloberfläche wird nicht unmittelbar ersetzt, was nicht zuletzt zur Vermeidung einer destruktiven Überreaktion im Organismus und zu einer transienten Desensibilisierung der Zelle gegenüber nachfolgenden LPS-Stimuli führt.

Dabei wird der betroffene Signalweg auch durch zahlreiche Rückkopplungen negativ reguliert [53], was sich vor allem auf die Expression von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen auswirkt [212]. Die Desensibilisierung der Makrophagen hinsichtlich einer LPS-Stimulation lässt sich durch die Expression von TLR4 auf der Zelloberfläche verfolgen. Um die TLR4-Oberflächenexpression unter dem Einfluss von LPS und MCMV vergleichend zu analysieren, wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach der LPS-Stimulation und/ oder MCMV-Infektion die TLR4/MD2-Expression an der Oberfläche von BMM durchflusszytometrisch bestimmt. Außerdem wurde in parallelen Ansätzen das LPS nach einer 5 h-Inkubation durch Spülen entfernt (Abbildung 3.25).

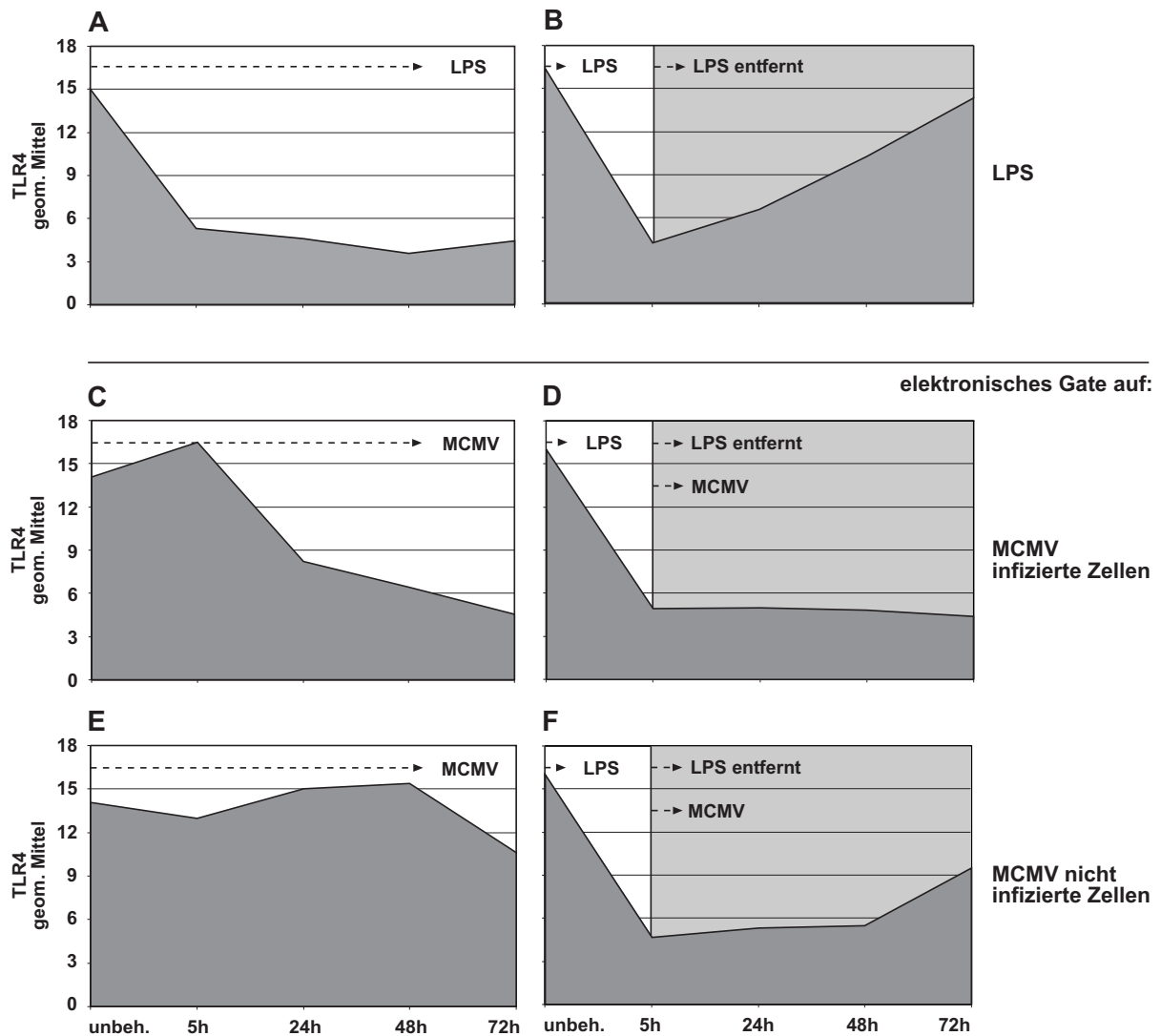


Abb. 3.25: TLR4-Oberflächenexpression unter dem Einfluss von LPS und MCMV. Die Oberflächenexpression von TLR4 auf BMM wurde durchflusszytometrisch gemessen. Aufgetragen ist das geometrische Mittel der Fluoreszenzintensität gegen die Zeit. **(A):** TLR4-Expression auf BMM, die zum Zeitpunkt 0 mit LPS stimuliert wurden und mit LPS im Medium inkubiert wurden. **(B):** TLR4-Expression auf BMM, die 5 h mit LPS stimuliert worden sind, anschließend wurde das verbliebene LPS im Überstand entfernt. **(C-F):** für diese Darstellung wurden ca. 50% der BMM mit MCMV-GFP infiziert ($moi = 0,02$), wobei bei C und D die infizierten Zellen und bei E und F die uninfizierten Zellen elektronisch voneinander abgegrenzt wurden (*Gate*) **(C):** TLR4-Expression auf MCMV-infizierten BMM. **(D):** TLR4-Expression auf MCMV-infizierten, LPS-stimulierten BMM. Die Zellen wurden 5 Stunden mit LPS stimuliert, nachfolgend wurde das LPS aus dem Überstand (wie B) entfernt und die Zellen infiziert, gezeigt sind nur die infizierten Zellen. **(E):** TLR4-Expression auf den uninfizierten Zellen (neben den infizierten Zellen im System). **(F):** TLR4-Expression auf uninfizierten, LPS-stimulierten BMM. Die Zellen wurden 5 Stunden mit LPS stimuliert, nachfolgend wurde das LPS aus dem Überstand (wie B) entfernt und die Zellen infiziert, gezeigt sind nur die uninfizierten Zellen (vgl. D).

Wie in Abbildung 3.25A deutlich wird, war TLR4/MD2 nach 5 h-Inkubation mit LPS von der Zelloberfläche verschwunden.

Wurde LPS wieder entfernt (Abb. 3.25B), wurde TLR4/MD2 zwischen 24 und 48 Stunden nach einem Kontakt mit LPS wieder an der Oberfläche exprimiert.

In dem Zeitraum davor ist die Zelle gegenüber einer LPS-Stimulation daher desensibilisiert. Im Gegensatz dazu stand die Herabregulation des TLR4/MD2 durch die Infektion mit MCMV (Abb. 3.25C). Das vollständige, mit der LPS-Stimulation vergleichbare Verschwinden des TLR4/MD2 von der Zelloberfläche der infizierten BMM benötigte 24 Stunden. Das heisst, dass die Kinetik der viralen Herabregulation des TLR4/MD2-Komplexes deutlich langsamer als die Agonist-induzierte war. In LPS-aktivierten BMM (Abb. 3.25D), die dadurch keinen TLR4/MD2 mehr an der Oberfläche exprimieren und die nach dem Entfernen des LPS mit MCMV infiziert wurden, fand über 72 Stunden keine Oberflächenexpression des TLR4/MD2 mehr statt. Uninfizierte BMM (Abb. 3.25E), die in einer Kokultur mit infizierten Zellen vorlagen, exprimieren weiterhin nahezu unverändert wie unbehandelte Zellen an ihrer Oberfläche TLR4/MD2. Uninfizierte, aber zuvor 5 Stunden mit LPS-stimulierte Zellen (Abb. 3.25F), aus deren Überstand LPS entfernt wurde, zeigten einen zeitlich etwas verzögerte Wiederkehr des TLR4/MD2 an die Zelloberfläche (vgl. Abb. 3.25B).

Im Folgenden sollte untersucht werden, auf welcher Ebene die Regulation des TLR4 auf der Oberfläche erfolgte. Zunächst wurde überprüft, ob die Transkription des TLR4-Gens durch eine MCMV-Infektion beeinflusst wurde.

Die Transkription des TLR4-Gens lässt sich durch eine quantitative *real time* PCR (qRT-PCR) überprüfen. Zur Etablierung dieser PCR wurden Knochenmarksmakrophagen mit einer TLR4-Deletion (TLR4 KO) als Negativkontrolle verwendet. Hierzu wurden die BMM aus Wildtyp-Mäusen und TLR4-defizienten Mäusen folgendermaßen behandelt:

- a.) unbehandelt
- b.) mit LPS behandelt (5 h)
- c.) vollständig mit MCMV infiziert (29 h)
- d.) mit LPS stimuliert (5 h) und nachträglich vollständig mit MCMV infiziert (24 h)
- e.) vollständig mit MCMV infiziert (24 h) und nachträglich mit LPS stimuliert (5 h)

Zur vollständigen Infektion wurde eine *moi* von 0,2 verwendet. Nach der Behandlung der Zellen wurde anhand des *RNeasy Mini Kit* der Firma Qiagen die Gesamt-RNA der Zellen gewonnen.

Die Integrität der RNA wurde mit dem Bioanalyzer 2100 der Firma Agilent überprüft und die Konzentration der RNA wurde mit dem Nanodrop 1000 der Firma Thermo Fischer Scientific bestimmt.

Durch die Verwendung von Randomprimern und einer Reversen Transkriptase wurde die RNA in cDNA umgeschrieben. Mit einer TLR4-spezifischen Sonde und Primern beziehungsweise mit einer β -Aktin-spezifischen Sonde und Primern wurde durch eine quantitative *real time* PCR die Anzahl der TLR4-Transkripte beziehungsweise der β -Aktintranskripte bestimmt (Abbildung 3.26).

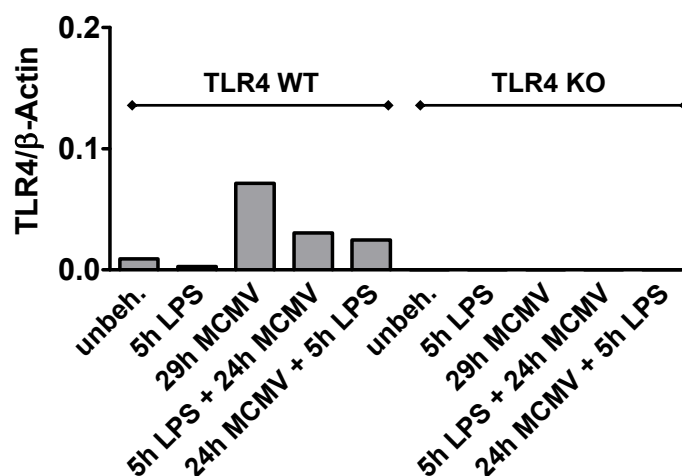


Abb. 3.26: Bestimmung der Anzahl der TLR4-Transkripte in BMM. Von unbehandelten, LPS-stimulierten (5 h), MCMV-infizierten (24 h), zuerst mit LPS stimulierten (5 h) und danach mit MCMV-infizierten (24 h), sowie MCMV-infizierten (24 h) und nachträglich mit LPS stimulierten (5 h) Wildtyp-BMM (TLR4 WT) und TLR4-defizienten BMM (TLR4 KO) wurde die gesamte RNA gewonnen, durch Primer mit zufälligen Sequenzen (Randomprimer) und einer Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Mit einer TLR4-spezifischen Sonde und Primern in einer quantitativen *real time* PCR wurde die Anzahl der TLR4-Transkripte bestimmt. Zur Normalisierung diente die Anzahl der β -Aktintranskripte, die im selben Ansatz gemessen wurden. Da die β -Aktin-Transkriptanzahl jeweils deutlich höher als die Anzahl der TLR4-Transkripte war, ist der Quotient TLR4/ β -Aktin kleiner 1.

Die schwache und konstitutive Expression des TLR4 wurde durch die Infektion mit MCMV nicht verringert. Die MCMV-Infektion hatte also keinen negativen Einfluss auf die TLR4-Transkription, das bedeutet, dass die TLR4-Herabregulation bei einer MCMV-Infektion auf der Ebene des Proteins erfolgt.

A.) Detektion des intrazellulären TLR4 durch Immunoblot und intrazelluläre Durchflusszytometrie

Das Ziel der folgenden Experimente war die Untersuchung des intrazellulären Verbleibs des TLR4-Proteins.

Als problematisch erwies sich, dass der zur spezifischen Oberflächenfärbung des nativen TLR4 verwendete monoklonale Antikörper MTS510 nicht das denaturierte/fixierte Molekül bei einer intrazellulären Durchflusszytometrie, konfokalen Analyse oder im Western Blot detektieren konnte (Daten nicht gezeigt).

Zur Untersuchung des weiteren Schicksals des TLR4 nach dessen Herabregulation durch MCMV standen verschiedene kommerzielle und teilweise in anderen Publikationen verwendete Antikörper zur Verfügung (siehe Material und Methoden). Diese Antikörper sollten nach Herstellerangaben den bei einer intrazellulären Durchflusszytometrie oder bei einer SDS-PAGE denaturierten TLR4 spezifisch detektieren. Nach unseren Analysen konnte keiner der getesteten Antikörper natives bzw. denaturiertes TLR4 spezifisch detektieren, denn Wildtypiere und TLR4-defiziente Tiere waren mit diesen Antikörpern (anders als bei der Verwendung des Antikörpers MTS510, der in Wildtypieren ein spezifisches Signal lieferte, das in TLR4-defizienten Tieren fehlte; Daten nicht gezeigt).

Zur Detektion des intrazellulären TLR4 wurden verschiedene Strategien verfolgt:

1. intrazelluläre Durchflusszytometrie
2. konfokale Mikroskopie von angefärbten, fixierten Zellen (mit verschiedenen Fixierungsstrategien)
3. SDS-PAGE/ Western Blot:
 - a.) unter verschiedenen Lysebedingungen: Triton-X, NP-40 mit und ohne Jodacetamid (zur Vermeidung nachträglich gebildeter Schwefelbrücken)
 - b.) native Gelelektrophoresen
 - c.) Probenaufbereitungen mit dem *MEM-Per Eukaryotic Membrane Protein Extraction Reagent Kit* der Firma Pierce

Keine der Publikationen, die vom Hersteller der Antikörper genannt wurden verwendeten TLR4-defiziente Zellen als Negativkontrolle [213], [214], arbeiteten nur mit TLR4-Transfektanten oder nutzten die Antikörper nicht als primäres Nachweisreagenz [215].

Die von Zager et al. dargestellte TLR4-Doppelbande ist zwar reproduzierbar, allerdings auch im Lysat der TLR4-defizienten Zellen und damit nicht spezifisch. Der polyklonale TLR4-Antikörper der Firma eBioscience (Kat. Nr.: #24-9004) färbte bei der Durchflusszytometrie Wildtyp-, TLR4-defiziente und TLR2-defiziente Zellen (Daten nicht gezeigt).

Aufgrund des Fehlens eines TLR4-spezifischen Antikörpers der das Molekül in fixierter Form binden konnte, war es im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, den intrazellulären Verbleib des TLR4-Proteins nach der Modulation durch MCMV aufzuklären.

B.) Detektion des TLR4 durch Transfektionen

Als alternative Methode zur Untersuchung des intrazellulären Verbleibs des TLR4 nach der Herabregulation durch MCMV wurde ein TLR4:YFP Fusionsprotein hergestellt. Die Transfektion von CHO-Zellen mit pMono-TLR4:YFP zeigte keine Oberflächenexpression bei der Untersuchung der Transfektanten durch die konfokale Mikroskopie. Erst die gleichzeitige Transfektion der Zellen mit pMono-TLR4:YFP und pDUO-mMD2, einem Vektor, der MD2 kodiert, zeigte eine Oberflächenexpression, welche auch durch eine durchflusszytometrische Messung verifiziert werden konnte (nicht gezeigt). Die MCMV-Infektion der CHO-Transfektanten führte allerdings innerhalb von 24 h nach Infektion zu einer vollständigen Lyse der Zellen und weder der Zustand der TLR4-Expression noch der Verbleib von TLR4 konnten sicher überprüft werden.

Stabil mit dem kommerziellen Vektor pDUO-mTLR4/mMD2 transfizierte 3T3-Zellen zeigten eine Oberflächenexpression von TLR4 und waren ebenfalls mit MCMV infizierbar. Allerdings konnte weder bei diesen Zellen, noch bei kommerziellen, stabil mit TLR4, MD2 und CD14 transfizierten HEK293-Zellen eine Herabregulation durch MCMV gezeigt werden, anhand derer das intrazelluläre Schicksal des TLR4-Proteins im Rahmen der MCMV-Infektion hätte verfolgt werden können.

3.3.5 Analyse von Oberflächenrezeptoren auf MCMV-infizierten BMM im Vergleich zu TLR4

3.3.5.1 MCMV reguliert die Expression von TLR2 herab

Im Folgendem wurde untersucht, ob andere Oberflächen-TLR durch MCMV reguliert werden. In Abbildung 3.18 ist zu erkennen, dass es neben der Stimulation der Makrophagen über den TLR4 mit LPS auch nicht mehr möglich war, MCMV-infizierte Zellen über andere TLR Agonisten zu stimulieren. Nachdem in den Abbildungen 3.21, 3.22 und 3.25 gezeigt werden konnte, dass der Grund für die ausbleibende Aktivierung durch LPS die Herabregulation des TLR4 gewesen war, wurde die Expression eines weiteren TLR untersucht. Zurzeit zugänglich sind kommerzielle Antikörper gegen TLR2, der daher bei einer MCMV-Infektion untersucht wurde.

Hierzu wurden BMM aus Wildtyp-Mäusen und BMM aus TLR2-defizienten Mäusen zu je 1×10^6 Zellen *in vitro* mit MCMV-GFP (24 h, *moi* = 0,02) infiziert und die TLR2-Expression zwischen den infizierten und uninfizierten Zellen der Kokultur durchflusszytometrisch verglichen.

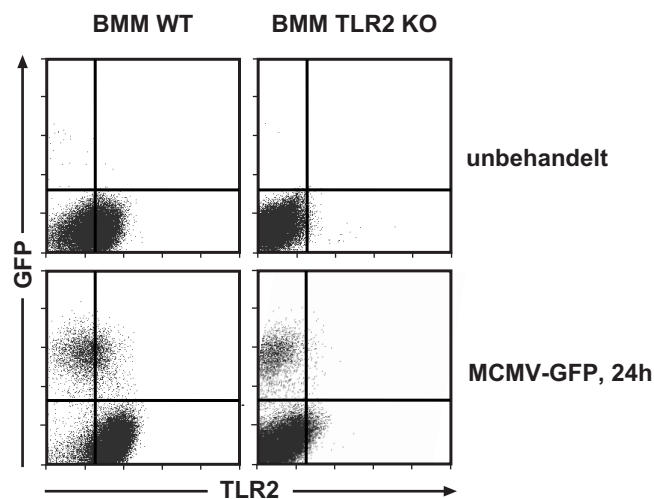


Abb. 3.27: TLR2 Herabregulation in BMM durch MCMV. Durchflusszytometrische Messung der TLR2-Expression an der Oberfläche von Wildtyp (WT)- und TLR2-defizienten (TLR2 KO)-BMM, die entweder unbehandelt oder zu ca. 50% mit MCMV-GFP infiziert (24 h, *moi* = 0,02) waren.

Wie in der Abbildung 3.27 zu erkennen ist, führt die Infektion mit MCMV in den BMM zu einer Herabregulation des TLR2. Diese Situation ist analog zu TLR4.

Zusätzlich wurde in der Kultur in der infizierte neben uninfizierten Zellen vorlagen, in den uninfizierten Zellen die TLR2-Expression erhöht. Auf den TLR2-defizienten BMM war keine TLR2-Expression messbar.

3.3.5.2 Die MCMV-Infektion erhöht die Expression von MHCI in den uninfizierten BMM

In den folgenden Experimenten wurde die Expression anderer immunologisch relevanter Oberflächenmarker der BMM bei einer MCMV-Infektion untersucht.

Einer der wichtigsten Schritte für eine erfolgreiche Abwehr von viralen Infektionen ist die Präsentation von viralen Peptiden auf der Zelloberfläche durch den MHCI (Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse 1, H2K^d in C57BL/6-Mäusen).

Diese Antigenpräsentation ist neben der Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen notwendig, um eine Immunantwort zu induzieren und die angeborene Immunantwort mit der adaptiven zu verschalten.

Durch die Erkennung von Fremdpeptiden, die über den MHCI der betroffenen Zellen präsentiert werden, werden antigenspezifische CD8⁺ T-Zellen aktiviert, die daraufhin proliferieren und sich zu zytotoxischen T-Zellen differenzieren, die infizierte Zellen eliminieren.

Wie in Abbildung 3.2 dargestellt wurde, exprimieren unbehandelte Knochenmarksmakrophagen MHCI. Zur Untersuchung der MHCI-Expression von BMM bei einer MCMV-Infektion wurden je 1×10^6 BMM *in vitro* mit MCMV (*moi* = 0,02) infiziert. Jeweils 5 h beziehungsweise 24 h nach der Infektion wurde die MHCI-Expression zwischen den infizierten und unbehandelten Zellen durchflusszytometrisch gemessen und verglichen.

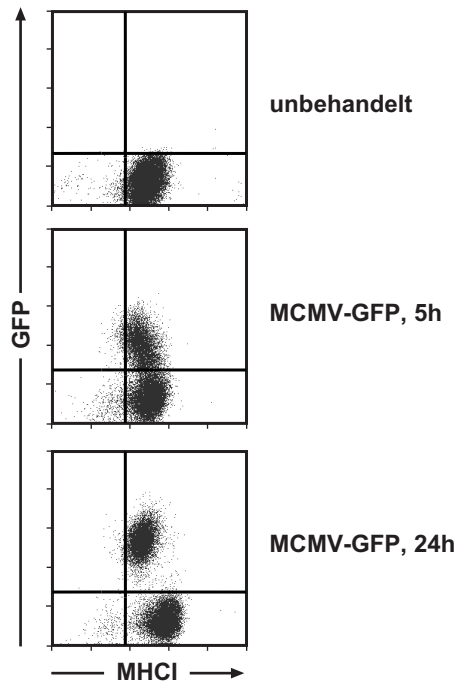


Abb. 3.28: Expression von MHC I auf BMM. Die Expression von MHC I wurde auf unbehandelten bzw. mit MCMV-GFP ($moi = 0,02$) 5 h oder 24 h infizierten und uninfizierten Zellen durchflusszytometrisch gemessen.

Im Gegensatz zu den Toll-like Rezeptoren 2 und 4 ist die MHC I-Expression durch MCMV nicht beeinträchtigt. Zusätzlich kommt es wie bei TLR2 zu einer vermutlich parakrin verursachten Erhöhung der MHC I-Expression in den uninfizierten BMM.

3.3.5.3 Einfluss der MCMV-Infektion auf die Expression weiterer immunologisch relevanter Rezeptoren

In weiteren Experimenten wurden andere, ebenfalls immunologisch relevante Oberflächenmarker der Knochenmarksmakrophagen untersucht. Hierzu wurden jeweils 1×10^6 BMM *in vitro* mit MCMV-GFP infiziert (24 h, $moi = 0,02$) und die Expression der Oberflächenmarker durchflusszytometrisch zwischen den infizierten und uninfizierten Zellen in einer Kokultur sowie den ruhenden (unbehandelten) verglichen. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in der folgenden Tabelle 3.1 zusammengefasst.

Tabelle 3.1: Expression von Oberflächenrezeptoren. Zusammenfassung der Ergebnisse der durchflusszytometrischen Bestimmung der Expression verschiedener Oberflächenrezeptoren.

| Rezeptor | Rezeptorfunktion in Makrophagen | unbeh. BMM | Zellen in einer Kokultur: | |
|----------|---|------------|---------------------------|------------------|
| | | | MCMV-infizierte BMM | uninfizierte BMM |
| CD29 | Integrin beta 1 (Phagosomenreifung) | ++ | – | n.g. |
| CD40 | Kostimulator (CD8 T-Zellantwort) | – | – | – |
| CD80 | Kostimulator (B7.1) | +/- | – | + |
| CD86 | Kostimulator (B7.2) | +/- | – | + |
| CD95 | Fas Rezeptor (Apoptose, Induktion proinflammatorischer Chemokine) | – | – | +/- |
| CD115 | M-CSF Rezeptor (Regulation der Proliferation, Differenzierung und Funktion von Makrophagen) | ++ | – | – |
| IL-10R | IL-10 Rezeptor (Hemmung von Makrophagen) | +/- | +/- | +/- |

Bewertung der Detektion/ Fluoreszenz: „–“ = keine, „+/-“ = schwach, „+“ = deutlich, „++“ = stark, „n.g.“ = nicht gemessen.

Die in Tabelle 3.1 dargestellten, durch unbehandelte Makrophagen exprimierten Rezeptoren CD29 und CD115 wurden durch MCMV herabreguliert. CD115 wurde gleichzeitig auch in den uninfizierten Zellen herabreguliert. Die Anwesenheit von infizierten Makrophagen stimulierte die Expression der Kostimulatoren CD80 und CD86 auf den uninfizierten Makrophagen. CD40 wurde nicht exprimiert und der IL-10R nur schwach und beide waren jeweils unbeeinflusst von der MCMV-Infektion.

3.3.6 Analyse weiterer Funktionen von Makrophagen bei einer MCMV-Infektion

3.3.6.1 MCMV unterbindet die Induktion der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) in BMM

Die Aktivierung von Makrophagen kann zur Bildung von Stickstoffmonoxid führen, dass durch die induzierbare NO-Synthase (iNOS bzw. NOS2) aus der Aminosäure L-Arginin gebildet wird. NO ist wie sein Folgeprodukt Peroxynitrit ein freies Radikal und wirkt dadurch als tumorizides und antimikrobielles Molekül, hat aber offenbar auch eine wichtige Funktion bei der Elimination einer MCMV Infektion, da eine iNOS-Defizienz eine erhöhte Viruslast im Wirt verursacht [216], [217]. Als Maß für die antimikrobielle Aktivität durch die Produktion von NO wird allgemein die Produktion von iNOS gemessen [218].

Im nachstehenden Experiment wurde der Einfluss einer MCMV-Infektion auf BMM untersucht, indem jeweils 1×10^6 BMM folgendermaßen behandelt wurden:

- a.) unbehandelt
- b.) mit LPS stimuliert (2 $\mu\text{g/ml}$, 24 h)
- c.) mit IFN- γ stimuliert (100 U/ml, 24 h)
- d.) mit LPS und IFN- γ stimuliert (24 h)
- e.) mit LPS und IFN- γ stimuliert (48 h)
- f.) mit MCMV zu ca. 50 % infiziert (*moi* = 0,02, 48 h)
- g.) mit MCMV zu ca. 50 % infiziert (24 h) und nachträglich mit IFN- γ und LPS stimuliert (24 h)
- h.) mit LPS und IFN- γ stimuliert (24 h) und nachträglich mit MCMV zu ca. 50 % infiziert (24 h)

Da der Antikörper, der spezifisch iNOS erkennt, bereits an FITC gekoppelt war, war es notwendig, MCMV-infizierte Zellen mit einem Antikörper gegen das virale Protein pp89 zu detektieren. Dieser Antikörper (Croma101) wurde mit einem sekundären an Cy5 gekoppelten Antikörper detektiert und in einer intrazellulären Durchflusszytometrie gemessen. Für diese Experimente wurde ein MCMV-Stamm verwendet, der nicht für GFP kodiert.

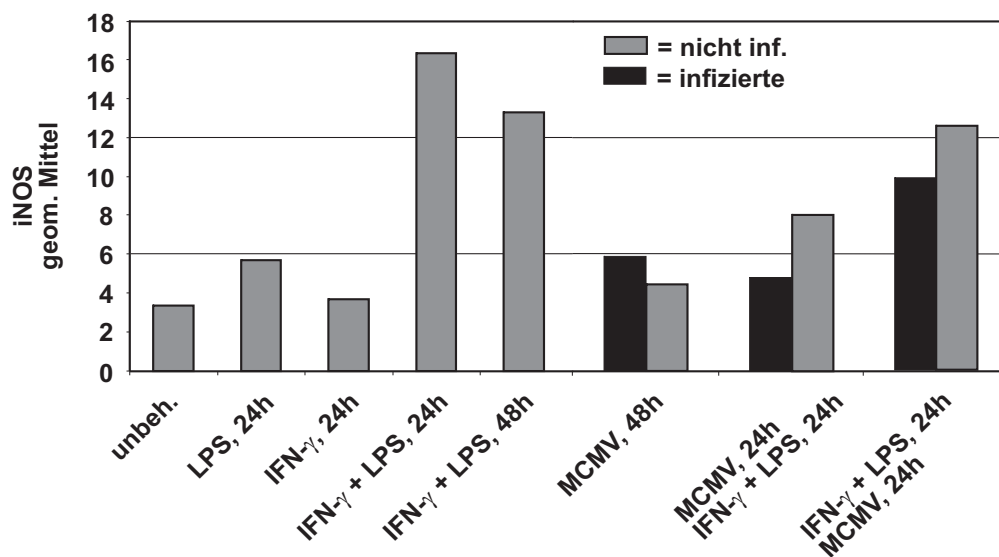


Abb. 3.29: Einfluss der MCMV-Infektion auf die Bildung von iNOS in BMM. Dargestellt ist das geometrische Mittel der Fluoreszenzintensität des iNOS spezifischen Antikörpers (α iNOS-FITC). Jeweils 1×10^6 BMM wurden mit LPS (2 μ g/ml), IFN- γ (100 U/ml) oder mit LPS und IFN- γ stimuliert und die iNOS-Expression intrazellulär durchflusszytometrisch gemessen. In parallelen Ansätzen wurden je ca. 50 % 1×10^6 BMM mit MCMV infiziert ($moi = 0,02$, 48 h) oder 24 h infiziert und nachträglich mit LPS und IFN- γ (24 h) stimuliert bzw. mit LPS und IFN- γ stimuliert (24 h) und nachträglich mit MCMV infiziert (24 h) und die iNOS-Expression sowie das virale Protein pp89 intrazellulär durchflusszytometrisch bestimmt. Die Identifikation der infizierten Zellen durch das virale Protein ermöglichte die elektronische Trennung der infizierten von den uninfizierten Zellen. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von zwei.

Knochenmarksmakrophagen (BMM) sind ruhende Makrophagen, für die eine Stimulation mit LPS hinreichend ist, um sie zur Chemokinproduktion zu aktivieren [10]. Zur Produktion von iNOS und der damit verbundenen Produktion von NO war allerdings wie in Abbildung 3.29 deutlich wird, ein zweiter Stimulus wie zum Beispiel IFN- γ , notwendig.

Unbehandelte BMM produzierten ebenso wie BMM, die mit LPS oder IFN- γ stimuliert wurden kein iNOS. Wurden die Zellen für 24 h gleichzeitig durch LPS und IFN- γ stimuliert, erfolgte eine deutliche iNOS-Expression, die sich nach 48 h Stimulation abschwächte. Die Infektion mit MCMV bewirkte weder in den infizierten noch in den uninfizierten Zellen einer Kokultur die Expression von iNOS. Im Gegensatz dazu exprimierten 24 h mit MCMV infizierte BMM nach einer 24 h Stimulation mit LPS und IFN- γ kein iNOS, das heißt eine MCMV-Infektion unterbindet die Induktion von iNOS durch IFN- γ und LPS.

Die in der gleichen Kultur uninfizierten BMM wurden durch LPS und IFN- γ nur im geringen Maße zur Expression von iNOS stimuliert, die iNOS-Expression verringerte sich um ca. 50 % im Vergleich zu den Zellen, die lediglich mit LPS und IFN- γ für 24 h stimuliert worden waren. In BMM, die für 24 h mit LPS und IFN- γ stimuliert worden waren, verursachte die Infektion mit MCMV nach weiteren 24 h nur eine geringe Abschwächung der iNOS-Expression in den infizierten Zellen. Die uninfizierten Zellen in der gleichen Kultur exprimierten die gleiche Menge an iNOS wie die Zellen die für 48 h nur mit LPS und IFN- γ stimuliert worden waren.

3.3.6.2 MCMV verhindert die Phagozytose von Dextran in BMM

Eine der fundamentalsten Funktionen der Makrophagen im Organismus ist die Fähigkeit, Fremdstoffe zu phagozytieren. Diese Phagozytose ist rezeptorvermittelt, wobei pathogenassoziierte Strukturen (PAMPs) erkannt werden, über deren Erkennung die Phagozytose eingeleitet wird. Letztere führt zur Aktivierung der Makrophagen und zur Einleitung der adaptiven Immunantwort. Eine dieser Strukturen bilden Polysaccharide, die dem Wirtsorganismus fremd sind und die als pathogenassoziiert von den Makrophagen erkannt werden. Hierzu gehört das Polysaccharid Dextran, welches abhängig von der Größe des Polymers durch verschiedene Mannoserezeptoren der Makrophagen gebunden und phagozytiert wird [30]. Das 40 kDa große Dextran wird durch den Rezeptor SIGNR3 erkannt. Durch die Verwendung von Fluorescein (FITC)-gekoppeltem Dextran (Dextran-FITC) lässt sich eine erfolgreiche Phagozytose durchflusszytometrisch überprüfen.

Zur Untersuchung des Einfluss von MCMV auf die Fähigkeit der Makrophagen Dextran zu phagozytieren, wurden jeweils 1×10^6 BMM folgendermaßen *in vitro* behandelt:

- a.) unbehandelt
- b.) mit LPS (2 $\mu\text{g/ml}$) stimuliert (24 h)
- c.) mit LPS stimuliert (24 h) und nachträglich vollständig mit MCMV ($moi = 0,2$) infiziert (24 h)
- d.) mit Dextran-FITC (10 $\mu\text{g/ml}$) inkubiert (2 h)
- e.) mit LPS stimuliert (24 h) und nachträglich mit Dextran-FITC inkubiert (2 h)
- f.) mit LPS stimuliert (24 h), danach vollständig mit MCMV infiziert (24 h) und nachträglich mit Dextran-FITC inkubiert (2 h)

Diese Experimente wurden parallel bei 4°C und 37°C durchgeführt. Anschließend wurde jede Kultur in zwei Teile geteilt, wovon ein Teil sofort durchflusszytometrisch auf das Vorhandensein von Dextran-FITC überprüft wurde. Im anderen Teil wurde das virale Proteins pp89 intrazellulär gefärbt und anschließend wurde die Infektion durchflusszytometrisch überprüft. Die getrennte Messung von Dextran-FITC und dem intrazellulären viralen Protein war erforderlich, weil sich das Fluoreszenzsignal von Dextran-FITC als nicht fixierungsresistent erwies.

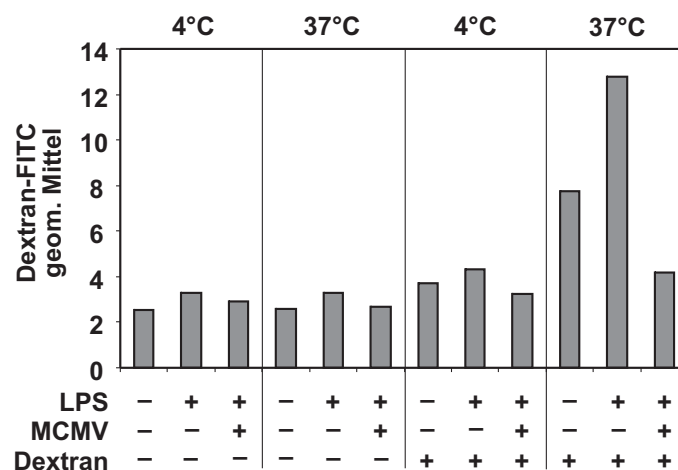


Abb. 3.30: MCMV blockiert die Phagozytose von Dextran-FITC in BMM. BMM wurden unbehandelt, LPS (2 µg/ml) stimuliert oder LPS stimuliert und vollständig mit MCMV (*moi* = 0,2) infiziert bei 4°C bzw. 37°C für 2 h mit Dextran-FITC (40 kDa, 10 µg/ml) inkubiert. Aufgetragen ist das geometrische Mittel der Fluoreszenzaktivität von FITC, bei einer durchflusszytometrischen Messung (gezeigt ist hier ein repräsentatives Experiment von drei).

Wie in der Abbildung 3.30 deutlich wird, fand unter keinen Bedingungen eine Phagozytose von Dextran-FITC bei 4°C statt. Bei der Inkubation der Zellen bei 37°C ohne Zugabe von Dextran-FITC war ebenfalls kein Signal messbar. Unbehandelte Zellen phagozytierten bei 37°C Dextran-FITC. Die Phagozytoseleistung erhöhte sich in den LPS-aktivierten BMM. Im Gegensatz dazu waren LPS-voraktivierte BMM, die anschließend vollständig (nicht gezeigt) mit MCMV infiziert wurden, nicht mehr in der Lage, Dextran-FITC zu phagozytieren.

3.3.7 Der Einfluss der MCMV Infektion auf die Funktionalität anderer Zellen

Zur Überprüfung der Abhängigkeit von der Zellspezies des beobachteten Einflusses von MCMV auf die LPS-abhängige Produktion der Chemokine MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES wurden verschiedene andere Zelltypen verwendet. Die murinen Zelllinien MHEC und SVEC sind immortalisierte Endothelzelllinien.

Hierzu wurden jeweils 5×10^5 Zellen folgendermaßen *in vitro* behandelt:

- a.) unbehandelt
- b.) mit LPS (2 $\mu\text{g/ml}$) stimuliert (5 h)
- c.) mit MCMV-GFP (*moi* = 0,02) zu ca. 50 % infiziert (24 h)
- d.) mit MCMV-GFP zu ca. 50 % infiziert (24 h) und nachfolgend mit LPS stimuliert (5 h)
- e.) mit LPS stimuliert (5 h) und nachträglich mit MCMV-GFP zu ca. 50 % infiziert (24 h)

Danach wurde durch eine intrazelluläre Färbung mit anschließender durchflusszytometrischer Messung die Produktion der Chemokine MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES bestimmt.

In der folgenden Abbildung 3.31 wird deutlich, dass die murinen Endothelzellen MHEC und SVEC weder durch einen LPS-Stimulus, noch bei einer Infektion mit MCMV MIP-1 β (sowie MIP-1 α , Daten nicht gezeigt) bildeten. Im Gegensatz dazu produzierten diese Zelllinien RANTES, sowohl nach LPS-Stimulation, als auch nach einer MCMV-Infektion. MCMV war hier nicht in der Lage, die RANTES-Produktion innerhalb der 24 h der Infektion zu unterbinden.

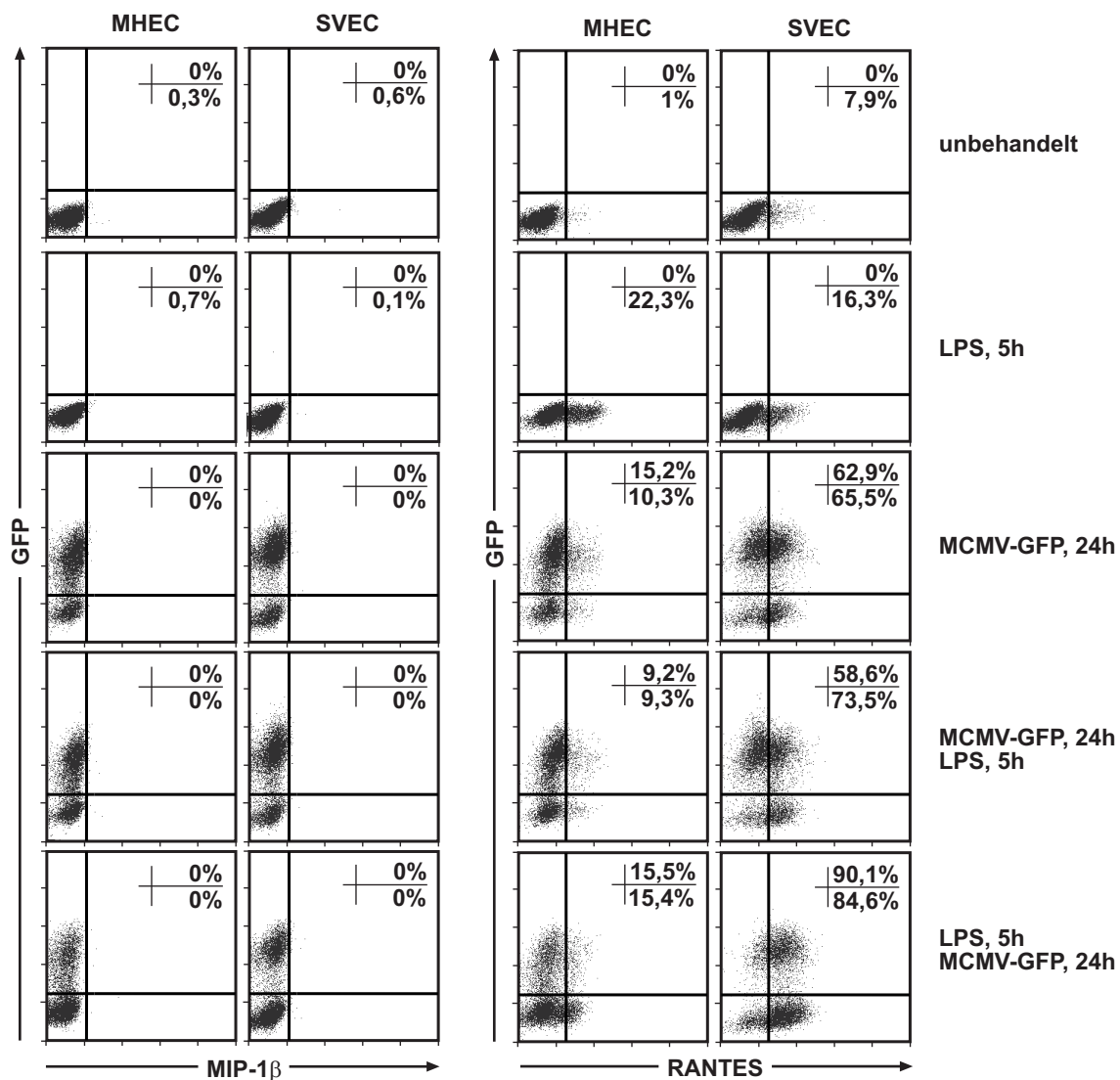


Abb. 3.31: MCMV beeinflusst nicht die LPS-induzierte Chemokinproduktion in den Endothelzelllinien MHEC und SVEC. Die Produktion von MIP-1 β und RANTES wurde in unbehandelten, mit LPS stimulierten, mit MCMV-GFP (*moi* = 0,02) infizierten, zuerst mit MCMV-GFP infizierten und nachträglich LPS stimulierten, sowie zuerst mit LPS stimulierten und nachträglich mit MCMV-GFP infizierten MHEC und SVEC durchflusszytometrisch gemessen.

Grundsätzlich scheint die Produktion der Chemokine in Endothelzellen anders reguliert zu sein als in Makrophagen. Die LPS-Stimulation verursachte keine Expression von MIP-1 α und MIP-1 β . Das Gleiche galt auch für verschiedene Kombinationen zwischen LPS und MCMV in infizierten und uninfizierten Zellen. Im Gegensatz dazu wurde RANTES durch die LPS-Stimulation produziert, allerdings weniger prominent als in Makrophagen. Außerdem wurde die RANTES-Produktion durch MCMV in den 24 h der Infektion in den infizierten nicht blockiert beziehungsweise herunterreguliert.

3.4 Die Suche nach dem viralen Gen, dass für die Blockade der Chemokinproduktion verantwortlich ist

3.4.1.1 Untersuchungen zur Abhängigkeit der Chemokinblockade von viralen Mechanismen

Die Expression der MCMV-Gene läuft in einer für Herpesviren charakteristischen Weise in mehreren Stufen ab: zunächst werden die *immediate-early-* (IE-) Gene durch die zelluläre RNA-Polymerase II transkribiert (unabhängig von einer Neusynthese von Proteinen). Der Übergang zur Expression der *early-* (E-) Gene hängt von der Transaktivierung der E-Gen-Promotoren durch ein IE-Protein ab. Die späte Phase mit der Expression der *late-* (L-) Gene ist durch das Einsetzen der viralen DNA-Synthese definiert [219]. Mit Hilfe von Inhibitoren der einzelnen Schritte sollte überprüft werden, ob die Blockade der Chemokinproduktion durch IE-, E- und/ oder L-Gene des Virus blockiert wird [220], [127].

Die Substanz Ganciclovir ist ein Analogon der Nukleinbase Guanin und ein Virostatikum, welches in der Behandlung und Bekämpfung von Infektionen mit Herpesviren eingesetzt wird. Die Inkubation mit Ganciclovir führt zur Hemmung der viralen DNA-Replikation in den MCMV-infizierten Zellen und damit zum Ausbleiben der Synthese der L-Gene. Im folgenden sollte untersucht werden, inwieweit die Blockade der Chemokinantwort von der viralen DNA-Replikation abhängt. Vor dem Einsatz von Ganciclovir war es notwendig, die optimale Wirkstoffkonzentration, die zum Stopp der DNA-Replikation und damit der Virusvermehrung führte, zu bestimmen. Hierzu wurden Knochenmarksmakrophagen unter dem Einfluss von 20 bis 80 μM Ganciclovir mit MCMV-GFP infiziert und 72 h nach der Infektion wurde der erhaltene virale Titer (in *plaque forming units*, pfu) bestimmt (Abbildung 3. 32A). Anschließend wurde die Chemokinproduktion nach einer LPS-Stimulation (5 h), bei einer MCMV-Infektion (24 h) und bei einer MCMV-Infektion (24 h) von zuvor LPS-stimulierten (5 h) BMM in An- und Abwesenheit von Ganciclovir untersucht (Abbildung 3. 32B).

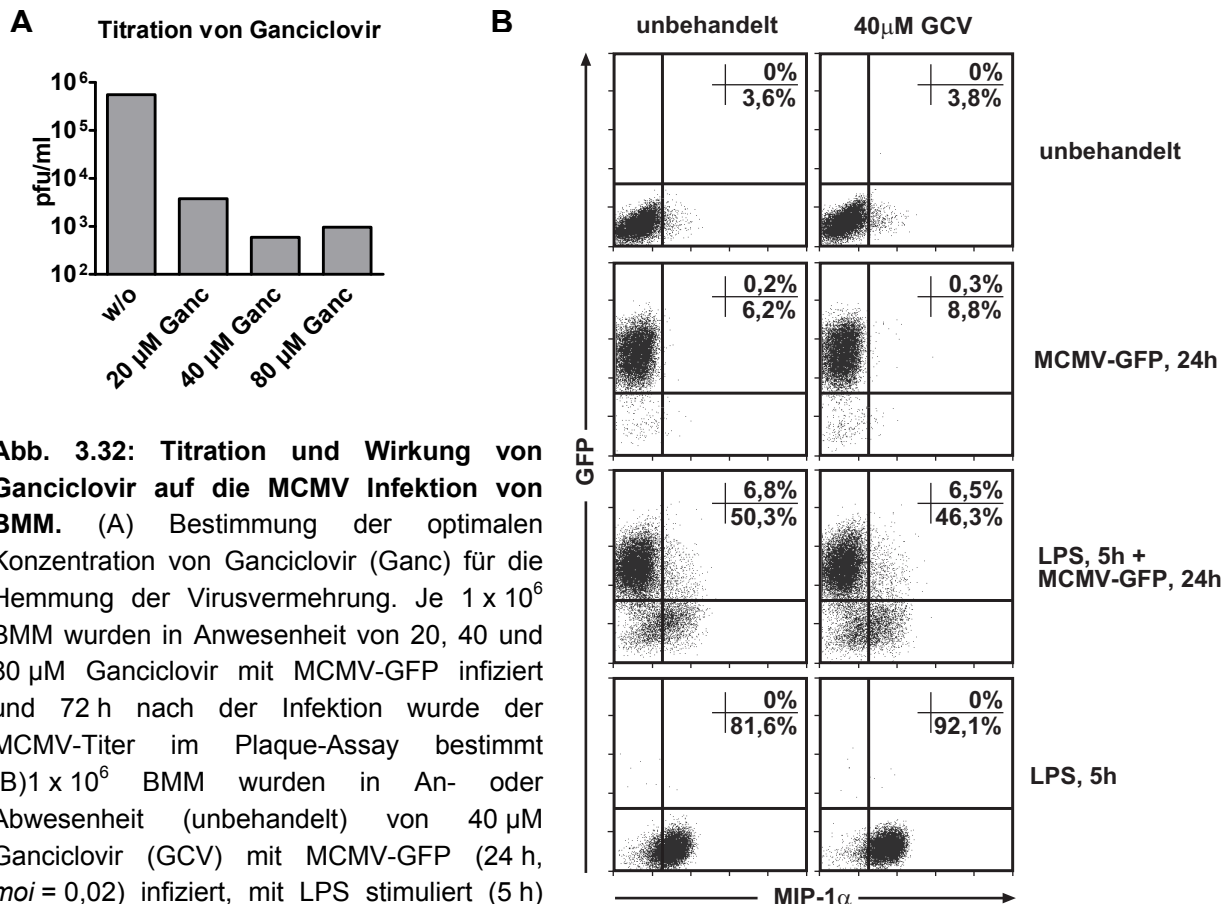


Abb. 3.32: Titration und Wirkung von Ganciclovir auf die MCMV Infektion von BMM. (A) Bestimmung der optimalen Konzentration von Ganciclovir (Ganc) für die Hemmung der Virusvermehrung. Je 1×10^6 BMM wurden in Anwesenheit von 20, 40 und 80 µM Ganciclovir mit MCMV-GFP infiziert und 72 h nach der Infektion wurde der MCMV-Titer im Plaque-Assay bestimmt (B) 1×10^6 BMM wurden in An- oder Abwesenheit (unbehandelt) von 40 µM Ganciclovir (GCV) mit MCMV-GFP (24 h, $moi = 0,02$) infiziert, mit LPS stimuliert (5 h) und nachfolgend mit MCMV-GFP infiziert oder nur mit LPS stimuliert (5 h). Die Produktion des Chemokins MIP-1α wurde durchflusszytometrisch bestimmt.

Die Titration von Ganciclovir ergab eine optimale Wirkstoffkonzentration von 40 µM Ganciclovir, bei der die geringste Virusreplikation 72 h nach Infektion mit MCMV von 1×10^6 BMM unter ständiger Einwirkung der Substanz gemessen werden konnte. Obwohl durch die eingesetzte Menge von 40 µM Ganciclovir die Virusreplikation durch Hemmung der DNA-Replikation um einen Faktor von ca. 1000 verringert wurde, konnte kein Einfluss auf die Herabregulation der Chemokinproduktion von MIP-1α gemessen werden. Das gleiche galt für die Produktion der Chemokine MIP-1β und RANTES (Daten nicht gezeigt). Alternativ zu Ganciclovir wurde auch die Substanz PAA (*phosphonoacetic acid*) eingesetzt (250 µg/ml), die ebenfalls die Synthese viraler DNA durch die Hemmung der Virus induzierten DNA Polymerase verhindert [221]. Analog zu Ganciclovir hatte der Einsatz von PAA keinen Einfluss auf die virale Chemokinblockade von MCMV (Daten nicht gezeigt).

Die Herabregulation der Chemokinproduktion war daher unabhängig von der Expression der viralen L-Gene, das bedeutet, dass die IE- und/ oder E-Gene von MCMV involviert sind. Im Rahmen der Arbeit wurde versucht, die Frage nach der Beteiligung von IE- und E-Genen mittels Inhibitoren der Transkription (Actinomycin D) und Translation (Cycloheximid) gemäß [127] zu klären. Da für beide Agenzien keine Konzentration ermittelt werden konnte, die auf die BMM nicht toxisch innerhalb von 5 – 7 h gewesen wäre (Daten nicht gezeigt), war dieser experimentelle Ansatz nicht erfolgreich.

Durch Kooperationen mit virologischen Arbeitsgruppen, die spezialisiert auf die Untersuchung von CMV-Funktionen sind, standen verschiedene MCMV-Deletionsmutanten zur Verfügung (s. Tabelle 3.2).

Diese Deletionsmutanten wurde auf ihre Fähigkeit hin untersucht, die Chemokinantwort von Makrophagen bei einer Aktivierung durch LPS zu beeinflussen und den Toll-like Rezeptor 4 herabzuregulieren. Die Untersuchungen erfolgten ausnahmslos durchflusszytometrisch, wobei infizierte Zellen mit Antikörpern gegen sehr frühe (*immediately early*) virale Genprodukte detektiert wurden (siehe Tabelle 3.2)

Tabelle 3.2: Liste der verwendeten MCMV Deletionsmutanten. Die Spalte „Deletion“ benennt die fehlenden Genabschnitte.

| Bez. des MCMV-Stammes | Deletion | Zustand der Expression in BMM von:* | | durchflusszytometrischer Nachweis |
|-----------------------|-------------|-------------------------------------|-----------|---|
| | | TLR4 | Chemokine | |
| Wildtyp (MCMV-GFP) | IE2 | - | - | GFP-Expression |
| C3xWT | - | - | - | |
| d6-MCMV | m144 – m158 | - | - | Nachweis von IE1 durch αIE1-Antikörper (Croma101) |
| d7-MCMV | m159 – m170 | - | - | |
| d8-MCMV | m01 – m22 | - | - | |
| d20-MCMV | m128 – m139 | -# | -# | |
| dIE1-MCMV | IE1 | - | - | Nachweis von E1 durch αE1-Antikörper (Croma103) |

* = dargestellt ist der Einfluss der Infektion mit dem jeweiligen MCMV-Stamm auf die TLR4-Expression und die Chemokinproduktion nach einer LPS-Stimulation: „-“ = herunterreguliert, # = nur mit 3T3-Zellen (siehe Text)

Keine der Deletionsmutanten zeigte eine Einschränkung in der Fähigkeit, eine LPS-Stimulation und die nachfolgende Produktion der Chemokine MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES zu verhindern bzw. zum Erliegen zu bringen. Diese Deletionsmutanten konnten auch vergleichbar zum Wildtypvirus den Toll-like Rezeptor 4 herabregulieren.

Aufgrund der Deletion des Gens m139, welches für den Makrophagentropismus notwendig ist, konnte die Deletionsmutante d20-MCMV Makrophagen nicht infizieren. Die Deletionsmutante d20-MCMV konnte die immortalisierte Fibroblastenzelllinie 3T3 infizieren, die den TLR4 endogen auf der Oberfläche exprimiert. Die Infektion von 3T3 Zellen mit d20-MCMV und zur Kontrolle mit dem MCMV-Wildtyp führte in beiden Fällen zur Herabregulation des TLR4 in den infizierten 3T3 Zellen (Daten nicht gezeigt).

Die Ergebnisse mit den viralen Deletionsmutanten zeigten, dass große Genabschnitte des Virus, die für nicht essentielle Gene kodieren, nicht in die Regulation der TLR4- beziehungsweise Chemokinproduktion involviert sind. In den untersuchten Bereichen liegen hingegen virale Gene, die an der Regulation von Kostimulatoren, MHC sowie der NK-Zellantwort beteiligt sind (s. Einleitung, Tabelle 1.12). Es könnte sein, dass essentielle Gene oder mehrere weit voneinander auf dem viralen Genom lokalisierte Gene benötigt werden, um die gezeigten Effekte zu verursachen.

4 Diskussion

Das Murine Zytomegalievirus ist ein an den Wirtsorganismus hochangepasstes Pathogen und hat eine Vielfalt von Mechanismen entwickelt, um der Erkennung und Elimination durch das Immunsystem zu entkommen. Das Virus etabliert nach einer akuten Infektion des immunkompetenten Wirts eine lebenslang persistierende Infektion, unter anderem in Zellen der myeloiden Linie. Begleitend zur akuten Infektion wurde eine transiente Immunsuppression beobachtet [222]. In der frühen Immunantwort gegen MCMV spielen Chemokine eine wichtige Rolle, um Effektorzellen zu rekrutieren und zu aktivieren. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass MCMV mit der Produktion von löslichen Mediatoren wie Chemokinen und Zytokinen sowie essentiellen immunologischen Funktionen der Makrophagen interferierte. In ruhenden Makrophagen wurde die Aktivierung der Zellen über mikrobielle Bestandteile durch MCMV blockiert, indem die Oberflächenrezeptoren für die Erkennung der pathogenassoziierten Strukturen, TLR2 und TLR4, herunterreguliert beziehungsweise die Signalwege der TLR-abhängigen intrazellulären Pathogenerkennungen reguliert wurden. Dies führte dazu, dass MCMV-infizierte Zellen bestimmte Zytokine und Chemokine (MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES und MCP-1) nicht mehr produzieren konnten. In aktivierten Makrophagen wurde durch MCMV die bereits eingesetzte Produktion der löslichen Mediatoren herabreguliert. MCMV interferierte ebenfalls mit anderen essentiellen Funktionen der Makrophagen wie die Phagozytose, die Produktion von Stickstoffoxidradikalen und die Expression von Oberflächenmarkern.

4.1 Makrophagen

Der allgemein gebräuchliche Begriff „Knochenmarksmakrophagen“ (BMM), für M-CSF stimulierte und *in vitro* proliferierte Zellen aus dem Knochenmark ist irreführend, da diese Zellen kein MHCII exprimieren. Einige Rezeptoren, wie MHCI sowie die kostimulatorischen Rezeptoren CD40, CD80 und CD86 werden kaum exprimiert, können aber hochreguliert werden. Aus diesen Gründen und der Tatsache, dass makrophagentypische Funktionen, wie die Expression von iNOS zwei gleichzeitige Stimuli benötigten (IFN- γ und LPS), handelt es sich bei den BMM eher um Knochenmarksmonozyten.

Diese Monozyten haben den Status von zirkulierenden Monozyten im Wirt und benötigen noch die zur Infiltration in Gewebe und der damit verbundenen Differenzierung zu Makrophagen notwendigen Stimuli [3]. Diese Monozyten sind einer der wichtigsten Wirte für MCMV und dessen Ausbreitung über das Gefäßsystem des Wirtes [223]. Zirkulierende Monozyten haben im Wirt eine verhältnismäßig geringe Lebensdauer, die erst durch die Infiltration ins Gewebe und durch die Differenzierung zu Makrophagen wesentlich verlängert wird [3].

Eine weitere Quelle für Monozyten würden die mononukleären peripheren Blutzellen (PBMC) darstellen. Aufgrund des niedrigen Blutvolumens in der Maus stehen diese im Mausmodell allerdings nur in so geringem Maße zur Verfügung, dass Grundlagenexperimente nicht praktikabel wären.

Im Gegensatz zu den BMM sind die Makrophagen der Peritonealen Exsudatzellen (PEC) reife Makrophagen, die durch eine Peritonitis induziert werden und in den intraperitonealen Raum eingewandert und dadurch aktiviert worden sind. Sie sind demnach nur bedingt als physiologisches Analogon zu den BMM zu betrachten.

4.2 Die Aktivierung von Makrophagen

Sowohl BMM als auch PEC exprimieren die Toll-like Rezeptoren 2 und 4 auf ihrer Oberfläche und können damit pathogenassoziierte Strukturen erkennen und darauf mit der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen reagieren.

Die Ergebnisse haben gezeigt, dass die Stimulation von BMM und PEC mit LPS zu einer umfangreichen Expression von Zytokinen und Chemokinen führte. Hierzu zählten insbesondere die Zytokine IL-6, IL-12, IL-15, IL-18, IFN- γ und TNF- α . Die Zytokine IL-2 und IL-4 wurden erwartungsgemäß von Makrophagen nicht produziert. Auffällig war die unterschiedliche Kinetik der Sezernierung von TNF- α und IFN- γ nach der LPS-Aktivierung. Während bei den BMM und PEC das TNF- α sehr früh (nach 5 h LPS Stimulation) sezerniert wurde, war IFN- γ erst nach 29 h nachweisbar (PEC). Des Weiteren wurden die Chemokine MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1, MIP-2, KC und RANTES innerhalb der ersten 5 Stunden nach einem LPS-Stimulus sezerniert. Insgesamt bedeutet die Produktion dieser Zytokine und Chemokine eine sehr umfangreiche Aktivierung wesentlicher Komponenten des Immunsystems.

So werden durch die Chemokine MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1 und RANTES vor allem Monozyten, Makrophagen, T-Zellen und auch Natürliche Killerzellen angezogen, während KC auf Neutrophile chemotaktisch wirkt. Die Chemokine MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES bewirken synergistisch mit IFN- γ die Freisetzung von IL-12 in BMM bei einer MCMV-Infektion [81].

Durch die Produktion der Zytokine IL-12, IL-15, IL-18 und TNF- α werden CD4⁺ T_H-Zellen und zytotoxische CD8⁺ T-Zellen aktiviert und dabei wird eine Polarisation der Immunantwort in Richtung einer T_{H1}-Antwort verursacht. Zusätzlich aktivieren IL-6 und IL-15 Neutrophile und IL-12 und TNF- α Natürliche Killerzellen. TNF- α allein kann außerdem Makrophagen aktivieren.

Einerseits haben IL-6 und TNF- α synergistische Effekte auf die Aktivierung von Immunzellen. Andererseits trifft das Maximum des TNF- α -Spiegels auf ein Minimum des IL-6-Spiegels (nach 5 h LPS-Stimulation) und umgekehrt nach 29 h LPS.

4.3 Einfluss von MCMV auf die Makrophagenfunktionen

4.3.1 Endozytose/ Herabregulation der TLR2 und 4

Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigten, dass MCMV in infizierten Makrophagen die Toll-like Rezeptoren 2 und 4 herabregulierte, dadurch war eine Stimulation mit Agonisten dieser Rezeptoren, wie bspw. LPS, von MCMV-infizierten Makrophagen unmöglich. Diese Abregulation war kein Nebeneffekt der Aktivierung der anderen Toll-like Rezeptoren, TLR2, TLR9 und TLR3 durch die frühe Erkennung von MCMV-assoziierten Strukturen, sondern offensichtlich viral induziert. Die Regulation von TLR4 durch MCMV ist gleichfalls kein vorübergehendes Phänomen wie die Endozytose des TLR4 nach der LPS-Bindung.

MCMV-infizierte Makrophagen konnten daher nicht mehr durch die betreffenden exogenen, pathogenassoziierten Strukturen aktiviert werden und waren gegenüber dem LPS-Stimulus paralysiert. Darin lag das Ausbleiben jeglicher Zytokin- und Chemokinproduktion begründet, die über die Toll-like Rezeptoren stimuliert werden sollten. Aus diesem Grund ließen sich auch keine Transkripte der gemessenen Chemokine mehr nachweisen. Durch den Einsatz von UV-inaktiviertem MCMV wurde deutlich, dass zur Herabregulation des TLR4 und dem damit verbundenen Ausbleiben der Transkription der Chemokine eine virale Genexpression notwendig war und „mitgebrachte“ strukturelle virale Bestandteile nicht hinreichend waren.

In weiteren Experimenten sind 3T3-, CHO- und HEK293-Zellen, die jeweils den murinen TLR4/MD2-Komplex exprimierten, mit MCMV infiziert worden. Die Überexpression war auf dem Hintergrund der schwachen endogenen Expression in den Makrophagen von TLR4 notwendig. Im Rahmen dieser Arbeit ist es nicht gelungen, Makrophagen zu transfizieren, so dass andere Zelllinien verwendet wurden. In den TLR4/MD2-transfizierten Zellen 3T3, CHO und HEK293 wurde keine durch MCMV induzierte Herabregulation von TLR4/MD2 beobachtet. Das ist möglicherweise durch die extreme Überexpression von TLR4/MD2, die durch eine begrenzte Menge an viralem Protein nicht beeinflusst werden konnte oder durch einen anderen zugrunde liegenden Zelltropismus, möglicherweise wegen fehlender intrazellulärer Signalmoleküle in den transfizierten Linien, erklärbar.

4.3.2 Die MCMV Infektion verursacht eine Verlängerung der Überlebensdauer von BMM *in vitro*.

Die MCMV-infizierten Makrophagen lebten nach dem Ausbleiben des M-CSF-Stimulus *in vitro* wesentlich länger (> 3 Wochen bei den BMM) als die unbehandelten Zellen (< 1 Woche). Eine ähnliche Beobachtung war bei den LPS-aktivierten Zellen zu machen, die ebenfalls wesentlich länger *in vitro* überlebten, aber einen erhöhten Stoffwechsel im Vergleich zu den infizierten Zellen zeigten. Die Verlängerung der Überlebenszeit *in vitro* von MCMV-infizierten Makrophagen war möglicherweise auf eine initiale Aktivierung der Zellen und spätere virale Blockade der Apoptose zurückzuführen [60].

4.3.3 Der Einfluss der MCMV Infektion auf die Phagozytose und die Expression von iNOS

Die MCMV-Infektion allein führte nicht zu einer messbaren Expression von iNOS. Knochenmarksmonozyten, die mit LPS und IFN- γ stimuliert wurden, exprimierten dagegen iNOS. Eine Stimulation mit LPS oder IFN- γ allein war nicht ausreichend, die iNOS-Expression zu induzieren. Nachdem bekannt wurde, dass MCMV in den infizierten Zellen TLR4 reguliert, konnte auch das Ausbleiben der iNOS-Expression in infizierten Zellen auf einen simultanen LPS- und IFN- γ -Stimulus erklärt werden – der LPS-Stimulus war hier unwirksam.

In LPS/ IFN- γ vorstimulierten Zellen, die nachträglich mit MCMV infiziert wurden, war immer noch eine basale iNOS-Expression nachweisbar, die aber geringer war, als die in den uninfizierten oder in den nur stimulierten Zellen.

Knochenmarksmonozyten konnten ohne weitere Stimulation Dextran phagozytieren. Die Phagozytoseleistung stieg allerdings deutlich in LPS-aktivierten Zellen. LPS-aktivierte und nachträglich vollständig MCMV-infizierte Zellen waren nicht mehr in der Lage, Dextran zu phagozytieren. Eine MCMV-induzierte Herabregulation des verantwortlichen Rezeptors für die Phagozytose von Dextran, namens SIGNR3, könnte eine der möglichen Erklärungen sein [30].

Diese Ergebnisse verdeutlichen die immunologisch weit reichende Paralyse der infizierten Monozyten durch MCMV, die auf mehreren Ebenen stattfindet. Diese Ebenen der Paralyse lassen sich in eine funktionelle und eine kommunikative unterteilen. Die funktionelle Paralyse ist die Hemmung der Phagozytose und die Beeinflussung der Bildung von Stickstoffoxidradikalen, die kommunikative Paralyse umfasst die Blockade der Expression von Oberflächenrezeptoren und die damit einhergehende Herabregulation der Produktion von löslichen Mediatoren.

4.3.4 Infektion von aktivierten BMM

Nach der Infektion wurde in den aktivierten Makrophagen die Produktion der Chemokine MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES und MCP-1 zu unterschiedlichen Zeitpunkten eingestellt, wie die intrazellulären durchflusszytometrischen Messungen zeigten. Die unterschiedlichen Zeitpunkte waren durch die verschiedenen Signalwege erklärbar, die zu verschiedenen Transkriptionsfaktoren führen.

Die Produktion von MIP-1 α , MIP-1 β und vermutlich MCP-1 werden nach bisherigem Erkenntnisstand über den MyD88-abhängigen und -unabhängigen Signalweg induziert, deren wichtigste Transkriptionsfaktoren NF κ B, AP-1 und IRF-5 sind [42].

Im Gegensatz dazu scheint RANTES nicht über den MyD88-unabhängigen Signalweg induzierbar zu sein, was Versuche mit CpG als Agonist des TLR3, der lediglich den MyD88-unabhängigen Signalweg initiiert, zeigten. Der MyD88-unabhängige Signalweg führt zu den Transkriptionsfaktoren NF κ B und IRF-3 [45], [43].

Sowohl in IFN- β -voraktivierten als auch in ruhenden BMM zeigte sich nach einer MCMV-Infektion eine präferentielle Produktion von MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES in den uninfizierten Zellen, während in den infizierten Zellen eine deutlich verminderte Produktion gemessen wurde. Zusätzlich können MCMV-infizierte Zellen auf IFN- β nicht mehr mit der Produktion der drei Chemokine reagieren. Insgesamt entspricht damit das Bild weitestgehend der LPS-Stimulation.

Bislang ist wenig bekannt über den Eingriff von MCMV in die TLR-Signalwege. Die Arbeiten mit MCMV-Deletionsmutanten haben gezeigt, dass große genetische Bereiche des Virus allein nicht in die Regulation von TLR4 und/oder der Chemokinproduktion involviert sind. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass mehrere virale Gene, die im Genom getrennt voneinander liegen, an der Regulation beteiligt sind. Eine weitere Möglichkeit ist die Involvierung von essentiellen viralen Genen. Im Fall von HCMV konnte kürzlich gezeigt werden, dass die viral induzierte Expression der Chemokine RANTES, MIG, MCP-2 und MIP-1 α auf transkriptioneller Ebene durch IE2, dem Sequenzhomolog des murinen IE3, blockiert wird [224], [225]. Dies könnte für MCMV bedeuten, dass das für die Virusreplikation essentielle Genprodukt von IE3 für die in dieser Arbeit beobachteten Regulationen verantwortlich ist. Das kürzlich als Regulator des TLR3-Signalweg identifizierte virale Genprodukt m45 [60] könnte ebenfalls in zukünftigen Arbeiten hinsichtlich der in dieser Arbeit gefundenen Beobachtungen zur Regulation der TLR4-Expression und Chemokinproduktion analysiert werden.

Die Expression aller in dieser Arbeit untersuchten Chemokine ist im Verlauf der MCMV-Infektion durch eine Herabregulation betroffen. Ebenso betroffen sind die Zytokine IL-6, IL-12 und schwächer IL-15 und IL-18, die durch eine MCMV-Infektion in den PEC herabreguliert werden.

Diese Herabregulation der Zytokin- und Chemokinproduktion ist allerdings mit dem Bioplex-System schlecht darstellbar, da lediglich eine verringerte kumulierte Konzentration zu messen ist. Diese kommt durch die Akkumulation der nach einem Stimulus gebildeten Zytokine und Chemokine bis zur vollständigen Herabregulation der Produktion durch MCMV zustande. Die zu einem bestimmten Zeitpunkt von einer bestimmten Zelle tatsächlich intrazellulär produzierten und in Vesikeln zur Sekretion vorbereiteten Zytokine lassen sich aber durchflusszytometrisch erfassen.

Eine Infektion von LPS-aktivierten PEC mit MCMV verursacht eine erhebliche Sekretion von IL-1 β und eine Verdopplung der IFN- γ -Produktion, gemessen im Bioplex-System. Da die Zellen zu >80% infiziert sind, ist ein möglicher parakriner Effekt der Infektion auf die uninfizierten Zellen gering. Möglicherweise führt die Anwesenheit von MCMV in den ersten Stunden der Infektion durch mehrere Stimuli (bspw. über die Toll-like Rezeptoren 2 und 9) zu einer hinreichenden Aktivierung der Makrophagen, welche im Bioplex-System zur Messung einer hohen Konzentration der kumulierten Zytokine führt.

4.4 Der Einfluss von MCMV auf andere Zelltypen

Bei den murinen Endothelzelllinien SVEC und MHEC konnte nach deren Aktivierung mit LPS nur die Bildung des Chemokins RANTES, nicht aber MIP-1 α und MIP-1 β nachgewiesen werden. Die Produktion erfolgte sowohl bei einer LPS-Stimulation, als auch unter einer MCMV-Infektion im Rahmen der Kinetik, die bei den BMM und PEC die Chemokinblockade zeigte, unverändert. Diese Ergebnisse zeigen einen möglichen Makrophagentropismus des regulatorischen Effektes von MCMV auf die Produktion von RANTES. Alternativ könnte die Kinetik des Effektes aber auch deutlich langsamer sein, was durch entsprechend spätere Zeitpunkte nach der MCMV-Infektion experimentell überprüfbar wäre.

4.5 Parakrine Effekte der MCMV-Infektion auf die uninfizierten Zellen.

Neben dem direkten Einfluss auf die immunologischen Funktionen der Monozyten und Makrophagen durch die Infektion mit MCMV gab es einige bemerkenswerte parakrine Effekte der infizierten Zellen auf die uninfizierten Zellen im gleichen System.

Parakrine Effekte der MCMV-Infektion ließen sich durchflusszytometrisch bei den im System verbliebenen uninfizierten Zellen beobachten, indem einzelne Marker (Zytokine, Oberflächenproteine) vergleichend auf infizierten und uninfizierten Zellen dargestellt wurden.

Die Frage, ob diese Effekte auf nicht replikationsfähige Viren oder Viruspartikel der Virenstammlösung oder auf die Produktion von löslichen Mediatoren in der frühen Phase der Infektion von infizierten Zellen zurückzuführen waren, blieb allerdings offen.

In uninfizierten Zellen wurde offenbar allein durch die Anwesenheit von MCMV oder MCMV-infizierten Zellen das Chemokin RANTES produziert.

RANTES wirkt, wie schon beschrieben, chemotaktisch auf Monozyten, Makrophagen, NK-Zellen, Dendritische Zellen [75] und ist förderlich für die Ausbildung einer T_{H1} -Antwort [74]. Geht dem Auftauchen von MCMV im System ein LPS-Stimulus voraus, erhöht sich die Produktion von RANTES in den uninfizierten Zellen.

Im Vergleich zu den Zellen, die lediglich mit LPS stimuliert worden sind, erhöhte sich die Produktion der Chemokine MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES in den uninfizierten Zellen. MIP-1 α und MIP-1 β gelten ebenfalls als Chemokine, die aufgrund ihrer chemotaktischen Eigenschaften eine T_{H1} -Antwort begünstigen und mit IFN- γ synergistische Effekte bei einer MCMV-Infektion haben [81].

Zusätzlich kam es in den uninfizierten BMM zu einer Erhöhung der Expression von TLR2 (nicht von TLR4) und insbesondere von MHCI, sowie den Korezeptoren CD80 und CD86. Der physiologische Nutzen einer, wenn auch leichten, Erhöhung der TLR2-Expression ließ sich nicht erschließen, es könnte sich allerdings um ein generelles Phänomen der Aktivierung der Zellen handeln. Die erhöhte Expression von MHCI hatte vermutlich seine Ursache in der Produktion und Wirkung von IFN- γ , welches parakrin die MHCI-Expression erhöht und diese Erhöhung steht in direkter Konkurrenz zur MHCI-Regulation durch MCMV [127]. Die Expression der ebenfalls zur Antigenpräsentation notwendigen Korezeptoren CD80 und CD86 war dagegen nur in den uninfizierten Zellen zu beobachten.

Im Gegensatz dazu wurde sowohl in den infizierten, als auch in den uninfizierten Zellen der M-CSF Rezeptor CD115 herabreguliert. M-CSF ist ein Wachstumsfaktor, der für das Überleben von naiven Monozyten, für deren Genese aus den myeloiden Vorläuferzellen des Knochenmarks, sowie deren Proliferation und Differenzierung notwendig ist. Mit der Aktivierung der BMM war die Entwicklung der Zellen vermutlich abgeschlossen, das könnte ein Grund für die Abregulation von CD115 sein.

Zusammenfassend kam es zu einer Änderung der Expression immunologisch relevanter Oberflächenrezeptoren in den uninfizierten BMM, wenn diese Kontakt mit MCMV-infizierten Zellen, entweder über einen direkten Zell-Zellkontakt oder über lösliche Mediatoren, hatten.

Mit ihrer veränderten Oberflächenexpression ähnelten die uninfizierten Zellen hierbei den aktivierten Makrophagen, allerdings ohne jegliche MHCII-Expression.

4.6 Einordnung der Ergebnisse in das immunologische Gesamtgeschehen

Makrophagen und Monozyten, die mit dem murinen Zytomegalievirus infiziert sind, können nicht mehr ihre immunologisch relevanten Funktionen im Organismus ausüben, das heißt, dass diese Zellen deutlich in ihren Funktionen beeinträchtigt sind:

1. MCMV-infizierte Makrophagen konnten einen Großteil aller löslichen Mediatoren nicht mehr produzieren und ließen sich nicht mehr aktivieren.
2. Die Phagozytose wurde unterbunden und die Produktion von NO verringert.
3. Die Expression von Kostimulatoren wurde inhibiert.

Damit sind die MCMV-infizierten Makrophagen hinsichtlich ihrer immunologischen Funktion weitgehend paralytisch. Zusammengenommen könnten dieser Einfluss von MCMV auf die angeborene Immunantwort erklären, weshalb während einer akuten MCMV-Infektion eine transiente Immunsuppression beobachtet wurde, bei der die Immunreaktion gegen eine zeitgleiche opportunistische Infektion, beispielsweise mit pathogenen Bakterien, gestört ist [222, 226-230].

Es ist zu erwarten, dass bei einer Infektion *in vivo* in unmittelbarer Nachbarschaft zu infizierten Zellen Bedingungen herrschen, die es dem Virus ermöglichen, dem Immunsystem teilweise zu entkommen. Einschränkend zu beachten ist, dass über die tatsächliche Anzahl von infizierten Zellen bei einer akuten Infektion mit MCMV unter physiologischen Bedingungen nichts bekannt ist, die Immunsuppression aber vermutlich lokal begrenzt ist.

4.6.1 Lokale Immunsuppression durch die akute MCMV-Infektion

Aus dem unmittelbaren Einfluss von MCMV auf die immunologische Funktionalität von Makrophagen ergibt sich unter einer akuten Infektion eine Population von Zellen, die trotz ihrer Anwesenheit nicht mehr auf weitere immunologische Stimuli reagieren und gleichfalls keine Antigenpräsentation mehr durchführen kann.

Die Aussagen von Andrews et al. über den Verlust der Fähigkeit zur Antigenpräsentation von MCMV-infizierten Dendritischen Zellen machen den Verlust einer weiteren für die initiale Immunabwehr bedeutenden Zellspezies deutlich [231]. Folglich ist eine zumindest lokale und temporäre Immunsuppression durch MCMV denkbar.

Die Ausprägung dieser Suppression ist dabei definiert durch den prozentualen Anteil der uninfizierten Zellen zu den betroffenen, also MCMV-infizierten antigenpräsentierenden und phagozytierenden Zellen.

Damit werden die Aussagen aus älteren Publikationen erklärbar, in denen eine mikrobielle, subletale Superinfektion bei gleichzeitiger akuten, subletalen MCMV-Infektion, mit extrazellulären Pathogenen (siehe Tabelle 4.1) zu einer deutlichen Erhöhung der Mortalitätsraten in Mäusen führten. Durch die Herabregulation von TLR2 und TLR4 durch MCMV in den Makrophagen und vermutlich auch den anderen phagozytierenden Zellen, sowie durch die Hemmung der Phagozytose, können die genannten extrazellulären Mikroorganismen nicht mehr über ihre Oberflächenstrukturen erkannt werden. Das heißt, dass durch die Modulation einer breiten Palette von TLR-abhängigen Signalwegen bei einer akuten Infektion keine Reaktion mehr auf pathogenassoziierte Strukturen mehr möglich ist. Tatsächlich wurde gezeigt, dass im Verlauf einer subletalen MCMV-Infektion eine Reihe von Mikroorganismen nicht mehr effizient bekämpft werden konnten (siehe Tabelle 4.1)

Tabelle 4.1: Opportunistische Pathogene mit nachgewiesenen synergistischen Effekten auf die Mortalität von Mäusen bei einer akuten MCMV-Infektion.

| Pathogen | PAMP (dominant)* | assoziiertes TLR | Referenz |
|-------------------------------|------------------------------|---|--------------|
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | LPS | TLR4 | [222] |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | LTA, Peptidoglykan | TLR2 | [222], [226] |
| <i>Candida albicans</i> | Kohlenhydrate | TLR2/ TLR6 (mglw. TLR3 [227]), C-typ Lektin | [222], |
| <i>Escherichia coli</i> K1 | LPS, Kapselpolysaccharide | TLR4, TLR2 | [228] |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | LPS, Kapselpolysaccharide | TLR4, TLR2 | [229] |

*: PAMP = pathogenassoziierte molekulare Strukturen (*pattern*), von denen hier die vermutlich für eine Immunabwehr dominantesten genannt sind.

Die maximale Synergie dieser Ko- oder Superinfektionen erfolgte dabei, wenn die bakterielle Infektion 3 Tage nach der viralen Infektion erfolgte und reduzierte sich ab dem 5. Tag nach der Primärinfektion mit MCMV [222] und war damit nur temporär.

Dazu summieren sich die, beispielsweise von Osborn et al. [230] beschriebenen und unter anderem durch Andrews et al. [231] und Buchmeier et al. [232] erklärten Phänomene von inhibierten Immunreaktionen, die von Antigenpräsentationen abhängig sind. Ein Beispiel ist das Ausbleiben der Bildung von neutralisierenden Antikörpern gegen das *Newcastle Disease Virus* und der damit verbundenen Ausbreitung des Virus bei einer gleichzeitigen akuten MCMV-Infektion [233].

Zusätzlich zu den hier gezeigten Ergebnissen konnten Bekiaris et al. darstellen [234], dass in MCMV-empfindlichen Mäusen (BALB/c) durch den Mangel einer spezifischen NK-Zellantwort gegen MCMV, am Tag 4 nach der MCMV-Infektion (LD50) ein großer Teil von CD3⁺ T-Zellen und CD11c⁺ Dendritischen Zellen in der Milz verloren gehen. Dieser Verlust ist gekennzeichnet durch die Auflösung der strukturellen Integrität der weißen Pulpa der Milz, durch die Zerstörung von Stromazellen, die unter anderem das homeostatischen Chemokin CCL21 bilden. Eine eingeschränkte oder verlorene Funktionalität der Milz ist ebenfalls ein wichtiges Indiz für eine Immunsuppression.

4.6.2 Der Einfluss von MCMV auf die weitere Ausrichtung der Immunantwort

Nach dem Ende der akuten Phase der MCMV-Infektion und der Ausbildung der latenten Infektion werden alle vom Immunsystem erreichbaren und virale Antigene exprimierende oder präsentierende Zellen eliminiert. Die eliminierten Zellen werden daraufhin ersetzt. Der Einfluss von MCMV auf die Funktion der Monozyten und Makrophagen besteht demnach im wesentlichen in der akuten Phase der Infektion.

Die latente MCMV-Infektion eines Organismus scheint durch die systemische Aufrechterhaltung einer basalen Aktivität des Immunsystems, bei der vor allem die Produktion des antiviralen IFN- γ im Vordergrund steht, zur verringerten Empfindlichkeit gegenüber bakterieller Infektionen zu führen. Latent MCMV-infizierte Mäuse waren weniger empfindlich gegenüber einer Infektion mit *Listeria monocytogenes* und *Yersinia pestis* [235].

Der weit reichende immunmodulatorische Einfluss von MCMV auf die infizierten Zellen der angeborenen Immunantwort dient letztlich dem Zweck, eine latente Infektion im Organismus zu etablieren. Durch die Infektion von zirkulierenden Monozyten wird das Virus im Organismus verteilt.

Die in dieser Arbeit gezeigte Paralyse immunologischer Funktionen der infizierten BMM unterstützt diese Aussage insofern, dass infizierte Monozyten nicht mehr aktivierbar sind und *in vitro* eine verlängerte Lebensdauer aufweisen.

Die bisher vorliegenden Informationen zur Immunmodulation und -evasion von MCMV, die für Zellen der angeborenen Immunantwort relevant sind, beinhalten die Hemmung der Antigenprozessierung und -präsentation, inklusive der Herabregulation von Kostimulatoren, die Unterdrückung einer NK-Zellantwort und die Produktion eines Homologes und eines Agonisten von Chemokinrezeptoren (siehe auch Kapitel 1.4.4). Die hier vorliegenden Ergebnisse fügen diesen Informationen unter anderem Aussagen zur interzellulären Kommunikation zwischen den Immunzellen durch Zytokine und Chemokine hinzu. Zusätzlich zum Einfluss auf die MHC-I-abhängige Antigenpräsentation und auf die NK-Zellaktivierung, führt die Herabregulation der Zytokine IL-12 und die Verringerung der Produktion von IL-15 und IL-18 durch MCMV zu einem Ausbleiben der Induktion der protektiven T_{H1} -Zellabhängigen Immunantwort. Diese Aussage ist unabhängig von dem Mangel an Informationen zur Produktion von IL-10 und der grundsätzlichen Unfähigkeit der Makrophagen, IL-4 zu produzieren.

Dazu passt ebenfalls die Herabregulation der Chemokine MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES, die aufgrund ihrer Funktion einer T_{H1} -Antwort zugeordnet sind [81, 82].

Das Ausbleiben einer effektiven T_{H1} -Antwort würde zu einem deutlichen Zeitgewinn für die Ausbreitung von MCMV im Organismus führen, da die Mechanismen, die zur Ausbildung einer antikörperabhängigen (humoralen) Immunantwort führen, mehr Zeit benötigen (> 5 Tage) als die der zur zellulären Immunantwort. Außerdem ist die erfolgreiche Abwehr einer akuten MCMV-Infektion neben einer funktionierenden NK-Zellantwort im weiteren Verlauf abhängig von zytotoxischen $CD8^+$ T-Zellen [127], welche über die T_{H1} -Antwort stimuliert werden. Die Bedeutung einer B-Zellantwort bei einer primären MCMV-Infektion ist bislang unklar. Einen T_{H1} -Phänotyp haben aber offenbar auch die zur Aufrechterhaltung der Latenz notwendigen MCMV-spezifischen $CD4^+$ T-Zellen [236].

Auf der anderen Seite wird das ebenfalls durch eine MCMV-Infektion herabregulierte Chemokin MCP-1 der T_{H2} -abhängigen Immunantwort zugeordnet [82], wird aber vermutlich über die gleichen Signalwege wie die anderen CC-Chemokine induziert und erfährt darüber auch eine Herabregulation.

Erste Ergebnisse deuten auch darauf hin, dass die Produktion des Chemokins IP-10, welches von LPS-stimulierten BMM ebenfalls gebildet wird, unter dem Einfluss einer MCMV-Infektion verringert wird. IP-10 wirkt chemotaktisch auf T_{H0} - und T_{H1} -Zellen [80].

Zusätzlich erfährt auch die Produktion des Zytokins IL-6 eine deutliche Herabregulation durch MCMV. IL-6 ist unter anderem ein Zytokin der humoralen Immunantwort, welches zur Aktivierung von T-Zellen beiträgt und die Proliferation von B-Zellen induziert. Die Produktion des Zytokins TNF- α , welches ebenfalls herabreguliert wird, aktiviert auch T-Zellen, insbesondere $CD8^+$ T-Zellen und deren Zytotoxizität sowie NK-Zellen. Die Wirkung von TNF- α scheint aber keine Rolle in der Ausprägung der MCMV Pathogenese zu haben [237], kann aber autokrin apoptotisch wirken [238] und die in dieser Arbeit gefundene Herabregulation ist konsistent mit früheren Publikationen [161]. Im Gegensatz dazu führt die MCMV-Infektion von LPS-voraktivierten Makrophagen wie schon erwähnt zu einer deutlichen Erhöhung der Produktion von IFN- γ und IL-1 β .

IFN- γ ist ebenfalls ein Zytokin der T_{H1} -Antwort, führt aber vor allem zur Aktivierung von Makrophagen, der Induktion von iNOS, zur erhöhten Expression von MHC I und MHC II, zur erhöhten Phagozytoseleistung, wie auch zur besseren Antigenprozessierung, was allerdings Funktionen sind, die in MCMV-infizierten Zellen herabreguliert oder nicht mehr induzierbar sind. Die Aufrechterhaltung der IFN- γ -Produktion erklärt aber die parakrinen Effekte auf die uninfizierten Zellen. IFN- γ wirkt zusätzlich antiviral, insbesondere durch die Induktion der RNase L in den Zielzellen.

IL-1 β ist ebenfalls ein proinflammatorisches Zytokin, welches Monozyten und Makrophagen aktiviert, die Produktion von iNOS induziert und die Differenzierung von myeloiden Zellen aus dem Knochenmark fördert. Zusätzlich kann IL-1 β vermutlich die Reaktivierung von latenten MCMV in immunkompetenten Mäusen auslösen [239]

Insgesamt können aus den Daten dieser Arbeit und der vorhandenen Literatur über die frühe Phase der Immunantwort während einer akuten MCMV-Infektion folgende Aussagen getroffen werden:

1. Eine akute MCMV Infektion aktiviert in den ersten Stunden ein initiale Immunantwort im Hinblick auf die Produktion der Chemokine MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES.
2. Infizierte Zellen präsentieren keine viralen Antigene über MHC und werden deshalb darüber nicht als infiziert von NK-Zellen³ und CD8⁺-T-Zellen erkannt.
3. Infizierte Monozyten sind länger lebensfähig, aber vermindert aktivierbar bzw. paralysiert im Hinblick auf die Freisetzung von Mediatoren und die Phagozytose und dienen daher als „unauffälliges Transportmittel“ für MCMV zur Verbreitung im Organismus
4. Infizierte Makrophagen sind ebenfalls nicht mehr durch PAMP aktivierbar und können daher nicht mehr ihre immunologische Aufgabe, die unspezifische Erkennung und Elimination von Pathogenen, wahrnehmen.
5. Infizierte Makrophagen scheiden aus der interzellulären Kommunikation zwischen den Bestandteilen des Immunsystems aus.
6. MCMV gewinnt durch die Hemmung der Produktion aller direkt eine NK-Zell-, CD8⁺-T-Zell- und T_{H1}-Zellantwort-fördernder Zytokine und Chemokine Zeit zur Dissemination und damit zum Erreichen der Zielgewebe und zum Erreichen der Latenz.
7. Die Paralyse der MCMV-infizierten Makrophagen entspricht teilweise der Paralyse von MCMV-infizierten murinen Dendritischen Zellen [231] und verursacht zusammengenommen eine lokale und transiente Immunsuppression.
8. Aktivierte Makrophagen, die nachträglich durch MCMV infiziert wurden, stellen einen Großteil ihrer Funktionen ein, produzieren aber deutlich verstärkt IL-1 β und IFN- γ . Diese Produktion könnte zu einer unspezifischen Aufrechterhaltung der Aktivierung des Immunsystems und zur Ausbildung des Antiviralen Zustands in den Zielzellen führen.

³ Dies gilt nicht für NK-Zellen in C57Bl/6 Mäusen, die das virale Protein m157 spezifisch über einen aktivierenden NK-Zellrezeptor (Ly49H) detektieren können [240]

9. Die Aktivierung des Immunsystems innerhalb der akuten Phase der MCMV-Infektion wird unterstützt durch die parakrinen Effekte der Infektion, die zur Aktivierung von uninfizierten Makrophagen, die im Kontakt zu infizierten Zellen stehen, führen.

4.7 Ausblick

Ausgangspunkt dieser Arbeit war, der Befund dass bei einer MCMV-Infektion Makrophagen *in vivo* keine Chemokine produzieren. Der zugrunde liegende Mechanismus wurde in dieser Arbeit *in vitro* untersucht.

Der Zusammenhang zwischen der MCMV-induzierten Paralyse der infizierten Monozyten und Makrophagen und die in der Literatur berichteten letalen Wirkungen von Superinfektionen im Anschluss an eine akute MCMV-Infektion erlauben die Schlussfolgerung des Auftretens einer lokalen transienten Immunsuppression. Zur endgültigen Klärung sind aufbauend auf den Ergebnissen dieser Arbeit Experimente im lebenden Organismus notwendig. Hierbei würde der Fokus auf der Untersuchung der frühen Immunantwort innerhalb der ersten 48 Stunden nach der MCMV-Infektion liegen, wobei gleichzeitig zu beachten ist, dass die paralytische Wirkung von MCMV auf Makrophagen und Monozyten vor allem in dem primären Gewebe der akuten Infektion zu untersuchen ist. Zu untersuchen wäre auch, welchen Beitrag die Paralyse im Rahmen einer natürlichen Infektion *in vivo* hat, deren horizontale Verbreitung vermutlich durch Bisse von infizierten Mäusen und durch deren infektiösen Speichel geschieht.

5 Zusammenfassung

Das Murine Zytomegalievirus (MCMV) ist ein an den murinen Wirtsorganismus hoch angepasstes Pathogen. Diese Anpassung führte zur Entwicklung von einer Vielfalt von Mechanismen, um der Erkennung und Elimination durch das Immunsystem des Wirts zu entgehen. Damit gelingt dem Virus nach der akuten Infektion des immunkompetenten Wirts die Etablierung einer lebenslang persistierenden Infektion, unter anderem in den Zellen der myeloiden Linie, wobei vor allem den zirkulierenden Monozyten eine wichtige Rolle zur Verbreitung des Virus im Wirtsorganismus zukommt. Die Aufgabe dieser Makrophagen ist die frühe Erkennung von Pathogenen über Oberflächenrezeptoren, die Freisetzung von Mediatoren und antimikrobielle Aktivitäten.

Die frühe Phase der Immunantwort gegen MCMV ist gekennzeichnet durch die Produktion von Chemokinen, die Effektorzellen rekrutieren und aktivieren. Eine der Hauptquellen der Mediatorenproduktion sind die Zellen der myeloiden Linie und Natürliche Killerzellen (NK-Zellen). In dieser Arbeit konnte erstmals auf Einzelzellebene gezeigt werden, dass MCMV Makrophagen infiziert und dabei mit der Produktion von löslichen Mediatoren wie Chemokinen und Zytokinen sowie essentiellen immunologischen Funktionen dieser Zellen interferiert.

In ruhenden Makrophagen wurde die Aktivierung und nachfolgende Produktion von Chemokinen (MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES und MCP-1), Zytokinen (IL-6, IL-12, IL-15, IL-18 und TNF- α) und Stickstoffmonoxidradikalen durch mikrobielle Bestandteile durch die Infektion mit MCMV blockiert. Diese Blockade durch MCMV wurde durch die Herabregulation der Oberflächenrezeptoren für die Erkennung der pathogenassoziierten Strukturen Toll-like Rezeptor 2 (TLR2) und TLR4 verursacht, was zu einem Stopp der Transkription der Chemokine führte.

Dies führte dazu, dass MCMV-infizierte Zellen Chemokine sowie einige Zytokine nicht mehr produzieren konnten, die zur Ausbildung einer effektiven T_{H1}-Zellantwort notwendig sind. In aktivierten Makrophagen wurde durch MCMV die bereits eingesetzte Produktion der löslichen Mediatoren herabreguliert. Die MCMV-infizierten Makrophagen sind daher hinsichtlich der Erkennung und Elimination von Pathogenen und der nachfolgenden Immunantwort paralysiert.

MCMV interferiert ebenfalls mit anderen essentiellen Funktionen der Makrophagen wie der Phagozytose von Dextran und der Expression von immunologisch relevanten Oberflächenmarkern (CD29, CD80, CD86 und CD115). Damit umfasst die MCMV-induzierte Paralyse der Makrophagen die drei funktionellen Hauptbereiche dieser Zellen: die interzelluläre Kommunikation (und Kostimulation), die Pathogenerkennung und die mikrobiziden Aktivitäten zur Pathogenbeseitigung. MCMV entgeht dadurch der primären Immunantwort trotz einer kurzzeitigen lokalen Aktivierung des Immunsystems, um durch die Mobilität der Makrophagen bzw. Monozyten in immunologisch privilegierte Regionen zu gelangen. Innerhalb der akuten primären Infektion könnte eine lokale, transiente Immunsuppression ein wichtiger Mechanismus zur viralen Verbreitung im Wirt sein.

Die Ergebnisse dieser Arbeit beschreiben einen möglichen Mechanismus, der die beobachtete transiente Immunsuppression in akut MCMV-infizierten Mäusen erklärt.

6 summary

The murine cytomegalovirus (MCMV) is a highly adapted pathogen and has developed numerous strategies to escape the host immune response. Using different escape mechanisms the virus is able to establish a lifelong persistent infection in immunocompetent hosts. Amongst others, myeloid cells are latently infected. Part of the latently infected cells are circulating monocytes, which play an important role in virus dissemination. The main functions of monocytes and macrophages are the early recognition of pathogens with respective surface receptors, the secretion of soluble mediators and other antimicrobial activities.

The early phase of the immune response against MCMV is characterized by the production of chemokines which subsequently recruit and activate effector cells. One of the main sources of chemokines are myeloid cells and natural killer cells. In the current work it was shown for the first time at the single cell level that MCMV infects macrophages and thereby impairs the production of chemokines, cytokines and other essential immunological functions.

MCMV blocked the activation of resting macrophages by microbial substances and the subsequent production of chemokines (MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES and MCP-1), cytokines (IL-6, IL-12, IL-15, IL-18 and TNF- α) and nitric oxid. The blockade by MCMV was achieved by downregulating of the surface receptors TLR2 (toll like receptor 2) and TLR4 leading to a stop of chemokine gene transcription. Hence MCMV infected macrophages were not able to produce chemokines and cytokines necessary for an effective T_{H1}-immune response. In activated macrophages MCMV downregulated the ongoing production of the above mentioned soluble mediators. Additionally, MCMV interfered with other essential macrophage functions: the phagocytosis of dextran and the expression of immunological important surface receptors (CD29, CD80, CD86 and CD115).

MCMV infected macrophages are therefore paralysed with respect to the recognition and elimination of microbial pathogens. Thus the MCMV induced paralysis of macrophages affects three main functions of phagocytes: the intercellular communication (and costimulation), the detection of pathogens and antimicrobial activities.

Using these strategies MCMV is able to evade the primary immune response despite a short-time and local immune activation and uses the mobility of monocytes and macrophages to disseminate and reach immunological privileged sites in the host. As a result, an acute infection could lead to a local and transient immune suppression that might be an important strategy of viral dissemination. The results of this work describe a possible mechanism which may explain the transient immune suppression observed in acute MCMV infected mice.

7 Literaturverzeichnis

1. Karnovsky, M.L., *Metchnikoff in Messina: a century of studies on phagocytosis*. N Engl J Med, 1981. **304**(19): p. 1178-80.
2. van Furth, R., et al., [*Mononuclear phagocytic system: new classification of macrophages, monocytes and of their cell line*]. Bull World Health Organ, 1972. **47**(5): p. 651-8.
3. van Furth, R. and Z.A. Cohn, *The origin and kinetics of mononuclear phagocytes*. J Exp Med, 1968. **128**(3): p. 415-35.
4. Ross, J.A., Auger, M.J., *The biology of the macrophage*, in *The Macrophage*, B. Burke, Lewis, E.L., Editor. 2002, Oxford University Press: New York. p. 1 - 57.
5. van Furth, R., M.C. Diesselhoff-den Dulk, and H. Mattie, *Quantitative study on the production and kinetics of mononuclear phagocytes during an acute inflammatory reaction*. J Exp Med, 1973. **138**(6): p. 1314-30.
6. Quesniaux, V.F.J. and T.C. Jones, *Granulocyte-macrophage colony stimulating factor*. In Thomson, A. (ed.), in *The Cytokine Handbook* 1998. p. 635-70.
7. Flanagan, A.M. and C.S. Lader, *Update on the biologic effects of macrophage colony-stimulating factor*. Curr Opin Hematol, 1998. **5**(3): p. 181-5.
8. Motoyoshi, K., *Biological activities and clinical application of M-CSF*. Int J Hematol, 1998. **67**(2): p. 109-22.
9. Hanson, L.K. and A.E. Campbell, *Determinants of Macrophage Tropism: Macrophage differentiation*, in *Cytomegalovirus: Molecular biology and Immunology*, M.J. Reddehase, Editor. 2006, Caister Academic Press: Norfolk. p. 423-424.
10. Mosser, D.M., *The many faces of macrophage activation*. J Leukoc Biol, 2003. **73**(2): p. 209-12.
11. Serbina, N.V., et al., *Monocyte-mediated defense against microbial pathogens*. Annu Rev Immunol, 2008. **26**: p. 421-52.
12. Wright, S.D., et al., *CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein*. Science, 1990. **249**(4975): p. 1431-3.
13. Pugin, J., et al., *CD14 is a pattern recognition receptor*. Immunity, 1994. **1**(6): p. 509-16.
14. Pugin, J., et al., *Cell activation mediated by glycosylphosphatidylinositol-anchored or transmembrane forms of CD14*. Infect Immun, 1998. **66**(3): p. 1174-80.
15. Kurt-Jones, E.A., et al., *Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus*. Nat Immunol, 2000. **1**(5): p. 398-401.
16. Compton, T., et al., *Human cytomegalovirus activates inflammatory cytokine responses via CD14 and Toll-like receptor 2*. J Virol, 2003. **77**(8): p. 4588-96.
17. Lee, H.K., et al., *Double-stranded RNA-mediated TLR3 activation is enhanced by CD14*. Immunity, 2006. **24**(2): p. 153-63.
18. Finberg, R.W. and E.A. Kurt-Jones, *CD14: chaperone or matchmaker?* Immunity, 2006. **24**(2): p. 127-9.
19. van den Berg, T.K. and G. Kraal, *A function for the macrophage F4/80 molecule in tolerance induction*. Trends Immunol, 2005. **26**(10): p. 506-9.

20. Kirby, A.C., J.G. Raynes, and P.M. Kaye, *CD11b regulates recruitment of alveolar macrophages but not pulmonary dendritic cells after pneumococcal challenge*. J Infect Dis, 2006. **193**(2): p. 205-13.
21. Tabora, C.P. and A. Casadevall, *CR3 (CD11b/CD18) and CR4 (CD11c/CD18) are involved in complement-independent antibody-mediated phagocytosis of Cryptococcus neoformans*. Immunity, 2002. **16**(6): p. 791-802.
22. Van Spriël, A.B., et al., *Mac-1 (CD11b/CD18) as accessory molecule for Fc alpha R (CD89) binding of IgA*. J Immunol, 2002. **169**(7): p. 3831-6.
23. Jongstra-Bilen, J., R. Harrison, and S. Grinstein, *Fcgamma-receptors induce Mac-1 (CD11b/CD18) mobilization and accumulation in the phagocytic cup for optimal phagocytosis*. J Biol Chem, 2003. **278**(46): p. 45720-9.
24. Oliva, C.R., et al., *The integrin Mac-1 (CR3) mediates internalization and directs Bacillus anthracis spores into professional phagocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(4): p. 1261-6.
25. Noubir, S., Z. Hmama, and N.E. Reiner, *Dual receptors and distinct pathways mediate interleukin-1 receptor-associated kinase degradation in response to lipopolysaccharide. Involvement of CD14/TLR4, CR3, and phosphatidylinositol 3-kinase*. J Biol Chem, 2004. **279**(24): p. 25189-95.
26. Ingalls, R.R., M.A. Arnaout, and D.T. Golenbock, *Outside-in signaling by lipopolysaccharide through a tailless integrin*. J Immunol, 1997. **159**(1): p. 433-8.
27. Moreland, J.G., et al., *CD11b and intercellular adhesion molecule-1 are involved in pulmonary neutrophil recruitment in lipopolysaccharide-induced airway disease*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2002. **27**(4): p. 474-80.
28. Ehrichiou, D., et al., *CD11b facilitates the development of peripheral tolerance by suppressing Th17 differentiation*. J Exp Med, 2007. **204**(7): p. 1519-24.
29. Zirlik, A., et al., *CD40 ligand mediates inflammation independently of CD40 by interaction with Mac-1*. Circulation, 2007. **115**(12): p. 1571-80.
30. Takahara, K., et al., *Functional comparison of the mouse DC-SIGN, SIGNR1, SIGNR3 and Langerin, C-type lectins*. Int Immunol, 2004. **16**(6): p. 819-29.
31. Girardin, S.E., et al., *Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan*. Science, 2003. **300**(5625): p. 1584-7.
32. Chamaillard, M., et al., *An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid*. Nat Immunol, 2003. **4**(7): p. 702-7.
33. Yoneyama, M., et al., *The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses*. Nat Immunol, 2004. **5**(7): p. 730-7.
34. Kang, D.C., et al., *mda-5: An interferon-inducible putative RNA helicase with double-stranded RNA-dependent ATPase activity and melanoma growth-suppressive properties*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(2): p. 637-42.
35. Barton, G.M., *Viral recognition by Toll-like receptors*. Semin Immunol, 2007. **19**(1): p. 33-40.
36. Takeda, K. and S. Akira, *Toll-like receptors in innate immunity*. Int Immunol, 2005. **17**(1): p. 1-14.

37. Underhill, D.M., et al., *The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens*. Nature, 1999. **401**(6755): p. 811-5.
38. Dunzendorfer, S., et al., *TLR4 is the signaling but not the lipopolysaccharide uptake receptor*. J Immunol, 2004. **173**(2): p. 1166-70.
39. Zhou, H., et al., *Lipopolysaccharide could be internalized into human peripheral blood mononuclear cells and elicit TNF-alpha release, but not via the pathway of toll-like receptor 4 on the cell surface*. Cell Mol Immunol, 2004. **1**(5): p. 373-7.
40. Blander, J.M. and R. Medzhitov, *Regulation of phagosome maturation by signals from toll-like receptors*. Science, 2004. **304**(5673): p. 1014-8.
41. Gohda, J., T. Matsumura, and J. Inoue, *Cutting edge: TNFR-associated factor (TRAF) 6 is essential for MyD88-dependent pathway but not toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor-inducing IFN-beta (TRIF)-dependent pathway in TLR signaling*. J Immunol, 2004. **173**(5): p. 2913-7.
42. Kawai, T., et al., *Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin*. Immunity, 1999. **11**(1): p. 115-22.
43. Kawai, T., et al., *Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes*. J Immunol, 2001. **167**(10): p. 5887-94.
44. Toshchakov, V., et al., *TLR4, but not TLR2, mediates IFN-beta-induced STAT1alpha/beta-dependent gene expression in macrophages*. Nat Immunol, 2002. **3**(4): p. 392-8.
45. Doyle, S., et al., *IRF3 mediates a TLR3/TLR4-specific antiviral gene program*. Immunity, 2002. **17**(3): p. 251-63.
46. Janeway, C.A., Jr. and R. Medzhitov, *Innate immune recognition*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 197-216.
47. Severa, M. and K.A. Fitzgerald, *TLR-mediated activation of type I IFN during antiviral immune responses: fighting the battle to win the war*. Curr Top Microbiol Immunol, 2007. **316**: p. 167-92.
48. Banchereau, J. and R.M. Steinman, *Dendritic cells and the control of immunity*. Nature, 1998. **392**(6673): p. 245-52.
49. Pasare, C. and R. Medzhitov, *Toll-like receptors and acquired immunity*. Semin Immunol, 2004. **16**(1): p. 23-6.
50. Tu, Z., et al., *TLR-dependent cross talk between human Kupffer cells and NK cells*. J Exp Med, 2008. **205**(1): p. 233-44.
51. Hou, B., B. Reizis, and A.L. DeFranco, *Toll-like Receptors Activate Innate and Adaptive Immunity by using Dendritic Cell-Intrinsic and -Extrinsic Mechanisms*. Immunity, 2008. **29**(2): p. 272-82.
52. Akira, S. and K. Takeda, *Toll-like receptor signalling*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(7): p. 499-511.
53. Liew, F.Y., et al., *Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(6): p. 446-58.

54. Kawai, T. and S. Akira, *Innate immune recognition of viral infection*. Nat Immunol, 2006. **7**(2): p. 131-7.
55. Dolken, L., et al., *Mouse cytomegalovirus microRNAs dominate the cellular small RNA profile during lytic infection and show features of posttranscriptional regulation*. J Virol, 2007. **81**(24): p. 13771-82.
56. Stetson, D.B. and R. Medzhitov, *Type I interferons in host defense*. Immunity, 2006. **25**(3): p. 373-81.
57. Bowie, A., et al., *A46R and A52R from vaccinia virus are antagonists of host IL-1 and toll-like receptor signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(18): p. 10162-7.
58. Stack, J., et al., *Vaccinia virus protein A46R targets multiple Toll-like-interleukin-1 receptor adaptors and contributes to virulence*. J Exp Med, 2005. **201**(6): p. 1007-18.
59. Li, K., et al., *Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(8): p. 2992-7.
60. Mack, C., et al., *Inhibition of proinflammatory and innate immune signaling pathways by a cytomegalovirus RIP1-interacting protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(8): p. 3094-9.
61. Hoshino, K., et al., *Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product*. J Immunol, 1999. **162**(7): p. 3749-52.
62. Chuang, T.H. and R.J. Ulevitch, *Triad3A, an E3 ubiquitin-protein ligase regulating Toll-like receptors*. Nat Immunol, 2004. **5**(5): p. 495-502.
63. Smith, A.D., *Phagolysosome*, in *Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology*, A.D. Smith, Editor. 2000, Oxford University press: Oxford.
64. Romagnani, S., *Regulation of the T cell response*. Clin Exp Allergy, 2006. **36**(11): p. 1357-66.
65. Zhu, J. and W.E. Paul, *CD4 T cells: fates, functions, and faults*. Blood, 2008. **112**(5): p. 1557-69.
66. Lichtman, A.H. and A.K. Abbas, *T-cell subsets: recruiting the right kind of help*. Curr Biol, 1997. **7**(4): p. R242-4.
67. Ato, M., et al., *Localization of marginal zone macrophages is regulated by C-C chemokine ligands 21/19*. J Immunol, 2004. **173**(8): p. 4815-20.
68. Vilcek, J., *The cytokines: an overview*, in *The Cytokine Handbook*, A. Thomson, Editor. 2003, Academic Press: London. p. 3-18.
69. O'Garra, A. and N. Arai, *The molecular basis of T helper 1 and T helper 2 cell differentiation*. Trends Cell Biol, 2000. **10**(12): p. 542-50.
70. Rengarajan, J., S.J. Szabo, and L.H. Glimcher, *Transcriptional regulation of Th1/Th2 polarization*. Immunol Today, 2000. **21**(10): p. 479-83.
71. *Chemokine/chemokine receptor nomenclature*. J Leukoc Biol, 2001. **70**(3): p. 465-6.
72. Murphy, P.M., et al., *International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors*. Pharmacol Rev, 2000. **52**(1): p. 145-76.
73. Murphy, P.M., *International Union of Pharmacology. XXX. Update on chemokine receptor nomenclature*. Pharmacol Rev, 2002. **54**(2): p. 227-9.

74. Baggiolini, M., *Introduction*, in *Chemokine Biology – Basic Research and Clinical Application, Volume I: Immunobiology of Chemokines*, B. Moser, G.L. Letts, and K. Neote, Editors. 2006, Birkhäuser Verlag, Basel. p. 3-15.
75. Janeway, C.A., Jr., et al., *Appendix IV: Chemokines and their receptors*, in *Immunobiology*. 2001, Garland Publishing: New York.
76. Salazar-Mather, T.P., J.S. Orange, and C.A. Biron, *Early murine cytomegalovirus (MCMV) infection induces liver natural killer (NK) cell inflammation and protection through macrophage inflammatory protein 1alpha (MIP-1alpha)-dependent pathways*. *J Exp Med*, 1998. **187**(1): p. 1-14.
77. Thelen, M., *Dancing to the tune of chemokines*. *Nat Immunol*, 2001. **2**(2): p. 129-34.
78. Loetscher, P., et al., *Interleukin-2 regulates CC chemokine receptor expression and chemotactic responsiveness in T lymphocytes*. *J Exp Med*, 1996. **184**(2): p. 569-77.
79. Bonecchi, R., et al., *Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s*. *J Exp Med*, 1998. **187**(1): p. 129-34.
80. Sallusto, F., et al., *Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes*. *J Exp Med*, 1998. **187**(6): p. 875-83.
81. Dorner, B.G., et al., *MIP-1alpha, MIP-1beta, RANTES, and ATAC/lymphotactin function together with IFN-gamma as type 1 cytokines*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(9): p. 6181-6.
82. Karpus, W.J., et al., *Differential CC chemokine-induced enhancement of T helper cell cytokine production*. *J Immunol*, 1997. **158**(9): p. 4129-36.
83. Gangur, V., F.E. Simons, and K.T. Hayglass, *Human IP-10 selectively promotes dominance of polyclonally activated and environmental antigen-driven IFN-gamma over IL-4 responses*. *FASEB J*, 1998. **12**(9): p. 705-13.
84. Romagnani, P., et al., *CXCR3-mediated opposite effects of CXCL10 and CXCL4 on TH1 or TH2 cytokine production*. *J Allergy Clin Immunol*, 2005. **116**(6): p. 1372-9.
85. Terhune, S.S., J. Schroer, and T. Shenk, *RNAs are packaged into human cytomegalovirus virions in proportion to their intracellular concentration*. *J Virol*, 2004. **78**(19): p. 10390-8.
86. Mocarski, E.S., Shenk, T., Pass, R. F., *Cytomegaloviruses*, in *Field's Virology*, D.M. Knipe, Howley, P. M., Editor. 2007, Lippincott Williams & Wilkins. p. 2703 - 2773.
87. Mitchell, B.M., A. Leung, and J.G. Stevens, *Murine cytomegalovirus DNA in peripheral blood of latently infected mice is detectable only in monocytes and polymorphonuclear leukocytes*. *Virology*, 1996. **223**(1): p. 198-207.
88. Koffron, A.J., et al., *Cellular localization of latent murine cytomegalovirus*. *J Virol*, 1998. **72**(1): p. 95-103.
89. Pollock, J.L. and H.W.t. Virgin, *Latency, without persistence, of murine cytomegalovirus in the spleen and kidney*. *J Virol*, 1995. **69**(3): p. 1762-8.
90. Campbell, A.E., V.J. Cavanaugh, and J.S. Slater, *The salivary glands as a privileged site of cytomegalovirus immune evasion and persistence*. *Med Microbiol Immunol*, 2008.
91. Barbara, J.A. and G.E. Tegtmeier, *Cytomegalovirus and blood transfusion*. *Blood Rev*, 1987. **1**(3): p. 207-11.

92. Britt, W., *Acquisition of HCMV: Sources of virus and transmission within populations*. Human Herpesvirus - Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis, ed. M.E. Arvin AM, Moore P. 2007, Cambridge: Cambridge Press.
93. Diosi, P., *Cytomegalovirus (CMV) in cervical secretion and breast milk. A thirty years perspective*. Roum Arch Microbiol Immunol, 1997. **56**(3-4): p. 165-78.
94. Ho, M., *Epidemiology of cytomegalovirus infections*. Rev Infect Dis, 1990. **12 Suppl 7**: p. S701-10.
95. McDonagh, S., et al., *Patterns of human cytomegalovirus infection in term placentas: a preliminary analysis*. J Clin Virol, 2006. **35**(2): p. 210-5.
96. Woolf, N.K., D.V. Jaquish, and F.J. Koehn, *Transplacental murine cytomegalovirus infection in the brain of SCID mice*. Virol J, 2007. **4**: p. 26.
97. Hummel, M., et al., *Allogeneic transplantation induces expression of cytomegalovirus immediate-early genes in vivo: a model for reactivation from latency*. J Virol, 2001. **75**(10): p. 4814-22.
98. Peacock, C.D. and P. Price, *The role of IL-12 in the control of MCMV is fundamentally different in mice with a retroviral immunodeficiency syndrome (MAIDS)*. Immunol Cell Biol, 1999. **77**(2): p. 131-8.
99. Steininger, C., *Clinical relevance of cytomegalovirus infection in patients with disorders of the immune system*. Clin Microbiol Infect, 2007. **13**(10): p. 953-63.
100. Grangeot-Keros, L., et al., *Value of cytomegalovirus (CMV) IgG avidity index for the diagnosis of primary CMV infection in pregnant women*. J Infect Dis, 1997. **175**(4): p. 944-6.
101. Hizel, S., S. Parker, and U. Onde, *Seroprevalence of cytomegalovirus infection among children and females in Ankara, Turkey, 1995*. Pediatr Int, 1999. **41**(5): p. 506-9.
102. Hudson, J.B., *The murine cytomegalovirus as a model for the study of viral pathogenesis and persistent infections*. Arch Virol, 1979. **62**(1): p. 1-29.
103. Kelsey, D.K., et al., *Alteration of host defense mechanisms by murine cytomegalovirus infection*. Infect Immun, 1977. **18**(3): p. 754-60.
104. Szomolanyi-Tsuda, E., et al., *Role for TLR2 in NK cell-mediated control of murine cytomegalovirus in vivo*. J Virol, 2006. **80**(9): p. 4286-91.
105. Welsh, R.M., et al., *Natural killer (NK) cell response to virus infections in mice with severe combined immunodeficiency. The stimulation of NK cells and the NK cell-dependent control of virus infections occur independently of T and B cell function*. J Exp Med, 1991. **173**(5): p. 1053-63.
106. Arase, H., et al., *Direct recognition of cytomegalovirus by activating and inhibitory NK cell receptors*. Science, 2002. **296**(5571): p. 1323-6.
107. Smith, H.R., et al., *Recognition of a virus-encoded ligand by a natural killer cell activation receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(13): p. 8826-31.
108. Krug, A., et al., *TLR9-dependent recognition of MCMV by IPC and DC generates coordinated cytokine responses that activate antiviral NK cell function*. Immunity, 2004. **21**(1): p. 107-19.

109. Tabeta, K., et al., *Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(10): p. 3516-21.
110. Munks, M.W., et al., *Viral interference with antigen presentation does not alter acute or chronic CD8 T cell immunodominance in murine cytomegalovirus infection*. J Immunol, 2007. **178**(11): p. 7235-41.
111. Doherty, P.C., J.M. Riberdy, and G.T. Belz, *Quantitative analysis of the CD8+ T-cell response to readily eliminated and persistent viruses*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2000. **355**(1400): p. 1093-101.
112. Andrews, D.M., et al., *The early kinetics of cytomegalovirus-specific CD8+ T cell responses are not affected by antigen load or the absence of perforin or IFN- γ* . J Virol, 2008.
113. Jonjic, S., et al., *Efficacious control of cytomegalovirus infection after long-term depletion of CD8+ T lymphocytes*. J Virol, 1990. **64**(11): p. 5457-64.
114. Jonjic, S., et al., *Site-restricted persistent cytomegalovirus infection after selective long-term depletion of CD4+ T lymphocytes*. J Exp Med, 1989. **169**(4): p. 1199-212.
115. Biron, C.A., et al., *Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines*. Annu Rev Immunol, 1999. **17**: p. 189-220.
116. Lanier, L.L., *Turning on natural killer cells*. J Exp Med, 2000. **191**(8): p. 1259-62.
117. Salazar-Mather, T.P., T.A. Hamilton, and C.A. Biron, *A chemokine-to-cytokine-to-chemokine cascade critical in antiviral defense*. J Clin Invest, 2000. **105**(7): p. 985-93.
118. Salazar-Mather, T.P., C.A. Lewis, and C.A. Biron, *Type I interferons regulate inflammatory cell trafficking and macrophage inflammatory protein 1 α delivery to the liver*. J Clin Invest, 2002. **110**(3): p. 321-30.
119. Amichay, D., et al., *Genes for chemokines MuMig and Crg-2 are induced in protozoan and viral infections in response to IFN- γ with patterns of tissue expression that suggest nonredundant roles in vivo*. J Immunol, 1996. **157**(10): p. 4511-20.
120. Liu, M.T., et al., *Expression of Mig (monokine induced by interferon- γ) is important in T lymphocyte recruitment and host defense following viral infection of the central nervous system*. J Immunol, 2001. **166**(3): p. 1790-5.
121. Koszinowski, U.H., M. Del Val, and M.J. Reddehase, *Cellular and molecular basis of the protective immune response to cytomegalovirus infection*. Curr Top Microbiol Immunol, 1990. **154**: p. 189-220.
122. Gold, M.C., et al., *Murine cytomegalovirus interference with antigen presentation has little effect on the size or the effector memory phenotype of the CD8 T cell response*. J Immunol, 2004. **172**(11): p. 6944-53.
123. Rollins, B.J., *Monocyte chemoattractant protein 1: a potential regulator of monocyte recruitment in inflammatory disease*. Mol Med Today, 1996. **2**(5): p. 198-204.
124. Fuentes, M.E., et al., *Controlled recruitment of monocytes and macrophages to specific organs through transgenic expression of monocyte chemoattractant protein-1*. J Immunol, 1995. **155**(12): p. 5769-76.

125. Hokeness, K.L., et al., *Monocyte chemoattractant protein-1 and CCR2 interactions are required for IFN-alpha/beta-induced inflammatory responses and antiviral defense in liver*. J Immunol, 2005. **174**(3): p. 1549-56.
126. Salazar-Mather, T.P. and K.L. Hokeness, *Cytokine and chemokine networks: pathways to antiviral defense*. Curr Top Microbiol Immunol, 2006. **303**: p. 29-46.
127. Hengel, H., et al., *Restoration of cytomegalovirus antigen presentation by gamma interferon combats viral escape*. J Virol, 1994. **68**(1): p. 289-97.
128. Orange, J.S., et al., *Mechanisms for virus-induced liver disease: tumor necrosis factor-mediated pathology independent of natural killer and T cells during murine cytomegalovirus infection*. J Virol, 1997. **71**(12): p. 9248-58.
129. Lucin, P., et al., *Late phase inhibition of murine cytomegalovirus replication by synergistic action of interferon-gamma and tumour necrosis factor*. J Gen Virol, 1994. **75 (Pt 1)**: p. 101-10.
130. Kavanagh, D.G., et al., *The multiple immune-evasion genes of murine cytomegalovirus are not redundant: m4 and m152 inhibit antigen presentation in a complementary and cooperative fashion*. J Exp Med, 2001. **194**(7): p. 967-78.
131. Pinto, A.K., et al., *Coordinated function of murine cytomegalovirus genes completely inhibits CTL lysis*. J Immunol, 2006. **177**(5): p. 3225-34.
132. Reusch, U., et al., *A cytomegalovirus glycoprotein re-routes MHC class I complexes to lysosomes for degradation*. EMBO J, 1999. **18**(4): p. 1081-91.
133. Ziegler, H., et al., *A mouse cytomegalovirus glycoprotein retains MHC class I complexes in the ERGIC/cis-Golgi compartments*. Immunity, 1997. **6**(1): p. 57-66.
134. Lu, X., et al., *Murine cytomegalovirus interference with antigen presentation contributes to the inability of CD8 T cells to control virus in the salivary gland*. J Virol, 2006. **80**(8): p. 4200-2.
135. Krmpotic, A., et al., *MCMV glycoprotein gp40 confers virus resistance to CD8+ T cells and NK cells in vivo*. Nat Immunol, 2002. **3**(6): p. 529-35.
136. Loewendorf, A., et al., *Identification of a mouse cytomegalovirus gene selectively targeting CD86 expression on antigen-presenting cells*. J Virol, 2004. **78**(23): p. 13062-71.
137. Zimmermann, A., et al., *A cytomegaloviral protein reveals a dual role for STAT2 in IFN- γ signaling and antiviral responses*. J Exp Med, 2005. **201**(10): p. 1543-53.
138. Mintern, J.D., et al., *Viral interference with B7-1 costimulation: a new role for murine cytomegalovirus fc receptor-1*. J Immunol, 2006. **177**(12): p. 8422-31.
139. Hasan, M., et al., *Selective down-regulation of the NKG2D ligand H60 by mouse cytomegalovirus m155 glycoprotein*. J Virol, 2005. **79**(5): p. 2920-30.
140. Lodoen, M.B., et al., *The cytomegalovirus m155 gene product subverts natural killer cell antiviral protection by disruption of H60-NKG2D interactions*. J Exp Med, 2004. **200**(8): p. 1075-81.
141. Krmpotic, A., et al., *NK cell activation through the NKG2D ligand MULT-1 is selectively prevented by the glycoprotein encoded by mouse cytomegalovirus gene m145*. J Exp Med, 2005. **201**(2): p. 211-20.

142. Singh, R., E. Haghjoo, and F. Liu, *Cytomegalovirus M43 gene modulates T helper cell response*. Immunol Lett, 2003. **88**(1): p. 31-5.
143. MacDonald, M.R., X.Y. Li, and H.W.t. Virgin, *Late expression of a beta chemokine homolog by murine cytomegalovirus*. J Virol, 1997. **71**(2): p. 1671-8.
144. Davis-Poynter, N.J., M. Degli-Esposti, and H.E. Farrell, *Murine cytomegalovirus homologues of cellular immunomodulatory genes*. Intervirology, 1999. **42**(5-6): p. 331-41.
145. Davis-Poynter, N.J., et al., *Identification and characterization of a G protein-coupled receptor homolog encoded by murine cytomegalovirus*. J Virol, 1997. **71**(2): p. 1521-9.
146. Melnychuk, R.M., et al., *Mouse cytomegalovirus M33 is necessary and sufficient in virus-induced vascular smooth muscle cell migration*. J Virol, 2005. **79**(16): p. 10788-95.
147. Froberg, M.K., et al., *Murine cytomegalovirus infection markedly reduces serum MCP-1 levels in MCP-1 transgenic mice*. Ann Clin Lab Sci, 2006. **36**(2): p. 179-84.
148. Compton, T., *Receptors and immune sensors: the complex entry path of human cytomegalovirus*. Trends Cell Biol, 2004. **14**(1): p. 5-8.
149. Wang, X., et al., *Epidermal growth factor receptor is a cellular receptor for human cytomegalovirus*. Nature, 2003. **424**(6947): p. 456-61.
150. Jarvis, M.A. and J.A. Nelson, *Human cytomegalovirus persistence and latency in endothelial cells and macrophages*. Curr Opin Microbiol, 2002. **5**(4): p. 403-7.
151. Hanson, L.K. and A.E. Campbell, *Determinants of Macrophage Tropism: Viral determinants of macrophage tropism: specif CMV gene products*, in *Cytomegalovirus: Molecular biology and Immunology*, M.J. Reddehase, Editor. 2006, Caister Academic Press: Norfolk. p. 430-437.
152. Menard, C., et al., *Role of murine cytomegalovirus US22 gene family members in replication in macrophages*. J Virol, 2003. **77**(10): p. 5557-70.
153. Brune, W., et al., *A ribonucleotide reductase homolog of cytomegalovirus and endothelial cell tropism*. Science, 2001. **291**(5502): p. 303-5.
154. Oliveira, S.A. and T.E. Shenk, *Murine cytomegalovirus M78 protein, a G protein-coupled receptor homologue, is a constituent of the virion and facilitates accumulation of immediate-early viral mRNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(6): p. 3237-42.
155. Karabekian, Z., et al., *Complex formation among murine cytomegalovirus US22 proteins encoded by genes M139, M140, and M141*. J Virol, 2005. **79**(6): p. 3525-35.
156. Gredmark, S., T. Tilburgs, and C. Soderberg-Naucler, *Human cytomegalovirus inhibits cytokine-induced macrophage differentiation*. J Virol, 2004. **78**(19): p. 10378-89.
157. Smith, M.S., et al., *HCMV activates PI(3)K in monocytes and promotes monocyte motility and transendothelial migration in a PI(3)K-dependent manner*. J Leukoc Biol, 2004. **76**(1): p. 65-76.
158. Redpath, S., et al., *Murine cytomegalovirus infection down-regulates MHC class II expression on macrophages by induction of IL-10*. J Immunol, 1999. **162**(11): p. 6701-7.
159. Odeberg, J. and C. Soderberg-Naucler, *Reduced expression of HLA class II molecules and interleukin-10- and transforming growth factor beta1-independent suppression of T-cell proliferation in human cytomegalovirus-infected macrophage cultures*. J Virol, 2001. **75**(11): p. 5174-81.

160. Yerkovich, S.T., et al., *The roles of tumour necrosis factor-alpha, interleukin-1 and interleukin-12 in murine cytomegalovirus infection*. Immunology, 1997. **91**(1): p. 45-52.
161. Popkin, D.L. and H.W.t. Virgin, *Murine cytomegalovirus infection inhibits tumor necrosis factor alpha responses in primary macrophages*. J Virol, 2003. **77**(18): p. 10125-30.
162. Gribaudo, G., et al., *Interferon-alpha inhibits the murine cytomegalovirus immediate-early gene expression by down-regulating NF-kappa B activity*. Virology, 1995. **211**(1): p. 251-60.
163. Dorner, B.G., et al., *Coordinate expression of cytokines and chemokines by NK cells during murine cytomegalovirus infection*. J Immunol, 2004. **172**(5): p. 3119-31.
164. Todaro, G.J. and H. Green, *Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines*. J Cell Biol, 1963. **17**: p. 299-313.
165. Puck, T.T., S.J. Cieciura, and A. Robinson, *Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects*. J Exp Med, 1958. **108**(6): p. 945-56.
166. Graham, F.L., et al., *Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5*. J Gen Virol, 1977. **36**(1): p. 59-74.
167. Mael, J. and V. Defendi, *Infection and transformation of mouse peritoneal macrophages by simian virus 40*. J Exp Med, 1971. **134**(2): p. 335-50.
168. Ralph, P. and I. Nakoinz, *Phagocytosis and cytolysis by a macrophage tumour and its cloned cell line*. Nature, 1975. **257**(5525): p. 393-4.
169. Jainchill, J.L., S.A. Aaronson, and G.J. Todaro, *Murine sarcoma and leukemia viruses: assay using clonal lines of contact-inhibited mouse cells*. J Virol, 1969. **4**(5): p. 549-53.
170. O'Connell, K.A. and M. Edidin, *A mouse lymphoid endothelial cell line immortalized by simian virus 40 binds lymphocytes and retains functional characteristics of normal endothelial cells*. J Immunol, 1990. **144**(2): p. 521-5.
171. Little, C., *Report of the Committee on Genetic Form and Nomenclature*. The American Naturalist, 1921. **55**(637): p. 175-178.
172. Takeuchi, O., et al., *Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components*. Immunity, 1999. **11**(4): p. 443-51.
173. Henry, S.C., et al., *Enhanced green fluorescent protein as a marker for localizing murine cytomegalovirus in acute and latent infection*. J Virol Methods, 2000. **89**(1-2): p. 61-73.
174. Ghazal, P., et al., *Elimination of ie1 significantly attenuates murine cytomegalovirus virulence but does not alter replicative capacity in cell culture*. J Virol, 2005. **79**(11): p. 7182-94.
175. Wagner, M., et al., *Systematic excision of vector sequences from the BAC-cloned herpesvirus genome during virus reconstitution*. J Virol, 1999. **73**(8): p. 7056-60.
176. Fischer, H.G., et al., *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-cultured bone marrow-derived macrophages reveal accessory cell function and synthesis of MHC class II determinants in the absence of external stimuli*. Eur J Immunol, 1988. **18**(8): p. 1151-8.
177. Kopydlowski, K.M., et al., *Regulation of macrophage chemokine expression by lipopolysaccharide in vitro and in vivo*. J Immunol, 1999. **163**(3): p. 1537-44.
178. Phillips, H.J. and J.E. Terryberry, *Counting actively metabolizing tissue cultured cells*. Exp Cell Res, 1957. **13**(2): p. 341-7.

179. Sinickas, V.G., R.B. Ashman, and R.V. Blanden, *The cytotoxic response to murine cytomegalovirus: requirements for the generation of MCMV-specific target cells*. Immunol Cell Biol, 1987. **65 (Pt 2)**: p. 173-82.
180. Brune, W., H. Hengel, and U. Koszinowski, *A Mouse Model for Cytomegalovirus Infection*, in *Current Protocols in Immunology*. 1999, Wiley Interscience: Hoboken, NJ, USA. p. 19.7.1 - 19.7.13.
181. Goding, J.W., *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*. 3rd ed, ed. J.W. Goding. 1996, San Diego: Academic Press.
182. Haugland, R.P., *Antibodies as Cell Biology Tools*, in *Current Protocols in Cell Biology*, M.D. .S. Bonifacino, J. Lippincott-Schwartz, J.B. Harford and K.M. Yamada, Editor. 2000, John Wiley and Sons. p. 16.5.1–16.5.22.
183. Herzenberg, L.A. and R.G. Sweet, *Fluorescence-activated cell sorting*. Sci Am, 1976. **234(3)**: p. 108-17.
184. Darzynkiewicz, Z., in *Methods in Cell Biology*, C.H. Robinson JP, Editor. 2001, Academic Press: San Diego.
185. Melamed, M., *Flow Cytometry and Sorting*. 2nd ed, ed. M. Melamed, Lindmo T., Mendelsohn ML. 1990, New York: Wiley-Liss, Inc. 824.
186. Shapiro, H., *Practical Flow Cytometry*. Vol. 3rd. 1995, New York: Wiley-Liss/John Wiley and Sons, Inc.
187. Holmes, K., Otten G., Yokoyama, WM, *Flow Cytometry Analysis Using the Becton Dickinson FACS Calibur*, in *Current Protocols in Immunology: Immunofluorescence and Cell Sorting*. 2001, John Wiley & Sons, Inc: New York. p. 5.4.1 - 5.4.22.
188. Carter, L.L. and S.L. Swain, *Single cell analyses of cytokine production*. Curr Opin Immunol, 1997. **9(2)**: p. 177-82.
189. Dorner, B.G., et al., *Single-cell analysis of the murine chemokines MIP-1alpha, MIP-1beta, RANTES and ATAC/lymphotactin by flow cytometry*. J Immunol Methods, 2003. **274(1-2)**: p. 83-91.
190. Klausner, R.D., J.G. Donaldson, and J. Lippincott-Schwartz, *Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure*. J Cell Biol, 1992. **116(5)**: p. 1071-80.
191. Rothman, J.E., *Mechanisms of intracellular protein transport*. Nature, 1994. **372(6501)**: p. 55-63.
192. Sander, B., J. Andersson, and U. Andersson, *Assessment of cytokines by immunofluorescence and the paraformaldehyde-saponin procedure*. Immunol Rev, 1991. **119**: p. 65-93.
193. Murray, N.E., S.A. Bruce, and K. Murray, *Molecular cloning of the DNA ligase gene from bacteriophage T4. II. Amplification and preparation of the gene product*. J Mol Biol, 1979. **132(3)**: p. 493-505.
194. Hanahan, D., J. Jessee, and F.R. Bloom, *Plasmid transformation of Escherichia coli and other bacteria*. Methods Enzymol, 1991. **204**: p. 63-113.
195. van Gijlswijk, R.P., et al., *Fluorochrome-labeled tyramides: use in immunocytochemistry and fluorescence in situ hybridization*. J Histochem Cytochem, 1997. **45(3)**: p. 375-82.

196. Bobrow, M.N., et al., *Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification. Application to immunoassays*. J Immunol Methods, 1989. **125**(1-2): p. 279-85.
197. Suzuki, T., et al., *DNA staining for fluorescence and laser confocal microscopy*. J Histochem Cytochem, 1997. **45**(1): p. 49-53.
198. Chen, C. and H. Okayama, *High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA*. Mol Cell Biol, 1987. **7**(8): p. 2745-52.
199. Kingston, R., Chen, CA., Okayama, H., Rose, JK, *Introduction of DNA into Mammalian Cells*, in *Current Protocols in Molecular Biology*, F. Ausubel, Editor. 2003, John Wiley & Sons, Inc.: New York. p. 9.1.1. - 9.1.11.
200. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
201. Burnette, W.N., *"Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A*. Anal Biochem, 1981. **112**(2): p. 195-203.
202. Kyhse-Andersen, J., *Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose*. J Biochem Biophys Methods, 1984. **10**(3-4): p. 203-9.
203. Hanson, L.K., et al., *Replication of murine cytomegalovirus in differentiated macrophages as a determinant of viral pathogenesis*. J Virol, 1999. **73**(7): p. 5970-80.
204. Prussin, C. and D.D. Metcalfe, *Detection of intracytoplasmic cytokine using flow cytometry and directly conjugated anti-cytokine antibodies*. J Immunol Methods, 1995. **188**(1): p. 117-28.
205. Reddehase, M.J., J. Podlech, and N.K. Grzimek, *Mouse models of cytomegalovirus latency: overview*. J Clin Virol, 2002. **25 Suppl 2**: p. S23-36.
206. Orange, J.S. and C.A. Biron, *Characterization of early IL-12, IFN- α , and TNF effects on antiviral state and NK cell responses during murine cytomegalovirus infection*. J Immunol, 1996. **156**(12): p. 4746-56.
207. Vivier, E., et al., *Functions of natural killer cells*. Nat Immunol, 2008. **9**(5): p. 503-10.
208. Sato, S., et al., *Synergy and cross-tolerance between toll-like receptor (TLR) 2- and TLR4-mediated signaling pathways*. J Immunol, 2000. **165**(12): p. 7096-101.
209. Jiang, W., et al., *Toll-like receptor 3 ligand attenuates LPS-induced liver injury by down-regulation of toll-like receptor 4 expression on macrophages*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(47): p. 17077-82.
210. Cabral, E.S., et al., *Borrelia burgdorferi lipoprotein-mediated TLR2 stimulation causes the down-regulation of TLR5 in human monocytes*. J Infect Dis, 2006. **193**(6): p. 849-59.
211. Boehme, K.W., M. Guerrero, and T. Compton, *Human cytomegalovirus envelope glycoproteins B and H are necessary for TLR2 activation in permissive cells*. J Immunol, 2006. **177**(10): p. 7094-102.
212. Foster, S.L., D.C. Hargreaves, and R. Medzhitov, *Gene-specific control of inflammation by TLR-induced chromatin modifications*. Nature, 2007. **447**(7147): p. 972-8.
213. Zager, R.A., et al., *Acute renal failure: determinants and characteristics of the injury-induced hyperinflammatory response*. Am J Physiol Renal Physiol, 2006. **291**(3): p. F546-56.

214. Carrithers, M., et al., *Enhanced susceptibility to endotoxic shock and impaired STAT3 signaling in CD31-deficient mice*. Am J Pathol, 2005. **166**(1): p. 185-96.
215. Ueta, M., et al., *Intracellularly expressed TLR2s and TLR4s contribution to an immunosilent environment at the ocular mucosal epithelium*. J Immunol, 2004. **173**(5): p. 3337-47.
216. Noda, S., et al., *Role of nitric oxide synthase type 2 in acute infection with murine cytomegalovirus*. J Immunol, 2001. **166**(5): p. 3533-41.
217. Zhang, M., et al., *Lack of iNOS facilitates MCMV spread in the retina*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007. **48**(1): p. 285-92.
218. Tanaka, K. and S. Noda, *Role of nitric oxide in murine cytomegalovirus (MCMV) infection*. Histol Histopathol, 2001. **16**(3): p. 937-44.
219. Honess, R.W. and B. Roizman, *Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. I. Cascade regulation of the synthesis of three groups of viral proteins*. J Virol, 1974. **14**(1): p. 8-19.
220. del Val, M., et al., *Cytomegalovirus prevents antigen presentation by blocking the transport of peptide-loaded major histocompatibility complex class I molecules into the medial-Golgi compartment*. J Exp Med, 1992. **176**(3): p. 729-38.
221. Huang, E.S., *Human cytomegalovirus. IV. Specific inhibition of virus-induced DNA polymerase activity and viral DNA replication by phosphonoacetic acid*. J Virol, 1975. **16**(6): p. 1560-5.
222. Hamilton, J.R., J.C. Overall, and L.A. Glasgow, *Synergistic effect on mortality in mice with murine cytomegalovirus and Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, or Candida albicans infections*. Infect Immun, 1976. **14**(4): p. 982-9.
223. Mocarski, E.S., Jr., Hahn, G., White, K.L., Aguirre, S.A., Noda, S., *Myeloid Cell Recruitment and Function in Pathogenesis and Latency*, in *Cytomegaloviruses: Molecular Biology and immunology*, M.J. Reddehase, Editor. 2006, Caister Academic Press: Norfolk. p. 465-481.
224. Taylor, R.T. and W.A. Bresnahan, *Human cytomegalovirus immediate-early 2 protein IE86 blocks virus-induced chemokine expression*. J Virol, 2006. **80**(2): p. 920-8.
225. Taylor, R.T. and W.A. Bresnahan, *Human cytomegalovirus IE86 attenuates virus- and tumor necrosis factor alpha-induced NFkappaB-dependent gene expression*. J Virol, 2006. **80**(21): p. 10763-71.
226. Kournikakis, B. and L.A. Babiuk, *Murine cytomegalovirus-Pseudomonas synergistic infections: comparison of virulent and attenuated virus*. Can J Microbiol, 1987. **33**(10): p. 923-7.
227. Muller, V., et al., *Candida albicans triggers activation of distinct signaling pathways to establish a proinflammatory gene expression program in primary human endothelial cells*. J Immunol, 2007. **179**(12): p. 8435-45.
228. Bale, J.F., Jr., et al., *Enhanced susceptibility of mice infected with murine cytomegalovirus to intranasal challenge with Escherichia coli: pathogenesis and altered inflammatory response*. J Infect Dis, 1982. **145**(4): p. 525-31.
229. Leung, W.C. and K. Hashimoto, *Modification of susceptibility to Klebsiella pneumoniae during murine cytomegalovirus infection*. Microbiol Immunol, 1986. **30**(8): p. 761-76.
230. Osborn, J.E., A.A. Blazkovec, and D.L. Walker, *Immunosuppression during acute murine cytomegalovirus infection*. J Immunol, 1968. **100**(4): p. 835-44.

231. Andrews, D.M., et al., *Infection of dendritic cells by murine cytomegalovirus induces functional paralysis*. Nat Immunol, 2001. **2**(11): p. 1077-84.
232. Buchmeier, N.A. and N.R. Cooper, *Suppression of monocyte functions by human cytomegalovirus*. Immunology, 1989. **66**(2): p. 278-83.
233. Osborn, J.E. and D.N. Medearis, Jr., *Suppression of interferon and antibody and multiplication of Newcastle disease virus in cytomegalovirus infected mice*. Proc Soc Exp Biol Med, 1967. **124**(2): p. 347-53.
234. Bekiaris, V., et al., *Ly49H+ NK cells migrate to and protect splenic white pulp stroma from murine cytomegalovirus infection*. J Immunol, 2008. **180**(10): p. 6768-76.
235. Barton, E.S., et al., *Herpesvirus latency confers symbiotic protection from bacterial infection*. Nature, 2007. **447**(7142): p. 326-9.
236. Walton, S.M., et al., *The dynamics of mouse cytomegalovirus-specific CD4 T cell responses during acute and latent infection*. J Immunol, 2008. **181**(2): p. 1128-34.
237. Shanley, J.D., et al., *The role of tumor necrosis factor-alpha in acute murine cytomegalovirus infection in BALB/c mice*. J Infect Dis, 1994. **169**(5): p. 1088-91.
238. Xaus, J., et al., *LPS induces apoptosis in macrophages mostly through the autocrine production of TNF-alpha*. Blood, 2000. **95**(12): p. 3823-31.
239. Cook, C.H., et al., *Lipopolysaccharide, tumor necrosis factor alpha, or interleukin-1beta triggers reactivation of latent cytomegalovirus in immunocompetent mice*. J Virol, 2006. **80**(18): p. 9151-8.
240. *The Cytokine Handbook*. 4. ed, ed. A. Thomson and M. Lotze. 2003, London: Academic Press.

8 Anhang

Ausgewählte Zytokine und Wachstumsfaktoren

Tabelle 8.1: Ausgewählte Zytokine und Wachstumsfaktoren [240]

| Zytokine | Familie | Induktion | Produzenten | Wirkungen (u.a.) |
|--------------|---------------------------|--|--|---|
| IL-1 β | IL-1 Familie | TLR-Signale, IL-2 | Blutmonozyten, Gewebsmakrophagen, Dendritische Zellen, NK-, B-Zellen | pro-inflammatorisch \uparrow iNOS, \uparrow Adhäsionsmoleküle \uparrow Angiogenese (\uparrow VEGF), \uparrow Antikörperproduktion, \uparrow Differenzierung myeloider Zellen aus dem Knochenmark |
| IL-2 | Hämatopoietin- Familie | T-Zell Rezeptor (TZR)/ CD3 Signale, TL-Signale IL-1, IL-6 | CD4 ⁺ T _{H1} T-Zellen, murine DZ | \uparrow T-Zell Proliferation und Aktivierung \uparrow zytotoxische CD8 ⁺ T-Zellen \uparrow Suppressor T-Zellen \uparrow mitogen- oder antigenaktivierte B-Zellen \uparrow zytolytische Aktivität von NK-Zellen, \uparrow GM-CSF, \uparrow IL-1 β , \uparrow IL-6. \downarrow autoreaktive T-Zellen |
| IL-4 | Hämatopoietin- Familie | TZR, IL-6, IL-7, CD1d (NKT- Zellen) | T _{H2} -Zellen, CD8 ⁺ T-Zellen, naive T-Zellen, Mastzellen, Eosinophile, Basophile, NKT-Zellen | \uparrow T _{H2} , \uparrow (+GM-CSF:) DZ Differenzierung aus Monozyten \uparrow MHCII-Expression, \uparrow Isotypwechsel IgG \rightarrow IgE \uparrow B-Zellkostimulatoren \uparrow IL12p70 \uparrow Kollagen, \uparrow Fibronektin \uparrow VCAM-1 \downarrow Zytokinproduktion von T _{H1} -Zellen \downarrow M-CSF abhängige Proliferation, \downarrow CD14, \downarrow Fc γ R \downarrow (IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- α) (LPS-abhängig) und \downarrow IFN- α/β (virusabhängig) in Monozyten |
| IL-6 | Hämatopoietin- Familie | IL-1, TNF TLR-Signale | T _{H2} –Zellen Monozyten B-Zellen | \uparrow IL-4, \uparrow Akute Phase Proteine, \uparrow B-Zellproliferation und Antikörperproduktion, \uparrow T-Zellaktivierung, - proliferation, -differenzierung, \uparrow zytotoxische T-Zellen (+IL-1) und dort \uparrow Perforin und Serinesterase, \uparrow (+IL-3, +M- CSF, +GM-CSF) hämatopoetische Vorläuferzellen, \uparrow Neutrophile \downarrow TNF- α |

Anhang

| Zytokine | Familie | Induktion | Produzenten | Wirkungen (u.a.) |
|---------------------------------|----------------------|---|--|---|
| IL-10 | Interferon-Familie | TLR-Signale, IL-2, IL-3, IL-6, IL-7, IL-12, IL-15, TNF- α , TGF- β , \uparrow cAMP | T-Zellen, NKT-Zellen, B-Zellen, Monozyten, Makrophagen, Eosinophile, Epithelzellen | multiple Immunsuppression T _{H1} \rightarrow T _{H2} \downarrow T _{H1} -Zellzytokine (IL-2, IL-5) \downarrow Zytokine der APZ (IL-1 β , -6, -8, -12, TNF- α , GM-CSF) \downarrow O ₂ ⁻ \downarrow NO \downarrow IFN- γ , \downarrow CD80, \downarrow CD86, \downarrow Chemokine \uparrow B-Zelldifferenzierung, -reifung |
| IL-12 (p35, p40) | Hämatopoetin-Familie | (*) CD14, TLR, CD11b/CD18, Phagozytose, CD40, MHCII, IFN- γ | B-Zellen, Makrophagen, Monozyten, Dendritische Zellen | <i>IL-12p70 (p40 + p35)</i> \uparrow T _{H1} , \uparrow NK-Zellenaktivierung, \uparrow zytotoxische T-Zellen (Reifung), Modulation von antigenpräsentierenden Zellen \downarrow Apoptose <i>IL-12p40</i> Chemoattraktant für Makrophagen |
| IL-15 | Hämatopoetin-Familie | CD40L, TLR-Signale | viele, aber nicht T-Zellen, vor allem aktivierte Makrophagen, | \uparrow Proliferation \uparrow Zytokinproduktion \uparrow Antikörperproduktion (NK-, B-, T-Zellen), \uparrow Neutrophile, \uparrow Dendritische Zellen, \uparrow Phagozyten, \uparrow T-Zellmigration, \uparrow Chemokine |
| IL-18 | IL-1 Familie | IL-12, CD40L, | konstitutiv in Splenozyten und PBMC, Makrophagen, div. Organ- und Gewebszellen | \uparrow T _{H1} , \uparrow T _{H2} , \uparrow IFN- γ , TNF- α , \uparrow IL-4, \uparrow IL-5, \uparrow IL-13, \uparrow GM-CSF, \uparrow IL-10, \uparrow iNOS \uparrow NK-Zellen |
| IFN- α / IFN- β | Interferon-familie | Virusinfektion, TLR-Signale, CSF-1, IL-1, IL-2, TNF- α | IFN- α : Leukozyten IFN- β : Fibroblasten | antiviral, \uparrow MHCI, \uparrow Zytotoxizität, \uparrow Überleben von aktivierten T-Zellen \uparrow Apoptose, \uparrow IL-15 (IFN- α), \uparrow IL-10 (IFN- β), \downarrow IFN- γ , \downarrow IL-12, \downarrow CD80, \downarrow CD86 \downarrow T-, B-Zellproliferation, -migration, \downarrow Wachstum myeloider Vorläuferzellen |
| IFN- γ | Interferon-familie | TZR-, TLR-Signale (IL-18 abhängig), IL-12, IL-15, TNF- α , „non-self“, | NKT-Zellen CD8 ⁺ und T _{H1} T-Zellen, APZ | antiviral, \uparrow RNase L \uparrow T _{H1} , \uparrow IL-12 \uparrow Makrophagenaktivierung \uparrow iNOS, \uparrow Phagozytose, \uparrow MHCI \uparrow MHCII \uparrow Antigenprozessierung, \downarrow T _{H2} -Proliferation, \downarrow B-Zelldifferenzierung |

| Zytokine | Familie | Induktion | Produzenten | Wirkungen (u.a.) |
|-----------------|--|---|--|--|
| TNF- α | TNF Familie | TZR-, TLR-Signale, Ig-Bindung, IL-15, Komplementbindung, MIP-1 α | die meisten Immunzellen | \downarrow IL-10, \downarrow TNF- α \uparrow TNF- α , \uparrow IL-1, \uparrow IL-8, \uparrow GM-CSF, \uparrow M-CSF, \uparrow IFN- γ , \uparrow TGF- β , \uparrow Chemotaxis, \uparrow Apoptose in reifen T-Zellen \uparrow CD8 $^+$ T-Zellen \uparrow Zytotoxizität \uparrow NK-Zellfunktion, \downarrow Monozyten/ Makrophagenproliferation und Differenzierung |
| M-CSF/ CSF-1 | Wachstumsfaktor, Tyrosinkinase-rezeptor Signalmoleküle | konstitutiv, \downarrow IFN Typ I, \downarrow TNF- α | Knochenmarkstromazellen, Stromazellen, Osteoblasten, T-Zellen, | Überlebensfaktor für Makrophagen, Osteoklasten und unreife Dendritische Zellen, \uparrow Genese, Proliferation, Differenzierung und Aktivierung von Monozyten/Makrophagen |

(*) = benötigt zwei verschieden Signale, APZ = Antigenpräsentierende Zellen, TLR = Toll-like Rezeptor, T_{H1} und T_{H2} = T-Helferzellen Typ 1 und 2, MHC = *major histocompatibility complex*, NK-Zellen = Natürliche Killerzellen, NKT-Zellen = CD3⁺ NK1.1⁺ T-Zellen (NK-Zellenphänotyp), iNOS = *inducible nitric oxid synthase*, (G)(M)-CSF = (Granulocyten)(Makrophagen) Kolonisations-Stimulationsfaktor, MIP-1 α = Makrophagen Inflammatorisches Protein -1 α , TGF- β = *tumor growth factor- β* , \uparrow = verstärkend, induzierend, \downarrow = verringernd, inhibierend

Vektorkarten

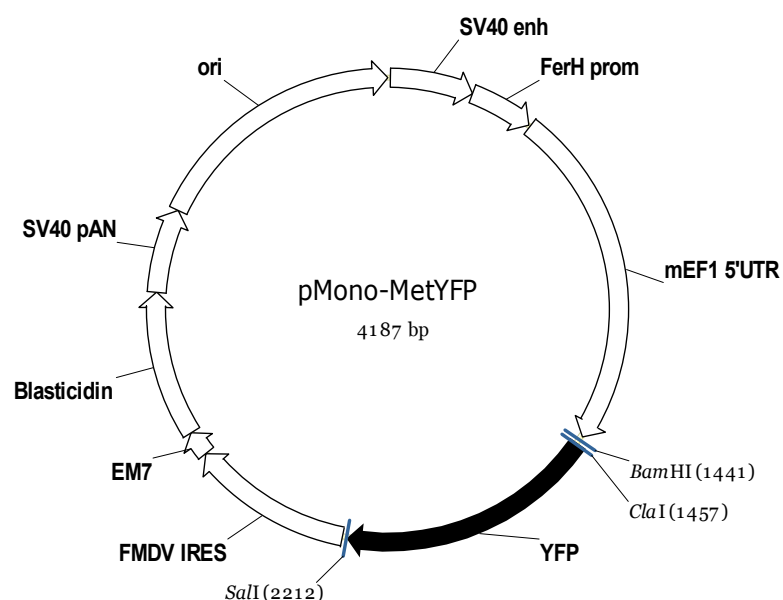


Abb. 8.1: Schematische Darstellung des Transfektionsvektor pMono-MetYFP.

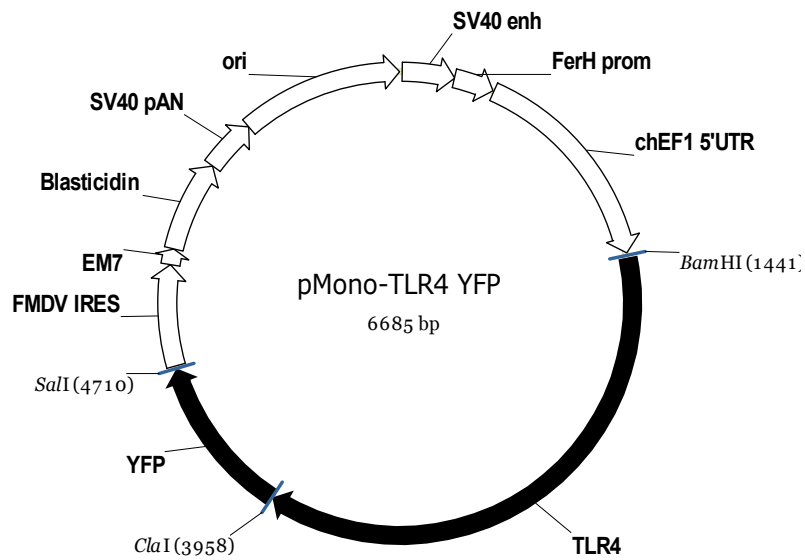


Abb. 8.2: Schematische Darstellung des Transfektionsvektor pMono-TLR4-YFP.

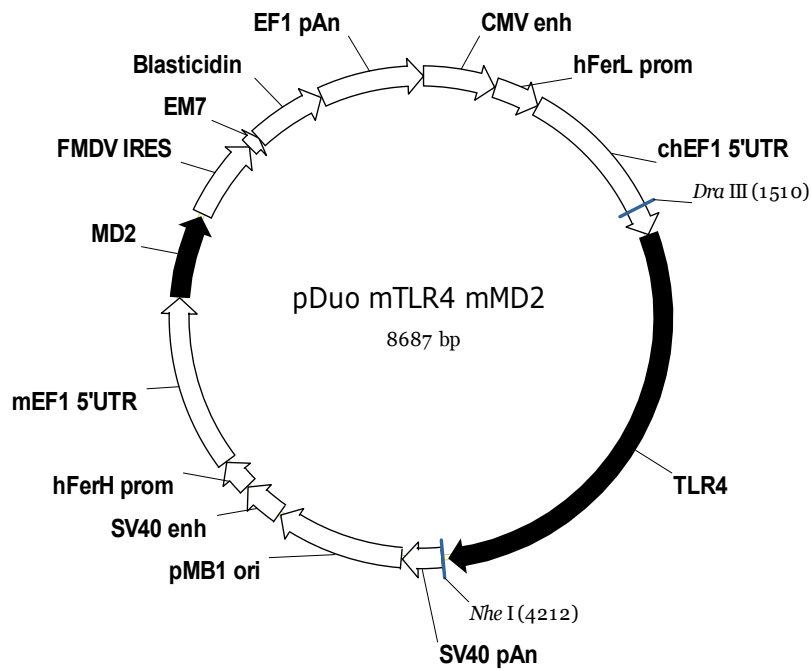


Abb. 8.3: Schematische Darstellung des Transfektionsvektor pDuo-mTLR4/mMD2 (Invivogen).

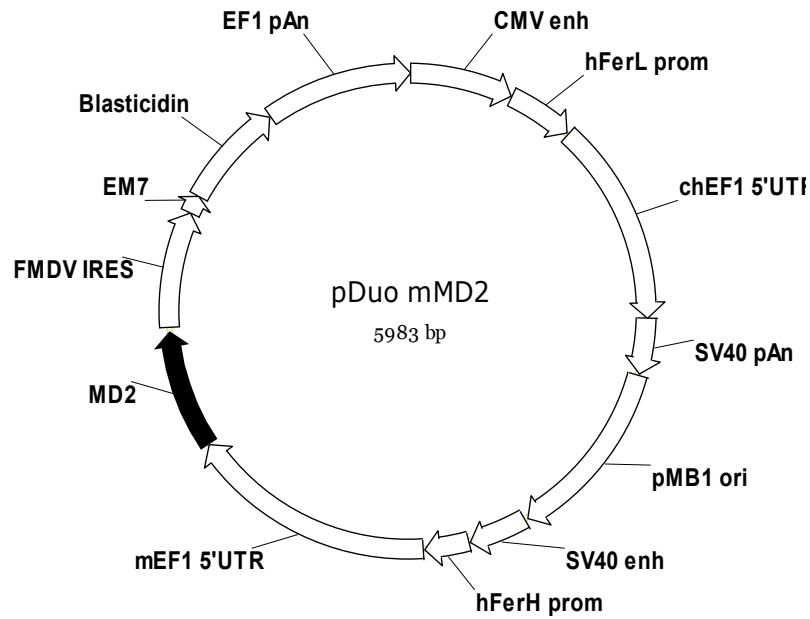


Abb. 8.4: Schematische Darstellung des Transfektionsvektor pDuo- mMD2.

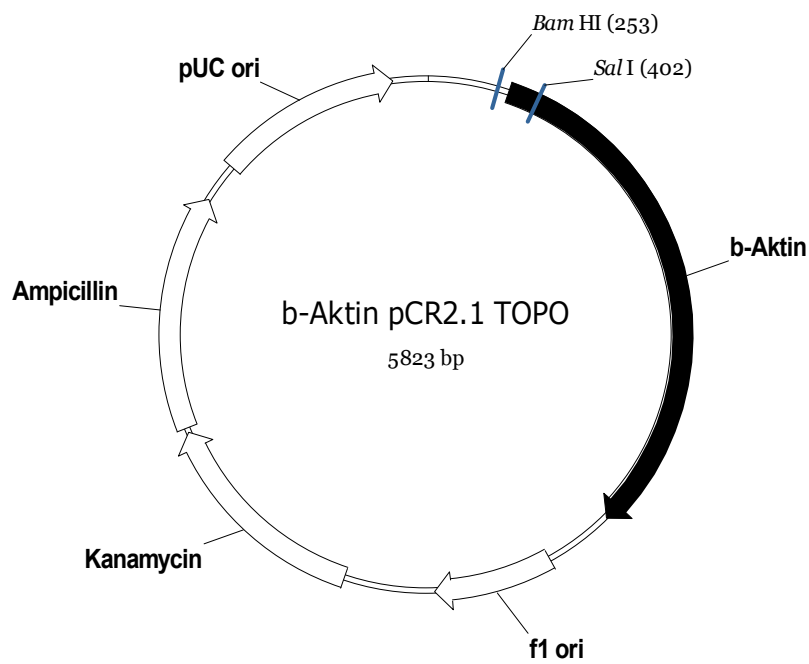


Abb. 8.5: Schematische Darstellung des β -Aktin-kodierenden Vektors, der für die Normalisierung der *real time* PCR eingesetzt wurde.

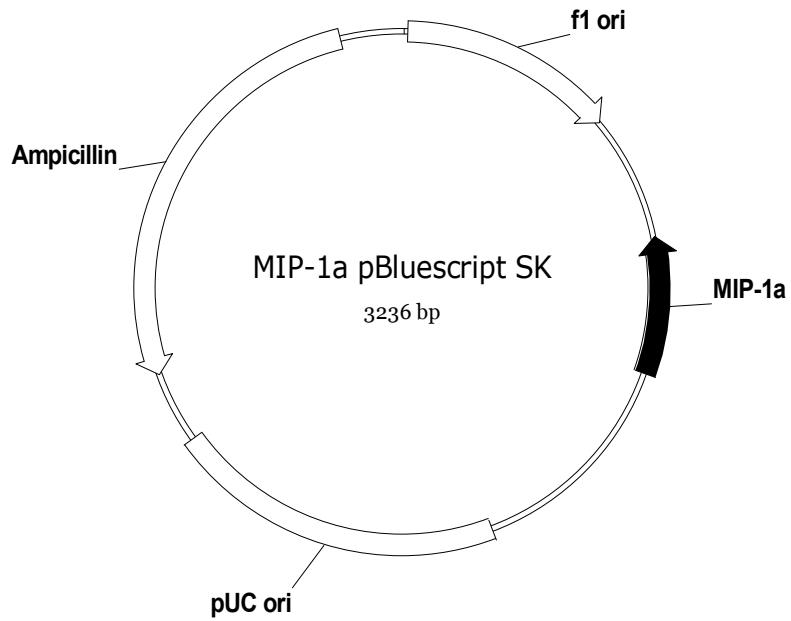


Abb. 8.6: Schematische Darstellung des MIP-1 α -kodierenden Vektors, der für die Normalisierung der *real time* PCR eingesetzt wurde.

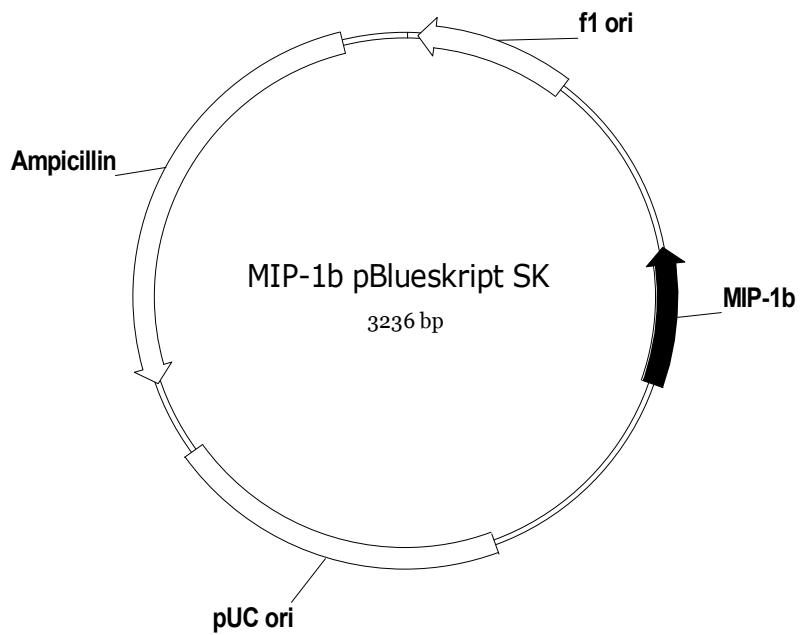


Abb. 8.7: Schematische Darstellung des MIP-1 β -kodierenden Vektors, der für die Normalisierung der *real time* PCR eingesetzt wurde.

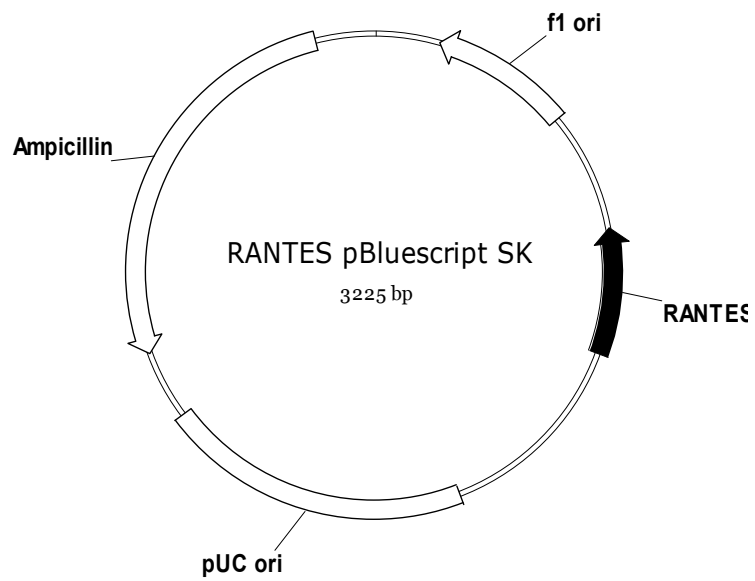


Abb. 8.8: Schematische Darstellung des RANTES-kodierenden Vektors, der für die Normalisierung der *real time* PCR eingesetzt wurde. Die RANTES-Sequenz wurde unter der *accession number* AY722103 bei NCBI veröffentlicht.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig durchgeführt und verfasst habe. Dabei wurden keine anderen, als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet.

Berlin, den 31.10.2008

Stefan Kaulfuß