

# **Interaktion von dendritischen Zellen mit dem humanen Zytomegalievirus**

Von der Fakultät Geo- und Biowissenschaften der Universität Stuttgart genehmigte Abhandlung zur  
Erlangung der Würde eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

**Kerstin Beck**

aus Freiburg

Hauptberichter: Prof. Dr. Peter Scheurich

Mitberichter: Prof. Dr. Frank Hufert

Tag der mündlichen Prüfung: 28.02.2003

Institut für Zellbiologie und Immunologie der Universität Stuttgart und  
Aus der Abteilung für Virologie des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der  
Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Breisgau

Januar 2003

# I Inhaltsverzeichnis

<b>I Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>II</b>
<b>II Abkürzungen</b> .....	<b>V</b>
<b>III Zusammenfassung</b> .....	<b>X</b>
<b>IV Abstract</b> .....	<b>XI</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>12</b>
1.1. Dendritische Zellen .....	12
1.1.1 DC-Subpopulationen .....	13
1.1.2 Funktion von dendritischen Zellen.....	16
1.1.2.1 Rekrutierung von DC.....	16
1.1.2.2 Antigenaufnahme.....	17
1.1.2.3 Antigenprozessierung und Antigenpräsentation.....	19
1.1.2.4 Zellausreifung.....	20
1.1.2.5 Migrationsregelung der Antigen beladenen DC.....	22
1.1.2.6 Aktivierung der T-Zellen .....	23
1.1.3 Die Rolle der DC bei viralen Infekten.....	26
1.2. Das humane Zytomegalievirus (HCMV) .....	27
1.2.1 Genomaufbau von HCMV .....	27
1.2.2 Virale Struktur.....	28
1.2.3 Replikationszyklus.....	29
1.2.4 Epidemiologie, klinische Symptomatik und Therapie.....	30
1.2.5 Zelltropismus von HCMV .....	31
1.2.6 Immunantwort gegen HCMV.....	32
1.2.7 Immunmodulation durch HCMV .....	33
1.3. Fragestellung und Zielsetzung.....	36
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>37</b>
2.1. Chemikalien.....	37
2.2. Plastikwaren.....	37
2.3. Geräte .....	37
2.4. Puffer und Lösungen.....	38

2.5. Antikörper.....	39
2.6. Isolierung und Kultivierung von Zellen.....	42
2.6.1 Bestimmung der Lebendzellzahl.....	42
2.6.2 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen.....	42
2.6.3 Präparation von Zellen für das Elektronenmikroskop.....	43
2.6.4 Gewinnung von unreifen und reifen dendritischen Zellen aus Monozyten.....	43
2.6.5 Isolierung von DC mit Hilfe des Blood Dendritic Cell Isolation Kit.....	45
2.6.6 Isolierung von plasmazytoiden dendritischen Zellen aus Tonsillen.....	46
2.6.7 Gewinnung von Humanen Endothelzellen (HUVEC).....	48
2.7. Arbeiten mit Viren.....	49
2.7.1 Virusanzucht und Virusankonzentrierung.....	49
2.7.2 Virustiterbestimmung mittels Kurzzeitkultur.....	50
2.7.3 Infektion von DC.....	51
2.7.4 UV-Inaktivierung von HCMV.....	52
2.8. Arbeiten mit DNA.....	52
2.8.1 Aufarbeitung von DNA für die PCR.....	52
2.8.2 Nachweis von HCMV-DNA in Zellen.....	53
2.8.2.1 Qualitativer Nachweis von HCMV-DNA mittels nested PCR.....	53
2.8.2.2 Auftrennung von DNA-Fragmenten im Agarosegel.....	54
2.8.2.3 Quantitative PCR-Amplifikation.....	55
2.8.3 Herstellung eines Plasmidstandards für die qualitative PCR.....	56
2.8.3.1 Klonierung des PCR-Produkts in den Vektor pCR®II.....	56
2.8.3.2 Präparation von Plasmid-DNA mittels TENS-Methode.....	58
2.8.3.3 Präparation von Plasmid-DNA mittels Qiagen-Säulen.....	58
2.8.3.4 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	59
2.8.3.5 Bestimmung der DNA-Konzentration.....	60
2.8.4 mRNA-Extraktion mit Hilfe des Poly-A-Tract-System-1000-Kit.....	60
2.8.5 Umschreiben von mRNA mit dem First-Strand cDNA Synthesis Kit.....	61
2.8.6 Quantitativer Nachweis der cDNA.....	62
2.9. Immunfluoreszenz.....	63
2.9.1 Färbung für die konfokale Fluoreszenzmikroskopie.....	63
2.9.2 Durchflusszytometrie.....	64
2.10. Messung der Vitalität.....	65
2.11. Gemischte-Lymphozyten-Reaktion (MLR).....	65

---

2.12.	Zytokin-ELISAs .....	66
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>68</b>
3.1.	Differenzierung von Monozyten zu DC.....	68
3.2.	Charakterisierung von myeloiden DC.....	70
3.3.	Infektion von myeloiden DC mit HCMV.....	71
3.3.1	Nachweis von HCMV-DNA in infizierten DC .....	72
3.3.2	Nachweis von HCMV-Proteinen in DC .....	73
3.3.3	Nachweis von HCMV-Virionen in infizierten DC.....	75
3.3.4	HCMV-Infektion von DC <i>in vivo</i> .....	76
3.3.5	HCMV verändert die Expression von Oberflächenmolekülen .....	77
3.3.6	Analyse der Vitalitätsrate infizierter und nicht-infizierter Zellen .....	79
3.3.6.1	Verminderte Expression der Oberflächenmoleküle liegt nicht an verminderter mRNA-Synthese .....	81
3.4.	Funktionsanalysen von HCMV-infizierten myeloiden DC.....	83
3.4.1	Hemmung der DC-vermittelten Proliferation allogener T-Zellen.....	83
3.4.2	HCMV-infizierte DC produzieren löslichen Faktor .....	85
3.4.2.1	Ein löslicher Faktor ist für die verminderte Expression von Oberflächenmolekülen verantwortlich .....	86
3.4.3	HCMV hemmt die Zytokinproduktion von DC .....	87
3.5.	Infektion von plasmazytoiden DC mit HCMV.....	89
3.5.1	Zytokinproduktion von HCMV-infizierten plasmazytoiden DC .....	90
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>92</b>
4.1.	HCMV-Infektion von DC.....	93
4.2.	Einfluss der HCMV-Infektion auf die Funktion von DC.....	94
<b>5.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>106</b>
<b>6.</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>119</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>120</b>

## II Abkürzungen

6CKine/SLC	secondary lymphoid tissue chemokine
7-AAD	7-Amino-Actinomycin D
AD1	antigene Domänen des gB
AD169	HCMV-Laborstamm
AIDS	acquired immuno deficiency syndrom
Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin
APC	Antigen präsentierende Zelle
APC	Allophycocyanin
AS	Aminosäure
bp	Basenpaar
BCA	B-cell attracting chemokine
BSA	Rinderserum Albumin
CCR	Chemokinrezeptor
cDNA	copy-DNA
CD	cluster of differentiation
CD40L	CD40-Ligand
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CMV	Zytomegalievirus
COOH	C-terminales Proteinende
CPE	cytopathischer Effekt
CpG	Cytosin-Guanosin-Dinukleotid
cpm	counts per minute
C-Term	cytoplasmatischer Proteinbereich
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten
CTLA-4	cytotoxic T lymphocyte antigen-4
CX <sub>x</sub> CR	Chemokinrezeptor
Dabcyl	dark Quencher für TaqMan™ Sonde
DC	Dendritische Zelle
DC-SIGN	DC specific ICAM-3 grabbing nonintegrin
DMEM	Zellkulturmedium, Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid

---

DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Dideoxynukleotide
ds	Doppelstrang
DTT	Dithiothreitol
E	delayed early Gene oder Proteine
EC	Endothelzellen
ECV	auf Endothelzellen adaptierter HCMV-Stamm
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetra-Essigsäure
EM	Elektronenmikroskop
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	fluorescence activated cell sorter
FAM	Reporterfarbstoff für TaqMan™ Sonde
FDC	follikuläre dendritische Zellen
FET	Fluoreszenz-Energie-Transfer
FFV	auf Fibroblasten adaptierter HCMV-Stamm
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FKS	Fötale Kälberserum
FL1/2	Fluoreszenzintensität 1/2
FSC	foreward-scatter (Vorwärts-Streulicht)
g	Erdanziehung
gB	Glykoprotein des HCMV
gH	Glykoprotein des HCMV
GM-CSF	granulocyte-macrophage-colony-stimulating-factor
HCMV	Humanes Zytomegalievirus
HFF	Humane Vorhaut-Fibroblasten
HHV5	Humanes Herpesvirus 5
HIV	Humanes Immunodefizienz Virus
HLA	human leukocyte antigen
HSV	Herpes Simplex Virus
ICAM	intercellular adhesion molecule
iDC	immature dendritic cell
IE	immediate early Gene oder Proteine
IE1	major immediate early 1 Gen oder Protein

---

IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IL	Interleukin
IP-10	IFN- $\gamma$ -inducible protein
IPTG	Isopropyl $\beta$ -D Thiogalactopyranosid
IR	internal repeat
Jak	Janus Kinase
kb	Kilo-Basenpaare
kDa	kilo Dalton
Konz.	Konzentration
L	late Gene oder Proteine
LB	Bakterienkulturmedium, Luria Bertani
LC	Langerhans cell
LFA	leukocyte function antigen
LPS	Lipopolysaccharid
MIIC	MHC Klasse II Kompartimente
MAC-1	Antikörper gegen eine Carboxypeptidase auf Makrophagen
mAk	monoklonaler Antikörper
MCMV	Murines Zytomegalievirus
MCP	major capsid Protein
MCP	monocyte chemotactic protein
mDC	mature dendritic cells
MDC	macrophage-derived chemokine
MEM	Zellkulturmedium, Minimum Essential Medium
MHC	major histocompatibility complex
MIP	macrophage inflammatoryprotein
MLR	mixed lymphocyte reaction
MOI	multiplicity of infection
MP	magnetische Partikel
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NH <sub>2</sub>	aminoterminals Proteinende

---

NK	Natürliche Killer-Zellen
nPCR	nested Polymerase Kettenreaktion
NTC	no-template-control, Negativkontrolle
N-Term	aminoterminaler Proteinbereich
ORF	offener Leserahmen
ORI	Replikationsursprung
PBL	periphere Blutleukozyten
PBMC	mononukleäre Zellen des Blutes
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PD-1	programmed cell death 1 receptor
pDC	plasmazytoide dendritische Zellen
PE	Phycoerythryn
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
pH	pars hydrogenii
pp150	Phosphoprotein 150 des HCMV
pp65	Phosphoprotein 65 des HCMV
RANTES	regulated on activation, normal, T-cell expressed and secreted
RNA	Ribonukleinsäure
Rox	Referenzfarbstoff für TaqMan™
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	Zellkulturmedium
RSV	Respiratorisches Syncytialvirus
RT	Reverse Transkription
RT	Raumtemperatur
SA-PMP	Streptavidin gekoppelte paramagnetische Partikel
SDF	stromal cell-derived factor
SLAM	signaling lymphocytic activation molecule
SLC/6CKine	secondary lymphoid tissue chemokine
SSC	Seitwärts-Streulicht (sideward-scatter)
Stat	signal transducers and activators of transcription
TAP1/2	transporter associated with antigen processing
TARC	thymus and activation-regulated chemokine
TBE	Tris-Bor-EDTA-Puffer



---

TCR	T-Zell-Rezeptor
TE	Tris-EDTA-Puffer
TECK	thymus-expressed chemokine
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylen-diamin
TGF- $\beta$	tumor-growth-factor- $\beta$
TH <sub>1/2</sub>	T-Helferzelle Typ 1/2
TLR	Toll-like-receptor
TNF- $\alpha$	tumor-nekrose-factor- $\alpha$
TR	terminal repeat
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Unit
UL x	Gene oder Proteine des HCMV
U <sub>L</sub>	unique long Region des HCMV Genoms
US x	Gene oder Proteine des HCMV
U <sub>S</sub>	unique short Region des HCMV Genoms
UV	ultraviolett
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl $\beta$ -D galaktopyranosid

### III Zusammenfassung

Dendritische Zellen (DC) sind als professionelle antigenpräsentierende Zellen von zentraler Bedeutung bei der Aktivierung der Immunantwort. Das humane Zytomegalievirus (HCMV), welches zur Familie der Herpesviren gehört, hat verschiedene immunmodulatorische Mechanismen entwickelt, dem Angriff durch das Immunsystem zu entgehen. In dieser Arbeit sollten die Interaktionen von DC mit HCMV untersucht werden.

Dendritische Zellen unterteilen sich in myeloide und plasmazytoide DC (pDC). Myeloide DC wurden aus Monozyten des peripheren Blutes differenziert und pDC wurden aus Tonsillen isoliert.

Durch einen Virusgenomanstieg, den Nachweis von IE-, E- und Late-Proteinen und die Anwesenheit viraler Partikel im Zellkern konnte eine produktive Infektion von unreifen (iDC) und reifen (mDC) myeloiden DC mit Endothelzell-adaptierten HCMV-Stämmen (ECV) bewiesen werden. Die Infektion von DC mit Fibroblasten-adaptierten HCMV-Stämmen (FFV) dagegen war nicht produktiv. Dies konnte aus dem Fehlen eines Genomanstiegs, aus dem Nachweis von IE-Proteinen und aus der Abwesenheit von E- und Late-Proteinen geschlossen werden.

HCMV ist auch in der Lage, DC *in vivo* zu infizieren. In DC, die aus dem Blut hochvirämischer Patienten isoliert wurden, konnte HCMV-DNA nachgewiesen werden.

Weiterhin sollten die Auswirkungen einer HCMV-Infektion auf DC untersucht werden. Sowohl FFV als auch ECV vermindern bei myeloiden iDC und mDC die Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen, von CD1a, den Adhäsionsmolekülen CD11c, CD33, CD54 und CD58, den Kostimulationsmolekülen CD4, CD40 und CD80, dem Reifungsmarker CD83 und der Aminopeptidase N (CD13). Die Expression des Kostimulationsmoleküls CD86, des Homing-Faktor CCR7 und der MHC-Klasse-II-Moleküle dagegen wurde durch HCMV nicht beeinflusst.

Die Funktion von HCMV-infizierten DC ist stark eingeschränkt. ECV- und FFV-infizierte myeloide iDC und mDC konnten keine allogene T-Zellen mehr stimulieren. Dieser Effekt wurde durch einen löslichen Faktor ausgelöst, der von infizierten DC gebildet wird. Die Produktion von IL-6, IL-10, IL-12 und TNF- $\alpha$  war in ECV- und FFV-infizierten myeloiden iDC und mDC vermindert.

Plasmazytoide DC (pDC) sind ebenfalls permissiv für ECV. Dies konnte aus der Anwesenheit von IE- und L-Proteinen geschlossen werden. Auch in HCMV-infizierten pDC gab es Funktionseinschränkungen. Ihre Fähigkeit IFN- $\alpha$  zu produzieren war reduziert.

In dieser Arbeit konnte eine neue Strategie des HCMV aufgezeigt werden, der Immunantwort des Menschen zu entgehen. Diese Mechanismen könnten sowohl zur Virus-vermittelten Immunsuppression als auch zur Etablierung der lebenslangen Persistenz im Wirt beitragen.

## IV Abstract

Human dendritic cells (DC) are the main antigen presenting cells and play a key role in inducing and maintaining immune responses. Human cytomegalovirus (HCMV), a member of the herpesvirus family, employs multiple mechanisms to evade the immune system. The aim of this study was to investigate the interaction between HCMV and DC.

DC can be divided into two main populations, myeloid and plasmacytoid DC. In this study myeloid DC were generated from monocytes obtained from peripheral blood mononuclear cells. Plasmacytoid DC were isolated from human tonsils.

Productive infection was shown by an increase of HCMV DNA in cell culture, the expression of HCMV IE-, E- and late proteins and by detecting viral nucleocapsids in the nucleus of infected cells. Productive infection occurred only when endothelial cell adapted HCMV strains (ECV) were used. This was independent of the state of DC maturation. The infection abrogated at the level of IE/E gene expression when virus strains adapted to human fibroblast (FFV) were used.

To analyze whether DC are infected *in vivo*, highly FACS-purified blood DC obtained from viremic patients were analyzed for HCMV-DNA. The results indicated HCMV infection of DC *in vivo*. To address the question whether HCMV infection impairs DC function, the expression of different cell surface molecules were analyzed. It was shown that FFV and ECV induce a downregulation of MHC class I, CD1a (antigen presenter of non-peptides), the adhesion molecules CD11c, CD33, CD54 and CD58, the costimulatory molecules CD4, CD40 and CD80, the maturation marker CD83 and the aminopeptidase-N (CD13) on DC, irrespectively of the state of DC maturation. However, the expression of the costimulator molecule CD86, the homing factor CCR7 and MHC class II was not altered.

When T cell proliferation was investigated, it turned out, that the function of HCMV-infected DC was severely impaired. FFV and ECV infected DC were not able to stimulate allogeneic T cells. Transfer experiments showed, that a soluble factor, produced by infected DC, is responsible for this effect. In addition the ability to produce cytokines such as IL-6, IL-10, IL-12 and TNF- $\alpha$  was hampered when DC were infected with FFV or ECV.

When the interaction of plasmacytoid DC with HCMV was investigated we could show that these cells were permissive for ECV. The production of INF- $\gamma$  in HCMV-infected plasmacytoid DC was reduced.

The impairment of DC function upon HCMV infection is a new strategy of immune escape and may contribute to virus-mediated immunosuppression and help the virus to establish persistence in the host.

# 1. Einleitung

## 1.1. Dendritische Zellen

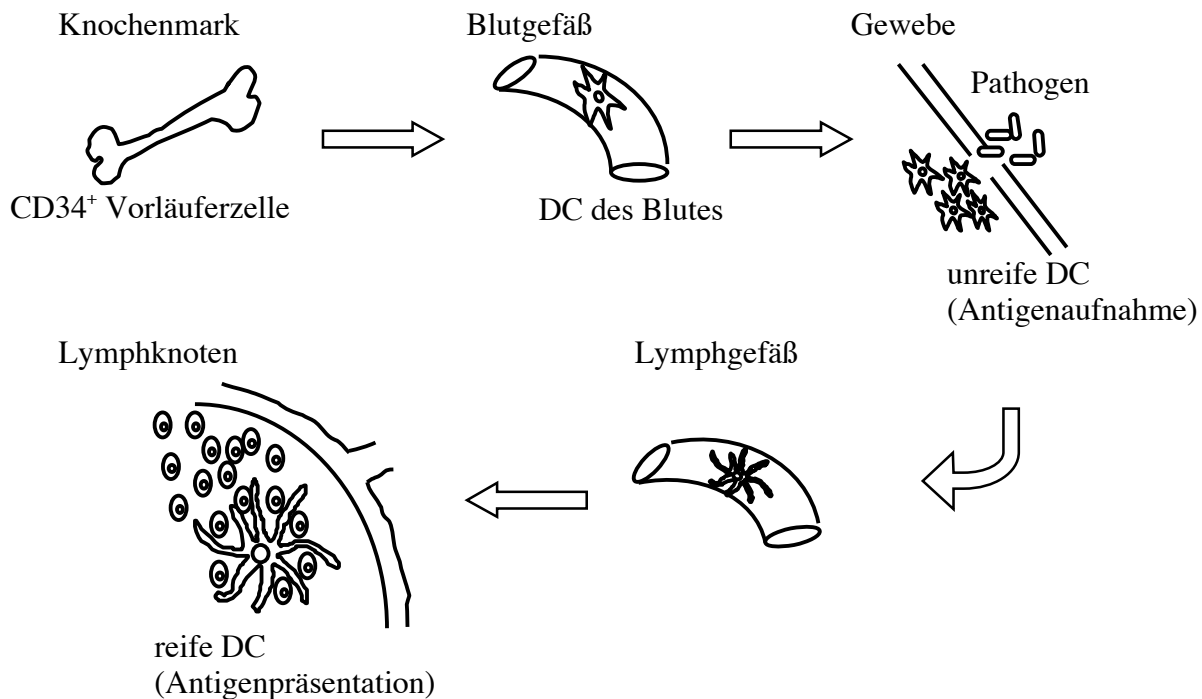
Die ersten dendritischen Zellen (DC) wurden 1868 von Paul Langerhans in der Epidermis der Haut entdeckt. Aufgrund ihrer Morphologie (lange Zellausläufer) nannte er sie dendritische Zellen und nahm an, dass sie zum Nervensystem gehörten (Langerhans, 1868). Über die Funktion dieser Zellen wurde jedoch lange spekuliert. 1973 identifizierten Steinmann und Cohn eine bis dahin unbekannte Zellpopulation in der Milz von Mäusen, die sie ebenfalls dendritische Zellen nannten. Diese Zellen gehörten nicht zu den Phagozyten und waren semi adhärent (Steinman, et al., 1975; Steinman, et al., 1973; Steinman, et al., 1974). In weiteren Versuchen zeigte sich, dass diese dendritischen Zellen aus Knochenmarksvorläuferzellen hervorgehen und in allen lymphoiden und vielen nicht lymphoiden Geweben von Säugern und Nagern vorhanden waren (Crowley, et al., 1989; Hart, et al., 1981; Pugh, et al., 1983; Van Voorhis, et al., 1982). Damit war aber noch keine Verbindung zu den von Langerhans entdeckten Zellen der Haut hergestellt. Deshalb wurden beide Populationen getrennt voneinander untersucht.

Es zeigte sich, dass die von Langerhans entdeckten Zellen und die Zellen, die von Steinmann und Cohn charakterisiert wurden, verschiedene Subpopulationen von hochspezialisierten antigenpräsentierenden Zellen (APC) waren. Beide Subpopulationen spielen eine zentrale Rolle bei der Induktion T-Zell-vermittelter Immunität (Steinman, 1991). Dendritische Zellen können eine Immunantwort wesentlich effektiver initiieren als Monozyten oder Makrophagen, die auch zu den antigenpräsentierenden Zellen (APC) gezählt werden.

Die weitere Erforschung der dendritischen Zellen wurde durch die Tatsachen erschwert, dass die Zellen nur in geringer Zahl vorhanden sind und über keinen „zelleigenen“ Marker verfügen. Durch die Entdeckung von Caux, dass humane  $CD34^+$  hämatopoetische Vorläuferzellen mit Hilfe von Zytokinen (GM-CSF und TNF- $\alpha$ ) *in vitro* zu DC differenziert werden können, konnten nun erstmals größere Mengen an DC erzeugt werden (Caux, et al., 1992). Eine weitere Verbesserung stellte die Veröffentlichung einer Methode von Sallusto und Lanzavecchia im Jahre 1994 dar. Darin wurde beschrieben, wie Monozyten des humanen peripheren Blutes *in vitro* mit GM-CSF und IL-4 zu unreifen und später, durch Zugabe eines Reifungssignals (TNF- $\alpha$ ), zu reifen DC ausdifferenziert werden konnten (Sallusto, et al., 1994). Da die Zahl der Monozyten wesentlich höher ist, als die der  $CD34^+$  hämatopoetischen Vorläuferzellen, konnte die Zahl der *in vitro* generierten DC nochmals erhöht werden.

### 1.1.1 DC-Subpopulationen

DC sind eine sehr heterogene Zellgruppe, die sich in ihrer Lokalisation, der Expression unterschiedlicher Oberflächenmoleküle und in ihrer Funktion unterscheiden (Hart, 1997; Lipscomb, et al., 2002). Dennoch besitzen sie einige Gemeinsamkeiten. Die verschiedenen DC Subtypen können beispielsweise *in vitro* aus CD34<sup>+</sup> Knochenmarksvorläuferzellen oder aus Vorläuferzellen des Blutes gebildet werden (Caux, et al., 1996; Romani, et al., 1994). DC wandern *in vivo* als unreife Zellen über das Blut (DC des Blutes) in zahlreiche Gewebe und Organe ein. Dort differenzieren die DC des Blutes z.B. zu Langerhans Zellen oder interstitiellen DC. Eine weitere DC-Population, die plasmazytoiden DC, sind vorwiegend in lymphatischen Geweben lokalisiert. Dort verweilen die DC



**Abbildung 1.1: Lebenszyklus von dendritischen Zellen**

Aus CD34<sup>+</sup>-Knochenmarksvorläuferzellen entwickeln sich DC. Diese unreifen dendritischen Zellen wandern über den Blutstrom in verschiedene Gewebe ein. Dort verweilen sie so lange, bis sie auf ein Antigen treffen, dieses aufnehmen und auf ihrer Oberfläche präsentieren. DC verändern durch diesen Ausreifungsprozess ihren Phänotyp und werden zu einer effizienten antigenpräsentierenden Zelle, die über die Lymphgefäße in die Lymphknoten einwandert. In der T-Zell-Zone des Lymphknotens wird dann die Immunantwort durch Aktivierung naiver T-Zellen initiiert. DC verlassen danach nur selten den Lymphknoten, da sie nach der Antigenpräsentation in den apoptotischen Zelltod eintreten. Quelle: (Dieu-Nosjean, et al., 1999) (verändert)

so lange, bis sie auf ein Antigen treffen, dieses aufnehmen und auf ihrer Oberfläche präsentieren. Nach Beendigung dieses Ausreifungsprozesses wandern die reifen DC in die lymphatischen Gewebe und initiieren dort die Immunantwort (siehe Abbildung 1.1) (Inaba, et al., 1993). Nach der Antigenpräsentation treten die DC in Apoptose ein.

Die DC des Blutes befinden sich im peripheren Blut oder den afferenten Lymphgefäße (Knight, et al., 1982; Spry, et al., 1980), wobei sie ca. 1% der peripheren mononukleären Zellen (PBMC) ausmachen.

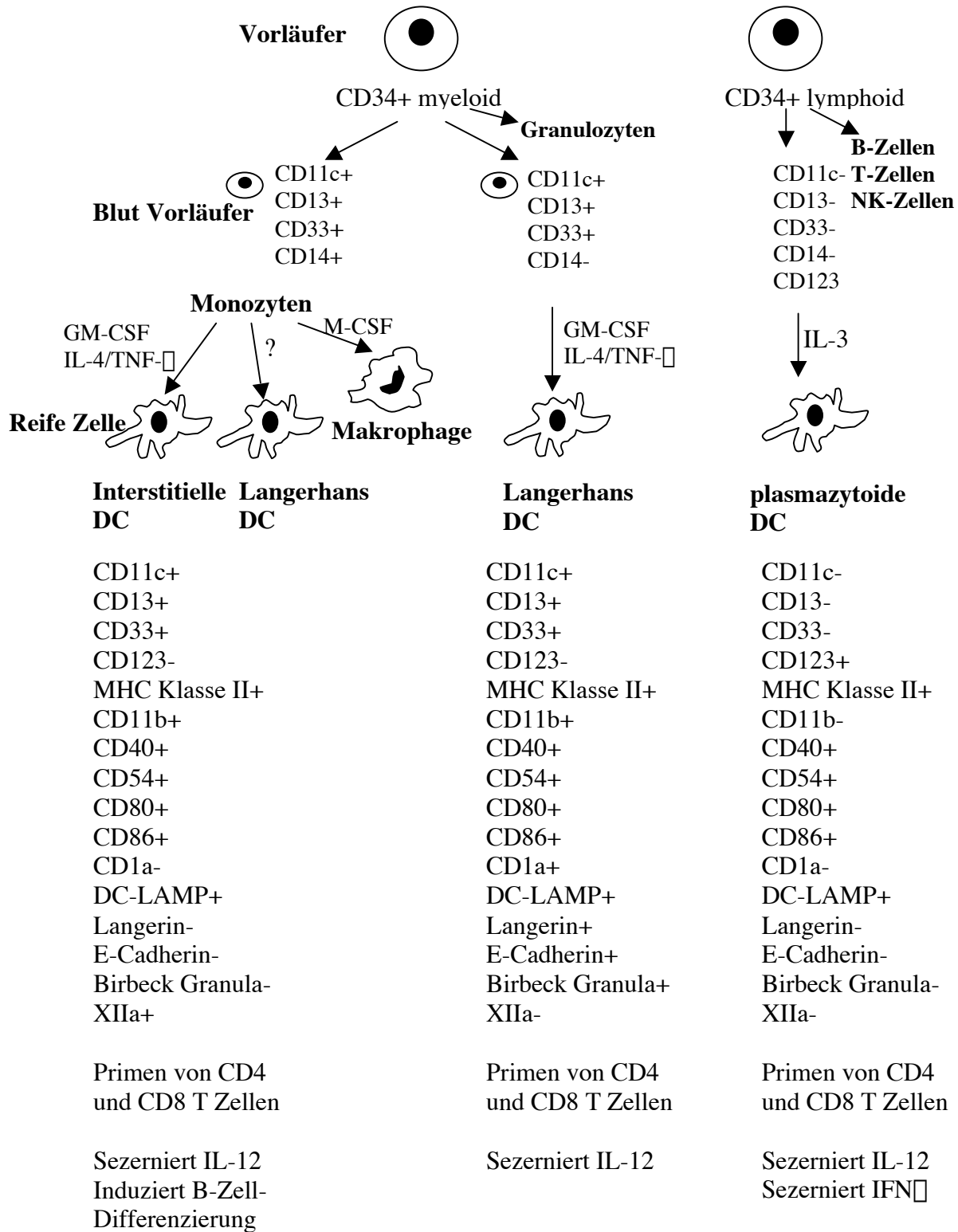
Die Langerhans Zellen (LC) befinden sich in der Epidermis der Haut. Diese LC sind die einzigen DC, die im unreifen Zustand die charakteristischen Birbeck Granula besitzen. Dies sind trilamellare zytoplasmatische Organellen, die aus gefalteten Membranen bestehen und häufig mit Vesikeln verbunden sind (Larsen, et al., 1992; Macatonia, et al., 1986). Die Membranen spannen sich von der äußeren Membran zur Zellkernmembran und werden häufig an den Kontaktstellen zwischen DC und T-Zellen beobachtet (Bos, et al., 1993). Die Funktion dieser Birbeck Granula ist noch umstritten. Man vermutet, dass sie beim Transport von Antigenen in die Zelle beteiligt sind (Rezeptorvermittelte Endozytose) oder dass sie eine sekretorische Funktion haben. Nach der Reifung verlieren die LC ihre Birbeck Granula.

Die interstitiellen DC befinden sich in fast allen Organen (Herz, Leber, Niere, Pankreas, Darm, Haut, Urogenitaltrakt, Schilddrüse) (Hart, et al., 1981; Prickett, et al., 1988). Diese Zellen zeigen einige Gemeinsamkeiten mit DC die aus Monozyten differenziert wurden (Keller, 2001).

Die plasmazytoiden DC (pDC), die im Gegensatz zu den gerade beschriebenen DC nicht aus einer myeloiden sondern aus einer lymphoiden Vorläuferzelle hervorgehen, findet man vorwiegend in den T-Zell-Zonen der lymphatischen Organe (Facchetti, et al., 1999; O'Doherty, et al., 1994; Strobl, et al., 1998). Da sie große Mengen IFN- $\alpha$  bilden können, wird ihnen eine zentrale Rolle bei der unspezifischen Abwehr von Viren zugeschrieben (Cella, et al., 1999; Siegal, et al., 1999).

Die unterschiedliche Expression von Oberflächenmolekülen der einzelnen DC-Subpopulationen ist in Abbildung 1.2 dargestellt.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde mit DC, die aus Monozyten des peripheren Blutes nach der Methode von Sallusto und Lanzavecchia differenziert wurden (Sallusto, et al., 1994) und mit plasmazytoiden DC gearbeitet, die aus menschlichen Tonsillen isoliert wurden. Die DC, die aus Monozyten hergestellt wurden, entsprechen den interstitiellen DC aus Abbildung 1.2. Der einzige Unterschied ist, dass die interstitiellen DC aus Abbildung 1.2 kein CD1a exprimieren, während die *in vitro* aus Monozyten differenzierten DC eine hohe Expression von CD1a aufweisen.



**Abbildung 1.2: Herkunft und Charakterisierung der DC-Populationen**

Sowohl die myeloide als auch die lymphoide Linie der DC können von CD34<sup>+</sup> Vorläuferzellen des Knochenmarks und von Blut-Vorläuferzellen abgeleitet werden. Dafür sind verschiedene Kombinationen von Wachstumsfaktoren wie GM-CSF, TNF- $\alpha$ , IL-4 oder IL-3 notwendig. Einige funktionelle und phänotypische Unterschiede, die die einzelnen DC-Subtypen charakterisieren, sind in dieser Abbildung zusammengefasst. Quelle: (Lipscomb, et al., 2002) (verändert)

## 1.1.2 Funktion von dendritischen Zellen

Die dendritischen Zellen sind als professionelle antigenpräsentierende Zellen (APC) von zentraler Bedeutung bei der Aktivierung der Immunantwort. DC sind hochspezialisiert und können eine Immunantwort wesentlich effektiver initiieren als die Monozyten, B-Zellen und Makrophagen, die auch zu den APC gezählt werden. Ihre Funktion ist es, Antigene aufzunehmen, diese auf ihrer Oberfläche zu präsentieren und zusätzlich durch die Produktion von Zytokinen eine Immunantwort auszulösen. Die Aktivierung von T-Zellen durch DC ist eine bedeutende Schaltstelle des adaptiven Immunsystems, da T-Zellen sowohl bei den zytotoxischen Effektormechanismen als auch bei der Induktion der humoralen Immunantwort eine wichtige Funktion übernehmen. Im Gegensatz zu den B-Zellen, die Antigene direkt über ihren B-Zell-Rezeptor erkennen, können T-Zellen ein Antigen nur erkennen, wenn es an einen „Major Histocompatibility Complex“ (MHC) auf der Zelloberfläche einer APC gebunden ist.

### 1.1.2.1 Rekrutierung von DC

Neu gebildete unreife DC wandern vom Knochenmark durch den Blutstrom in nicht lymphatische Gewebe ein. Einige von ihnen werden dort ansässig, während die anderen weiterwandern. Es befindet sich stets eine konstante Zahl von DC in den Blutbahnen, um bei der Anwesenheit eines Antigens rasch zum Ort der Infektion wandern zu können. Die Migration vom Endothelium in das Gewebe ist ein mehrstufiger Prozess bei dem Selektine, Chemokine und Integrine beteiligt sind (Butcher, et al., 1996). Es konnte gezeigt werden, dass E- und P-Selektine bei der Migration im Endothelium notwendig sind (Robert, et al., 1999). DC produzieren außerdem verschiedene Matrix-Metalloproteasen, die für den Transport durch die Membranen verantwortlich sind (Caux, et al., 2000). Verschiedene Adhäsionsmoleküle (z.B. das E-cadherin bei LC) ermöglichen den DC das Verweilen in den Organen (Caux, et al., 2000). Bei einer Infektion werden verschiedene inflammatorische Chemokine gebildet, die eine verminderte Expression dieser Adhäsionsmoleküle auf den DC bewirken, so dass sie das Organ verlassen und zum Ort der Infektion wandern können. Diese Wanderung erfolgt entlang eines Chemokingradienten, der während einer Infektion aufgebaut wird. Da die einzelnen DC-Subtypen auf unterschiedliche Chemokine reagieren (siehe Tabelle 1.1), können die einzelnen Populationen selektiv rekrutiert werden.



**Tabelle 1.1: Expression von Chemokinrezeptoren bei den einzelnen DC-Subpopulationen**

Rezeptor	Ligand	Monozyten generierte DC	Interstitielle DC	Langerhans DC	Plasmazytoide DC
CCR1	MIP-1 $\alpha$	++	+	+	+
CCR2	MCP-1	-	++	++	+
CCR3	Eotaxin	+	-/+	-/gering	-/+
CCR4	TARC, MDC	-	-	-	-
CCR5	MIP-1 $\alpha$ , Rantes	+	+	-	+
CCR6	MIP-3 $\alpha$	-	-	++	-
CCR7	MIP-3 $\alpha$ , 6CKine	++ (reife)	++ (reife)	++ (reife)	++ (reife)
CCR8	1309, TARC	-	-	-	-
CCR9	TECK	+	-	-	-
CXCR1	IL-8	-	-	-	-
CXCR2	IL-8	-	-	-	-
CXCR3	IP-10, MIG	-	gering/+	-	+++
CXCR4	SDF-1	gering/+	++	gering/+	++
CXCR5	BCA-1	-	-	-	-
XCR1	Lymphotactin	-	-	-	-
CX <sub>3</sub> CR	Fractalkine	-	-	-	-

### 1.1.2.2 Antigenaufnahme

In den meisten Geweben befinden sich die DC in einem unreifen Zustand. Diese Zellen sind kaum in der Lage, T-Zellen zu stimulieren, da sie nur eine geringe Expression von T-Zell-Aktivierungsmarkern aufweisen. Dafür können sie sehr effizient Antigene aufnehmen. Dies wird durch verschiedene Mechanismen, wie die Makropinozytose, die Rezeptor-vermittelte Endozytose und die Phagozytose vermittelt.

Bei der Makropinozytose werden große pinozytotische Vesikel aufgenommen. Sie enthalten in extrazellulärer Flüssigkeit gelöste Moleküle. Dadurch verfügen die DC über die Fähigkeit, Partikel bis

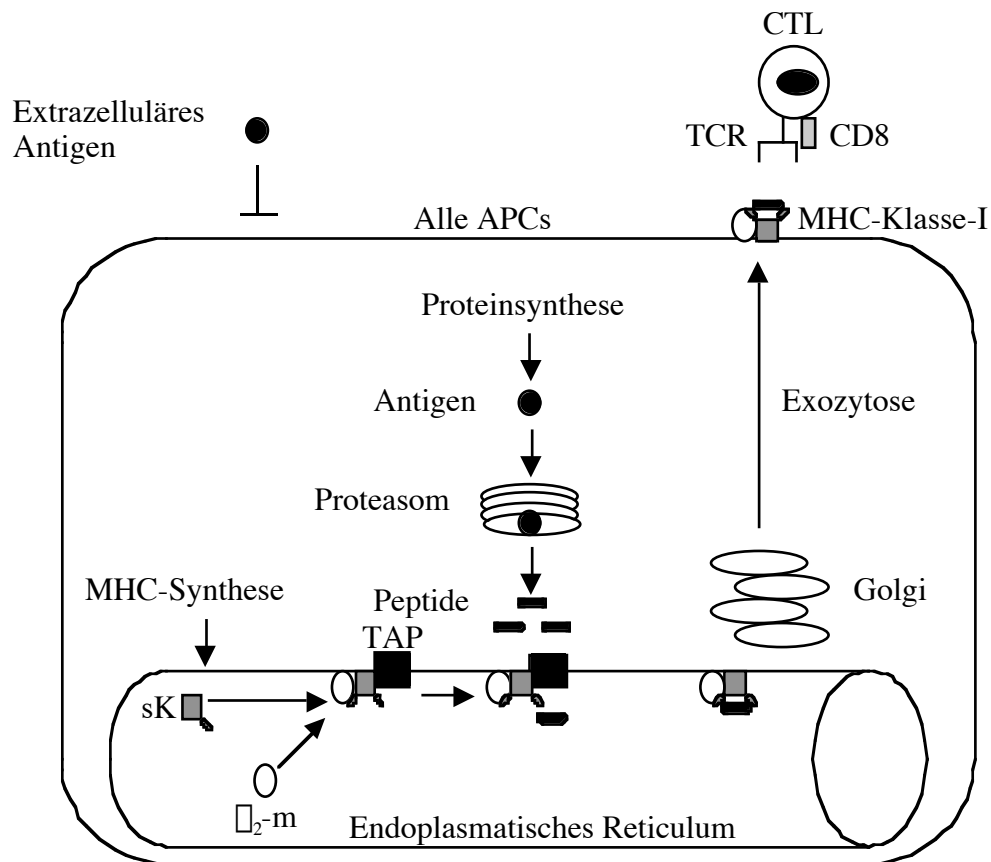
zu einem Durchmesser von  $3\mu\text{m}$  aufzunehmen, während die meisten anderen Zellen nur Moleküle bis zu einer Größe von  $1\mu\text{m}$  aufnehmen können (Mikropinozytose).

Die Antigenaufnahme über die Rezeptor-vermittelte Endozytose erfolgt bei den DC über eine Adsorption der Antigene an Rezeptoren. Die Bindung an den Rezeptor führt zur Aufnahme des gebundenen Antigens. DC exprimieren mehrere solcher Rezeptoren. Dazu zählen z. B. die Fc-Rezeptoren (FcR) (Banchereau, et al., 1998; Fanger, et al., 1996), das Mac-1-Molekül (auch CD11b/CD18-Komplex oder  $\alpha\text{M}\beta 2$  Integrin genannt) (Anderson, et al., 1986), DEC-205 (Jiang, et al., 1995), der Mannose-Rezeptor (Tan, et al., 1997), CD14 (Rescigno, et al., 1999) und die Toll-like-Rezeptoren (TLR) (Medzhitov, 2001). Die FcR binden an den Fc-Teil von Antikörpern, die ein Antigen gebunden haben. Die Aufnahmerate über FcR ist bei den DC allerdings nur halb so groß wie die der Monozyten. Das Mac-1-Molekül befindet sich in intrazellulären Vesikeln, die nach einem Chemokin-signal rasch an die Zelloberfläche transportiert werden. Dieser Rezeptor wird zur Phagozytose Komplement-gebundener Bakterien verwendet. Der Mannose-Rezeptor hat eine hohe Affinität zu Kohlenhydraten und ist daher bei der Internalisierung und Präsentation von mannosylierten Proteinen beteiligt. CD14 wurde lange als Rezeptor für Lipopolysaccharide (LPS = Bestandteil vieler Bakterienmembranen) angesehen. Da dieses Molekül aber nicht über eine Transmembrandomäne verfügt, konnte es nicht der einzige LPS-Rezeptor einer Zelle sein. Mittlerweile konnten die Toll-like-Rezeptoren 2 und 4 (TLR2 und TLR4) als weitere Rezeptoren für LPS identifiziert werden (Poltorak, et al., 1998; Yang, et al., 1998). Die TLR gehören zu den Typ I Transmembranrezeptoren. Von den mittlerweile 10 bekannten TLR des Menschen hat jeder Rezeptor seine spezifischen Liganden und kann damit eine spezifische Immunantwort auslösen (Medzhitov, 2001). Die Aufnahmerate über DEC-205, der Glycane (= Bestandteil von Oberflächenmolekülen vieler Mikroorganismen) binden kann, ist bei DC so gering, dass man sie vernachlässigen kann.

Apoptotische und nekrotische Zellfragmente werden meistens durch Phagozytose, z.B. über CD36,  $\alpha\text{v}\beta 3$ - oder  $\alpha\text{v}\beta 5$ -Integrine aufgenommen. Aber auch Viren, Bakterien und intrazelluläre Parasiten werden durch diesen Prozess, bei dem die DC das Pathogen mit pseudopodienartigen Ausläufern umschließen, internalisiert. Diese aktive Bewegung, die abhängig von actinbindenden Proteinen ist, wird entweder direkt durch den Kontakt von Mikrobe und phagozytotischem Rezeptor oder indirekt durch opsonierende Antikörper oder opsonierende Komplementfaktoren ausgelöst (Rescigno, et al., 1999).

### 1.1.2.3 Antigenprozessierung und Antigenpräsentation

DC können Antigene mit Hilfe zweier unterschiedlicher Oberflächenmoleküle, den „Major Histocompatibility“-Komplexen I und II (MHC-Klasse-I und MHC-Klasse-II) präsentieren. MHC-Klasse-I-Moleküle bestehen aus drei Ig-ähnlichen Domänen, einer Transmembrandomäne und dem nicht-kovalent assoziierten extrazellulären  $\beta_2$ -Mikroglobulin. MHC-Klasse-II-Moleküle dagegen besitzen eine  $\alpha$ - und eine  $\beta$ -Kette mit je zwei Ig-ähnlichen Domänen und einer Transmembrandomäne.



**Abbildung 1.3: Präsentation eines endogenen Antigens auf MHC-Klasse-I-Molekülen**

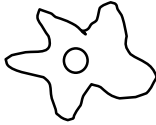
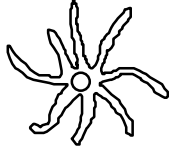
Im endoplasmatischen Retikulum (ER) binden neu synthetisierte schwere Ketten (sK) von MHC-Klasse-I-Molekülen an  $\beta_2$ -Mikroglobulin ( $\beta_2$ -m). Dieser Komplex wird solange am „transporter associated with antigen processing“ (TAP-Transporter) festgehalten, bis er mit einem Peptid beladen wird. Peptide werden im Zytosol im Proteasom aus Proteinen hergestellt und in das ER transportiert. Nach der Peptidbindung wird das fertige MHC-Klasse-I-Molekül mittels Exozytose an die Plasmamembran transportiert. Die auf den MHC-Klasse-I-Molekülen präsentierten Peptide aktivieren  $CD8^+$  zytotoxische T-Zellen (CTL), die den entsprechenden T-Zell-Rezeptor (TCR) tragen. Quelle: (Rock, 1996) (verändert).

Endogene Antigene werden im Zytoplasma durch intrazelluläre Proteasen und Peptidasen in Peptidfragmente gespalten. Diese häufig aus 9 Aminosäuren bestehenden Peptidfragmente werden durch die Bindung an den TAP1/TAP2-Translokator in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER) transportiert. In der ER-Membran werden neu synthetisierte MHC-Klasse-I-Moleküle durch Chaperone zurückgehalten, bis das MHC-Klasse-I-Molekül mit  $\beta_2$ -Mikroglobulin und einem geeigneten Peptidfragment beladen worden ist. Erst beladene MHC-Klasse-I-Moleküle können das ER verlassen und zur Oberfläche wandern (Howard, 1995; Lehner, et al., 1996; York, et al., 1996). Diese MHC-Klasse-I-Moleküle können  $CD8^+$  T-Zellen aktivieren, die dann zu zytotoxischen T-Zellen (CTL) ausdifferenzieren (siehe Abbildung 1.3).

Exogene Antigene, die durch Phagozytose oder Endozytose in die DC gelangen, werden in Vesikeln bei sinkendem pH-Wert von Proteasen in kleine Peptidfragmente gespalten. Bei der Bildung von MHC-Klasse-II-Molekülen werden zuerst die  $\alpha$ - und die  $\beta$ -Kette der MHC-Klasse-II-Moleküle synthetisiert und dann, an HLA-DM gebunden, in die Klasse-II-Kompartimente (MIIC) innerhalb des ERs transportiert. Dort erhalten sie ihre endgültige Struktur und werden, in Vesikeln verpackt, aus dem Beladungskompartiment zur Plasmamembran geschleust. Nach der Fusion der beiden oben erwähnten Vesikel, wird das HLA-DM durch ein Fremdpeptid ausgetauscht (German, et al., 1996; Lanzavecchia, 1996). MHC-Klasse-II-Moleküle aktivieren  $CD4^+$  T-Zellen, die dadurch B-Zellen zur Proliferation und zur Produktion von Antikörpern anregen können.

#### 1.1.2.4 Zellausreifung

Die Aufnahme und Prozessierung von Antigenen, die Interaktion mit einigen Molekülen (z.B. CD40 und CD40L) oder die Anwesenheit von Zytokinen lösen bei unreifen dendritischen Zellen eine Reihe von phänotypischen, morphologischen und funktionellen Veränderungen aus (Jonuleit, et al., 1997; Reddy, et al., 1997; Sallusto, et al., 1995). Dadurch wird aus der antigenaufnehmenden Zelle eine antigenpräsentierende Zelle. Aber nicht nur der Verlust der Antigenaufnahmefähigkeit kennzeichnet diesen Prozess, sondern auch die verminderte Endozytosekapazität und das Verschwinden der MHC-Klasse-II-Kompartimente. Gleichzeitig kommt es zu einer erhöhten Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen, MHC-Klasse-II-Molekülen und den zur T-Zell-Aktivierung notwendigen Kostimulations- und Adhäsionsmolekülen (z.B. CD54, CD80, CD86 und CD40) auf der Zelloberfläche. Ferner wird die Expression des Homing-Faktors CCR7 induziert und die Expression anderer Chemokinrezeptoren (z.B. CCR6) vermindert. Die charakteristischen Unterschiede

	Unreife DC	Reife DC
		
		Reifungssignal →
Endozytose/Phagozytosekapazität	+++	+
MHC-II	Intrazellulär	auf Zelloberfläche
Expression von		
- Chemokinrezeptoren		
- CCR1	+++	+/-
- CCR5	+++	+/-
- CCR6	+++	+/-
- CCR7	-	+++
- Kostimulationsmoleküle		
- CD4	+	+
- CD40	+	++
- CD80	+	++
- CD86	+	++
- Adhäsionsmolekülen		
- CD11c	+++	+++
- CD33	++	+
- CD54	+	++
- CD58	+	++
- Reifungsmarker		
- CD83	-	++
- Antigenpräsentationsmoleküle		
- MHC-I	++	+++
- CD1a	++	++
- Aminopeptidase-N (CD13)	+++	++
Produktion von Zytokinen	-/+	+++

**Abbildung 1.4: Charakteristische Merkmale von unreifen und reifen DC**

Während der Reifungsphase durchlaufen unreife DC verschiedene morphologische und funktionelle Veränderungen. Reife DC verlieren ihre Fähigkeit Antigene aufzunehmen und steigern gleichzeitig ihre Fähigkeit T-Zellen zu stimulieren.

zwischen den unreifen und den reifen DC sind in Abbildung 1.4 zusammengefasst. Der Reifungsprozess ist zusätzlich durch die Sezernierung verschiedener Zytokine und die Reorganisation des Zytoskeletts gekennzeichnet. Während der Reifung wandern die DC vom Ort der Antigenaufnahme über die afferenten Lymphe in die Lymphknoten ein. Dort findet in den T-Zell-Regionen die antigenspezifische Präsentation und Stimulierung von T-Lymphozyten statt (Larsen, et al., 1990; Steinman, 1991).

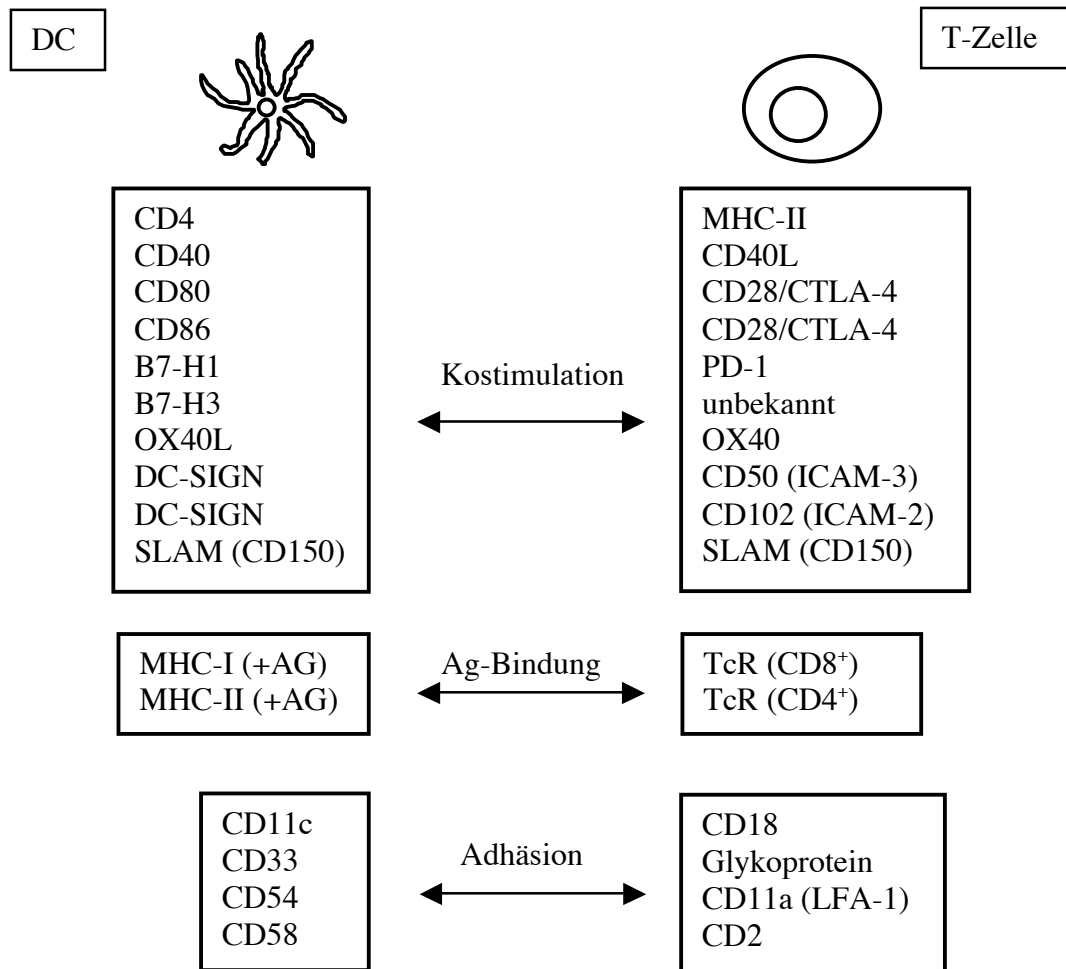
In Zellkultur kann dieser Reifungsprozess durch die Zugabe von TNF- $\alpha$  (Sallusto, et al., 1994), CD40-Ligand (CD40L) (Wurtzen, et al., 2001), LPS (Sallusto, et al., 1995), monozytenkonditioniertem Medium (Bender, et al., 1996) oder einem Gemisch aus IL-1 $\alpha$ /IL-6/TNF- $\alpha$ /Prostaglandin E<sub>2</sub> (Jonuleit, et al., 2000) ausgelöst werden. In dieser Arbeit wurde mit TNF- $\alpha$ , mit LPS oder mit IL-1 $\alpha$ /IL-6/TNF- $\alpha$ /PGE<sub>2</sub> ausgereiften DC gearbeitet.

### 1.1.2.5 Migrationsregelung der Antigen beladenen DC

Nach der Antigenaufnahme werden Signale zur Wanderung der DC zu den Lymphorganen, dem Ort der T-Zell-Stimulation, induziert. Diese Wanderung wiederum erfolgt entlang von Chemokingradienten. Unreife DC besitzen für die Wanderung zu den Geweben und zum Ort der Infektion unterschiedliche Rezeptoren. Langerhans Zellen exprimieren beispielsweise CCR6-Moleküle und reagieren daher auf das Chemokin MIP-3 $\alpha$ , DC des Blutes exprimieren CCR2 und reagieren auf MCP, aus Monozyten generierte DC exprimieren CCR1 und CCR5 und reagieren auf MIP-1 $\alpha$ / $\beta$ . Es ist zu vermuten, dass durch die unterschiedliche Produktion der Chemokine selektiv einzelne DC-Subpopulationen rekrutiert werden können und damit Einfluss auf die Art der Immunantwort genommen werden kann. Nach der Aufnahme von Antigenen erfolgt eine verminderte Expression dieser Chemokinrezeptoren und eine verstärkte Expression des Chemokinrezeptors CCR7 (siehe Abbildung 1.4). Dieser Rezeptor bindet die Chemokine SLC/6CKine und MIP-3 $\alpha$ . SLC/6CKine werden in den Lymphgefäßen von spezialisierten säulenförmigen hohen Endothelzellen produziert, die sich in den Venulen der Lymphknoten befinden („high endothelial venuels“ (HEV)). Dieses Chemokin bewirkt die direkte Wanderung der reifen DC zu den afferenten Lymphgefäßen. MIP-3 $\alpha$  dagegen wird von Zellen der T-Zell-Region gebildet und leitet die Zellen bis in die parakortikale Region der Lymphknoten (Caux, et al., 2000).

### 1.1.2.6 Aktivierung der T-Zellen

Nachdem DC ein Antigen aufgenommen und prozessiert haben, wandern sie in die Lymphknoten, um dort die Antigene den naiven T-Zellen zu präsentieren und deren Differenzierung in Effektorzellen zu initiieren. Wichtig dabei sind aber nicht nur die von den DC übermittelten Signale, sondern auch die Konzentration des Antigens, die Konzentration der Zytokine und die Konzentrationen anderer löslicher Faktoren in der Umgebung. Der Zell-Zell-Kontakt zwischen DC und T-Zelle wird durch die Interaktion ihrer Adhäsionsmoleküle vermittelt. Auf den DC sind dabei vorwiegend CD11c, CD54 (ICAM-1) und CD58 (LFA-3) beteiligt und bei den T-Zellen CD18, CD11a (LFA-1) und CD2 (Inaba, et al., 1989; Prickett, et al., 1992; Xu, et al., 1992). Bei der spezifischen Bindung des T-Zellrezeptors (TCR) an einen Antigen/MHC-Komplex auf DC erhöht sich die Affinität zwischen den Adhäsionsmolekülen so stark, dass die Zellen über Tage in Kontakt bleiben können (Dustin, et al., 1989). Reife DC sind in der Lage sowohl naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen (erkennen Antigene die an MHC-Klasse-II gebunden sind) als auch naive CD8<sup>+</sup> T-Zellen (erkennen Antigene die an MHC-Klasse-I gebunden sind) zu stimulieren. Für eine vollständige Aktivierung benötigen die T-Zellen aber noch ein weiteres kostimulatorisches Signal. Dies wird z.B. durch die Bindung der DC-Moleküle CD40, CD80 oder CD86 an die T-Zell-Moleküle CD40L, CD28 oder CTLA-4 ausgelöst (siehe Abbildung 1.5). Entfällt dieses kostimulatorische Signal, werden die T-Zellen entweder anerg oder sie treten in Apoptose ein (Jenkins, 1994; Schwartz, 1990). Infolge des DC-T-Zell-Kontaktes kommt es unter anderem zur Produktion von IL-2. Gleichzeitig wird die Expression der IL-2-Rezeptoren hochreguliert. Dies ermöglicht die klonale Expansion der T-Zellen (Fraser, et al., 1991; Jain, et al., 1995). In Abbildung 1.5 ist die Interaktion von DC mit den T-Zellen noch einmal veranschaulicht. Naive CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die durch ein an MHC-Klasse-I gebundenes Antigen aktiviert wurden, differenzieren zu zytotoxischen T-Zellen (CTL). Treffen sie auf eine Zelle, die auf ihrer Oberfläche einen Antigen/MHC-Klasse-I-Komplex exprimiert, der spezifisch an den TCR der CTL bindet, werden diese Zellen von den CTL lysiert und abgetötet (O'Rourke, et al., 1992). CTL haben dafür 2 Mechanismen entwickelt. Entweder sie attackieren die zu lysierende Zelle mit Perforin, welches die Zellmembran durchlöchert oder sie binden an den Fas-Rezeptor der Zielzelle und lösen damit deren programmierten Zelltod aus (Paul, 1993). Für die Differenzierung der durch Antigen/MHC-Klasse-II-Komplex aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen spielt die Sekretion von Zytokinen eine wichtige Rolle (Mosmann, et al., 1989). Bei Anwesenheit von IL-12 wird aus einer aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zelle eine T-Helferzelle Typ 1 (TH<sub>1</sub>). Diese inflammatorischen TH<sub>1</sub>-Zellen sezernieren IFN- $\gamma$ , IL-2 und TNF- $\alpha$ . Dadurch werden z. B. Makrophagen aktiviert, Pathogene durch

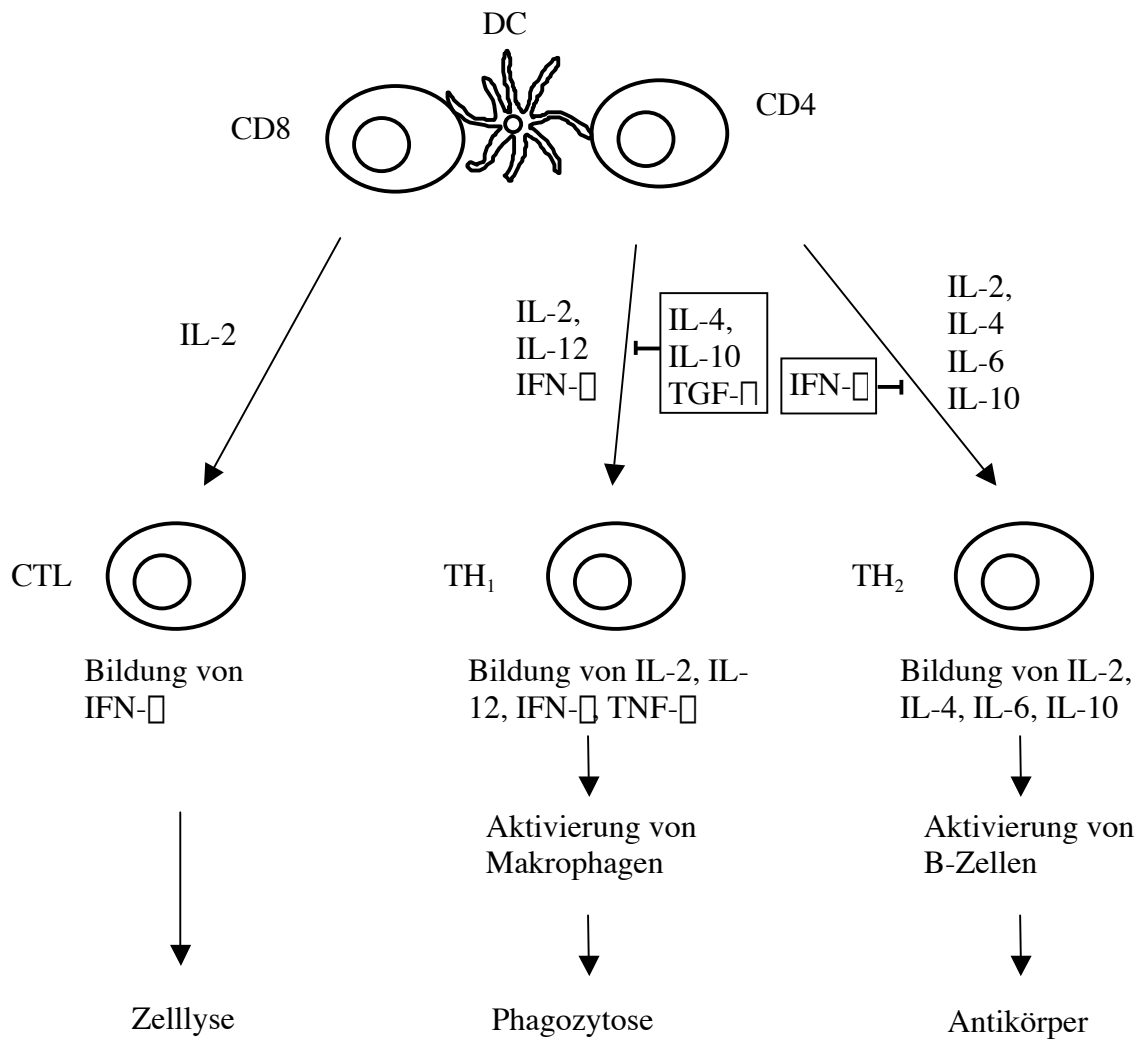


**Abbildung 1.5: Interaktion von DC und T-Zellen**

Hier sind die notwendigen Moleküle für die Aktivierung von naiven T-Zellen durch DC dargestellt. Für die Aufrechterhaltung des Zell-Zell-Kontaktes sind die Adhäsionsmoleküle notwendig. Die Antigene werden auf den MHC-Molekülen präsentiert. Durch die Kostimulationsmoleküle, die sich nur auf APC befinden, erhalten die T-Zellen ihr zweites Signal, dass für ihre Aktivierung unerlässlich ist.

Phagozytose zu eliminieren (siehe Abbildung 1.6). Bei der Anwesenheit von IL-4, IL-6 und IL-10 erfolgt eine Differenzierung in Richtung T-Helferzelle Typ 2 (TH<sub>2</sub>). Diese Zellen sezernieren vorwiegend IL-2, IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10 und regen B-Zellen zur Bildung von Antikörpern an (Paul, 1993). In Abbildung 1.6 ist dies noch einmal anschaulich zusammengefasst. Abhängig vom Antigen, wird entweder eine TH<sub>1</sub>-oder eine TH<sub>2</sub>-Antwort ausgelöst oder zuerst eine TH<sub>1</sub>- und anschließend eine TH<sub>2</sub>-Antwort initiiert. Werden beide Antworten ausgelöst, wird einige Stunden nach dem Auslösen der TH<sub>1</sub>-Antwort die Zytokinproduktion umgestellt und es erfolgt anschließend eine TH<sub>2</sub>-Antwort (Langenkamp, et al., 2000).





**Abbildung 1.6: Einfluss der Zytokine auf die Differenzierung von T-Zellen**

Aktivierte T-Zellen differenzieren sich je nach Zytokinmilieu in unterschiedliche Effektorzellen. CD8<sup>+</sup> T-Zellen werden zu zytotoxischen T-Zellen, CD4<sup>+</sup> T-Zellen dagegen zu T-Helferzellen Typ 1 oder Typ 2. Da TH<sub>1</sub>-Zytokine hemmend auf die TH<sub>2</sub>-Antwort wirken und die TH<sub>2</sub>-Zytokine die TH<sub>1</sub>-Antwort inhibieren, kann nur eine von beiden Antworten ausgelöst werden.

Plasmazytoide DC produzieren nicht nur IL-12 sondern auch große Mengen an IFN- $\gamma$ . Dieses Zytokin spielt bei der Bekämpfung von viralen Infekten eine wichtige Rolle. Es hemmt die virale Replikation, erhöht die MHC-Klasse-I-Produktion und aktiviert natürliche Killerzellen (NK-Zellen) ( Paul, 1993).

### 1.1.3 Die Rolle der DC bei viralen Infekten

Viren vermehren sich intrazellulär. Daher werden die verschiedenen Virusantigene auf den DC vorwiegend auf MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert. Im Mausmodell konnten beispielsweise CD8<sup>+</sup> CTL gegen virale Antigene des Sendai-Virus, des Moloney-Leukämie-Virus, des Herpes-Simplex-Virus und des Influenza-Virus nachgewiesen werden (Hengel, et al., 1987; Kast, et al., 1988; Nonacs, et al., 1992). Untersuchungen mit humanen DC und verschiedenen Viren (z.B. Influenza-Viren) zeigten, dass humane DC nach Kontakt mit diesen Viren, ebenfalls funktionelle CTL-Antworten auslösen konnten (Bender, et al., 1995; Bhardwaj, et al., 1994). Außerdem haben auch einige von DC gebildete Zytokine eine antivirale Wirkung. IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$  hemmen z.B. die virale Replikation. IFN- $\gamma$  inhibiert ebenfalls die virale Vermehrung, wird aber hauptsächlich von aktivierten NK-Zellen und T-Effektorzellen gebildet.

Viren haben im Laufe der Koevolution mit ihren Wirtsorganismen vielfältige Mechanismen entwickelt, der Immunantwort durch die DC zu entgehen. Dazu gehört z. B. die Replikation innerhalb einer Wirtszelle, das Abtöten von DC oder das Verhindern einer Antigenpräsentation. Eine weitere Strategie, die z. B. vom Humanen Immunodefizienz-Virus (HIV) genutzt wird, ist die Infektion von DC in der Peripherie, die daraufhin ausreifen und zu den T-Zellen in den Lymphknoten, dem Ort der HIV-Replikation, wandern (Braathen, et al., 1987; Cameron, et al., 1994). Masern und HSV dagegen benutzen die infizierten DC nicht nur als Transportvehikel, sondern hemmen auch die DC-vermittelte T-Zell-Proliferation (Fugier-Vivier, et al., 1997; Grosjean, et al., 1997; Salio, et al., 1999; Schnorr, et al., 1997).

Auch für das humane Zytomegalievirus (HCMV) sind einige immunmodulatorische Mechanismen bekannt, die in 1.2.7 näher beschrieben werden.

## 1.2. Das humane Zytomegalievirus (HCMV)

Zytomegalieviren (auch als humanes Herpesvirus Typ 5 (HHV5) bezeichnet) gehören in die Familie der Herpesviren. Da sie sich durch einen langsamen Replikationszyklus und ein enges Wirtsspektrum auszeichnen, sind sie der Subfamilie der Betaherpesviren zugeordnet. Der Name Zytomegalievirus leitet sich von ihrer Eigenschaft ab, infizierte Zellen zu vergrößern (griech: kytos, Zelle; megas, groß) und die Bildung charakteristischer DNA-haltiger intranukleärer Einschlusskörperchen zu induzieren. 1956 gelang Smith die erstmalige Isolierung von HCMV aus der Speicheldrüse und den Nieren eines Kindes (Smith, 1956).

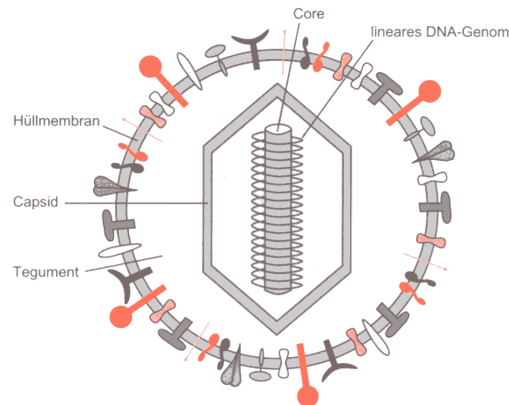
### 1.2.1 Genomaufbau von HCMV

Das Genom von HCMV liegt als lineare Doppelstrang-DNA im Nukleokapsid vor und besitzt mit seinen 229354 Basenpaaren (bp), die für ca. 200 Proteine kodieren, das größte Genom unter den Herpesviren (Geelen, et al., 1978). Die Sequenz des HCMV-Laborstammes AD169 ist vollständig bekannt (Chee, et al., 1990) (EMBL Nukleotid-Datenbank Accession-No. X17403). Etwa 30 Proteine weisen in ihrer Aminosäuresequenz eine signifikante Homologie mit entsprechenden Genprodukten anderer Herpesviren auf.

Das Genom ist in zwei Segmente unterteilt, eine lange Einheit Unique long ( $U_L$ ) und eine kurze Einheit Unique short ( $U_S$ ). Diese nicht-repetitiven Genomsegmente werden von repetitiven Sequenzen, den terminal repeats (TRs) und internal repeats (IRs), flankiert. Mit Hilfe der TRs kann das Genom eine geschlossene Ringform bilden, welche für die Replikation notwendig ist. Während der Replikation können durch intramolekulare Rekombination der TRs und IRs vier isomere Genomformen entstehen, in denen die  $U_L$ - und die  $U_S$ -Regionen unterschiedlich zueinander orientiert sind. Die Ausgangsstelle für die Genomreplikation befindet sich in der  $U_L$ -Region.

## 1.2.2 Virale Struktur

HCMV-Virionen haben einen Durchmesser von ca. 150 nm und bestehen, wie alle Herpesviren, aus einem Nukleokapsid, einer Hülle (Envelope) und einem Tegument (Mocarski, 1996). Der schematische Aufbau eines HCMV-Virions ist in Abbildung 1.7 dargestellt.



**Abbildung 1.7: Schematische Zeichnung eines HCMV-Virions**

Im Innern des Virions befindet sich das Nukleokapsid mit dem linearen, doppelsträngigen DNA-Genom. Zwischen dem Nukleokapsid und der Hüllmembran befindet sich das Tegument. In die Hüllmembran eingelagert sind die verschiedenen Glykoproteine. Quelle: (Modrow, 1997) (verändert)

Das Nukleokapsid von HCMV umgibt die doppelsträngige DNA und besteht aus 162 Kapsomeren, die sich zu einem etwa 100 nm großen Ikosaeder zusammenfügen. Der größte Teil wird von dem "major capsid protein" (MCP) gebildet. Das "minor capsid protein" befindet sich an der Innenseite des Kapsides und spielt dort eine Rolle beim Verankern der DNA. Verschiedene andere Proteine, deren Aufgabe z.B. der Transport des MCP in den Zellkern ist, vervollständigen das Kapsid. Die Kapsidproteine sind nur gering immunogen (Gibson, et al., 1996; Jahn, et al., 1990).

Die Kapside sind von einer Hüllmembran (Envelope) umgeben, in die verschiedene Glykoproteine eingelagert sind. Von den acht bekannten HCMV-Glykoproteinen sind das Glykoprotein B (gB) und das Glykoprotein H (gH) die am besten charakterisierten. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Penetration der Viruspartikel, bei der Fusion der Virushülle mit der Zellmembran und bei der Weitergabe des Virus von Zelle zu Zelle (Keay, et al., 1991; Navarro, et al., 1993; Pachel, et al., 1989; Reschke, et al., 1995). Aber auch immunmodulierende Proteine sind Bestandteil des Envelo-

pes. So kann z.B. das US-11-Genprodukt die MHC-Klasse-I-Expression der Wirtszelle beeinflussen, während das US-6-Genprodukt den TAP-Transporter, der für die Bildung von MHC-Klasse-I-Molekülen notwendig ist, blockiert (Hengel, et al., 1997; Wiertz, et al., 1996).

Zwischen Nukleokapsid und Hülle befindet sich das Tegument, eine unstrukturierte Matrix, die bis zu 20 Virusproteine enthält. Sie gelangen bei einer Infektion mit in die Zelle und übernehmen wichtige regulatorische Funktionen im Replikationszyklus des Virus. Zwei der häufigsten Tegumentproteine des HCMV sind die Phosphoproteine pp65 und pp150. Beide sind stark immunogen und können eine CTL-Antwort auslösen (Jahn, et al., 1987).

### 1.2.3 Replikationszyklus

Der Replikationszyklus dauert bei HCMV ca. 72 Stunden. Die Infektion beginnt mit der Adsorption der viralen Glykoproteine an bisher noch unbekannte Rezeptoren der Zielzelle. Anschließend fusioniert die Virushülle mit der Zellmembran und das Nukleokapsid gelangt zusammen mit dem Tegument in das Zytoplasma. Das Kapsid wird mit Hilfe von Mikrotubuli zum Kern transportiert und entlässt die HCMV-DNA in das Nukleoplasma. Das DNA-Genom zirkularisiert und liegt dann als Episom im Kernplasma vor.

Die Expression des Virusgenoms erfolgt in einem kaskadenartig regulierten Zyklus (Becker, 1993; Mocarski, 1996). Bereits 30 min nach der Infektion beginnt die Transkription der „immediate early“ Proteine (IE) mit Hilfe der RNA-Polymerase II der Wirtszelle, wobei die Tegumentproteine des infizierenden Viruspartikels als Transaktivatoren wirken. Die IE-Proteine werden im Kern angereichert und regulieren dort die weiteren Schritte der Virusvermehrung, indem sie die Aktivität viraler und zellulärer Promotoren beeinflussen. Etwa acht bis 36 Stunden nach Infektion erfolgt die Transkription der „delayed early“ Gene (E). Bei diesen Proteinen handelt es sich hauptsächlich um Enzyme, wie zum Beispiel die DNA-Polymerase oder die Helikase, welche für die Replikation des Virusgenoms erforderlich sind. Die Replikation des HCMV-Genoms beginnt etwa 12 bis 24 Stunden nach der Infektion und folgt dem Prinzip des „rolling circle“. Dabei wird ein DNA-Strang geschnitten, so dass ein 3'-OH- und ein 5'-Phosphat-Ende entstehen. Die Nukleotide werden mit dem 3'-OH-Ende als Primer und unter Verwendung des geschlossenen DNA-Stranges als Matrize kontinuierlich ansynthetisiert. Das 5'-Ende wird fortlaufend vom Matrizenstrang gelöst und zum Doppelstrang ergänzt. So bildet sich ein DNA-Strang, der vielfache Einheiten des Virusgenoms in konkatemerer Anordnung enthält.

Ungefähr zeitgleich mit der Replikation der Virus-DNA werden die "late" Proteine (L) exprimiert. Hierbei handelt es sich um Strukturproteine: Glykoproteine, Tegumentproteine und Proteine des Nukleokapsids. Ein Teil der gebildeten Glykoproteine wird zur Zelloberfläche transportiert und in die Zytoplasmamembran eingebaut. Gegen diese Proteine richtet sich die Antikörper-vermittelte zytotoxische T-Zell-Antwort, die zur Lyse der als infiziert erkennbaren Zellen führt.

Im Zellkern findet anschließend der Zusammenbau der verschiedenen Strukturproteine des Virus-Genoms zum Viruspartikel statt. Es folgt der Transport durch die innere und äußere Kernmembran, das endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche. Hier werden die auf ihrem Weg modifizierten und gereiften Virionen freigesetzt. Das Virus kann sich jedoch auch durch Zell-Zell-Kontakt oder Zellfusion ausbreiten. Der Infektionszyklus endet mit der Lyse der Zelle.

Wie alle Herpesviren besitzt auch HCMV einen lytischen und einen latenten Infektionszyklus. Bei der Latenz kann das Virus lebenslang im Organismus verbleiben und persistieren. Hierbei liegt die Virus-DNA in den Zellen als extrachromosomales Episom im Kernplasma vor. Sie wird parallel mit dem Zellgenom durch die zelluläre DNA-Polymerase repliziert und an die Tochterzellen weitergegeben. Die Produktion infektiöser Partikel wird unterdrückt. Die Etablierung und die Aufrechterhaltung der Latenz sowie die erneute Reaktivierung zur lytischen Replikation wird z.B. über CMV-Latenz-Assoziierte-Transkripte reguliert (Kondo, et al., 1995; Slobedman, et al., 1999). Allerdings spielt auch der Differenzierungsgrad der Zelle eine Rolle. Während HCMV in Monozyten, myelomonozytären Vorläuferzellen des Knochenmarks und Endothelzellen latent verweilen kann, wird in Makrophagen der lytische Infektionszyklus ausgelöst (Fish, et al., 1995; von Laer, et al., 1995).

#### **1.2.4 Epidemiologie, klinische Symptomatik und Therapie**

Die Zytomegalieviren sind weltweit verbreitet und besitzen eine hohe Wirtsspezifität. Das einzige Reservoir für HCMV ist der Mensch. Eine Übertragung von HCMV erfolgt durch den Kontakt mit infektiösen Körpersekreten wie Speichel, Urin, Sperma, Zervixsekret und Tränenflüssigkeit (W. J. A. Britt, C.A., 1996). Eine Mutter kann das Virus transplazentar und durch Muttermilch auf ihr Kind übertragen (Reynolds, et al., 1973; Stagno, et al., 1980). Außerdem kann das Virus auch über Blutprodukte oder durch Transplantationen in den Organismus gelangen. Die Durchseuchungsrate liegt in den westlichen Ländern bei etwa 60% der über 35-jährigen. In weniger entwickelten Ländern kann sie, wie in einigen Teilen Afrikas, bis auf 100% steigen (Onorato, et al., 1985). Die Infektion ist endemisch und hat keine jahreszeitliche Häufung.

Die Inkubationszeit beträgt zwischen vier und acht Wochen. Die Primärinfektion immunkompetenter Personen verläuft meist asymptomatisch, in seltenen Fällen kann es zu mononukleoseähnlichen Erkrankungen kommen. Danach werden die Zytomegalieviren intermittierend ausgeschieden. HCMV-Infektionen sind die häufigsten kongenitalen viralen Infektionen des Lebendgeborenen. Die häufigsten Symptome dabei sind Hepatosplenomegalien, Thrombozytopenien, Hörschäden und Entwicklungsdefekte aufgrund der Infektion des zentralen Nervensystems (Becker, 1993; W. J. Britt, Alford C.A., 1996).

Bei immunsupprimierten Patienten kann eine HCMV-Infektion schwere, zum Teil tödlich verlaufende Krankheitsbilder verursachen. Sie reichen von einer Fieberreaktion bis zu lebensbedrohlichen Organmanifestationen wie Hepatitis, Chorioretinitis, Enzephalitis, gastrointestinaler Ulzeration oder die interstitielle HCMV-Pneumonie. Letztere tritt bei 10-15% der Herz-, Lungen- oder Knochenmarktransplantationen auf und führt unbehandelt in 80-90% der Fälle zum Tod. Sowohl eine HCMV-Primärinfektion, wie auch eine Reaktivierung können bei organtransplantierten Patienten zur Abstoßung des Transplantats führen (Becker, 1993; W. J. Britt, Alford C.A., 1996).

Bei HIV-infizierten Personen kann HCMV zu einer disseminierten Infektion mit multiplem Organbefall wie Lunge, Nebenniere, Gastrointestinaltrakt, dem zentralen Nervensystem und der Netzhaut führen (Becker, 1993; W. J. A. Britt, C.A., 1996). Dabei kommt es häufig zur Erblindung der Patienten (HCMV-Retinitis). Eine HCMV-Infektion beschleunigt den Krankheitsverlauf von AIDS und gilt als prognostisch ungünstig (Leach, et al., 1994).

Zur Behandlung einer aktiven HCMV-Infektion stehen zur Zeit das Nukleosidanalogen Ganciclovir und das Pyrophosphatanalogen Foscarnet zur Verfügung (Becker, 1993). In beiden Fällen wird die Virus-Replikation unterbrochen und somit die Virusvermehrung verhindert.

Als prophylaktische Maßnahmen vor HCMV-Infektionen empfiehlt sich bei seronegativen Empfängern die Verwendung von seronegativen Blutprodukten und Organen. Ein Impfstoff gegen HCMV steht derzeit noch nicht zur Verfügung.

### **1.2.5 Zelltropismus von HCMV**

Histopathologische Untersuchungen von Organen HCMV-infizierter Patienten zeigen, dass zahlreiche Organe und Zelltypen mit diesem Virus infiziert werden können. Hauptzielzellen sind ubiquitär vorkommende Zellen, wie Epithel- und Endothelzellen sowie Fibroblasten (Sinzger, et al., 1995). In virämischen Patienten kann das Virus auch in den Leukozyten des peripheren Blutes, in Granulozyten und Monozyten nachgewiesen werden (Gerna, et al., 1992). HCMV konnte aber auch schon

in Neuronen des Gehirns, in Zellen der Retina, in der glatten Muskulatur des Gastrointestinaltraktes und in Hepatozyten gefunden werden (Rummelt, et al., 1994; Sinzger, et al., 1993; Wiley, et al., 1988). Die Fähigkeit viele verschiedene Zellpopulationen infizieren zu können, wurde durch *in vitro* Versuche bestätigt. Allerdings sind diese Zellen nicht immer permissiv für HCMV. Dies bedeutet, dass die Zellen zwar lebenslang latent infiziert sind, aber keinen vollständigen Replikationszyklus durchführen können. In diesem Zusammenhang wurden als Latenzorte vor allem Monozyten und myelomonozytäre Vorläuferzellen des Knochenmarks erkannt (Hahn, et al., 1998; Taylor-Wiedeman, et al., 1991). Diese Zellen sind nicht in der Lage HCMV-IE-Proteine zu bilden. Erst mit der Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen kann eine produktive Infektion erfolgen (Cinatl, et al., 1994; Lazzarotto, et al., 1994; Poland, et al., 1994).

Für die Virusanzucht in der Zellkultur werden hauptsächlich Fibroblasten und Endothelzellen verwendet. Beide Zellpopulationen zeichnen sich durch Permissivität gegenüber HCMV aus. Da sich diese Stämme unterschiedlich verhalten, wird zwischen Endothelzell-adaptierten HCMV-Stämmen (ECV) und Fibroblasten-adaptierten HCMV-Stämmen (FFV) unterschieden. ECV verhält sich wie ein HCMV-Stamm *in vivo* und besitzt eine größere Infektiösität als FFV. Das unterschiedliche Infektionsverhalten ist wahrscheinlich durch den Verlust einiger Gene bei FFV während der Viruspassagen auf Fibroblasten in der Zellkultur zu erklären (Cha, et al., 1996; Sinzger, et al., 1999).

### 1.2.6 Immunantwort gegen HCMV

Um eine HCMV-Infektion kontrollieren zu können, sind sowohl NK-Zellen wie auch zelluläre und humorale Komponenten des Immunsystems notwendig. Da HCMV mit den Zellen des Immunsystems interagieren kann, ist es schwierig, den genauen Wirkungsgrad der einzelnen Bestandteile zu bestimmen.

NK-Zellen werden bei einer HCMV-Infektion während der Bildung der HCMV-Early-Proteine aktiviert. Diese Aktivierung ist unabhängig von der Anwesenheit von Interferonen (Borysiewicz, et al., 1985).

Die Bildung von Antikörpern kontrolliert die virämische Ausbreitung von HCMV (Becker, 1993). Es konnte gezeigt werden, dass die Gabe von CMV-Immunglobulinen eine protektive Wirkung hat. Dies kann man sich auch bei HCMV erkrankten Menschen zu nutze machen (Zaia, 1993).

Die zelluläre Immunantwort ist für die Kontrolle der lytischen Infektion und für die Beendigung der Symptome verantwortlich. Ein adoptiver Immuntransfer von HCMV-spezifischen CTL reduziert erheblich die Entwicklung schwerer HCMV-Infektionen bei Knochenmarktransplantierten (Riddell,

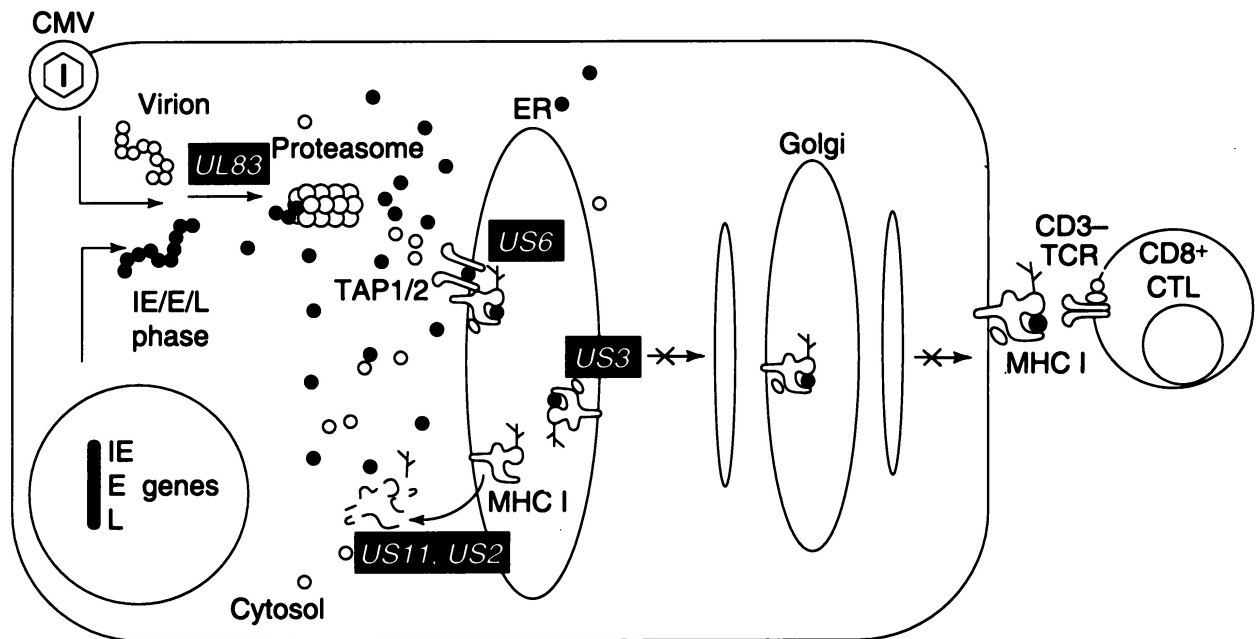


et al., 1992). Daher wird der CTL-Antwort eine entscheidende Rolle bei der Bekämpfung einer HCMV-Infektion zugeschrieben. Neuere Untersuchungen zeigen allerdings, dass für die Persistenz von CD8<sup>+</sup> CTL die CMV-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen notwendig sind (Walter, et al., 1995).

Die Reaktivierung oder eine Neuinfektion mit HCMV kann aber weder die humorale noch die zelluläre Immunantwort verhindern.

### 1.2.7 Immunmodulation durch HCMV

HCMV selbst hat verschiedene Mechanismen entwickelt, durch immunmodulatorische Effekte der Eliminierung durch das Immunsystem zu entgehen. Dazu gehört z.B. die Entwicklung der lebenslangen Persistenz innerhalb des Wirtsorganismus oder die Fähigkeit in Zellen zu replizieren, die vom Immunsystem weniger stringent überwacht werden. Ein Beispiel dafür sind die Epithelzellen der Speiseröhre. Diese Zellen exprimieren nur wenige MHC-Klasse-I-Moleküle und können daher nach einer HCMV-Infektion die CTL nur gering aktivieren (Hengel, et al., 1998). Außerdem kann HCMV durch die Expression verschiedener Faktoren die virusspezifische Immunantwort des Wirtes stark vermindern. Ein detailliert untersuchter Effekt ist die Manipulation der MHC-Klasse-I gekoppelten Antigenpräsentation (siehe Abbildung 1.8). Das virale US-3-Protein sorgt beispielsweise dafür, dass die gebildeten MHC-Klasse-I-Komplexe das endoplasmatische Retikulum nicht verlassen können (Ahn, et al., 1996), während das US-6-Protein dafür verantwortlich ist, dass der Import von Peptiden durch den TAP-Transporter in das ER blockiert ist (Ahn, et al., 1997). Die von US-2- und US-11 kodierte Glykoproteine exportieren membraninsertierte schwere Ketten von MHC-Klasse-I-Molekülen zurück in das Zytosol, wo sie vom Proteasom degradiert werden (Wiertz, et al., 1996; Wiertz, et al., 1996). Außerdem kann das HCMV-pp65 (codiert von UL-83) das HCMV-IE-Protein so phosphorylieren, dass es nicht mehr als Peptid an ein MHC-Klasse-I-Molekül gebunden werden kann (Gilbert, et al., 1996). Dies ist in Abbildung 1.8 noch einmal anschaulich dargestellt. Gleichzeitig mit der Expressionsblockade von MHC-Klasse-I kommt es zur Expression eines viralen MHC-Klasse-I-Homologon (UL-18). Es wurde vermutet, dass auf diese Weise die Lyse infizierter Zellen durch NK-Zellen verhindert wird, da eine geringe MHC-Klasse-I-Expression eine NK-vermittelte Lyse auslöst (Reyburn, et al., 1997). Odeberg et al konnten aber zeigen, dass die Expression des UL-18-Proteins keinen Schutz vor NK-Zellen bietet (Odeberg, et al., 2002). Wie Wang und Kollegen herausfanden, ist das Glykoprotein UL-40 für die verminderte Lyse durch NK-Zellen verantwortlich (Wang, et al., 2002). Dieses Protein besitzt ein neun Aminosäuren langes Sequenzhomologon zu der MHC-Klasse-I-Sequenz, das die Expression von HLA-E hochreguliert.



**Abbildung 1.8: Behinderung der MHC-Klasse-I gekoppelten Antigenpräsentation durch HCMV**

Das UL-83-kodierte pp65-Matrix-Protein verhindert die Peptid-Bildung des 72-kDa IE-Proteins. Das US-6- Protein blockiert den Import von Peptiden in das ER. Die US-2 und US-11 kodierte Glykoproteine exportieren membraninsertierte MHC-Klasse-I-Schwere Ketten zurück in das Zytoplasma. Dort werden sie vom Proteasom degradiert. Das vom US-3 kodierte Glykoprotein blockiert den Export des MHC-Klasse-I-Komplexes aus dem ER. IE: HCMV-„immediate early“, E: HCMV-„early“, L: HCMV-„late“, Quelle: (Hengel, et al., 1998) (verändert)

HLA-E schützt vor einer NK-Zell-vermittelten Lyse, durch die Bindung an einen Inhibitionsrezeptor auf der NK-Zelle (Tomasec, et al., 2000). HCMV ist allerdings nicht in der Lage die Antigenpräsentation infizierter Zellen gegenüber CD8<sup>+</sup> T-Zellen vollständig zu blockieren. In einigen *in vitro* Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass die Stärke der Inhibition von der Konzentration bestimmter Zytokine in der Umgebung abhängt. Die Anwesenheit von TNF- $\alpha$  und Typ-1 Interferonen hat weder einen Einfluss auf die Expression viraler Gene, noch auf die Inhibition der MHC-Klasse-I-Molekülbildung. Allerdings regen diese Zytokine die verstärkte Bildung von MHC-Klasse-I-Molekülen an, so dass der inhibitorische Effekt durch HCMV teilweise aufgehoben werden kann (Hengel, et al., 1995; Hengel, et al., 1994). HCMV kann aber nicht nur die MHC-Klasse-I gekoppelte Antigenpräsentation hemmen, sondern auch die MHC-Klasse-II gekoppelte Antigenprä-

sentation. Das virale US-2-Protein ist nämlich in der Lage, den Abbau von MHC-Klasse-II-Molekülen einzuleiten (Tomazin, et al., 1999). Weiterhin kann die IFN $\gamma$ -vermittelte MHC-Klasse-II-Expression auf der Oberfläche einer infizierten Zelle inhibiert werden. Eine Infektion mit HCMV führt zu einer Degradierung des Jak1-Proteins und dadurch zu einer Unterbrechung des Jak/Stat-Signaltransduktionsweges (Miller, et al., 1998). Auch die Interferenz mit Interferonen und Zytokinen ist schon beschrieben worden. HCMV ist zum Beispiel in der Lage, die Expression des immun-supprimierenden Zytokins TGF- $\beta$  zu induzieren (Haagmans, et al., 1997; Michelson, et al., 1994). Dieses Zytokin verhindert die Bildung einer TH<sub>2</sub>-Antwort, interagiert mit IL-2, TNF und IL-1 und unterdrückt die Bildung polyklonaler Antikörper. TGF- $\beta$  unterdrückt aber nicht nur die T-Zell-Proliferation, sondern stimuliert auch die Virusreplikation (Alcami, et al., 1991). Weiterhin beinhaltet das Genom von HCMV ein Gen, welches für ein IL-10-Homologon (CMV-IL-10) kodiert. Es konnte gezeigt werden, dass das virale IL-10 die Proliferation von PBMC in gleicher Höhe wie das menschliche IL-10 inhibiert. Ferner ist dieses Protein in der Lage, die Zytokinproduktion von Monozyten einzuschränken und die Expression von MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Molekülen zu vermindern (Spencer, et al., 2002). HCMV ist außerdem im Stande verschiedene Moleküle auszubilden, die homolog zu menschlichen G-Protein-Rezeptoren sind (Chee, et al., 1990). Die dafür benötigten HCMV-Gene US27, US28, UL33 und UL78 werden in der „Early“ und „Late“-Phase während der lytischen Infektion gebildet (Margulies, et al., 1996). Die US-27-, UL-28-, UL-33-Proteine binden zum Beispiel  $\beta$ -Chemokine und verhindern so deren Bindung an die Zielzellen (Bodaghi, et al., 1998). Die bisher genannten Mechanismen sind sehr vielfältig und es ist zu vermuten, dass noch nicht alle immunmodulierende Effekte von HCMV identifiziert wurden.

### 1.3. Fragestellung und Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit sollten die Interaktionen zwischen dem humanen Zytomegalievirus und dendritischen Zellen untersucht werden. Im Einzelnen sollten folgende Fragestellungen näher erörtert werden:

Sind dendritische Zellen *in vitro* und *in vivo* Zielzellen von HCMV? Wenn ja, ist die Infektion der DC durch HCMV permissiv oder abortiv? Ist HCMV in der Lage verschiedene DC-Subtypen zu infizieren ?

Kann eine HCMV-Infektion den Phänotyp der DC beeinflussen? Wenn ja, gibt es Hinweise auf die dafür zugrunde liegenden Mechanismen?

Verändert die HCMV-Infektion die Vitalität der infizierten Zellen?

Kann eine HCMV-infizierte DC T-Zellen zur Proliferation anregen? Wenn nicht, wie kann dies erklärt werden?

Ist eine HCMV-infizierte DC in der Lage, verschiedene Zytokine zu sezernieren? Wenn nicht, wie kann dies begründet werden?

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien, Biochemika und Medienzusätze wurden, wenn nicht gesondert angegeben, über Bayer (Leverkusen), Biorad (München), Fluka (Deisenhofen), Gibco BRL (Eggenstein), New England Biolabs (Schwalbach), Riedel-de-Haen (Seelze), CCpro (Neustadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma (Deisenhofen) bezogen.

### 2.2. Plastikwaren

Deckgläser	Langenbrinck, Emmendingen
Einfrierröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Eppendorf-Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
FACS-Röhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg
Falconröhrchen (15ml, 50 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
Objektträger beschichtet	Shandon, Pittsburgh, USA
Pipettenspitzen	Peqlab, Erlangen
	ART, Fisher Scientific,
PCR-Reaktionsgefäße	Perkin Elmer, Weiterstadt
Zählkammer	Madaus, Köln
Zellkulturflaschen (25cm <sup>2</sup> , 75cm <sup>2</sup> , 162cm <sup>2</sup> )	Costar, New York, USA
Zellkulturplatten (6-, 24-, 96-Loch)	Greiner, Frickenhausen
Zellschaber	Costar, New York, USA

### 2.3. Geräte

ABI Prism 7700 Sequence Detector	PE-Applied Biosystems, Weiterstadt
Bakterieninkubator	Infors, Stuttgart

Cell Harvester	Berthold, Wildbad
CO <sub>2</sub> -Brutschrank	Heraeus, Fellbach
Elektrophoresekammern	Biorad, München
ELISA-Reader Multiscan MCC/340	Labsystems, Oy, Finnland
FACSsort™	Becton Dickinson, Heidelberg
FACSstar plus cell sorter	Becton Dickinson, Heidelberg
Fluoreszenzmikroskop DNRB	Leica, Wetzlar
Genequant RNA/DNA Calculator	Pharmacia, Freiburg
Heizblock	Mulitmed, Kirchheim-Teck
Konfokales Fluoreszenzmikroskop DM IRBE	Leica, Wetzlar
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Lichtmikroskope	Leica, Wetzlar
	Zeiss, Jena
Spannungsgerät	Biorad, München
Thermocycler, DNA Thermal-Cycler	PE-Applied Biosystems, Weiterstadt
Trace-96 □-Counter	Berthold, Wildbad
Ultrazentrifuge, Sorvall®RC28S	Kendro, Hanau
UV-Lampe VL-6LM	Fröbel, Lindau
Zentrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Sigma 4K15C	Qiagen, Hilden
Zentrifuge, Megafuge 1.0R	Heraeus, Fellbach
Zytozentrifuge	Shandon, Runcorn, UK

## 2.4. Puffer und Lösungen

PBS:	140mM NaCl; 20mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 1mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 3mM KCl; pH 7,4
Trypsin:	140mM NaCl; 20mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 1mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 3mM KCl; 2,5% Trypsin (Difco)
Elvanol:	12mM Dithiothreitol (DTT); 0,4% Elvanol in 500mM Tris (pH 8,2) + 10mM Glycerin (nach dem Lösen, 70°C)
TE-Puffer:	10mM Tris/HCl; 1mM EDTA; pH 8,0

## Medien:

HFF:	Eagles MEM-Medium mit 10% FKS; 2mM Glutamin; 100mg/ml Penicillin und 100mg/ml Streptomycin
EC:	RPMI 1640 mit 100µg/ml Gentamycin; 5U/ml Heparin; 50µg/ml Endothelzell-Wachstumsfaktor; 15% Humanserum (seronegativ für HCMV) und 12,5µg/ml Cibrobay
DC:	RPMI 1640 mit 10% FKS endotoxinfrei; 2mM Glutamin; 100mg/ml Penicillin 100mg/ml Streptomycin; 50ng/ml GM-CSF (Leukomax, Essex Pharma, München) und 500U/ml IL-4 (R+D Systems, Wiesbaden)
pDC:	RPMI 1640 mit 10% FKS endotoxinfrei; 2mM Glutamin; 100mg/ml Penicillin; 100mg/ml Streptomycin und 100µg/ml IL-3 (R+D System, Wiesbaden)
PBMC:	RPMI 1640 mit 10% FKS; 2mM Glutamin; 100mg/ml Penicillin und 100mg/ml Streptomycin
Einfriermedium:	60% RPMI 1640; 30% FKS; 10% DMSO

## 2.5. Antikörper

Es wurden folgende Antikörper verwendet:

**Tabelle 2.1: Antikörper**

Antikörper	Konju- gation	Klon, Subtyp	Firma, Firmensitz
anti-Human-BDCA-2	FITC	AC144, IgG1, Maus	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
anti-Human-BDCA-2	PE	AC144, IgG1, Maus	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
anti-Human-BDCA-4	PE	AD5-17F6, IgG1, Maus	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
anti-human-CCR7	-	IgG2a, Ratte	*
anti-Human-CD1a	FITC	HI149, IgG1, Maus	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-Human-CD11c	PE	S-HCL-3, IgG2b, Maus	BD Pharmingen, Heidelberg

Antikörper	Konjugation	Klon, Subtyp	Firma, Firmensitz
anti-Human-CD40	FITC	IgG1, Maus	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-Human-CD13	PE	WM 15, IgG1, Maus	Cymbus Biotechnology LTD, Hants, England
anti-Human-CD14	FITC	M5E2, IgG2a, Maus	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-Human-CD54	FITC	84H10, IgG1, Maus	Immunotech, Marseille, Frankreich
anti-Human-CD54	Cy-chrome	HA58, IgG1, Maus	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-Human-CD58	PE	AICD58, IgG2a, Maus	Immunotech, Marseille, Frankreich
anti-Human-CD80	FITC	BB1, IgM, Maus	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-Human-CD80	Biotin	L307.4, IgG1, Maus	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-Human-CD83	PE	HB15, IgG2a, Maus	Immunotech, Marseille, Frankreich
anti-Human-CD86	PE	IT2.2, IgG2b, Maus	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-Human-CDw123	PE	9F5, IgG1, Maus	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-Human-CMRF-44	-	IgM, Maus	#
anti-Human-CMRF-56	-	IgG1, Maus	#
anti-Human-HLA-ABC	PE	W6/32, IgG2a, Maus	DPC Biermann, Bad Nauheim
anti-Human-HLA-ABC	Biotin	B9.12.1, IgG2a, Maus	Immunotech, Marseille, Frankreich
anti-Human-HLA-DR	Biotin	B8.12.2, IgG2b, Maus	Immunotech, Marseille, Frankreich
anti-Human-HLA-DR, DP, DQ	FITC	Tü39, IgG2a, Maus	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-Human-HLA-DR, DP, DQ	PE	WR18, IgG2a, Maus	DPC Biermann, Bad Nauheim
anti-HCMV-IE	-	E-13, IgG1, Maus	Clonatec, Paris, Frankreich
anti-HCMV-pp65	-	1C3, IgG1, Maus	Biosoft, Varilhes, Frankreich
Streptavidin	PE	-	BD Pharmingen, Heidelberg
Streptavidin	TRITC	-	KPL, Dunn, Asbach
Streptavidin	APC	-	BD Pharmingen, Heidelberg
Streptavidin	Alexa488	-	Molecular probes, Leiden, Niederlande
Streptavidin	Alexa546	-	Molecular probes, Leiden, Niederlande



Antikörper	Konjugation	Klon, Subtyp	Firma, Firmensitz
Streptavidin	Alexa633	-	Molecular probes, Leiden, Niederlande
anti-Ratte-IgG2a	Biotin	RG7/1.30, IgG2b, Maus	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-Maus-IgM	Alexa 633	Ziege	Molecular probes, Leiden, Niederlande
anti-Maus-IgG-IgM	FITC	Ziege	Biosoft, Varilhes, Frankreich
anti-Maus-IgG1	Alexa 488	Ziege	Molecular probes, Leiden, Niederlande
anti-Maus-IgG1	Alexa 546	Ziege	Molecular probes, Leiden, Niederlande
anti-Maus-IgG1	FITC	A85-1, IgG1, Ratte	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-Maus-IgG1	Biotin	A85-1, IgG1, Ratte	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-Maus-IgG2a	FITC	IgG1, Ratte	BD Pharmingen, Heidelberg
Maus IgG2a Isotyp	FITC	G155-178	BD Pharmingen, Heidelberg
Maus IgG2a Isotyp	PE	G155-178	BD Pharmingen, Heidelberg
Maus IgG1 Isotyp	FITC	697.1Mc7	Immunotech, Marseille, Frankreich
Maus IgG1 Isotyp	PE	679.1Mc7	Immunotech, Marseille, Frankreich
Maus IgG1 Isotyp	Cy-chrome	MOPC-21	BD Pharmingen, Heidelberg
Maus IgM Isotyp	FITC	G155-228	BD Pharmingen, Heidelberg
Maus IgG2b	FITC	49.2	BD Pharmingen, Heidelberg
Ratte IgG2b	Biotin	R35-38	BD Pharmingen, Heidelberg

\* wurde uns freundlicherweise überlassen von: Martin Lipp, Max-Delbrück-Zentrum, Berlin

# wurde uns freundlicherweise überlassen von: Derek Hart, MMRI, Brisbane, Australien

## 2.6. Isolierung und Kultivierung von Zellen

### 2.6.1 Bestimmung der Lebendzellzahl

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurde eine Vitalfärbung mit Trypanblaulösung durchgeführt. Lebende Zellen besitzen eine intakte Zellwand, die das Trypanblau nicht durchdringen kann. Im Lichtmikroskop lassen sich die blau gefärbten toten Zellen gut von den lebenden Zellen unterscheiden.

#### Material:

Zählkammer (Madaus, Köln, Deutschland)

Trypanblau-Lösung (0,25% in PBS)

#### Protokoll:

10 $\mu$ l einer Zellsuspension wurden mit 10 $\mu$ l Trypanblaulösung vermischt. 10 $\mu$ l dieser Lösung wurden in eine Zählkammer gegeben. Mit Hilfe des Lichtmikroskops konnte anschließend die Lebendzellzahl bestimmt werden. Danach wurden die Zellen entsprechend der gewünschten Zellzahl verdünnt und eingesetzt.

### 2.6.2 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen zunächst zentrifugiert, in Einfriermedium resuspendiert und aliquotiert. Die Zellen wurden für eine Nacht in einem isopropanolhaltigen Kryogefäß bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert. Dadurch sinkt die Temperatur um  $1^{\circ}\text{C}$  pro Minute in den Einfrierröhrchen ab.

Zum Auftauen der Zellen wurden die Einfrierröhrchen kurz in einem  $37^{\circ}\text{C}$  Wasserbad angetaut und in Zellkulturmedium überführt. Nach einer Zentrifugation wurden die Zellen in frischem Kulturmedium aufgenommen und in die entsprechenden Zellkulturflaschen gegeben.

#### Material:

Einfrierröhrchen; Einfriermedium; Zellkulturmedium

Cryo  $1^{\circ}\text{C}$  freezing container (Nalgene, Hereford, England)

Protokoll:

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen für 10min bei 300xg und 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in  $10^7$  Zellen/ml Einfriermedium resuspendiert und in Einfrierröhrchen aliquotiert. Die Einfrierröhrchen wurden anschließend für eine Nacht in einem isopropanolhaltigen Kryogefäß bei -70°C gelagert. Für längere Lagerzeiten wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen der Zellen wurden die Einfrierröhrchen in einem 37°C Wasserbad kurz angetaut. Die Zellen wurden danach in ein vorbereitetes 50ml Röhrchen mit Zellkulturmedium überführt. Nach einer Zentrifugation bei 300xg für 5min, wurde das Zellpellet in frischem Zellkulturmedium resuspendiert und in Zellkulturflaschen ausgesät.

### **2.6.3 Präparation von Zellen für das Elektronenmikroskop**

Die zu untersuchenden Zellen wurden abzentrifugiert und mit EM-Fixier-Lösung überschichtet und abgedunkelt gelagert. Von diesen Proben wurden am Tropeninstitut in Hamburg ultradünne Schnitte angefertigt und im Elektronenmikroskop ausgewertet.

Material:

EM-Fixier-Lösung: 130mM Natriumcacodylate; 100mM Saccharose; 1,5mM  $\text{CaCl}_2$ ; 100mM HCl; 2% Glutaraldehyde; pH 7.2

Protokoll:

Infizierte und nicht-infizierte dendritische Zellen wurden zweimal zentrifugiert (300xg, 5min, 4°C) und in PBS resuspendiert. Das Zellpellet wurde anschließend mit 5ml EM-Fixier-Lösung überschichtet und abgedunkelt bei 4°C gelagert. Diese Zellen wurden an das Tropeninstitut in Hamburg geschickt. Dort wurden von den Proben ultradünne Schnitte angefertigt und im Elektronenmikroskop analysiert.

### **2.6.4 Gewinnung von unreifen und reifen dendritischen Zellen aus Monozyten**

Humane dendritische Zellen können *in vitro* durch Stimulation von Monozyten mit IL-4 und GM-CSF nach dem Protokoll von Sallusto und Lanzavecchia hergestellt werden (Sallusto, et al., 1994).

Aus einem Leukozytenkonzentrat (Buffy coat) HCMV-seronegativer Blutspender konnten mit Hilfe eines Dichtegradienten die Monozyten angereichert werden. Die Granulozyten und Erythrozyten haben die größte Dichte und sind nach der Zentrifugation als Sediment sichtbar. Die peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) sind als sogenannte Interphasezellen zu sehen. Thrombozyten, die Zellen mit der geringsten Dichte, befinden sich oberhalb der Interphase. Zur weiteren Isolierung werden die PBMC der Interphase zur Adhärenz in Zellkulturflaschen überführt. Die Monozyten lagern sich dabei an die Zellkulturflasche an. Die Lymphozyten besitzen diese Adhärenzeigenschaft nicht und können daher abgewaschen werden. Um den Reinigungsgrad zu erhöhen werden die angereicherten Monozyten mit Hilfe von spezifischen Antikörpern, die an magnetische Partikel gebunden sind (MP), von den noch vorhandenen CD2<sup>+</sup>-Zellen (T-Zellen und NK-Zellen) und CD19<sup>+</sup>-Zellen (B-Zellen) getrennt. Diese hochreinen Monozyten werden nun zu dendritischen Zellen ausdifferenziert, die sich durch eine hohe Expression von CD1a und einer fehlenden Expression von CD14 auszeichnen.

#### Material:

Buffy coat HCMV-seronegativ (Transfusionsmedizin, Uniklinik Freiburg)

Ficoll-Paque<sup>®</sup> (Pharmacia Biotech, Freiburg)

PBS; PBMC-Medium; DC-Medium

CD2- und CD19-Dynabeads (Dynal, Oslo, Norwegen) (=MP)

#### Protokoll:

Der Buffy coat wurde 1:3 mit PBS verdünnt. 35ml dieses Gemisches wurden langsam auf 15ml Ficoll-Paque<sup>®</sup> geschichtet. Anschließend wurden die Zellen durch eine Zentrifugation (30min, 350xg, ohne Bremse) aufgrund ihrer Dichte aufgetrennt. Die Zellen der Interphase wurden vorsichtig abgenommen und 1:2 mit PBS verdünnt. Nach der anschließenden Zentrifugation (450xg, 10min, 4°C) folgten noch zwei weitere Waschstritte mit jeweils 50ml PBS. Die noch verbliebenen Erythrozyten (Rotfärbung des Zellpellets) wurden mit 5ml Aqua dest für 25sec lysiert. Anschließend wurde die Zellsuspension mit PBS auf 50ml aufgefüllt. Dieser Vorgang wurde solange wiederholt, bis das Zellpellet keine Rotfärbung mehr aufwies. Die PBMC wurden nun mit einer Konzentration von  $7,5 \times 10^6$  Zellen/ml PBMC-Medium aufgenommen. Hiervon wurden jeweils 10ml in eine 75cm<sup>2</sup> große Zellkulturflasche eingesät und für 90min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach Beendigung der Adhärenzzeit wurden die Lymphozyten dreimal mit 15ml vorgewärmtem RPMI 1640 abgewaschen. Die in der Zellkultur verbliebenen Monozyten wurden nun mit 15ml Medium überschichtet und über Nacht im Brutschrank kultiviert. Am nächsten Tag wurden die

Zellen 1h bei 4°C inkubiert und anschließend mit einem Zellschaber aus der Flasche gelöst. Die Zellen wurden mit 50ml kaltem PBS gewaschen (450xg, 7min, 4°C) und in  $4 \times 10^7$  Zellen/ml PBS/30%FKS aufgenommen.  $4 \times 10^7$  dieser angereicherten Monozyten wurden mit 50µl CD2-MP und 50µl CD19-MP versetzt und für 20min in einem Schüttelrad bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die MP mit den daran gebundenen CD2<sup>+</sup>- und CD19<sup>+</sup>-Zellen in einem Magnetständer von den Monozyten getrennt. Die Monozyten wurden erneut mit je 50µl CD2- und CD19-MP versetzt, nochmals in einem Schüttelrad bei 4°C für 20min inkubiert und wiederum in einem Magnetständer getrennt. Um die magnetischen Partikel vollständig zu entfernen, wurde die Trennung am Magneten noch viermal wiederholt. Diese hochreinen Monozyten wurden nun in einer Konzentration von  $5 \times 10^5$  Zellen/3 ml DC-Medium aufgenommen und in 6-Loch-Platten mit jeweils 3ml Zellsuspension ausgesät. Alle 2-3 Tage wurde 1ml Medium durch neues Medium ersetzt. Nach 7-8 Tagen Kultur wurden die Zellen durchflusszytometrisch auf die Expression von CD1a und CD14 (siehe 2.9.2) untersucht. Zeigten die DC eine hohe Expression von CD1a und keine Expression von CD14, wurden sie zur Ausreifung für 24h entweder mit 500U/ml Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , Sigma, Deisenhofen), 1µg/ml LPS (Sigma, Deisenhofen) oder einem Zytokingemisch aus 10ng/ml IL-1 $\alpha$ , 1000U/ml IL-6 (IL-1 $\alpha$  und IL-6, Promocell, Heidelberg), 10ng/ml TNF- $\alpha$ , 10µg/ml PGE<sub>2</sub> (Sigma, Deisenhofen) inkubiert.

### 2.6.5 Isolierung von DC mit Hilfe des Blood Dendritic Cell Isolation Kit

Das Blood DC Isolation Kit ermöglicht die Isolierung myeloider DC aus dem peripheren Blut mit Hilfe von magnetischen Partikeln (MP). Auch hier werden zuerst die peripheren mononukleären Zellen aus dem Blut isoliert und anschließend mit magnetischen Partikeln versetzt, die an Antikörpern gegen T-Zellen, NK-Zellen und Monozyten gebunden sind. Mit Hilfe einer Säule, die sich in einem starken Magnetfeld befindet, werden die MP-gebundenen Zellen zurückgehalten. Die restlichen Zellen, zu denen auch die DC gehören, können die Säule ungehindert passieren. Nach dieser negativen Selektion von T-Zellen, NK-Zellen und Monozyten werden nun in einem zweiten Reinigungsschritt die DC positiv selektioniert. Dazu werden die Zellen mit MP versetzt, an die ein DC spezifischer Antikörper gebunden ist. Die DC werden nun an der Säule innerhalb des Magnetfeldes festgehalten und anschließend eluiert. Die so gewonnene DC-Population hat laut Herstellerangaben einen Reinheitsgrad von 97%.

Material:

Blood Dendritic Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach)

Puffer (PBS; 0,5% BSA; 2mM EDTA; entgast)

LD Separation Columns (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach)

MS Separation Columns (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach)

Midi-MACS/Mini-MACS (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach)

Protokoll:

Die peripheren mononukleären Zellen des Blutes wurden wie in Kapitel 2.6.4 beschrieben isoliert und mit einer Konzentration von  $10^8$  Zellen/300 $\mu$ l Puffer aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen mit 100 $\mu$ l FcR „Blocking Reagents“ und 100 $\mu$ l Hapten-Antibody Cocktail (an Hapten gebundenes CD3, CD11b und CD16) für 10min bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit 20ml Puffer gewaschen (300xg, 10min, 4°C) und mit einer Konzentration von  $10^8$  Zellen/900 $\mu$ l in Puffer aufgenommen. Nun wurden die Zellen mit 100 $\mu$ l MACS Anti-Hapten-MP versetzt. Nach 15min im Kühlraum wurde dieses Gemisch auf eine vorher äquilibrierte MACS LD-Depletionssäule pipettiert. Die Säule wurde mit 3ml Puffer gewaschen. Der Durchlauf, der die DC angereicherte Fraktion enthält, wurde für 10min bei 300xg zentrifugiert, das Zellpellet in 100 $\mu$ l Puffer resuspendiert und mit 100 $\mu$ l MACS CD4-MP versetzt. Nach 30min Inkubation bei 4°C wurden die Zellen mit 8ml Puffer gewaschen und auf eine äquilibrierte MS-Säule gegeben. Anschließend wurde die Säule dreimal mit 500 $\mu$ l Puffer gewaschen. Zur Gewinnung der gereinigten DC wurde die Säule aus dem Magneten entfernt, mit 500 $\mu$ l Puffer versetzt und anschließend mit Hilfe eines Stempels das Eluat gewonnen. Die Reinheit der dendritischen Zellen wurde mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern (HLA-DR-PE, CD2-FITC, CD16-FITC, CD19-FITC, CD57-FITC) durchflusszytometrisch überprüft (siehe Kapitel 2.9.2). Um die Reinheit der gewonnen DC weiter zu erhöhen, wurden die Zellen mit Anti-CMRF-44/Anti-Maus-IgM-FITC und Anti-CMRF-56/Anti-Maus-IgG1-FITC gefärbt. CMRF-44 und CMRF-56 positive Zellen wurden dann mit Hilfe eines FACSsorter<sup>®</sup> isoliert und in DC-Medium kultiviert.

## 2.6.6 Isolierung von plasmazytoiden dendritischen Zellen aus Tonsillen

Bei der Isolierung von plasmazytoiden DC (pDC) aus Tonsillen werden die Zellen mechanisch durch Ausschaben und enzymatisch durch Kollagenase und DNase vom Tonsillengewebe getrennt. Anschließend werden die pDC mit dem BDCA-2 Cell Isolation Kit oder mit dem BDCA-4 Cell

Isolation Kit weiter angereichert. In beiden Fällen erfolgt die Aufreinigung plasmazytoider dendritischer Zellen aus Tonsillen mit Hilfe von Antikörpern, die an magnetische Partikel (MP) gekoppelt sind. Diese Antikörper binden spezifisch nur an pDC, die somit über eine Säule, die sich in einem starken Magnetfeld befindet, isoliert werden können. Das Eluat enthält laut Herstellerangaben 97% reine pDC.

#### Material:

BDCA-2 Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach)

BDCA-4 Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach)

Blood Dendritic Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach)

Puffer (PBS; 0,5% BSA; 2mM EDTA; entgast)

LS Separation Columns (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach)

MS Separation Columns (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach)

Midi-MACS/Mini-MACS (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach)

pDC-Medium; Streptavidin-PE (BD Pharmingen, Heidelberg)

#### Protokoll:

Die beiden Tonsillen eines Spenders wurden jeweils in einer mit ca. 30ml RPMI 1640 gefüllten Petrischale mit einem Skalpell aufgeschnitten und deren Zellen ausgeschabt. Die Zellsuspension wurde in einen sterilen Erlenmeyerkolben überführt und bei 37°C 40min bei 200U/min auf einem Rührer mit 1mg/ml Kollagenase und 0,25mg/ml DNase inkubiert. Die Zellsuspension wurde in ein 50ml Röhrchen gefüllt und mit 10% FKS versetzt. Nach der anschließenden Zentrifugation (300xg, 10min, 4°C) wurden die Zellen gezählt und, um Zellklumpen zu vermeiden, durch einen Filter mit 70µm Porengröße gegeben. Die Zellen wurden auf einen Ficoll-Paque<sup>®</sup>-Dichtegradienten geschichtet und die peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) wie in Kapitel 2.6.4 gewonnen. Die so gewonnenen PBMC wurden in PBMC-Medium bei 4°C über Nacht gelagert.

Für die Isolierung mit dem BDCA-2 Cell Isolation Kit wurden jeweils 10<sup>8</sup> dieser PBMC in 100µl Puffer aufgenommen und mit 50µl „Blocking Reagents“ (Humanes IgG) versetzt. Nach der Zugabe von 100µl biotinkoppeltem Anti-BDCA-2-Antikörper wurde der Ansatz gevortext und für 10min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 400µl Puffer, 150µl „Blocking Reagents“ und 200µl Anti-Biotin-MP versetzt. Nach einer Inkubationsdauer von 15min bei 4°C, wurden die Zellen mit 20ml Puffer gewaschen (Zentrifugation: 300xg, 10min). Das Zellpellet wurde in 500µl Puffer aufgenommen und über eine zuvor äquilibrierte MS-Säule gegeben. Anschließend wurde die Säule dreimal mit 500µl Puffer gewaschen. Zur Gewinnung der pDC wurde die Säule aus dem

Magnetfeld entfernt, mit 500 $\mu$ l Puffer versetzt und mit Hilfe eines Stempels wurden die BDCA-2<sup>+</sup> Zellen von der Säule eluiert. Um die Reinheit der Zellen zu erhöhen, wurden die Zellen mit 10 $\mu$ l Streptavidin-PE pro 10<sup>6</sup> Zellen für 20min bei 4°C versetzt. Mit Hilfe eines FACSSort wurden alle PE-positiven Zellen isoliert und in 5x10<sup>5</sup>Zellen/ml pDC-Medium aufgenommen.

Für die Isolierung der BDCA4<sup>+</sup>-pDC wurden aus den PBMC zuerst die B-,T, und NK-Zellen mit Hilfe des Blood Dendritic Cell Isolation Kit isoliert. Aus den verbliebenen Zellen wurden mit Hilfe des BDCA-4 Cell Isolation Kit anschließend die pDC angereichert. Dafür wurden jeweils 10<sup>8</sup> PBMC in 300 $\mu$ l Puffer aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen mit 100 $\mu$ l FcR „Blocking Reagents“ und 100 $\mu$ l Hapten-Antibody Cocktail (an Hapten gebundenes CD3, CD11b und CD16) für 10min bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit 20ml Puffer gewaschen (300xg, 10min, 4°C) und mit einer Konzentration von 10<sup>8</sup> Zellen/900 $\mu$ l Puffer aufgenommen. Nun wurden die Zellen mit 100 $\mu$ l MACS Anti-Hapten-MP versetzt. Nach 15min bei 6°C wurde dieses Gemisch auf eine vorher äquilibrierte MACS LD-Depletionssäule pipettiert. Anschließend wurde die Säule mit 3ml Puffer gewaschen. Der Durchlauf, der die pDC angereicherte Fraktion enthält, wurde für 10min bei 300xg zentrifugiert und das Zellpellet in einer Konzentration von 10<sup>8</sup>Zellen/300 $\mu$ l Puffer resuspendiert. Danach wurden die Zellen mit 100 $\mu$ l FcR „Blocking Reagents“ und 100 $\mu$ l BDCA4-MP versetzt und 15min bei 4°C inkubiert. Nach der Zugabe von ca. 20ml Puffer wurde die Zellsuspension zentrifugiert (10min, 300g,4°C). Das Zellpellet wurde in 500 $\mu$ l Puffer resuspendiert und auf eine vorher äquilibrierte MS-Säule gegeben. Die Säule wurde dreimal mit 1ml Puffer gewaschen. Zur Gewinnung der pDC wurde die Säule aus dem Magnetfeld entfernt, mit 500 $\mu$ l Puffer versetzt und mit Hilfe eines Stempels wurden die BDCA-4<sup>+</sup> Zellen von der Säule eluiert, in pDC-Medium aufgenommen und in Zellkulturplatten ausgesät.

### **2.6.7 Gewinnung von Humanen Endothelzellen (HUVEC)**

Endothelzellen kleiden die Innenseiten von Blutgefäßen aus. Humane Endothelzellen (HUVEC) können daher aus Nabelschnurvenen gewonnen werden. Dazu werden die Nabelschnurvenen mit Chymotrypsin inkubiert, wodurch sich die Zellen von der Gefäßwand ablösen. Die Endothelzellen können nun mit Medium ausgespült und kultiviert werden.

#### Material:

PBS; EC-Medium; Kocherklemmen; 50 ml Spritzen

Lösung A (137mM NaCl; 5,4mM KCl; 4,2mM NaHCO<sub>3</sub>; 5mM D-Glukose; in H<sub>2</sub>O dest; pH 7,3)



Chymotrypsin (50  $\mu\text{g/ml}$  in PBS )

Zellkulturflaschen beschichtet mit 0,1% Gelatine

#### Protokoll:

Die Nabelschnur wurde äußerlich mit einem sterilen Tuch gereinigt und die Nabelschnurvene mit ca. 50ml Lösung A gründlich gespült. Das untere Ende der Vene wurde mit einer Klemme verschlossen. Nun wurde die Vene mit Chymotrypsin gefüllt und danach am oberen Ende ebenfalls mit einer Klemme verschlossen. Um die Zellen von der Gefäßwand zu lösen, wurde diese Nabelschnur für 15min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Nabelschnur an beiden Enden geöffnet und die Zellen mit RPMI 1640 ausgespült. Nach einer Zentrifugation von 300xg für 10min wurden die Zellen in ca. 5ml frischem EC-Medium aufgenommen und in eine gelatinebeschichtete 25cm<sup>2</sup> große Kulturflasche ausgesät.

## **2.7. Arbeiten mit Viren**

### **2.7.1 Virusanzucht und Virusankonzentrierung**

Zur Gewinnung von HCMV-Isolaten wurden humane Vorhautfibroblasten (HFF) mit virushaltigem Patientenmaterial inkubiert. Der konfluente Zellrasen wurde so lange geteilt, bis ein deutlicher zytopathischer Effekt zu sehen war und infektiöse Partikel im Überstand passagiert werden konnten. Um Endothelzell-adaptierte Isolate zu erhalten, werden infizierte HFF mit Mitomycin D behandelt. Diese Zellen sind nicht mehr teilungsfähig und werden nun so lange mit nicht infizierten Endothelzellen kokultiviert, bis ein zytopathischer Effekt bei den EC zu sehen ist. Anschließend wird das Virus auf Endothelzellen passagiert.

Zur Ankonzentrierung wird der Virusüberstand mit einem Succrosekissen unterschichtet. Bei der anschließenden Ultrazentrifugation werden die Viruspartikel, welche als Pellet unterhalb der Succrose sichtbar sind, vom Zellmedium getrennt .

#### Material:

Virushaltiges Patientenmaterial (Blut oder Urin)

Humane Vorhautfibroblasten; HFF-Medium

eventuell Endothelzellen; EC-Medium

Mitomycin D (10 $\mu$ g/ml)

Protokoll:

1ml Blut oder Urin von HCMV-erkrankten Patienten wurde in eine humane Vorhautfibroblasten (HFF) enthaltende Zellkulturflasche gegeben, 50min bei 900xg zentrifugiert und nach anschließendem Medienwechsel bei 37°C kultiviert. Konfluente Zellrasen wurden so lange 1:3 geteilt, bis ein deutlicher zytopathischer Effekt (CPE) zu sehen war. Um ein humanes Vorhautfibroblasten-adaptiertes Virus (FFV) zu erhalten, wurde das Virusisolat weiterhin auf HFF passagiert. Für die Generierung eines humanen Endothelzell-adaptierten Virus (ECV), wurden infizierte, mit 10 $\mu$ g/ml Mitomycin D behandelte HFF mit Endothelzellen kokultiviert. Der virushaltige Überstand wurde mindestens 15 mal auf Endothelzellen passagiert, bevor ein Virusstock dieses Stammes angelegt wurde.

Virusstocks für die Fibroblasten-adaptierten Stämme 6055, 214820, 244186, 258410, 283588, 212828, AD169 und Towne und für die Endothelzell-adaptierten Stämme AA07/E, KSA16/3, TB40/E und TB42/E wurden durch die Infektion mit humanen Fibroblasten generiert. Am Tag 14 - 21 nach Infektion wurden die jeweiligen Überstände 10min bei 5000xg zentrifugiert. Zur Ankonzentrierung der Virusstocks wurde der zellfreie Überstand mit 2ml 20% Succrose unterschichtet und bei 125000xg für 150min in einer Ultrazentrifuge zentrifugiert. Das Viruspellet wurde in TE-Puffer resuspendiert, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

## **2.7.2 Virustiterbestimmung mittels Kurzzeitkultur**

Um den Titer eines HCMV-Isolates zu bestimmen, wurden HFFs mit unterschiedlichen Verdünnungen des Virustammes infiziert. Nach 18 Stunden wurden die in den infizierten Zellen gebildeten HCMV-IE-Proteine mit Hilfe von Antikörpern angefärbt. Dieses Protein wird bereits mehrere Stunden nach der Infektion als eines der ersten Virusproteine gebildet. Der Virustiter wird dann aus der Anzahl der HCMV-IE positiven Zellkerne und der entsprechenden Verdünnungsstufe ermittelt.

Material:

24-Loch-Platte; HFFs; HFF-Medium; Virusisolat; PBS

Aceton/Methanol (1:1)

Evans-Blau-Lsg (150 $\mu$ l Evans-Blau in 100ml PBS)

IE-Antikörper E13 (1:200 in PBS verdünnt)

Ratte-anti-Maus-FITC-Antikörper (1:40 in Evans-Blau-Lsg)

Protokoll:

Konfluente HFF-Zellen in einer 24-Loch-Platte wurden mit verschiedenen Verdünnungsstufen ( $10^2$ - $10^8$ ) eines HCMV-Isolats infiziert, wobei jeweils 4 Löcher mit identischen Verdünnungen angesetzt wurden. Dazu wurden die Platten nach Viruszugabe bei 900xg 50min zentrifugiert und nach einem anschließenden Medienwechsel für ca. 18h in einem Brutschrank bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und zur Fixierung und Permeabilisierung für 10min mit 1ml gekühlten Aceton/Methanol inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschrritten mit PBS wurden zu jedem Loch 200µl des HCMV-IE-Antikörpers gegeben und 45min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die einzelnen Löcher zweimal mit PBS gewaschen und mit jeweils 200µl FITC-konjugiertem Ratte-anti-Maus-Antikörper versetzt. Auch hier folgte eine 45min Inkubationsdauer bei 37°C. Danach wurde wieder zweimal mit PBS gewaschen. Die Auswertung der Platten erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes. Der Virustiter, welcher gleich bedeutend mit der Anzahl infektiöser Partikel ist, lässt sich dann aus der Anzahl der HCMV-IE positiven Zellkerne pro Loch bestimmen.

### **2.7.3 Infektion von DC**

Um DC zu infizieren, wurden entweder einzelne HCMV-Stämme verwendet oder ein Viruspool aus 3-6 verschiedenen Stämmen. Die meisten Versuche wurden mit einer MOI („Multiplicity of infection“) von 1 oder einer MOI von 50 durchgeführt. Dies bedeutet, dass sich in dieser Kultur gleichviele DC wie infektiöse Partikel (MOI 1) oder 50 mal mehr infektiöse Partikel als DC (MOI 50) befinden.

Material:

6-Loch-Platten; HCMV; DC; DC-Medium

Protokoll:

Die Infektion erfolgte in 6-Loch-Platten durch Zugabe von höchstens 1ml Virusstock oder 1ml Viruspool zu den  $5 \times 10^5$  Zellen eines Lochs. Die Platten wurden 50min bei 900xg und 25°C zentrifugiert und danach 24h bei 37°C im Brutschrank kultiviert. Anschließend wurden die Zellen zweimal

mit PBS gewaschen, in neuem zytokinhaltigen DC-Medium aufgenommen und wieder mit  $5 \times 10^5$  Zellen/3ml Medium in 6-Loch-Platten ausgesät.

### **2.7.4 UV-Inaktivierung von HCMV**

Bei einigen Kontrollversuchen wurden die DC mit UV-inaktiviertem HCMV infiziert. Hierfür wurden die Virusisolate bzw. der Virenpool vor der Infektion in einer 12 Loch-Platte für 2h bei 312nm (12W) mit einer UV-Lampe bestrahlt. Danach sind die Viruspartikel noch intakt, können aber nicht mehr replizieren.

## **2.8. Arbeiten mit DNA**

### **2.8.1 Aufarbeitung von DNA für die PCR**

Die Zellen werden mit Lysepuffer und Proteinase K inkubiert. Dies bewirkt die Aufspaltung der Zellwände und den proteolytischen Abbau der Zellproteine. Da die Proteinase K ein Enzym mit geringer Spezifität ist, kann sie Proteine bis hin zu den freien Aminosäuren degradieren. Die dadurch freiwerdende DNA kann nun in eine Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) eingesetzt werden.

#### Material:

Lysepuffer A (100mM KCl; 10mM Tris-HCl; pH 8,3)

Lysepuffer B (10mM Tris-HCl; pH 8,3; 1% Tween20; 1% NP40)

20mg/ml Proteinase K (Boehringer, Mannheim)

#### Protokoll:

$5 \times 10^5$  DC wurden durch Zentrifugation vom Medium getrennt, mit  $50 \mu\text{l}$  Lysepuffer A,  $50 \mu\text{l}$  Lysepuffer B und  $1 \mu\text{l}$  Proteinase K versetzt und für mindestens 4h oder über Nacht bei  $56^\circ\text{C}$  inkubiert.  $1 \times 10^4$  DC wurden mit  $25 \mu\text{l}$  Lysepuffer A,  $25 \mu\text{l}$  Lysepuffer B und  $1 \mu\text{l}$  Proteinase K versetzt und wie oben beschrieben behandelt. Danach wurde die Proteinase K bei  $95^\circ\text{C}$  für 5min inaktiviert. Dieses Zelllysate wurde zur quantitativen Untersuchung in einer Real-Time PCR, basierend auf der Taq-

Man™ Chemie (siehe 2.8.2.3) oder zur qualitativen Untersuchung in einer nested PCR (siehe 2.8.2.1) verwendet.

## 2.8.2 Nachweis von HCMV-DNA in Zellen

### 2.8.2.1 Qualitativer Nachweis von HCMV-DNA mittels nested PCR

Die Polymerase-Ketten-Reaktion ist eine Methode zur exponentiellen Amplifizierung von Nukleinsäuren. Bei dieser nested PCR wurde ein Teil des gB-Gens amplifiziert. Um Kontaminationen zu vermeiden, wurden alle Versuchsschritte an räumlich getrennten Arbeitsplätzen durchgeführt, die zuvor mit 1M Salzsäure gereinigt wurden.

#### Material:

Primer :        1.Runde:    gB1319 (5'-tgg aac tgg aac gtt tgg c-3')  
  gB Ci 3 (5'-taa gcc tgc tcg ttg gtg ta-3')  
                        2.Runde:    AD15 (5'-gga cgc tgc tac tca cga cc-3')  
  AD13 (5'-ggg tcg act acc ttg tcc tcc-3')

2mM dNTPs (Pharmacia, Freiburg)

25mM MgCl<sub>2</sub> (Perkin Elmer, Weiterstadt)

10x PCR-Puffer: 100mM Tris-HCL; (pH 8,3); 500mM KCl (Perkin Elmer, Weiterstadt)

5U/ $\mu$ l Taq-Polymerase Gold (Perkin Elmer, Weiterstadt)

Mineralöl H<sub>2</sub>O dest

#### Protokoll:

In einem 50 $\mu$ l-PCR-Ansatz der ersten und der zweiten Runde wurden jeweils 5 $\mu$ l des 10x PCR-Puffers, 2,5mM MgCl<sub>2</sub>, 200 $\mu$ M dNTP, 1,25U Taq Gold Polymerase mit jeweils 25pmol der entsprechenden Primer versetzt. Als Template wurden in der ersten Runde 5 $\mu$ l der wie in 2.8.1 aufgearbeiteten DC eingesetzt (dies entspricht der DNA-Menge von 7-12 x 10<sup>3</sup> DC) sowie 2 $\mu$ l des Erste-Runde-Amplifikats in der zweiten Runde. Die PCR-Ansätze wurden mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet und anschließend in einen DNA Thermal-Cycler der Firma Perkin Elmer überführt. Die Amplifikation erfolgte mit einem klassischen 3-Schritt-Programm:

1. Aktivierung der Taq-Polymerase Gold:    10min 95°C

2. Denaturierung	1min	95°C
3. Annealing	1min	X°C
4. Elongation	1min	72°C
5. Auslaufzeit	10min	72°C

Die Schritte 2. bis 4. wurden 40 x wiederholt. Die Annealingtemperatur der ersten Runde betrug 59°C und die der zweiten Runde 68°C. Die Fragmentlänge des Erste-Runde-Amplifikats betrug 1215 bp und die des Zweite-Runde-Amplifikats 397 bp. Die Sensitivität dieser nested PCR betrug  $\leq 10$  Kopien pro PCR-Ansatz.

### **2.8.2.2 Auftrennung von DNA-Fragmenten im Agarosegel**

Zur Identifizierung der DNA-Fragmente nach einer PCR wurden die Amplifikate durch eine Gelelektrophorese in Agarosegelen aufgetrennt. Hierbei macht man sich die Tatsache zu nutze, dass die DNA ein negativ geladenes Rückrad (durch die negativ geladenen Phosphatgruppen) besitzt und daher in einem elektrischen Feld zum positiven Pol wandert. Da die Laufstrecke der DNA-Fragmente proportional zu ihrer Größe ist, können die unterschiedlichen Amplifikate im Gel identifiziert werden. Um die Auftrennung sichtbar zu machen, wird in das Gel Ethidiumbromid gegeben. Durch die Interkalation von Ethidiumbromid in die DNA ist sie bei UV-Bestrahlung als fluoreszierende Bande erkennbar.

#### Material:

Agarose (FMC, Maine, USA)

Ethidiumbromid (Roth, Karlsruhe)

0,5 x TBE-Puffer: 45mM TrisBase; 45mM Borsäure; 1mM EDTA

6 x Ladepuffer: 0,25 % Bromphenolblau; 0,25 % Xylene-Cyanol; 15 % Ficoll 400

DNA-Längenstandard 100 bp (Pharmacia, Freiburg)

DNA-Längenstandard 1 kb (Pharmacia, Freiburg)

#### Protokoll:

Je nach gewünschter Trennleistung des Gels bzw. der Größe der zu erwartenden Banden, wurden zwischen 0,7g und 2g Agarose in 100ml 0,5 x TBE-Puffer in der Mikrowelle kurz aufgeköcht. Die Lösung wurde auf etwa 50°C abgekühlt und mit 0,5µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Anschließend

wurde die Lösung in einen Gelträger mit Kamm gegossen. Nachdem das Gel polymerisiert war, wurden jeweils 10  $\mu$ l der Proben mit 2  $\mu$ l 6x Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen einpipettiert. Als Marker wurde ein 100 bp oder ein 1 kb Standardmarker mitgeführt. Die Gelelektrophorese erfolgte in einer horizontalen Elektrophoresekammer bei 5-10 V/cm unter 0,5x TBE-Puffer. Bei einer ausreichenden Auftrennung der DNA-Banden wurde die Gelelektrophorese abgebrochen. Das Gel wurde mit UV-Licht (260nm) beleuchtet und fotografiert.

### 2.8.2.3 Quantitative PCR-Amplifikation

Der quantitative Nachweis von DNA in dendritischen Zellen wurde mit einer Real-Time PCR, basierend auf der TaqMan™ Chemie, durchgeführt. Hierfür wird in den PCR-Ansatz zusätzlich eine fluorogene Sonde eingesetzt. Diese Sonde besteht aus einem Oligonukleotid, dessen 5'-Ende mit einem fluoreszenten Reporter-Farbstoff (Fluoreszein-Derivat) markiert ist, während das 3'-Ende einen Quencher-Farbstoff (Rhodamin-Derivat) trägt. Wird die intakte Sonde bei einer spezifischen Wellenlänge zur Fluoreszenz angeregt, so wird die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffes aufgrund der räumlichen Nähe zum Quencher durch einen Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) unterdrückt. Während der PCR hybridisiert die Sonde mit den Primern an den Matrizen-Strang und aktiviert dadurch die DNA-Polymerase, die Sonde zu hydrolysieren. Die räumliche Nähe (und damit auch der FRET) zwischen Reporter und Quencher wird unterbrochen. Freie, nicht-hybridisierte Sonde dagegen wird nicht hydrolysiert. Entsprechend der Akkumulation der PCR-Produkte steigt die Fluoreszenzintensität des Reporters mit jedem PCR-Zyklus an. Das dabei gebildete Signal ist strikt sequenzspezifisch. Die Fluoreszenzintensität der verschiedenen Farbstoffe kann mit Hilfe des ABI PRISM 7700 Sequence Detectors im geschlossenen Reaktionsgefäß Zyklus für Zyklus erfasst werden.

#### Material:

10x PCR-Puffer: 50mM MgCl<sub>2</sub>; 500mM KCl; 100mM Tris; 0,1mM EDTA; 0,5% Gelatine; 0,1% Tween 20

2mM dNTP (Pharmacia, Freiburg)

5U/ $\mu$ l AmpliTaq Gold Polymerase (Perkin Elmer, Weiterstadt)

Primer; Sonde (TibMolbiol, Berlin)

20  $\mu$ M Rox (TibMolbiol, Berlin)

Protokoll:

Die Real-Time PCR wurde in einem Reaktionsvolumen von 25  $\mu$ l durchgeführt, welcher 1x PCR-Puffer, 200  $\mu$ M dNTP, 2  $\mu$ M Rox, 1,25U Taq Gold Polymerase, 15pmol eines jeden Primers sowie 5pmol Sonde beinhaltet.

Für den Nachweis von HCMV-DNA wurde ein Amplicon aus der AD1-Region des Glykoprotein B (gB)-Gens mit folgenden Sequenzen ausgewählt:

Primer: 3TQAD1 (5'-TGA GGC TGG GAA RCT GAC A-3')  
5TQAD1 (5'-GGG YGA GGA YAA CGA AAT C-3')

Sonde: CMVTQ1 (5'-FAM-TGG CAA CCA CCG CAC TGA GG -TAMRA-3')

Die Ergebnisse der HCMV-DNA-PCR wurden in Relation zur Konzentration des zellulär konstitutiv exprimierten Genes für Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH) in den untersuchten DNA-Extrakten gesetzt. Dieses Amplicon befindet sich an der Grenze zwischen Intron 2 und Exon 3 und besitzt folgende Sequenzen:

Primer: GAP5 (5'-GGC AGC CCC TTC ATA CCC T-3')  
GAP3 (5'-GAA TTT GCC ATG GGT GGA ATC-3')

Sonde: CCS2 (5'-VIC-ACG TAT TCC CCC AGG TTT ACA TGT TCC AA-TAMRA-3')

Die Amplifikation erfolgte in beiden Fällen mit einem klassischen TaqMan<sup>TM</sup>-Programm, die Schritte 2. und 3. wurden 40 x wiederholt.

1. Aktivierung der Taq-Polymerase Gold: 10min 95°C
2. Denaturierung 15sec 95°C
3. Annealing und Elongation 1min 60°C

## 2.8.3 Herstellung eines Plasmidstandards für die qualitative PCR

### 2.8.3.1 Klonierung des PCR-Produkts in den Vektor pCR<sup>®</sup>II

Mit dem Vektor pCR<sup>®</sup>II ist es möglich, PCR-Fragmente direkt zu klonieren. Bei der PCR wird, unabhängig vom Template, von der Taq-Polymerase ein Adenosin an die 3'-Enden des PCR-



Produkts ansynthetisiert. Der linearisierte Vektor pCR<sup>®</sup>II besitzt jeweils einzelne 3'-Thymidin-Überhänge, die eine direkte Klonierung ermöglichen. Anschließend wurden kompetente Bakterien mittels Hitzeschocks behandelt, um den Vektor aufzunehmen und zu vermehren. Da sich auf dem Vektor ein Ampicillinresistenzgen befindet, können sich nur Bakterien mit Vektor auf ampicillinhaltigen LB-Platten vermehren. Die Insertionsstelle des Vektors befindet sich innerhalb des LacZ-Gens. Daher kann ein Bakterium, welches einen Vektor ohne Insert aufgenommen hat und über ein intaktes LacZ-Gen verfügt, nach der Induktion mit IPTG  $\beta$ -Galaktosidase bilden. Dieses Enzym kann die farblose Verbindung X-Gal spalten, welches die Bakterien durch das Entstehen von 5-Brom-4-Chlor-Indigo blau anfärbt. Mit einer sogenannten Blau-Weiß-Selektion können nun Bakterienklone, die einen Vektor mit Insert enthalten, von denen unterschieden werden, die einen Vektor ohne Insert aufgenommen haben. Bakterien, die einen Vektor mit Insert aufgenommen haben, können das Enzym  $\beta$ -Galaktosidase nicht bilden und sind daher als weiße Kolonien zu erkennen.

#### Material:

TA Cloning<sup>®</sup> Kit (Invitrogen, Leek, Niederlande)

Kompetente Zellen (One Shot<sup>™</sup>, Invitrogen, Leek, Niederlande)

SOC-Medium: 2% Trypton; 0,5% Hefeextrakt; 10mM NaCl; 2,5mM KCl; 10mM MgCl<sub>2</sub>; 10mM MgSO<sub>4</sub>; 20mM Glucose

LB-Amp-Platten: 1% Trypton; 0,5% Hefeextrakt; 1% NaCl; 1,5% Bactoagar; 100 $\mu$ g/ml Ampicillin  
20mg/ml X-Gal; 100mM IPTG

#### Protokoll:

Für die Ligation wurden je nach DNA-Konzentration 0,5 - 2 $\mu$ l frisches PCR-Produkt mit 2 $\mu$ l pCR<sup>®</sup>II-Vektor, 1 $\mu$ l 10x Ligationspuffer und 1 $\mu$ l T4 DNA-Ligase versetzt, auf 10 $\mu$ l mit sterilem Wasser aufgefüllt und 4-18 Stunden bei 14°C inkubiert. Anschließend wurden zu 50 $\mu$ l kompetenten Zellen 2 $\mu$ l  $\beta$ -Mercaptoethanol und 2 $\mu$ l Ligationsansatz gegeben, gemischt und 30min auf Eis inkubiert. Nach dem Hitzeschock (30sec bei 42°C) wurden die Zellen 2min auf Eis inkubiert. Zur Vorkultur wurden die Bakterien mit 250 $\mu$ l SOC-Medium versetzt und 30min bei 37°C geschüttelt. Ampicillinhaltige LB-Platten wurden mit 40 $\mu$ l IPTG und 80 $\mu$ l X-Gal beimpft. Anschließend wurden dort ca. 100 $\mu$ l Vorkultur ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die weißen Klone wurden danach mit Hilfe einer PCR voruntersucht. 10 PCR-positive Klone wurden über Nacht in LB-Amp-Medium hochgezogen, deren Plasmide isoliert (siehe 2.8.3.2 und 2.8.3.3) und durch den Verdau mit Restriktionsendonukleasen oder durch die Sequenzierung der Firma SeqLab identifiziert.

### 2.8.3.2 Präparation von Plasmid-DNA mittels TENS-Methode

Die Plasmid-Minipräparation mittels TENS-Methode dient der schnellen Gewinnung geringer Mengen Plasmid-DNA aus transformierten Bakterien. Dabei werden die Bakterienzellen lysiert und die Zellproteine sowie die chromosomale DNA mit Natriumacetat gefällt. Durch eine Zentrifugation wird die Plasmid-DNA von den Zellbestandteilen getrennt und kann nach einer Fällung mit Ethanol in RNase-haltigem Wasser aufgenommen werden.

#### Material:

LB-Amp-Medium: 1% Trypton; 0,5% Hefeextrakt; 1% NaCl; 100 $\mu$ g/ml Ampicillin

TENS-Lsg: 10mM Tris-HCl (pH 7,5); 1mM EDTA; 0,1N NaOH; 0,5% SDS

Natrium-Acetat pH 5,3; Ethanol 70% und 96% (-20°C)

10 $\mu$ g/ml RNaseA in Wasser (RNaseA, Promega, Mannheim)

#### Protokoll:

2ml einer über Nacht bei 37°C im Inkubationsschüttler inkubierten Kultur wurden bei 15000xg für 5min zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 200 $\mu$ l LB-Amp-Medium resuspendiert, mit 300 $\mu$ l TENS-Lösung und 150 $\mu$ l Natrium-Acetat (NaAc) versetzt und gut gevortext. Das gefällte Protein, die chromosomale DNA und die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert (15000xg, 10min). Der Überstand mit der darin enthaltenen Plasmid-DNA wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt, mit zwei Volumen eiskaltem 100% Ethanol versetzt und für 10min mit 15000xg bei 4°C zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70% eiskaltem Ethanol resuspendiert und erneut 10min bei 15000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet an der Luft getrocknet. Anschließend wurde die Plasmid-DNA in 50 $\mu$ l RNaseA-haltigem Wasser gelöst.

### 2.8.3.3 Präparation von Plasmid-DNA mittels Qiagen-Säulen

Zur Gewinnung größerer Mengen sehr reiner Plasmid-DNA wurde das Plasmid MidiKit der Firma Qiagen (Hilden) verwendet. Die Methode basiert auf der alkalischen Lyse der Bakterien, der Fällung von Protein und chromosomaler DNA gefolgt von der Bindung von Plasmid-DNA an ein Anionen-Austausch-Resin.

#### Material:

LB-Amp-Medium: 1% Trypton; 0,5% Hefeextrakt; 1% NaCl; 100 $\mu$ g/ml Ampicillin

Isopropanol; 70% Ethanol

Qiagen Puffer P1; P2; P3; FWB; QBT; QC; QF; QN und TE

#### Protokoll:

30ml einer über Nacht (12-16 Stunden) im Schüttler inkubierten Bakterienkultur wurden 15min mit 6000xg bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in 4ml Puffer P1 resuspendiert. Nach der Zugabe von 4ml Puffer P2 und einer fünfminütigen Inkubation bei Raumtemperatur waren die Bakterien lysiert. Die Neutralisation des Lysats erfolgte durch Zugabe von 4ml kaltem Puffer P3. Nach einer Zentrifugation von 20000xg für 30min bei 4°C wurde der Überstand, der die Plasmid-DNA enthielt, auf eine mit 4ml QBT voräquilibrierte Qiagen-tip 100 gegeben. Um die Kontamination durch Zellbestandteile zu verringern, wurde der Überstand gefiltert, bevor er auf die Säule gegeben wurde. Die Plasmid-DNA bindet nun effizient an die Säule, während sich die RNA, die Proteine und die chromosomale DNA durch zweimaliges Waschen mit jeweils 10ml Puffer QC im Durchlauf befinden. Die Plasmid-DNA wurde mit 5ml Puffer QF eluiert, mit 3,5ml (0,7 Volumen) Isopropanol präzipitiert und 10min bei 15000xg und 4°C pelletiert. Das Pellet wurde mit 2ml 70% Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert (10min, 15000g, 4°C ) und an der Luft getrocknet. Anschließend wurde die DNA in 100µl TE-Puffer gelöst.

### **2.8.3.4 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen**

Um die erhaltenen Plasmide auf das Vorhandensein der richtig insertierten Sequenz zu untersuchen, wurden sie mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen geschnitten. Auch das Linearisieren der Plasmide erfolgte durch Restriktionsenzyme.

#### Material:

Restriktionsenzyme: Apa1; BamH1; Pst1; Blp1; EcoR1; Sca1; Sma1

Restriktionsenzym-puffer (mitgeliefert von MBI Fermentas, St. Leon-Roth; Boehringer, Mannheim; New England Biolabs, Schwalbach)

#### Protokoll:

Für den Restriktionsverdau von Plasmid-DNA wurden 0,5-10µg DNA in einem 20µl Ansatz mit 3-

100Units des entsprechenden Restriktionsenzym vermischt. Als Reaktionspuffer wurden jeweils die vom Hersteller mitgelieferten optimalen Puffer benutzt. Der Ansatz wurde für mindestens 1h bei 37°C inkubiert. Durch das Auftragen auf ein 1-3% Agarosegel, konnten die DNA-Fragmente, aufgrund ihrer Größe, mit den zu erwarteten Längen verglichen werden. Für die Linearisierung wurde ein Restriktionsenzym ausgewählt, welches die Plasmid-DNA nur einmal und zwar außerhalb des Inserts schneidet.

### **2.8.3.5 Bestimmung der DNA-Konzentration**

Der Bestimmung von DNA-Konzentrationen liegt die Lichtabsorbtion von DNA-Molekülen im UV-Bereich zugrunde. Konzentrationsmessungen wurden im Photometer bei  $\lambda=260\text{nm}$  mit Aqua dest als Leerwert vorgenommen. Eine Extinktion von 1,0 entspricht dabei etwa 50mg/ml DNA. Ein Anhaltspunkt für die Reinheit der DNA ergibt sich aus dem Quotienten  $E_{260}/E_{280}$ , der im Idealfall 1,8 betragen sollte. Höhere Werte deuten auf Verunreinigung mit RNA, niedrigere Werte auf Proteinverunreinigung hin.

### **2.8.4 mRNA-Extraktion mit Hilfe des Poly-A-Tract-System-1000-Kit**

Dieses Kit macht sich die Tatsache zu nutze, dass fast alle eukaryontischen mRNAs eine adeninreiche Region an ihrem 3'-Ende besitzen. Nach dem Aufschluß der Zellwände werden die mRNAs mit Hilfe kurzer, einzelsträngiger, biotinylierter, thymidinhaltiger DNA (oligo(dT)) isoliert. Die mRNAs hybridisieren mit den biotinylierten oligo(dT)s. Dieser Komplex bindet nun, mit Hilfe von Biotin, spezifisch an Streptavidin gekoppelte paramagnetische Partikel. In einem Magneten kann die mRNA, die indirekt an die paramagnetischen Partikel gekoppelt ist, anschließend aufgereinigt werden.

#### Material:

Poly-A-Tract-System-1000-Kit (Promega, Mannheim) darin enthalten sind:

GTC-Extraction-Buffer: 4M Guanidin-Thiocyanat; 25mM Na-Citrat (pH 7,1)

Dilution-Buffer: 10mM Tris-HCl (pH 7,6); 1mM EDTA; 90mM Na-Citrat; 900mM NaCl; 0,25% SDS

biotinylierte oligo(dT)s (1:10 in Dilution-Buffer verdünnt)

48,7% Mercapto-Ethanol; Nukleasefreies Wasser

Streptavidin-paramagnetische Partikel

0,5x SSC: 75mM NaCl; 7,5mM Na-Citrat

#### Protokoll:

Für  $1 \times 10^6$  Zellen werden  $80 \mu\text{l}$  Dilution-Buffer sowie  $40 \mu\text{l}$  Extraction-Buffer mit jeweils  $1,64 \mu\text{l}$  Mercapto-Ethanol versetzt. Das Dilution-Buffer/Mercapto-Ethanol-Gemisch wird anschließend auf  $70^\circ\text{C}$  erhitzt. Das Zellpellet wird in  $40 \mu\text{l}$  Extraction-Buffer/Mercapto-Ethanol resuspendiert und mit  $80 \mu\text{l}$  Dilution-Buffer/Mercapto-Ethanol und  $1 \mu\text{l}$  Oligo(dT)s für 5min bei  $70^\circ\text{C}$  inkubiert. Bei der nun folgenden Zentrifugation ( $12000 \times g$ , 10min) hybridisiert die mRNA im Überstand an die Oligo(dT)s. In der Zwischenzeit wurden  $60 \mu\text{l}$  Streptavidin-paramagnetische Partikel (MP) mit 0,5x SSC am Magnetständer gewaschen. Der Überstand wurde mit den MP versetzt und für 2min bei Raumtemperatur inkubiert. Die MP-gebundene mRNA wurde nun in einem Magnetständer pelletiert. Durch dreimaliges Waschen des Pellets mit  $100 \mu\text{l}$  0,5 x SSC wurde der Reinheitsgrad der mRNA erhöht. Durch die Aufnahme des Pellets in  $30 \mu\text{l}$  nukleasefreiem Wasser löst sich die mRNA von dem Komplex. Die Partikel wurden erneut am Magneten pelletiert und so von der im Überstand verbleibenden mRNA isoliert. Die mRNA wurde entweder sofort in cDNA umgeschrieben (siehe 2.8.5) oder bei  $-70^\circ\text{C}$  eingefroren.

### **2.8.5 Umschreiben von mRNA mit dem First-Strand cDNA Synthesis Kit**

Da die mRNA nicht direkt als Matrize für eine Taq-Polymerase genutzt werden kann, muss die mRNA zunächst in cDNA umgeschrieben werden. Das Umschreiben der extrahierten mRNA erfolgt in diesem Kit durch die reverse Transkriptase aus dem „Moloney Murine Leukemia Virus“ (M-MuLV). Dieses Enzym kann mit Hilfe von dNTPs und eines kurzen Primers, der an mehreren Stellen auf der mRNA binden kann, einen zur mRNA komplementären DNA-Strang (cDNA) synthetisieren, welcher als Template in einer PCR verwendet werden kann.

#### Material:

mRNA

First-strand cDNA-Synthese-Kit (Promega, Mannheim) darin enthalten sind:

Bulk-Mix: M-MuLV; RNase/DNase-freies Rinderserumalbumin (BSA); dNTPs

200mM DTT; RNase-freies Wasser

0,2µg/µl Primer: Poly-d(N)<sub>6</sub>

#### Protokoll:

Die eluierte mRNA wurde für 10min erhitzt und dann auf Eis gestellt. Zu 20µl mRNA wurden 1µl Primer, 1µl DTT und 11µl Bulk-Mix pipetiert. Dieser Ansatz wurde 1h bei 37°C inkubiert und anschließend bei 95°C inaktiviert. Die Proben wurden entweder gleich in einen PCR-Ansatz eingesetzt oder bei -20°C eingefroren.

### **2.8.6 Quantitativer Nachweis der cDNA**

Für den quantitativen Nachweis der CD40-, CD54- und CD80-mRNA in DC wurde die mRNA, wie in 2.8.4 beschrieben, isoliert und wie in 2.8.5 beschrieben, in cDNA umgeschrieben. Diese cDNA wurde wiederum in einer Real-Time PCR, basierend auf der TaqMan™ Chemie (Protokoll wie in 2.8.2.3), eingesetzt. Die dafür benötigten Primer und Sonden besitzen folgende Sequenzen:

CD40-Primer: CD40 II RP (5'-ATG GAC AGC GGT CAG CAA G-3')  
CD40 II FP (5'-TCT CAC CTC GCT ATG GTT CGT-3')

CD40-Sonde: CDC40TM2 (5'-FAM-TGC CTC TGC AGT GCG TCC TCT GGT-TAMRA-3')

CD54-Primer: CD54FP (5'-ATG AAA CCG AAC ACA CAA GCC-3')  
CD54RP (5'-TAT GGG AAG GCC GAG GAA G-3')

CD54-Sonde: CD54TM1 (5'-FAM-ACG CCT CCC TGA ACC TAT CCC GGT-TAMRA-3')

CD80-Primer: CD80 II FP (5'-GCC TGA CCT ACT GCT TTG CC-3')  
CD80 II RP (5'-GGG CGT ACA CTT TCC CTT CTC-3')

CD80-Sonde: CD80TM2 (5'-FAM-CAA GAT GCA GAG AGA GAA GGA GGA ATG AGA GA-Dabcyl-3')

Um eine Aussage über die in den Zellen gebildeten mRNA-Konzentrationen treffen zu können, wurden die cDNA-Konzentrationen der einzelnen Proben photometrisch bestimmt. Die erhaltenen Kopienzahlen wurden dann auf 5µg cDNA normalisiert.

## 2.9. Immunfluoreszenz

### 2.9.1 Färbung für die konfokale Fluoreszenzmikroskopie

Werden gleichzeitig Oberflächenmoleküle einer Zelle und Proteine im Zellkern durch fluoreszenzmarkierte Antikörper angefärbt, hat man bei einem herkömmlichen Lichtmikroskop Schwierigkeiten bei der Fokussierung. Bei einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop dagegen wird das Präparat mit Lasern unterschiedlicher Wellenlängen bestrahlt. Ein Computer sammelt anschließend die emittierte Fluoreszenz und setzt sie anschließend zu einem zwei- bzw. dreidimensionalen Bild zusammen.

#### Material:

Antikörper gegen verschiedene HCMV-Proteine und Oberflächenmoleküle von DC (siehe 2.5) PBS; Objektträger; Aceton/Methanol (1:1); 5% Paraformaldehyd; 0,5% NP40; Elvanol

#### Protokoll:

$10^6$  zu färbende Zellen wurden pelletiert (300xg, 5min, 4°C) und zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Oberflächenmoleküle der DC gefärbt. Reife und unreife DC wurden dazu mit 50µl Anti-Human-CMRF-44 und 50µl Anti-Human-CMRF-56 versetzt und für 30min bei 4°C abgedunkelt inkubiert. Plasmazytoide DC wurden dagegen mit 10µl CD123-Biotin für 15min bei 4°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die DC mit 1:100 verd. Anti-Maus-IgM-Alexa633 (Zweit-Antikörper für CMRF-44) und 1:100 verd. Anti-Maus-IgG1-TRITC (Zweit-Antikörper für CMRF-56) für 30min bei 4°C versetzt. Für die Detektion von CD123 wurden die Zellen mit 1:100 verd. Streptavidin-TRITC für 15min bei 4°C inkubiert. Nach dem anschließenden Waschschrift wurden die Zellen mit Hilfe einer Zytospin-Zentrifuge (Shandon, Pittsburgh, USA) auf Objektträger zentrifugiert. Diese Objektträger wurden nun entweder in kaltem Aceton/Methanol für 10min inkubiert (Nachweis von HCMV-IE und HCMV-pp150) oder in 5% Paraformaldehyd für 10min fixiert und anschließend 10min in 0,5% NP40 permeabilisiert (Nachweis von HCMV-pp65). Nach zwei weiteren Waschschriften in PBS wurden die Zellen mit 50µl der entsprechenden Antikörper gegen virale Proteine versetzt (1:50 verd. anti-HCMV-IE, 1:40 verd. anti-HCMV-pp150 oder 1:50 verd. HCMV-pp65). Nach 30min bei 37°C wurden die Zellen wiederum gewaschen und mit 50µl der entsprechenden fluoreszenzmarkierten Zweit-Antikörper (1:100 verd. Anti-Maus-IgG+IgM-FITC bzw. 1:40 verd. Anti-Maus-FITC) inkubiert. Nach weiteren 30min bei 37°C und

einem Waschschrift, wurden nach kurzem Antrocknen unter Zugabe eines Tropfens Elvanols, die Objektträger eingedeckelt. Die Präparate wurden nun im konfokalen Fluoreszenzmikroskop untersucht.

## 2.9.2 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie („fluorescence-activated-cell-sorter“, FACS) ist eine Methode zur Beurteilung von Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften einzelner mit Antikörpern markierter Zellen. Dafür werden die Zellen durch eine dünne Kapillare transportiert, so dass ein Strom einzelner Zellen erzeugt wird, der nun mit einem Laser bestrahlt wird. Photodetektoren messen dabei die Emission der verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe sowie die Lichtstreuung, welche ein Maß für die Granularität und die Größe einzelner Zellen ist.

### Material:

Antikörper siehe 2.5; PBS; 2% Paraformaldehyd

### Protokoll:

Die zu färbenden Zellen wurden in einem FACS-Röhrchen pelletiert (450xg, 6min), zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit den gewünschten Antikörpern (Konzentrationen nach Herstellerangaben) für 15min inkubiert. Danach wurden die Zellen wiederum zweimal gewaschen, in höchstens 300µl PBS aufgenommen und mit Hilfe eines FACSSort analysiert. War für die Färbung ein Zweit-Antikörper (bei vorheriger Verwendung von unkonjugierten oder biotin-gekoppelten Antikörpern) notwendig, so folgte nun eine weitere 15 minütige Inkubation mit den gewünschten Zweit-Antikörpern. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit Hilfe eines Durchflusszytometers (FACSSort) ausgewertet.

Bei der Färbung von infizierten Zellen wurden die Zellen vor der Auswertung immer, nicht-infizierte Zellen manchmal mit 2% Paraformaldehyd für 20min fixiert. Nicht-fixierte Zellen müssen direkt, fixierte dagegen innerhalb einer Woche (Lagerung bei 4°C und Dunkelheit) analysiert werden.



## 2.10. Messung der Vitalität

Um bei einer Analyse in einem Durchflusszytometer die Vitalitätsrate der Zellen zu untersuchen, werden die gefärbten Zellen zusätzlich mit 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) gefärbt. Dringt dieser Farbstoff aufgrund von porösen Zellmembranen in die Zelle ein, kann er mit DNA und Chromatin Komplexe bilden. Dies führt zu einer Verschiebung seines Absorptionsmaximums (von 503 nach 547nm) und seines Emissionsmaximums (von 675 nach 655nm). Aufgrund dieser Verschiebung können selektiv die lebenden Zellen auf die Expression verschiedener Oberflächenmoleküle untersucht werden.

### Material:

7-Aminoactinomycin D (Fluka, Buchs, Schweiz); Zellen

### Protokoll:

Die zu analysierenden Zellen wurden mit 5mg/ml 7-Aminoactinomycin D versetzt, für 20min auf Eis inkubiert und anschließend sofort in einem Durchflusszytometer (FACSSort) ausgewertet.

## 2.11. Gemischte-Lymphozyten-Reaktion (MLR)

In einer MLR wird die Fähigkeit von antigenpräsentierenden Zellen gemessen, allogene T-Zellen zu stimulieren. Zellpopulationen nicht verwandter Personen unterscheiden sich mit großer Wahrscheinlichkeit in ihren MHC-Molekülen. Kokultiviert man nicht mehr teilungsfähige antigenpräsentierende Zellen (APC) und allogene T-Zellen miteinander, reagieren die T-Zellen auf das fremde MHC-Molekül der APC, indem sie proliferieren und sich zu Effektorzellen differenzieren. Die Proliferationsrate kann durch den Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin gemessen werden.

### Material:

5mCi Methyl-<sup>3</sup>H-Thymidin (Pharmacia, Freiburg); PBL; APC; Kulturmedium  
Filter (GF/A, Dunn Labortechnik, Asbach)

### Protokoll:

$10^3$ ,  $10^4$  oder  $10^5$  mit 30Gy bestrahlte DC wurden mit  $10^5$  allogenen PBL in einer 96-Rundboden-

Loch-Platte in 100 $\mu$ l DC-Medium/Loch bei 37°C für 5 Tage kokultiviert. Anschließend wurden pro Loch 50 $\mu$ l DC-Medium, welches 1 $\mu$ Ci Methyl-<sup>3</sup>H-Thymidin enthielt, hinzugegeben. Nach 18h wurde jeder Lochinhalt mit Hilfe des „Cell Harvester“ auf einen Filter übertragen. Das nicht eingebaute Methyl-<sup>3</sup>H-Thymidin wurde abgesaugt. Anschließend wurden die Filter für mindestens 4 Stunden bei Rotlicht getrocknet und dann in einem Trace-96- $\beta$ -Counter ausgewertet. Die radioaktive Strahlung des Methyl-<sup>3</sup>H-Thymidins wurde in „counts per minute“ (cpm) gemessen. Es wurden immer 3 Löcher mit identischen Bedingungen angesetzt und zur Auswertung deren Mittelwerte verwendet.

Um die Fähigkeit von DC zu analysieren, allogene T-Zellen zu stimulieren, wurden nicht-infizierte, HCMV-infizierte und mit UV-inaktiviertem Virus kokultivierte DC in der MLR getestet.

Um zu untersuchen, ob HCMV die DC zur Bildung eines löslichen Faktors anregen kann, wurden iDC und mDC mit FFV bzw. ECV infiziert. Sieben bis 14 Tage nach der Infektion wurde der Überstand von den Zellen getrennt und 2 Stunden bei 312nm mit einer UV-Lampe inaktiviert. Von diesem Überstand wurden 50 $\mu$ l auf die 100 $\mu$ l DC/T-Zellen Kokultur gegeben, wie oben beschrieben 5 Tage kokultiviert und anschließend analysiert.

## 2.12. Zytokin-ELISAs

In einem Enzymimmunoassay (EIA oder ELISA) kann die spontane und induzierte Zytokinproduktion von DC gemessen werden. Ein monoklonaler Antikörper, der an eine feste Phase gekoppelt ist, bindet sein spezifisches Zytokin, bei dessen Anwesenheit im Kulturüberstand. Anschließend wird ein weiterer spezifischer Antikörper, der an ein Enzym gebunden ist, hinzugegeben. Bei Anwesenheit des entsprechenden Zytokins bindet er daran und kann dann sein farbloses Substrat in einen löslichen Farbstoff umwandeln. Diese Chromogenumwandlung ist proportional zur anwesenden Zytokinkonzentration und daher quantifizierbar.

### Material:

OptEIA™ Set: IL-2; OptEIA™ Set: IL-6; OptEIA™ Set: IL-10; OptEIA™ Set: IL-12p70; OptEIA™ Set: TNF- $\alpha$ ; OptEIA™ Set: TGF- $\beta$  (BD Pharmingen, Heidelberg)

IFN-alpha Module Set (Bender Medsystem, Wien, Österreich)

Coating-Puffer: 100mM NaHCO<sub>3</sub>; 34mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; pH 9,5

Verdünnungspuffer: PBS; 10% FKS

Waschpuffer: PBS; 0,05% Tween 20

Substratlösung: Tetramethylbenzidine (TMB) und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (BD Pharmingen, Heidelberg)

Stopplösung: 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

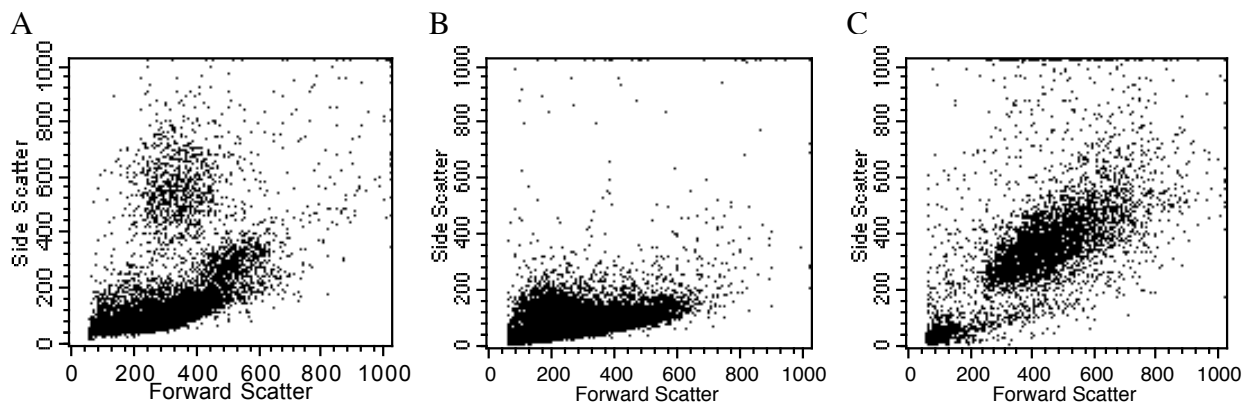
#### Protokoll:

HCMV-infizierte und nicht-infizierte unreife DC (iDC) wurden an Tag 6 nach der Infektion entweder mit 1 µg/ml LPS (=Bestandteil vieler Bakterienmembranen und daher ein Reifungssignal) stimuliert oder unbehandelt gelassen. Die Überstände der infizierten, nicht-infizierten, stimulierten und nicht-stimulierten DC wurden an Tag 1, 2 und 3 nach der Zugabe von LPS im ELISA getestet. Beschichtete 96-Loch-Platten wurden mit 100 µl (nach Herstellerangaben verdünnt) monoklonalen anti-Human Zytokin-Antikörper versetzt und verschlossen über Nacht im Kühlraum inkubiert. Danach wurden die einzelnen Löcher dreimal mit jeweils 300 µl Waschpuffer gewaschen, wobei der Waschpuffer, wie auch bei den folgenden Waschschritten, vollständig durch Ausklopfen entfernt wurde. Anschließend wurden die Löcher mit jeweils 200 µl Verdünnungspuffer für 1 Stunde bei Raumtemperatur geblockt. Es folgten drei weitere Waschschrritte mit je 300 µl Waschpuffer pro Loch. 100 µl der nach Herstellerangaben verdünnten Standards bzw. der DC-Kulturüberstände wurden als Doppelansätze in die entsprechenden Löcher pipettiert und verschlossen. Nach der zwei-stündigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Platte fünfmal mit jeweils 300 µl Waschpuffer pro Loch gewaschen. Nun wurden ein spezifischer biotینگekoppelter Zytokin-Antikörper und ein Avidin-Antikörper, der mit einer Peroxidase gekoppelt war, entsprechend den Herstellerangaben in Verdünnungspuffer gemischt. In jedes Loch wurden nun 100 µl dieser Detektionslösung gegeben. Nach einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur, wurde die Platte siebenmal mit jeweils 300 µl Waschpuffer gewaschen. Nun wurden 100 µl Substratlösung pro Loch hinzugegeben und für weitere 30min bei Raumtemperatur abgedunkelt inkubiert. Mit 50 µl Stopplösung wurde die Enzymreaktion beendet und zur Auswertung die Absorption in einem ELISA-Reader bei 450nm gemessen.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Differenzierung von Monozyten zu DC

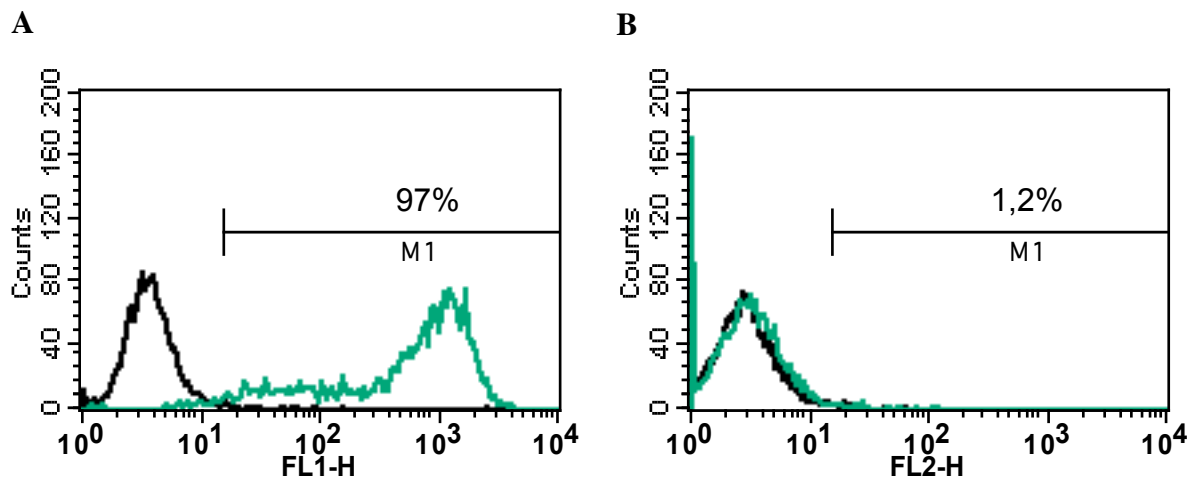
Aus peripherem Blut gesunder, HCMV-seronegativer Spender wurden zunächst die Monozyten, wie unter 2.6.4 beschrieben, isoliert. In der Abbildung 3.1 sind die Ergebnisse der Isolierung mit Hilfe der Durchflusszytometrie veranschaulicht. Mit Hilfe eines Dichtegradienten wurden zuerst die peripheren mononukleären Zellen (PBMC) isoliert, welche in Abbildung 3.1 A dargestellt sind. Man kann deutlich erkennen, dass sich in dieser Fraktion unterschiedliche Zellpopulationen befinden. Anschließend werden die Zellen zur Adhärenz in Zellkulturflaschen überführt. Dabei erfolgt eine Trennung in die Lymphozyten (Abbildung 3.1 B) und Monozyten (Abbildung 3.1 C).



**Abbildung 3.1: Isolierung der Monozyten**

Abgebildet sind Punktwolkendiagramme einer durchflusszytometrischen Untersuchung zur Darstellung der erfolgreichen Auftrennung von mononukleären Zellen des Blutes (PBMC) (A) in Lymphozyten (B) und Monozyten (C). Die einzelnen Zellpopulationen unterscheiden sich anhand ihrer Größe (Forward Scatter) und ihrer Granularität (Side Scatter) in einem Durchflusszytometer .

Die durchflusszytometrische Analyse der so isolierten Zellen ergab, dass es sich hierbei um mehr als 95% CD14<sup>+</sup> Zellen handelt, welche nun nach der Methode von Sallusto und Lanzavecchia mit GM-CSF und IL-4 zu unreifen DC differenziert wurden (Sallusto, et al., 1994). Die erfolgreiche Differenzierung wurde durch eine Färbung mit den Antikörpern gegen CD1a und CD14 und der anschließenden Analyse am Durchflusszytometer überprüft.



**Abbildung 3.2: Expression von CD1a und CD14 auf *in vitro* generierten DC**

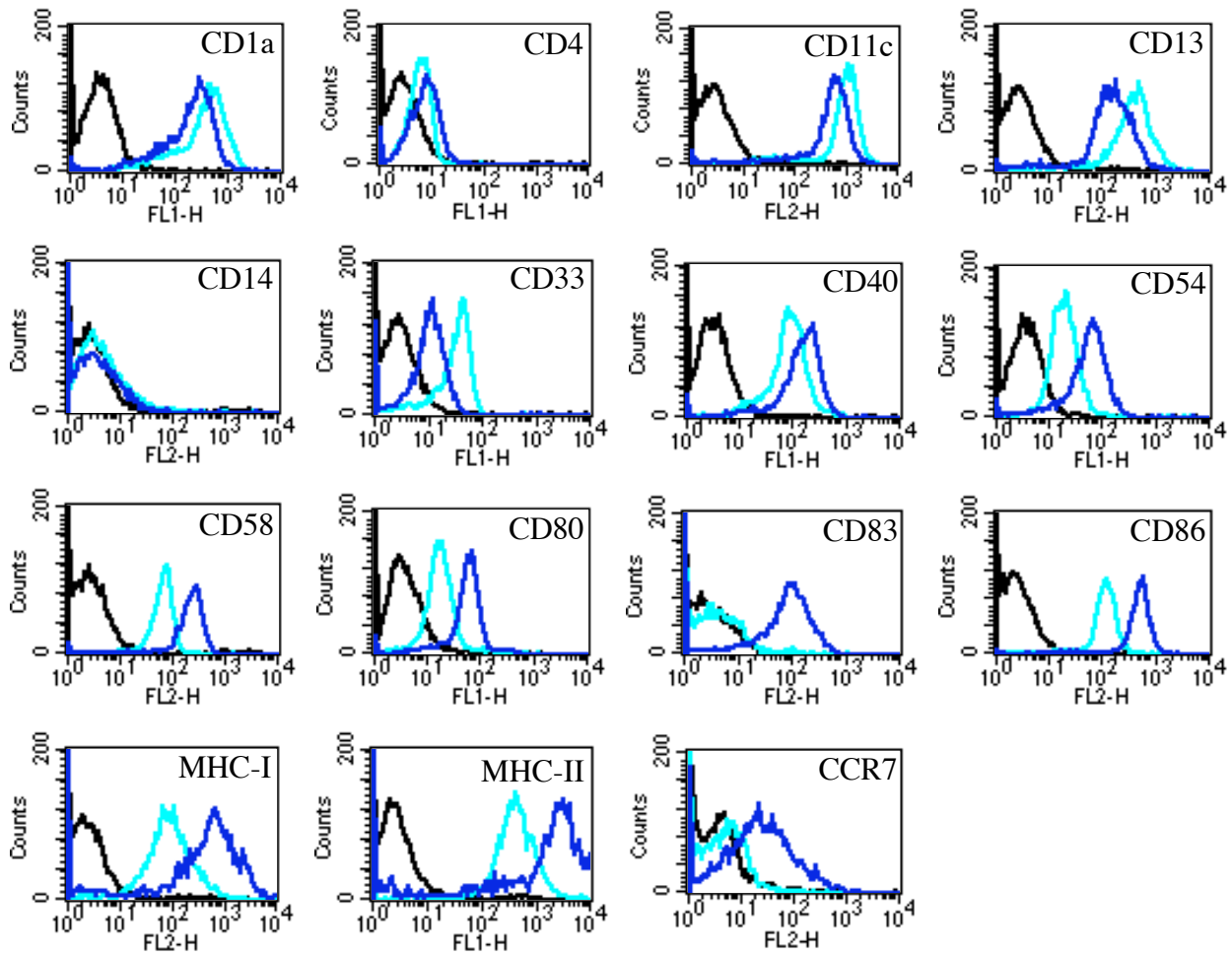
Monozyten wurden mit GM-CSF und IL-4 für 7 Tage kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit Antikörpern gegen CD1a und CD14 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. DC zeigen eine hohe Expression von CD1a (A) und keine Expression des Monozyten/Makrophagenmarkers CD14 (B). Die X-Achse entspricht der Fluoreszenzintensität der Antikörper und die Y-Achse der Anzahl der Zellen, die diesen Marker exprimieren. Die schwarze Linie repräsentiert die Färbung mit der Isotypkontrolle (= Maß der unspezifischen Bindung) und die grüne Linie die Färbung mit dem entsprechenden Antikörper.

Ausdifferenzierte DC weisen zu diesem Zeitpunkt eine starke Expression mit CD1a auf (Abbildung 3.2 A). Gleichzeitig ist eine Expression von CD14 (Abbildung 3.2 B) nicht vorhanden. Zur Ausreifung wurden die Zellen für 24h mit TNF- $\alpha$ , LPS oder einem Gemisch aus IL-1 $\beta$ /IL-6/PGE<sub>2</sub>/TNF- $\alpha$  versetzt. Der Erfolg des Ausreifungsprozesses ließ sich anhand der Expression von CD83 (Reifungsmarker) sowie weiterer charakteristischer Veränderungen im Expressionsmuster ihrer Oberflächenmoleküle (siehe Abbildung 3.3) nachweisen.

Da bei den jeweiligen Blutspendern erhebliche Schwankungen in der Expression der Marker CD1a und CD14 beobachtet werden konnten, wurden nur diejenigen DC in die anschließenden Experimente eingesetzt, bei denen mindestens 95% der Zellen gleichzeitig eine starke CD1a Expression und eine sehr geringe Expression von CD14 (wie in Abbildung 3.2) zeigten.

### 3.2. Charakterisierung von myeloiden DC

Die Einteilung von DC in unreif (iDC) oder reif (mDC) erfolgt über die Expressionsanalyse verschiedener Oberflächenmoleküle. Daher wurden die Zellen mit verschiedenen fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert (siehe Abbildung 3.3).



**Abbildung 3.3: Expressionsmuster verschiedener Oberflächenmoleküle von iDC und mDC**

iDC und mDC wurden mit fluoreszierenden Antikörpern gegen diverse Oberflächenmoleküle gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die Y-Achse entspricht der Anzahl der Zellen, die diesen Marker exprimieren und die X-Achse der Fluoreszenzintensität der Antikörper.

— Isotyp    — iDC    — mDC

In Abbildung 3.3 sind die Ergebnisse der Färbung verschiedener Oberflächenmoleküle von unreifen und reifen DC eines Spenders zu sehen. Die schwarze Linie entspricht dem Signal der Isotypkontrolle. Dieser Antikörper bindet an ein auf der Zelle nicht vorhandenes Protein und ist daher ein Maß für die unspezifische Bindung. Wird ein Marker auf der Oberfläche einer Zelle exprimiert, sollte die Fluoreszenzintensität höher sein als die der Isotypkontrolle. Wird der Marker nicht exprimiert, befinden sich die Kurven der Isotypkontrolle und die der gefärbten Zelle an nahezu identischer Position. Die unreifen DC, die den hellblauen Linien in Abbildung 3.3 entsprechen, exprimieren den DC-Marker CD1a, die Kostimulationsmoleküle CD4, CD40, CD80, CD86, die Adhäsionsmoleküle CD11c, CD33, CD54, CD58, die Antigenpräsentationsmoleküle MHC-Klasse-I und MHC-Klasse-II und CD13. Eine Expression des Monozyten/Makrophagenmarkers CD14, des Reifungsmarkers CD83 oder des Homing-Faktors CCR7 konnte allerdings nicht nachgewiesen werden. Die reifen DC (dargestellt durch die dunkelblauen Linien) exprimieren zusätzlich zu den Markern, die auch die iDC besitzen CD83 und CCR7. Das Vorhandensein des CD14-Moleküls konnte auch bei den mDC nicht festgestellt werden. Die iDC und mDC unterscheiden sich aber nicht nur in der Expression von CD83 und CCR7 sondern auch in der Expressionshöhe der einzelnen Oberflächenmoleküle. CD1a und CD11c werden bei den unreifen DC stärker exprimiert als bei den reifen DC. Bei CD13 und CD33 ist die Expression bei den iDC um ca. das 10fache höher als bei den mDC. CD4 wird stärker bei den mDC exprimiert. Die restlichen Marker (CD40, CD54, CD58, CD80, CD83, CD86, MHC-I, MHC-II, CCR7) werden von den mDC um ca. das 10fache stärker exprimiert als bei den iDC. Die Expressionshöhen variieren je nach Spender (Daten nicht gezeigt). Die Unterschiede in den Expressionshöhen zwischen iDC und mDC desselben Spenders, bezogen auf die einzelnen in Abbildung 3.3 gezeigten Oberflächenmoleküle, sind dagegen konstant vorhanden.

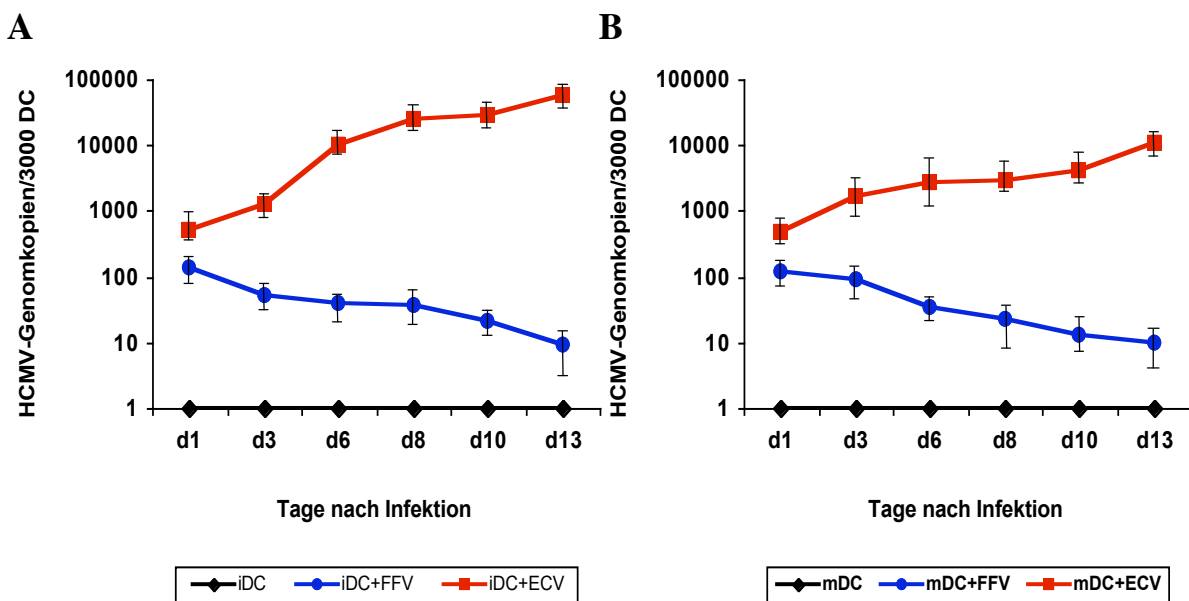
### **3.3. Infektion von myeloiden DC mit HCMV**

HCMV hat verschiedene Mechanismen entwickelt, der Immunantwort des Wirtes zu entgehen (siehe 1.2.7). Da DC eine Schlüsselrolle bei der Aktivierung des Immunsystems einnehmen (siehe 1.1.2), sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob HCMV auch in der Lage ist, diese Zellen zu infizieren und deren Funktion zu beeinflussen. Daher wurde zuerst überprüft, ob DC mit HCMV infizierbar ist und ob diese Infektion zur Produktion neuer Viruspartikel (permissive Infektion) führt oder nicht (abortive Infektion). Dazu wurden DC mit einem Pool aus Endothelzell-adaptierten Vi-

ren (ECV) oder einem Pool aus Fibroblasten-adaptierten Viren (FFV) infiziert und anschließend auf das Vorhandensein von Virus-DNA, Virusproteinen und der Bildung von Viruspartikeln untersucht.

### 3.3.1 Nachweis von HCMV-DNA in infizierten DC

Nach der HCMV-Infektion wurden die DC zweimal in PBS gewaschen, in neuem Medium aufgenommen und neu ausgesät. An Tag 1-13 nach der Infektion wurden die Zellen geerntet und anschließend mit Hilfe einer quantitativen Real-Time PCR auf das Vorhandensein viraler DNA untersucht. Gleichzeitig wurden die Proben auf das zelluläre, konstitutiv exprimierte Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase-Gen (GAPDH) getestet. Dies ermöglichte die Quantifizierung der viralen DNA in Bezug auf die eingesetzte Zellzahl. Abbildung 3.4 zeigt die Mittelwerte von 8 verschiedenen Spendern, wobei die Fehlerbalken jeweils der einfachen Standardabweichung entsprechen.



**Abbildung 3.4: Quantitativer Nachweis von HCMV-DNA in infizierten DC**

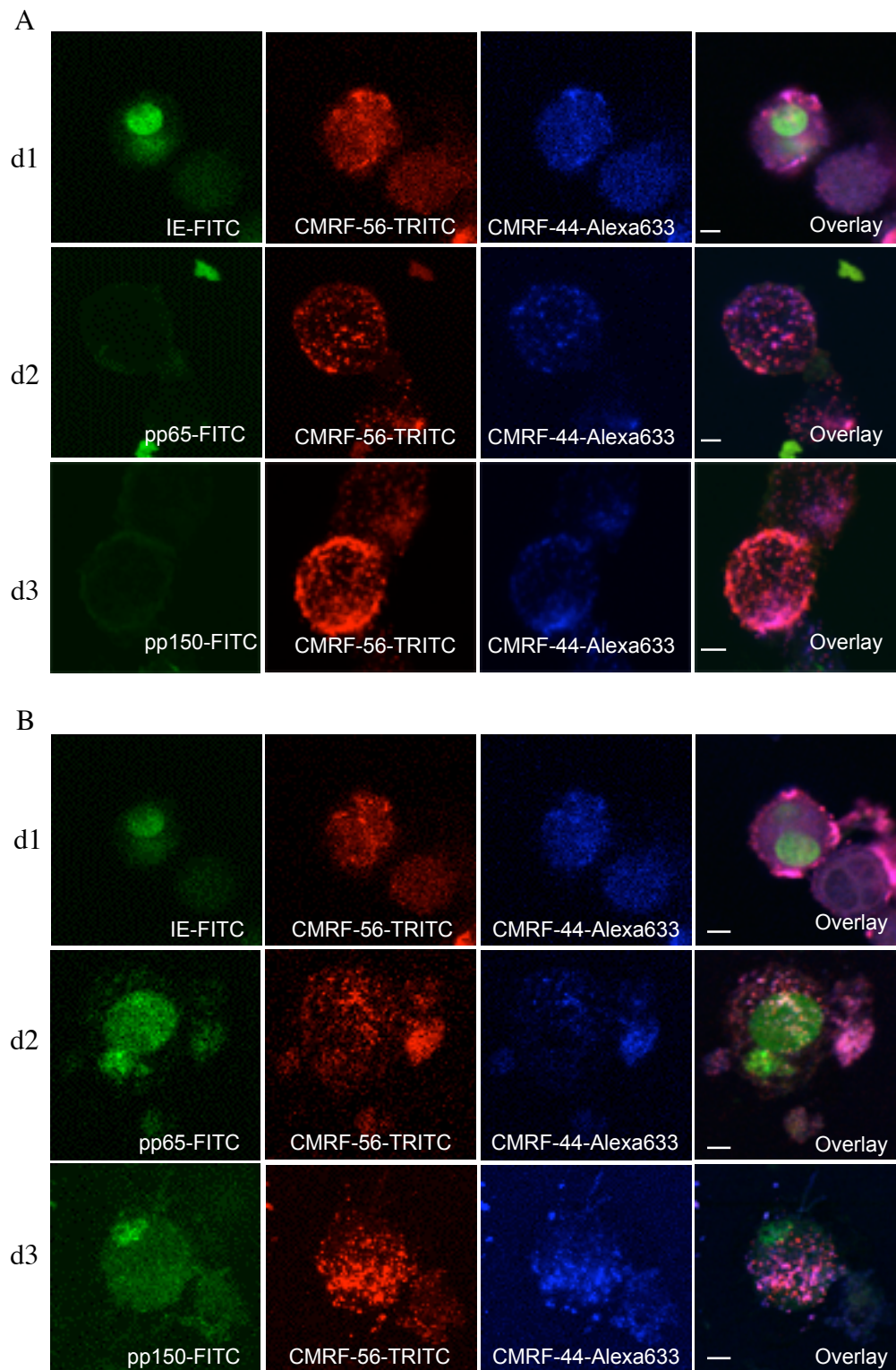
Reife (B) und unreife (A) DC wurden mit FFV oder ECV (MOI 1) infiziert. Nach 24h wurden die DC gewaschen und neu ausgesät. An verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion wurden die DC geerntet und die HCMV-Genomkopien pro 3000 Zellen mit Hilfe einer Real-Time PCR bestimmt. In der Abbildung sind die Mittelwerte von 8 verschiedenen Spendern dargestellt. Die Fehlerbalken zeigen jeweils die einfache Standardabweichung an.



Sowohl bei den ECV-infizierten iDC (Abbildung 3.4 A) als auch bei den ECV-infizierten mDC (Abbildung 3.4 B) ist ein HCMV-Genomanstieg zu sehen. Die HCMV-Genomkopienzahl steigt bei den iDC von ca. 500 Kopien pro 3000 DC an Tag 1 auf ca. 56000 Kopien pro 3000 DC an Tag 13 nach der Infektion an. Bei den ECV-infizierten mDC steigt sie von ca. 500 Kopien pro 3000 DC an Tag 1 auf ca. 11000 Kopien pro 3000 DC an Tag 13 nach der Infektion an. Der Anstieg bei den ECV-infizierten mDC ist nicht so hoch wie der der ECV-infizierten iDC, dennoch ist er deutlich vorhanden. Wurden die iDC bzw. die mDC dagegen mit einem FFV-Pool infiziert, nimmt die HCMV-DNA ab. Sowohl bei den FFV-infizierten iDC als auch bei den FFV-infizierten mDC wurde an Tag 1 nach der Infektion eine HCMV-Genomkopienzahl von ca. 120 Kopien pro 3000 DC gemessen. Im weiteren Verlauf sinkt die virale Kopienzahl stetig. An Tag 13 nach der Infektion konnten in beiden Fällen nur noch ca. 10 HCMV-Genomkopien pro 3000 DC detektiert werden. Die nicht-infizierten Zellen zeigten zu keinem Zeitpunkt die Anwesenheit von HCMV-DNA. Zur Kontrolle wurde der Versuch auch mit DC durchgeführt, die mit UV-inaktivierten ECV-Pools oder UV-inaktivierten FFV-Pools kokultiviert wurden. Ein weiterer Kontrollversuch war die Infektion von DC mit ECV- oder FFV-Pools, die zuvor mit neutralisierenden Antikörpern inkubiert wurden (Daten nicht gezeigt). Die Kurven zeigten in beiden Fällen einen ähnlichen Verlauf, wie die der FFV-infizierten DC. An Tag 1 nach Infektion konnten HCMV-Genomkopien nachgewiesen werden, die Kopienzahl nahm aber bis Tag 13 nach der Infektion stetig ab.

### 3.3.2 Nachweis von HCMV-Proteinen in DC

Der Nachweis von HCMV-DNA in den Zellen gibt keinen Aufschluss darüber, ob nach dem Eindringen der Viren auch eine Bildung von Virusproteinen stattfindet. Daher wurden die infizierten unreifen und reifen DC an verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion auf die Expression der HCMV- IE-, pp65-, und pp150-Gene untersucht. Diese Proteine werden zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Replikationszykluses gebildet (siehe 1.2.3). Zur eindeutigen Identifizierung wurden die Zellen in einer Dreifach-Immunfluoreszenz zuerst mit Antikörpern gegen die beiden DC-Marker CMRF-44 und CMRF-56 gefärbt. Anschließend erfolgte eine Färbung der einzelnen Virusproteine und die Auswertung im konfokalen Mikroskop.



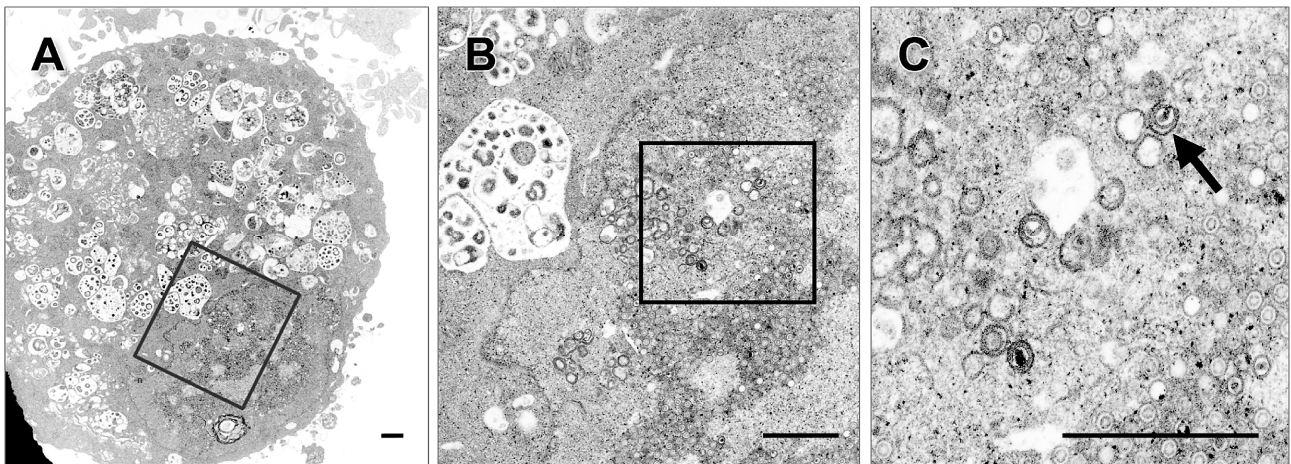
**Abbildung 3.5: Virusproteinnachweis durch Immunfluoreszenzfärbung und konfokaler Mikroskopie**

Unreife DC wurden mit einem Pool aus FFV (A) oder ECV (B) infiziert (MOI 50). An den Tagen 1-3 (d1-d3) nach der Infektion wurden die Zellen mit Antikörpern gegen die DC-Marker CMRF-44 und CMRF-56 und gegen die zu verschiedenen Zeitpunkten der Replikation gebildeten Virusproteine IE, pp65 oder pp150 gefärbt und am konfokalen Mikroskop analysiert. Linie = 4 $\mu$ m

In FFV-infizierten iDC (Abbildung 3.5 A) konnten nur HCMV-IE-Proteine, aber keine HCMV-pp65- oder HCMV-pp150-Proteine nachgewiesen werden. In den iDC, die mit einem ECV-Pool infiziert wurden (Abbildung 3.5 B), konnten dagegen alle drei HCMV-Proteine detektiert werden. Die drei verschiedenen Virusproteine werden zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Replikation gebildet. Das HCMV-IE-Protein ist ein sehr früh gebildetes Protein, gefolgt von HCMV-pp65 und HCMV-pp150. Bei den ECV-infizierten iDC konnten alle drei Proteine gebildet werden. Daher ist zu vermuten, dass es sich hierbei um eine produktive Infektion handelt. Bei den FFV-infizierten DC dagegen konnte nur die Anwesenheit von IE nachgewiesen werden. In diesem Fall wird der Replikationszyklus nach der Bildung von IE-Proteinen und vor der Produktion von pp65-Proteinen unterbrochen. Es handelt sich daher um eine abortive Infektion. Dieselben Ergebnisse erhält man bei den FFV- und ECV-infizierten mDC. Die Bildung der Virusproteine ist daher nicht abhängig vom Differenzierungsgrad der DC, sondern vom verwendeten Virusisolat. Allerdings war die Infektionsrate (=Anzahl der HCMV-IE positiven Zellen) der mDC mit ca. 20-50% (bei MOI 50) niedriger als die der iDC (50-80%). Wurden die DC mit UV-inaktivierten Viren kokultiviert, konnten keine HCMV-Proteine nachgewiesen werden.

### 3.3.3 Nachweis von HCMV-Virionen in infizierten DC

Um zu untersuchen, ob auch virale Partikel in HCMV-infizierten DC gebildet werden, wurden nicht-infizierte, FFV-infizierte und ECV-infizierte iDC für die Elektronenmikroskopie vorbereitet (siehe 2.6.3). Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen sind in Abbildung 3.6 zu sehen. In Abbildung 3.6 A ist der Zellkern einer ECV-infizierten unreifen DC zu sehen. In der entsprechenden Vergrößerung kann man im Zellkern der infizierten Zelle virale Nukleokapside (Abbildung 3.6 C) erkennen. Bei den FFV-infizierten iDC konnten dagegen lediglich an der äußeren Zellmembran und im Zytoplasma HCMV-Partikel detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Im Zellkern, dem Ort der HCMV-Replikation, konnten jedoch keine HCMV-Partikel identifiziert werden. Reife DC wurden elektronenmikroskopisch nicht untersucht, doch es ist anzunehmen, dass sich deren Ergebnisse mit denen der unreifen DC decken würden. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass bei DC nur eine Infektion mit ECV zu einer produktiven Infektion führt. Die FFV-Stämme dagegen können die DC zwar infizieren, doch deren Replikationszyklus bricht nach der Produktion von IE-Proteinen und vor der Bildung von pp65-Proteinen ab. In diesem Fall handelt es sich um eine abortive Infektion.



**Abbildung 3.6: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von ECV-infizierten iDC**

ECV-infizierte iDC (MOI 1) wurden mit EM-Puffer versetzt, in ultradünne Scheiben geschnitten und am Elektronenmikroskop mit einer Vergrößerung von 5800x (A), 21000x (B), 52500x (C) analysiert. (B) repräsentiert einen Ausschnitt von (A) and (C) repräsentiert einen Ausschnitt von (B). Der Pfeil deutet auf ein virales Nukleokapsid. Linie = 1 µm

### 3.3.4 HCMV-Infektion von DC *in vivo*

Nachdem der Nachweis einer HCMV-Infektion in DC *in vitro* gelungen war, sollte untersucht werden, ob auch DC *in vivo* mit HCMV infiziert werden können. Dazu wurden DC aus dem Blut hochvirämischen Patienten (190-500 pp65-positive Zellkerne pro  $2 \times 10^5$  Leukozyten), wie unter 2.6.5 beschrieben isoliert. Nach dem Sortieren im FACSstar plus cell sorter wies die CMRF-44+/CMRF-56+ Population eine Reinheit von  $\geq 99\%$  auf. Die DNA von 700 - 1200 dieser DC wurden in einer nested PCR (beschrieben unter 2.8.2.1) untersucht. In dieser PCR wurde ein Teil der AD1-Region amplifiziert, welche sich im HCMV-Glykoprotein gB befindet. Von jedem Spender wurden 5 PCR-Ansätze pipettiert. In Tabelle 3.1 sind die Ergebnisse von 4 verschiedenen Spendern zusammengefasst. Mit diesem Versuchsansatz konnte gezeigt werden, dass 3 von 4 Patienten in mindestens einem PCR-Ansatz ein positives Signal ergaben. Für jeden Patienten wurden 6 Negativkontrollen mitgeführt. In ihnen konnte niemals ein positives PCR-Signal detektiert werden. Der Patient, bei dem die PCR negativ war, war auch derjenige mit der niedrigsten HCMV pp65 positiven Zellzahl pro  $2 \times 10^5$  Leukozyten.

**Tabelle 3.1: HCMV-Infektion von DC in vivo**

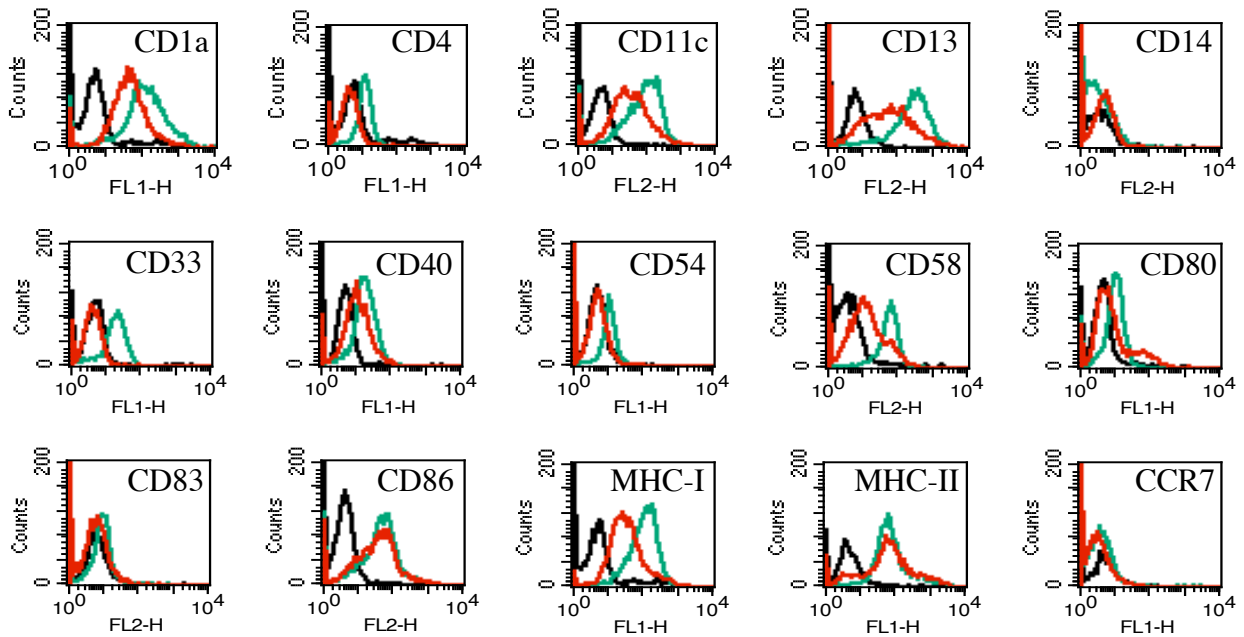
Patient	Anzahl der HCMV pp65 positiven Zellen / $2 \times 10^5$ Leukozyten	HCMV nested PCR
1	468	+
2	384	+
3	190	-
4	500	+

DC aus dem Blut hochvirämischer Patienten mit einer Reinheit von  $\geq 99\%$  wurden in einer nested PCR auf das Vorhandensein von HCMV-DNA untersucht.

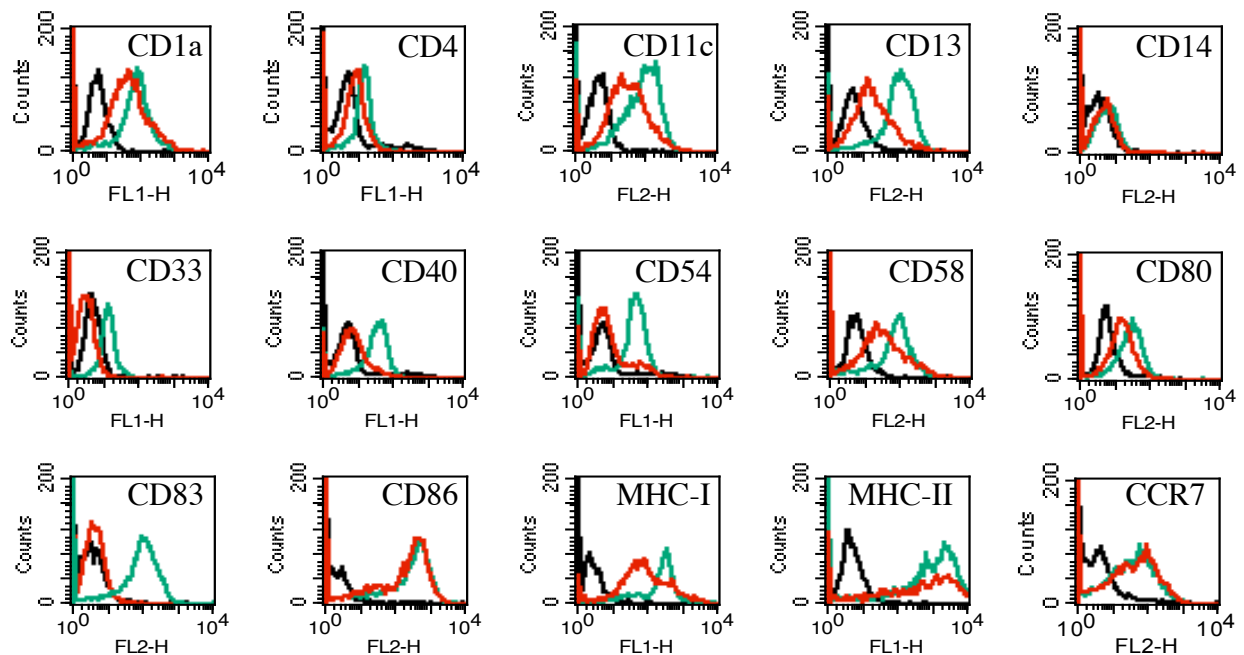
### 3.3.5 HCMV verändert die Expression von Oberflächenmolekülen

Es konnte gezeigt werden, dass HCMV DC produktiv infizieren kann. Nun sollten die Auswirkungen dieser Infektion auf die Zellen erforscht werden. Zuerst sollte untersucht werden, ob die HCMV-Infektion eine Veränderung in der Expression einzelner Oberflächenmoleküle bewirkt. Hierzu wurden iDC und mDC mehrerer Spender mit einer MOI von 50 infiziert, an verschiedenen Tagen nach der Infektion auf die einzelnen Proteine gefärbt und am Durchflusszytometer analysiert. Die Expression der nicht-infizierten iDC und mDC wurde anschließend mit der Expression der infizierten iDC und mDC desselben Spenders zum gleichen Zeitpunkt verglichen. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.7 dargestellt. HCMV ist in der Lage, die Expression der Moleküle CD1a, CD4, CD11c, CD13, CD33, CD40, CD54, CD58, CD80, CD83 und MHC-Klasse-I sowohl bei den iDC wie auch bei den mDC zu hemmen. Die Moleküle CD14, CD86, MHC-Klasse-II und CCR7 sind davon nicht betroffen. Die Stärke der Hemmung zwischen iDC und mDC ist allerdings unterschiedlich. Eine HCMV-Infektion bewirkt bei den iDC eine komplette Hemmung der Kostimulationsmoleküle CD4 und CD80, sowie der Adhäsionsmoleküle CD54 und CD33. Bei den Antigenpräsentationsmoleküle CD1a und MHC-Klasse-I, den Adhäsionsmolekülen CD11c, CD40 und CD58 sowie bei der Aminopeptidase-N (CD13) kann eine ca. 80%ige Hemmung beobachtet werden. Die Expression von CD14, dem Reifungsmarker CD83, dem Kostimulationsmolekül CD86, dem

A



B



### Abbildung 3.7: HCMV verändert die Expression der Oberflächenmoleküle von DC

Verschiedene charakteristische Oberflächenmoleküle von infizierten und nicht-infizierten iDC (A) und mDC (B) wurden mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die Y-Achse entspricht der Anzahl der Zellen, die diesen Marker exprimieren und die X-Achse der Fluoreszenzintensität der Antikörper.

— Isotypkontrolle    — nicht-infizierte DC    — infizierte DC

Antigenpräsentationsmolekül MHC-Klasse-II und dem Homing-Faktor CCR7 wird auf den iDC nicht durch das Virus beeinflusst. Auch die FFV-infizierten DC zeigten die gleiche charakteristische Hemmung der Oberflächenmoleküle wie die der ECV-infizierten DC. Allerdings war die verminderte Expression nach einer Infektion mit FFV nicht so stark wie die der ECV-infizierten DC. Die gleichen Ergebnisse konnten auch mit unreifen DC erzeugt werden, die zuerst infiziert wurden und danach einen Ausreifungsstimulus erhielten. Sowohl die FFV-infizierten, als auch die ECV-infizierten Zellen waren nicht mehr in der Lage, die reifungsbedingte erhöhte Expression der Moleküle MHC-Klasse-I, CD80, CD40 und CD54 auszubilden (Daten nicht gezeigt). Bei den infizierten mDC erfolgt durch die HCMV-Infektion eine komplette Hemmung des Kostimulationsmoleküls CD40, des Adhäsionsmoleküls CD54 und des Reifungsmarkers CD83. Bei dem Antigenpräsentationsmolekül MHC-Klasse-I, dem Adhäsionsmolekülen CD58 und CD11c und bei der Aminopeptidase-N (CD13) konnte eine ca. 80%ige Hemmung beobachtet werden. Eine um ca. 50% geringere Expression ist bei dem Antigenpräsentationsmolekül CD1a, den Kostimulationsmolekülen CD4 und CD80 und dem Adhäsionsmolekül CD33 zu vermerken. Das CD14-Molekül, das Kostimulationsmolekül CD86, das Antigenpräsentationsmolekül MHC-Klasse-II und der Homing-Faktor CCR7 zeigten keine unterschiedlichen Expressionshöhen zwischen infizierten und nicht-infizierten mDC. Die verminderte Expression der verschiedenen Oberflächenmoleküle konnte sowohl bei einer Infektion mit ECV-Stämmen als auch bei einer Infektion mit FFV-Stämmen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). In Kapitel 3.3.2 konnte gezeigt werden, dass die FFV-Infektion in DC nach der Bildung der IE-Proteine und vor der Produktion von pp65-Proteinen abbricht. Daher liegt die Schlussfolgerung nahe, dass ein HCMV-IE und/oder ein HCMV-E-Genprodukt für die verminderte Expression der Oberflächenmoleküle verantwortlich ist.

### **3.3.6 Analyse der Vitalitätsrate infizierter und nicht-infizierter Zellen**

Eine geringere Expression von Oberflächenmolekülen kann mehrere Gründe haben. Dies könnte zum Beispiel an einer Virus-vermittelten Hemmung oder an einem verstärkten Zelltod der infizierten Zellen liegen. Um zu untersuchen, ob die geringere Expression verschiedener Marker am vermehrten Absterben der HCMV-infizierten Zellen liegt, wurden die Zellen nach der Färbung mit den fluoreszenzmarkierten Antikörpern zusätzlich mit dem Farbstoff 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) gefärbt. Dieser Farbstoff kann die intakte Zellmembran einer lebenden Zelle nicht durchdringen. Dringt dieser Farbstoff aufgrund poröser Zellmembranen in die Zelle ein, bindet er an die zelluläre DNA, was zu einem veränderten Emissions- und Absorptionsspektrum dieses Farbstoffes führt.

Diese Veränderung kann durchflusszytometrisch analysiert werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.2 dargestellt. Außerdem können damit gezielt nur die lebenden Zellen auf ihre Oberflächenexpressionen untersucht werden. Die Tabelle 3.2 gibt die Prozentzahlen der lebenden Zellen an verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion an. Die Anzahl der lebenden Zellen in dem Untersuchungszeitraum von 10 Tagen zwischen den infizierten und nicht-infizierten Zellen unterscheidet sich kaum. Auch gibt es keine Unterschiede zwischen ECV-infizierten DC und FFV-infizierten DC. Die tageweise auftretenden Schwankungen werden durch die Bildung des Mittelwertes ausgeglichen und liegen zwischen ca. 93% und 95% lebende DC.

**Tabelle 3.2: Vitalitätsrate von infizierten und nicht-infizierten DC**

	Tag 4	Tag 7	Tag 10	Mittlere Vitalität über 10 Tage
Nicht-infizierte iDC	98,5 ± 0,6	91,6 ± 1,9	91,3 ± 1,8	93,8
FFV-infizierte iDC	97,8 ± 0,4	93,0 ± 1,0	92,7 ± 1,2	94,5
ECV-infizierte iDC	92,5 ± 0,2	93,8 ± 2,3	92,8 ± 1,9	93,0
Nicht-infizierte mDC	87,9 ± 3,9	97,9 ± 0,5	98,9 ± 0,2	94,9
FFV-infizierte mDC	84,6 ± 9,7	98,6 ± 0,1	98,4 ± 0,4	93,9
ECV-infizierte mDC	85,8 ± 5,8	97,1 ± 0,9	98,7 ± 0,3	93,8

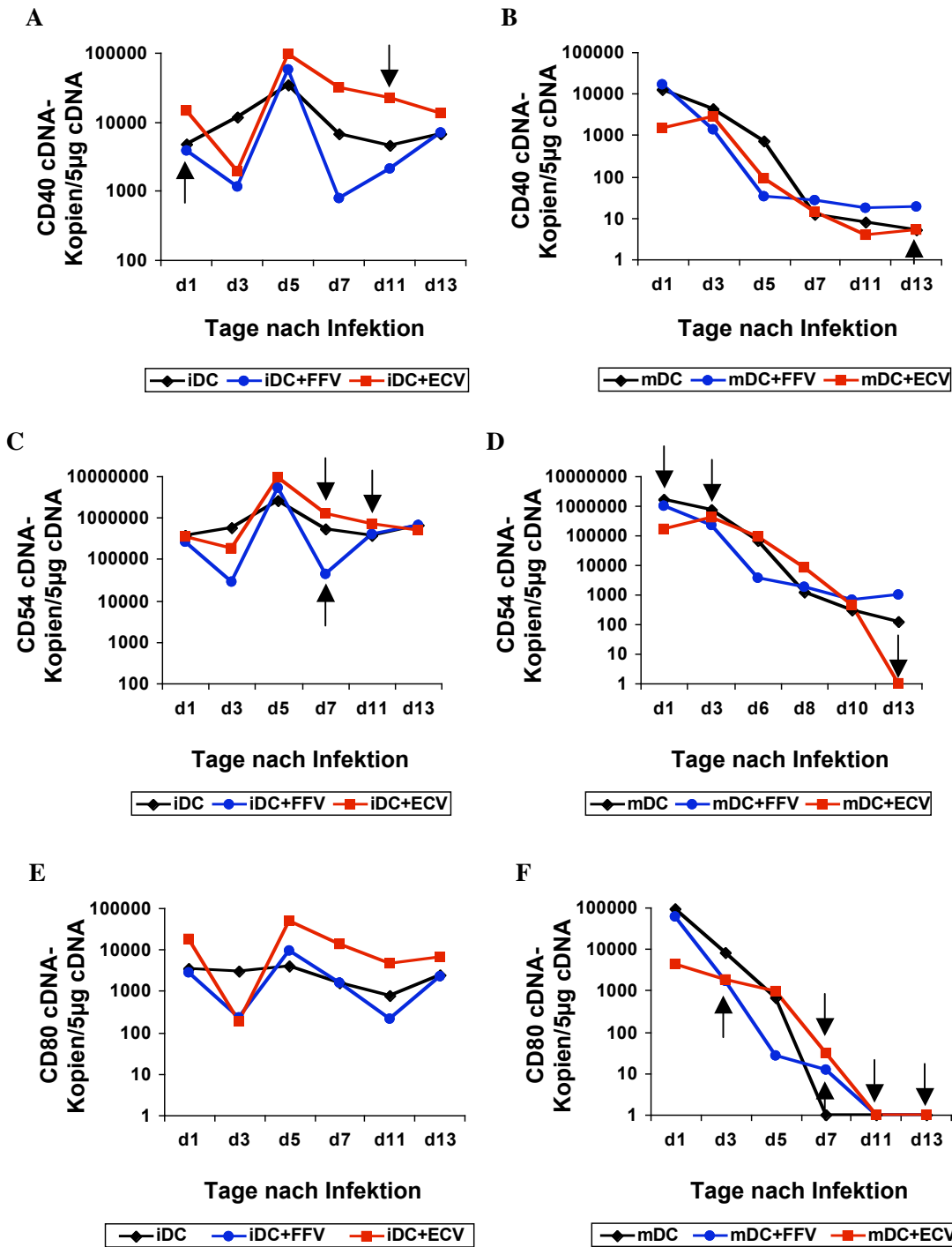
DC wurden an verschiedenen Tagen nach der HCMV-Infektion (MOI 50) mit 7-Aminoactinomycin D gefärbt und wie in 2.10 beschrieben analysiert. Die Prozentzahlen der lebenden Zellen wurden als Mittelwerte von 3 unabhängigen Experimenten angegeben.



### 3.3.6.1 Verminderte Expression der Oberflächenmoleküle liegt nicht an verminderter mRNA-Synthese

Wie im vorangegangenen Kapitel gezeigt werden konnte, kann die geringere Expression verschiedener Oberflächenmoleküle nicht mit der geringeren Vitalitätsrate der HCMV-infizierten DC erklärt werden. Es ist daher zu vermuten, dass das Virus Mechanismen entwickelt hat, die Expression dieser Moleküle zu hemmen. Nun sollte untersucht werden, ob dieses Phänomen ein prä- oder posttranslationales Ereignis ist. Deshalb sollten die mRNA-Konzentrationen einiger Oberflächenproteine von infizierten und nicht-infizierten Zellen miteinander verglichen werden. Zu diesem Zweck wurde die gesamte mRNA von nicht-infizierten, ECV-infizierten und FFV-infizierten iDC und mDC an verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion isoliert und in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurde die cDNA-Konzentration von CD40, CD54 und CD80 darin bestimmt. Außerdem wurden die Zellen an denselben Zeitpunkten mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Antikörpern durchflusszytometrisch auf die Expression von CD40, CD54 und CD80 untersucht. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.8 zu sehen. Bei allen 3 Molekülen unterscheiden sich die Kurven der nicht-infizierten, von denen der FFV-infizierten oder von denen der ECV-infizierten Zellen kaum. An den Messpunkten, die mit einem Pfeil gekennzeichnet sind, konnte eine deutlich geringere Expression in der durchflusszytometrischen Analyse gemessen werden (siehe Abbildung 3.8). Die cDNA-Konzentrationen der infizierten DC an diesen mit Pfeilen gekennzeichneten Tagen ist aber weder bei CD40 noch bei CD54 oder CD80 signifikant niedriger als bei den nicht-infizierten Zellen. Diese Resultate waren auch unabhängig vom Differenzierungsgrad der DC. Die einzige Ausnahme ist die cDNA-Konzentration von CD54 bei FFV-infizierten iDC an Tag 7.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die verminderte Expression der CD40-, CD54- und CD80-Moleküle weder bei den FFV-infizierten iDC und mDC noch bei den ECV-infizierten iDC und mDC an einer geringeren Synthese der einzelnen mRNAs liegt. Es muss sich hier, wie auch die verminderte Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen, um ein posttranslationales Ereignis handeln.



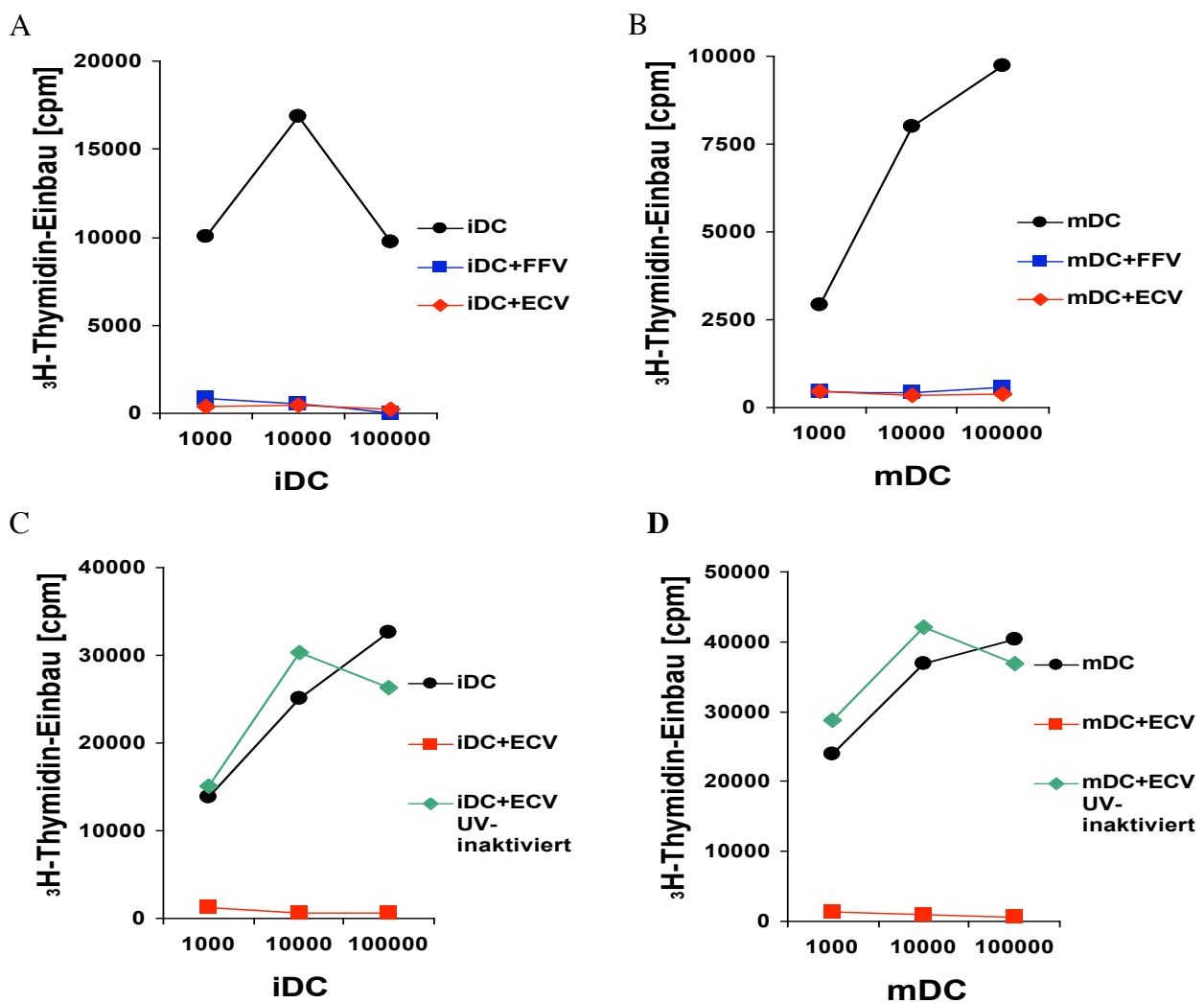
**Abbildung 3.8: Messung der cDNA-Konzentrationen verschiedener Oberflächenmoleküle**

Die Gesamt-mRNA von HCMV-infizierten und nicht-infizierten iDC und mDC wurden an verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die cDNA-Konzentration von CD40 (A+B), CD54 (C+D) und CD80 (E+F) wurden in einer Real-Time PCR bestimmt und in Relation zur Gesamt-cDNA-Konzentration dargestellt. Gleichzeitig wurden die Zellen mit Antikörpern gegen CD40, CD54 und CD80 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Der Pfeil entspricht dem Zeitpunkt, an dem eine deutlich verminderte Expression von CD40, CD54 oder CD80 in der Durchflusszytometrie nachgewiesen werden konnte.

### 3.4. Funktionsanalysen von HCMV-infizierten myeloiden DC

#### 3.4.1 Hemmung der DC-vermittelten Proliferation allogener T-Zellen

Die Hauptfunktion von DC ist es, T-Zellen zu aktivieren und zur Proliferation anzuregen. Ob diese Fähigkeit der DC durch eine HCMV-Infektion beeinflusst wird, kann in einer Gemischten-Lymphozyten-Reaktion (MLR) überprüft werden (siehe Kapitel 2.11). Dabei werden nicht mehr



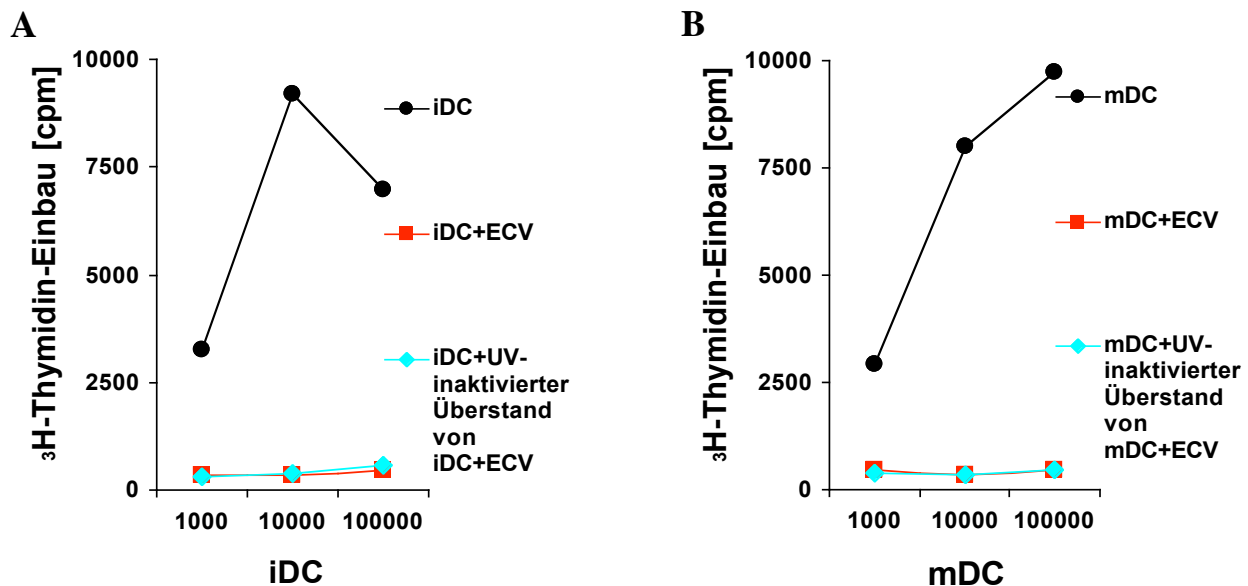
**Abbildung 3.9: Funktionsanalyse HCMV-infizierter DC mittels MLR**

$10^3$ - $10^5$  infizierte und nicht-infizierte DC werden mit  $10^5$  PBL für 5 Tage kokultiviert. Anschließend wird  $1\mu\text{Ci}$   $^3\text{H}$ -Thymidin für 18h hinzugegeben. Die Proliferationsrate der T-Zellen kann nun anhand des  $^3\text{H}$ -Thymidin-Einbaus gemessen werden. Die Kurven entsprechen den Mittelwerten von 3 identischen Ansätzen.

teilungsfähige iDC und mDC in unterschiedlichen Konzentrationen mit PBL eines anderen Spenders für 5 Tage kokultiviert. Anschließend erfolgt eine Inkubation mit  $^3\text{H}$ -Thymidin für ca. 18h. Die Proliferationsrate der PBL kann dann durch den Einbau des  $^3\text{H}$ -Thymidins gemessen werden. Für diese Fragestellung wurden zwischen  $10^3$  und  $10^5$  nicht-infizierte iDC und mDC, FFV-infizierte iDC und mDC, ECV-infizierte iDC und mDC sowie mit UV-inaktivierten Viren kokultivierte iDC und mDC verwendet. In Abbildung 3.9 sind die Ergebnisse dieser Funktionsanalyse als Mittelwerte von 3 identischen Ansätzen zusammengefasst. Die Proliferationsrate der T-Zellen, die mit nicht-infizierten iDC kokultiviert wurden (Abbildung 3.9 A) steigt je nach DC-Konzentration von ca. 10000cpm bis 17000cpm. Wurden die PBL mit FFV- oder ECV-infizierten iDC kokultiviert, konnten nur ca. 500cpm gemessen werden. Daraus lässt sich schließen, dass bei den MLR-Ansätzen mit infizierten DC nur eine sehr geringe Proliferation der T-Zellen stattfand. Die gleiche Aussage erhält man, wenn mDC statt iDC (Abbildung 3.9 B) verwendet werden. Die Höhe der cpm-Werte schwankte zwischen den einzelnen Spendern, so dass die niedrigeren Werte der hier gezeigten mDC in Vergleich zu den iDC keinen Rückschluss auf eine geringere T-Zell-Aktivierung zulassen. Um zu beweisen, dass die Infektion der Zellen mit HCMV notwendig für diesen Effekt ist, wurden die Viren für 2h UV-inaktiviert. Unreife und reife DC wurden mit diesen inaktivierten ECV-Stämmen kokultiviert und ebenfalls in eine MLR eingesetzt (siehe Abbildung 3.9 C + D). Sowohl bei den iDC als auch bei den mDC konnte die Hemmung der T-Zell-Proliferation durch die UV-Inaktivierung des Virus aufgehoben werden. Die Kurven waren mit denen der nicht-infizierten Zellen vergleichbar. Die Ergebnisse der MLR mit DC, die mit UV-inaktivierten FFV-Stämmen kokultiviert wurden, gleichen denen in Abbildung 3.9 C + D gezeigten Kurven (Daten nicht gezeigt). In weiteren, hier nicht dargestellten, Versuchen konnte nachgewiesen werden, dass bei einer Infektionsrate von 0,1% schon eine 50%ige Hemmung der T-Zell-Proliferation erzielt werden konnte. Die Ergebnisse der in Abbildung 3.9 dargestellten MLR zeigen, dass die Hemmung der T-Zell-Proliferation sowohl bei FFV-infizierten, die nur HCMV-IE, aber kein HCMV-pp65 oder HCMV-pp150 bilden können, als auch bei ECV-infizierten iDC und mDC eintritt. Daher liegt die Schlussfolgerung nahe, dass auch in diesem Fall ein HCMV-IE und/oder E-Genprodukt für die Proliferationshemmung verantwortlich ist. Dies wird durch die Tatsache unterstützt, dass die verminderte Proliferation durch die Verwendung von UV-inaktivierten Viren aufgehoben werden konnte. Die Bindung von HCMV an DC ist daher nicht ausschlaggebend für diesen Effekt, sondern dafür sind replikationskompetente Viren notwendig.

### 3.4.2 HCMV-infizierte DC produzieren löslichen Faktor

Die verminderte Expression der Oberflächenmoleküle (siehe Abbildung 3.7) kann nicht die einzige Ursache für die Proliferationshemmung der T-Zellen sein, denn schon bei einer Infektionsrate von 0,1% konnte eine 50%ige Hemmung erzielt werden. Dies führte zu der Hypothese, dass HCMV-infizierte Zellen einen löslichen Faktor produzieren, der für diese Proliferationshemmung verantwortlich ist. Zur Überprüfung dieser Theorie wurden Überstände von infizierten und nicht-infizierten DC gesammelt und UV-inaktiviert. Dieses Vorgehen schließt das Vorhandensein von infektiösen Viruspartikeln in diesen Überständen aus. Anschließend wurden 50  $\mu$ l dieser Überstände zu einem MLR-Ansatz hinzupipettiert, der nicht-infizierte iDC oder mDC mit  $10^5$  PBL enthielt. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.10 zu sehen. Die nicht-infizierten iDC (Abbildung 3.10 A) und mDC (Abbildung 3.10 B) können die PBL zur Proliferation anregen, was an den steigenden cpm-Werten von ca. 3000 auf 10000cpm zu sehen ist. Die infizierten iDC und mDC dagegen können die T-Zellen nicht mehr zur Teilung anregen. Dort liegen die Werte an den gemessenen Zeitpunkten bei



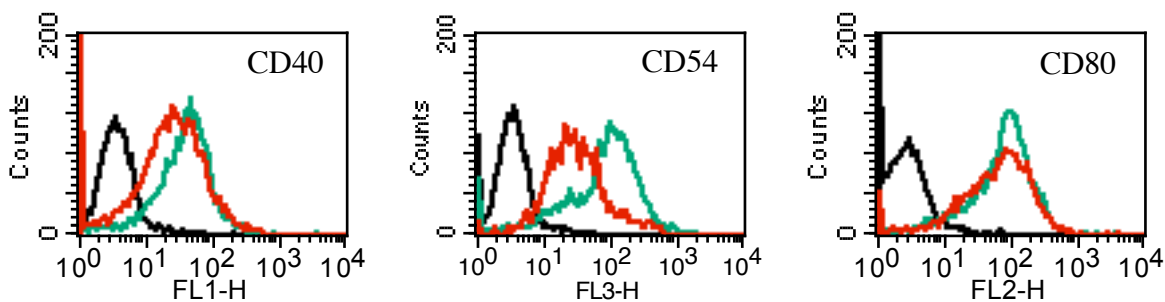
**Abbildung 3.10: MLR mit UV-inaktivierten Überständen**

Die Überstände von infizierten und nicht-infizierten DC wurden gerettet, 2h UV-inaktiviert und davon jeweils 50  $\mu$ l in einen MLR-Ansatz gegeben, der nicht-infizierte DC und  $10^5$  PBL enthielt. Die Kurven entsprechen den Mittelwerten von 3 identischen Ansätzen.

ca. 500cpm. Die nicht-infizierten iDC und mDC, die mit den UV-inaktivierten Überständen infizierter Zellen inkubiert wurden, zeigen ebenfalls eine Proliferationshemmung (ca. 500cpm). Die Überstände der hier gezeigten Schaubilder wurden von DC gewonnen, die mit ECV-infiziert waren. Die gleichen Ergebnisse konnten auch erzielt werden, wenn die Überstände von FFV-infizierten DC verwendet wurden (Daten nicht gezeigt). Auch hier sind die Ergebnisse der verwendeten Überstände von ECV- und FFV-infizierten iDC und mDC gleich. Dies legt den Schluss nahe, dass auch hier wieder ein HCMV-IE und/oder E-Genprodukt die Bildung dieses löslichen Faktors auslöst.

### 3.4.2.1 Ein löslicher Faktor ist für die verminderte Expression von Oberflächenmolekülen verantwortlich

Nicht-infizierte DC wurden mit dem UV-inaktivierten Überstand von ECV- oder FFV-infizierten DC für 5 Tage inkubiert und anschließend die Expression von CD40, CD54 und CD80 gemessen und mit der von unbehandelten DC verglichen. In Abbildung 3.11 ist exemplarisch für jedes Molekül eine Graphik gezeigt. Nach der Kokultivierung der nicht-infizierten DC mit dem UV-inaktivierten Überstand von infizierten DC kann eine verminderte Expression von CD40 und CD54



**Abbildung 3.11: Expression einiger Oberflächenmoleküle nach Inkubation mit HCMV-induziertem löslichen Faktor**

$5 \times 10^5$  DC wurden mit 1ml UV-inaktiviertem Überstand von HCMV-infizierten DC kokultiviert oder unbehandelt gelassen. 5 Tage später wurden diese Zellen mit Antikörpern gegen CD40, CD54 und CD80 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die Y-Achse entspricht der Anzahl der Zellen, die diesen Marker exprimieren und die X-Achse der Fluoreszenzintensität der Antikörper.

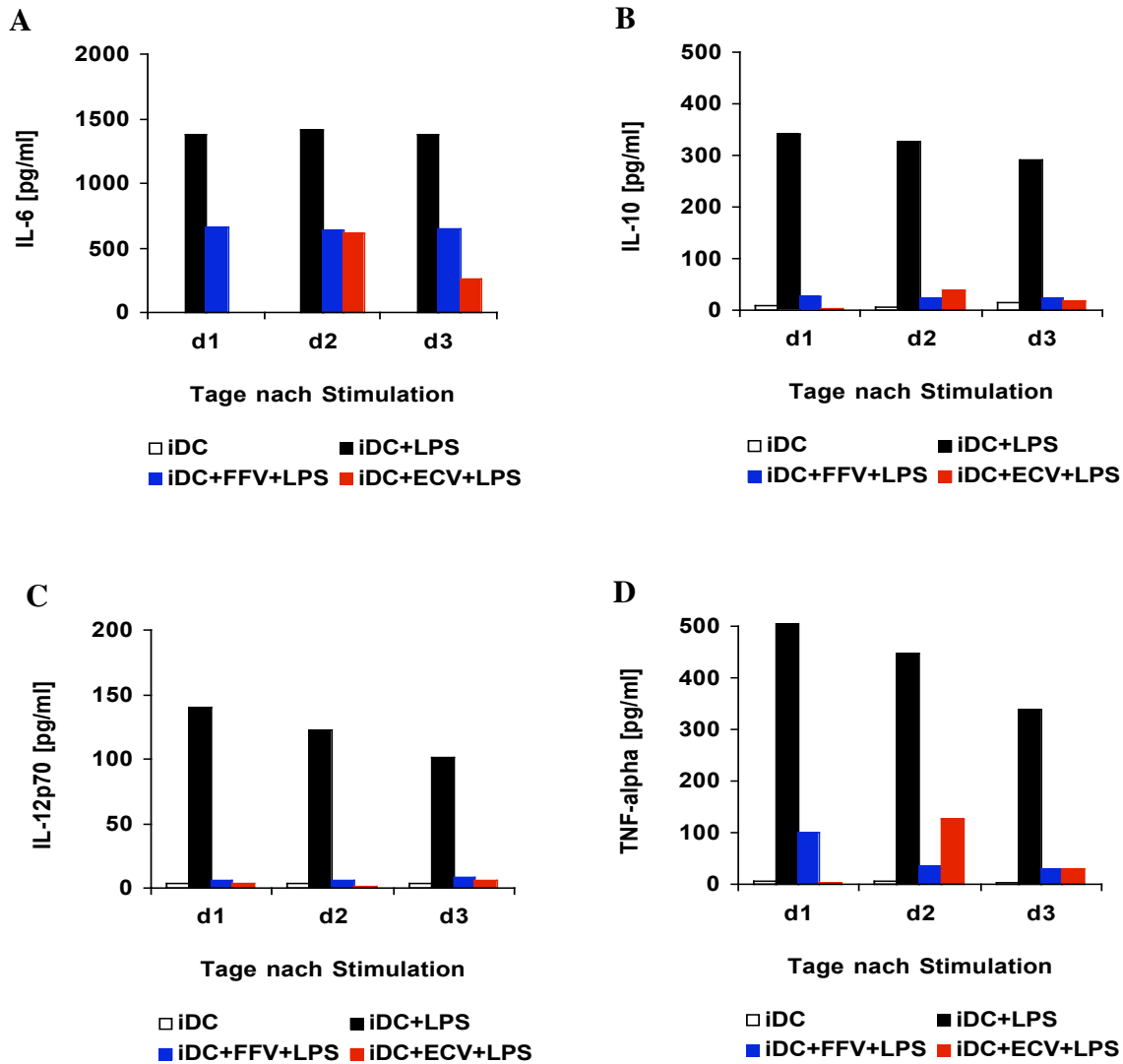
— Isotypkontrolle — grüne — unbehandelte DC — rote — mit Überstand kokultivierte DC

gemessen werden. Die Expression von CD80 wird durch diese Kokultivierung nicht beeinflusst. Mit der Produktion eines löslichen Faktors ist HCMV nicht nur in der Lage, die Expression verschiedener Oberflächenmoleküle infizierter DC zu vermindern, sondern auch die der nicht-infizierten Nachbarzellen.

### 3.4.3 HCMV hemmt die Zytokinproduktion von DC

Dendritische Zellen präsentieren nicht nur Antigene, sondern können auch durch eine gezielte Zytokinproduktion die Proliferation von T-Zellen sowie deren Differenzierung von TH<sub>0</sub> in TH<sub>1</sub>- oder TH<sub>2</sub>-Zellen anregen. Um zu untersuchen, ob die HCMV-Infektion bei DC einen Einfluss auf deren Zytokinproduktion und damit auch auf die Differenzierung und Proliferation von T-Zellen hat, wurde die spontane und induzierte Zytokinproduktion von IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  und IFN- $\gamma$  in den Überständen von infizierten und nicht-infizierten Zellen gemessen. IL-2 ist ein Proliferationssignal für B-, T- und NK-Zellen. IL-6 und IL-10 induzieren die Differenzierung der TH<sub>0</sub>- in TH<sub>2</sub>-Zellen und IL-12 die von TH<sub>0</sub>- in TH<sub>1</sub>-Zellen. TNF- $\alpha$  induziert einen gesteigerten Blutfluss und eine erhöhte Permeabilität der Gefäßwände. Dies führt zu einem verstärkten Einwandern von IgG, Komplement und Zellen. IFN- $\gamma$  hemmt die virale Replikation und kann NK-Zellen aktivieren, während TGF- $\beta$  IFN- $\gamma$  hemmt. Infizierte und nicht-infizierte DC wurden sieben Tage nach der Infektion mit HCMV entweder mit 1  $\mu$ g/ml LPS stimuliert oder ohne Aktivierungssignal kultiviert. Am Tag eins, zwei und drei nach der Stimulation wurden die Überstände gesammelt und in einem ELISA-Test auf die darin enthaltenen Zytokinkonzentrationen getestet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.12 veranschaulicht. Die Produktion von IL-6, IL-10, IL-12 und TNF- $\alpha$  ist bei den HCMV-infizierten DC stark eingeschränkt. Die Konzentration von IL-10, IL-12 und TNF- $\alpha$  war fast vollständig reduziert, während die infizierten DC zwar noch in der Lage waren IL-6 zu bilden, doch dessen Konzentration war um ca. 50% niedriger als bei den nicht-infizierten DC. Diese verminderte Zytokinsekretion war unabhängig vom verwendeten HCMV-Stamm. In den Überständen der FFV-infizierten und der ECV-infizierten DC konnten die gleichen Konzentrationen nachgewiesen werden. Eine Produktion von IL-2, TGF- $\beta$  und IFN- $\gamma$  konnte weder bei den infizierten, noch bei den nicht-infizierten DC nachgewiesen werden. Auch eine Stimulation mit LPS bewirkte keine Produktion dieser Zytokine. Auch hier erfolgten keine unterschiedlichen Reaktionen nach einer Infektion mit FFV- oder ECV-Stämmen. In beiden Fällen waren die infizierten DC nur bedingt in der Lage eine adäquate Konzentration an Zytokinen zu sezernieren. Dies führt auch hier zu

der Schlussfolgerung, dass ein HCMV-IE- und/oder E-Genprodukt für die verminderte Zytokinausschüttung verantwortlich ist.



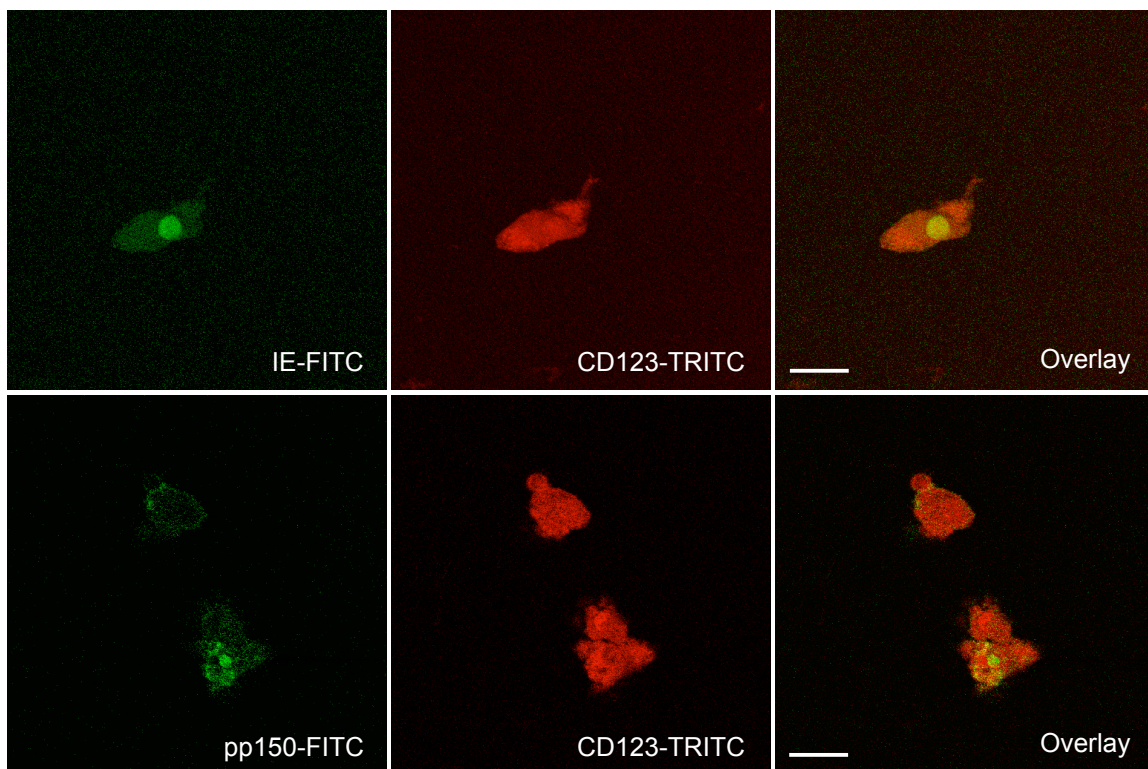
**Abbildung 3.12: Messung der Zytokinproduktion mittels ELISA**

HCMV-infizierte und nicht-infizierte DC wurden an Tag 7 nach der Infektion entweder mit  $1\mu\text{g/ml}$  LPS stimuliert oder unstimuliert kultiviert. An Tag 1, 2 und 3 nach der Stimulation wurden die verschiedenen Überstände gesammelt und in ELISA-Tests die Konzentrationen der verschiedenen Zytokine bestimmt.



### 3.5. Infektion von plasmazytoiden DC mit HCMV

Dendritische Zellen lassen sich in verschiedene Subpopulationen unterteilen. Es sollte nun untersucht werden, ob HCMV in der Lage ist, nicht nur myeloide sondern auch plasmazytoide DC (pDC) zu infizieren. Zu diesem Zweck wurden pDC aus Tonsillen verschiedener Spender isoliert und mit HCMV infiziert. Anschließend wurden die infizierten Zellen mit Antikörpern gegen CD123 (IL-3R) und gegen verschiedene HCMV-Proteine gefärbt. Das Oberflächenmolekül CD123 ist charakteristisch für plasmazytoide DC. In Abbildung 3.13 sind die Ergebnisse der Färbungen und deren Auswertung am konfokalen Mikroskop gezeigt. In den HCMV-infizierten Zellen konnten die Virusproteine IE und pp150, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Replikationszykluses gebildet werden, angefärbt werden. Da sowohl ein frühes als auch ein spätes HCMV-Protein nachgewiesen werden konnte, kann man in diesem Fall von einer produktiven Infektion ausgehen. Die Infektionsraten waren stark Spender abhängig und betrug zwischen 0,01-10%.

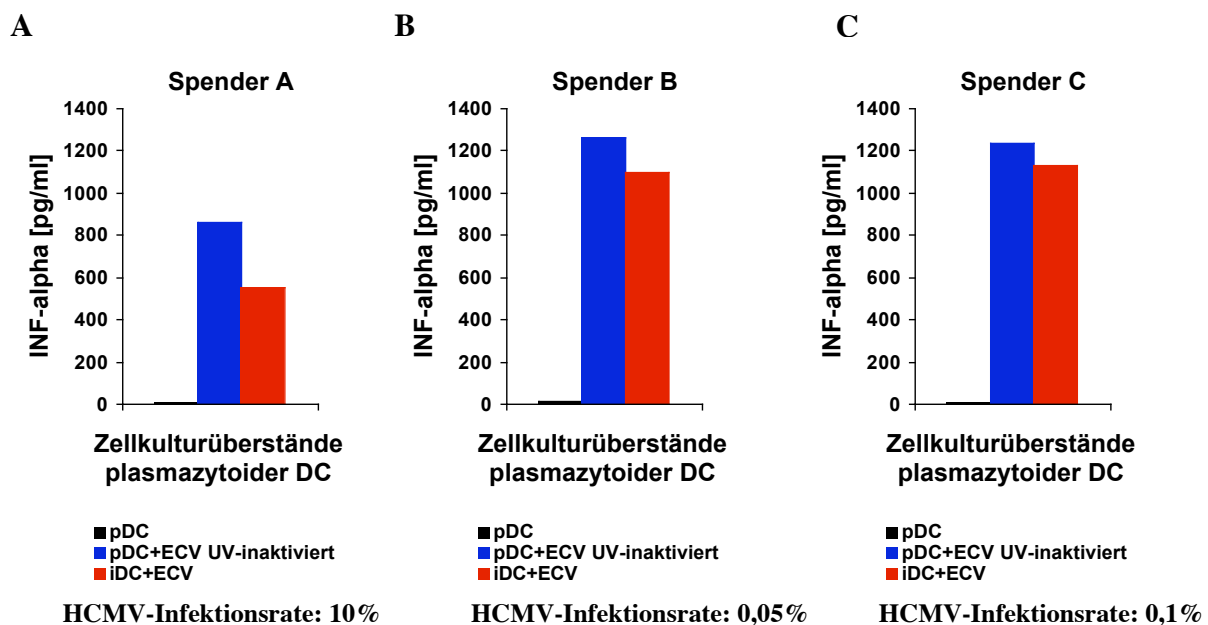


**Abbildung 3.13: Virusproteinnachweis in HCMV-infizierten plasmazytoiden DC**

Plasmazytoide DC wurden aus Tonsillen isoliert und mit HCMV (MOI 50) infiziert. 5 Tage nach der Infektion wurden die Zellen mit Antikörpern gegen CD123 (IL-3R) und gegen die HCMV-Proteine IE und pp150 gefärbt. Linie = 20  $\mu$ m.

### 3.5.1 Zytokinproduktion von HCMV-infizierten plasmazytoiden DC

Es konnte gezeigt werden, dass HCMV nicht nur in der Lage ist, myeloide DC sondern auch plasmazytoide DC zu infizieren. Die Hauptfunktion von pDC ist die Produktion von IFN- $\alpha$ , welches eine antivirale Wirkung besitzt. Daher sollte untersucht werden, ob HCMV in der Lage ist, die IFN- $\alpha$ -Produktion von pDC zu hemmen. Zu diesem Zweck wurden pDC mit ECV (MOI 50) infiziert. Zur Kontrolle wurden pDC, die mit UV-inaktivierten ECV-Stämmen kokultiviert wurden oder nicht-infizierte pDC verwendet. Fünf Tage nach der Infektion wurde die Menge an IFN- $\alpha$  in den Zellkulturüberständen mittels ELISA bestimmt. Es zeigte sich, dass nicht-infizierte pDC kaum messbare Mengen an IFN- $\alpha$  sezernierten. Hingegen waren die IFN- $\alpha$ -Konzentration der einzelnen Zellkulturüberstände nach Virusinfektion oder Inkubation mit UV-inaktiviertem Virus positiv. Die Menge der IFN- $\alpha$ -Produktion war sowohl abhängig vom Spender als auch von der Infektionsrate



**Abbildung 3.14: Messung der Zytokinproduktion mittels ELISA**

Aus Tonsillen isolierte plasmazytoide DC wurden entweder mit einem ECV-Stamm (MOI 50) oder einem UV-inaktivierten ECV-Stamm (MOI 50) infiziert. Fünf Tage nach der Infektion wurde die Konzentration an IFN- $\alpha$  in diesen Überständen mittels ELISA-Tests ermittelt. Zur Kontrolle wurden gleichbehandelte Überstände von nicht-infizierten pDC verwendet. Die Ergebnisse drei verschiedener Spender sind hier dargestellt.

der pDC. Die Daten sind in Abbildung 3.14 dargestellt. Die Konzentrationen der Kulturüberstände der ECV-infizierten pDC betrug zwischen ca. 550pg/ml (Spender A) und ca. 1250pg/ml (Spender B+C), während die IFN- $\gamma$ -Konzentration in den Kulturüberständen von pDC, die mit einem UV-inaktivierten ECV-Stamm kokultiviert wurden, zwischen ca. 860 pg/ml (Spender A) und ca. 1100 pg/ml IFN- $\gamma$  (Spender B+C) lag. Somit konnte eine verminderte IFN- $\gamma$ -Produktion von ca. 12% (bei Spender B+C) und ca. 40% (Spender A) gemessen werden. Diese Ergebnisse zeigen, (1) dass die Produktion von IFN- $\gamma$  bei den pDC erst nach Kontakt mit Viruspartikeln induziert wird und (2) dass die Produktion bei den ECV-infizierten pDC geringer ist, als die der pDC, die mit UV-inaktivierten Viren kokultiviert wurden. Dies legt den Schluss nahe, dass die Bildung von IFN- $\gamma$  in pDC durch die HCMV Replikation gehemmt wird.

## 4. Diskussion

Viren sind nicht in der Lage sich selbst zu replizieren. Sie müssen dafür in Wirtszellen gelangen und deren Synthesemaschinerie für die Vermehrung nutzen. Für die Koexistenz zwischen Viren und den Wirbeltieren als Wirtsorganismen haben beide Seiten im Laufe der Evolution Mechanismen erworben, sich gegen die Krankheitserreger zu verteidigen bzw. sich dem Immunsystem des Wirtes zu entziehen. Das Immunsystem des Menschen besitzt eine unspezifische und eine spezifische Immunabwehr. Zur unspezifischen Immunantwort zählen (1) zur Phagozytose befähigte Zellen (z.B. Makrophagen), (2) Zellen, die Zytokine und Chemokine mit antiviraler oder immunregulatorischer Aktivität produzieren (z.B. Makrophagen, neutrophile Granulozyten oder Mastzellen), (3) natürliche Killerzellen (NK-Zellen), die virusinfizierte Zellen erkennen und lysieren können und (4) das Komplementsystem, welches unabhängig oder mit Hilfe von Antikörpern Bakterien und behüllte Viren lysieren kann. Spezifische Abwehrmechanismen werden vermittelt durch (1) B-Lymphozyten, die Antikörper produzieren und durch (2) T-Lymphozyten, die sich in zytotoxische T-Zellen, TH<sub>1</sub>-oder TH<sub>2</sub>-Zellen differenzieren können (siehe auch Abbildung 4.2). Viele Viren haben daher nicht nur eine sondern mehrere Strategien ausgebildet, der Immunantwort des Wirtes zu entgehen. Das humane Immunodefizienzvirus (HIV) beispielsweise besitzt eine sehr hohe Mutationsrate. Da schon der Austausch einer Aminosäure zu einer reduzierten Antikörperbindung führen kann, kann bei einer gesteigerten Virusvermehrung die Effektivität der Antikörper-vermittelten Immunabwehr vermindert werden. Außerdem kann HIV CD4<sup>+</sup> T-Zellen infizieren und damit deren Funktionen beeinträchtigen. Das humane Zytomegalievirus (HCMV) hat eine andere Strategie entwickelt. Mit der Ausbildung eines latenten Infektionszykluses kann das Virus lebenslang im Organismus verbleiben. Die Produktion von infektiösen Partikeln wird dabei unterdrückt und kann daher vom Immunsystem nicht entdeckt werden. Für die Bildung von neuen Viruspartikeln besitzt HCMV einen lytischen Infektionszyklus. Da HCMV mit 72 Stunden einen langsamen Replikationszyklus besitzt, ist es für das Virus wichtig, die ersten Schritte der Immunantwort zu hemmen. Dendritische Zellen (DC) spielen bei der Aktivierung des Immunsystems eine Schlüsselrolle. Es ist daher vorstellbar, dass HCMV Mechanismen entwickelt hat, welche die Funktionen der DC beeinflussen. Durch die zunehmende Zahl von immunsupprimierten Patienten durch Organ- oder Knochenmarkstransplantationen und dem gehäuften Auftreten von HIV-Infektionen hat die Bedeutung von HCMV als Pathogen in den letzten Jahren stark zugenommen. Für die Entwicklung von Impfstoffen und anderer therapeutischer Maßnahmen ist es wichtig, die immunmodulatorischen Mechanismen, die HCMV entwickelt hat, zu verstehen. Daher sollte in dieser Arbeit die Interaktion von HCMV und DC untersucht werden.

#### 4.1. HCMV-Infektion von DC

Um die Frage zu beantworten, ob HCMV DC infizieren und in ihnen replizieren kann, wurden *in vitro* generierte myeloide DC mit FFV- und ECV-Stämmen infiziert. An verschiedenen Tagen nach der Infektion wurden die Zellen in einer quantitativen Real-Time PCR auf das Vorhandensein viraler DNA getestet. Die Ergebnisse dieses Versuchsansatzes zeigten, dass die Virus-DNA-Konzentration in den ECV-infizierten iDC und mDC ansteigt, während sie in den FFV-infizierten Zellen sinkt. Auch DC, die mit UV-inaktivierten Viren kokultiviert wurden, zeigten anfangs das Vorhandensein von HCMV-DNA, deren Konzentration an den darauf folgenden Zeitpunkten jedoch stetig sank. Dies legt den Schluss nahe, dass FFV-Stämme zwar in der Lage sind, die Zellen zu infizieren, aber nur die ECV-Stämme in DC einen vollständigen Replikationszyklus durchlaufen können.

Die anschließenden HCMV-Proteinnachweise im konfokalen Mikroskop und die Analyse der Zellen im Elektronenmikroskop bestätigen diese Vermutung. In ECV-infizierten DC konnten sowohl IE-, als auch E- und Late-Proteine in einer Dreifach-Immunfluoreszenz im konfokalen Mikroskop nachgewiesen werden. In FFV-infizierten DC dagegen konnte nur die Anwesenheit von IE-Proteinen gezeigt werden. Auch die Auswertung der elektronenmikroskopischen Bilder belegt die Annahme, dass DC für ECV-Stämme permissiv sind. In diesen Zellen konnten virale Kapside im Zellkern gefunden werden, während dies in den FFV-infizierten DC nicht möglich war. Der Nachweis von IE-Proteinen sowie das Fehlen von Late-Proteinen und viralen Kapsiden im Zellkern infizierter Zellen, wie das bei den FFV-infizierten DC beobachtet werden konnte, sind typisch für eine abortive Infektion.

In unterschiedlichen Studien konnte gezeigt werden, dass abortiv infizierte Zellen permissiv für HCMV wurden. Dabei spielte der Differenzierungsgrad der Zellen eine entscheidende Rolle. Liu et al. konnten beispielsweise zeigen, dass der Transkriptionsfaktor YY1 in der nicht-permissiven Zelllinie NteraT2D1, als Repressor an den HCMV-IE-Promotor binden kann. Nach der Differenzierung dieser Zellen, wird der Transkriptionsfaktor YY1 nicht mehr exprimiert und die Zellen werden permissiv für HCMV (Liu, et al., 1994). Ähnliche Beobachtungen wurden bei der HCMV-Infektion des Monozyten/Makrophagensystems gemacht, welches das mit den DC am besten vergleichbare Modell ist. Monozyten sind nicht permissiv für HCMV, sondern bleiben latent infiziert. Nach der Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen kommt es zur Aufhebung der HCMV-Genexpressionsblockade und es erfolgt eine produktive Infektion (Fish, et al., 1996; Soderberg-Naucler, et al., 1998). Daher wurden in der hier vorliegenden Arbeit unreife und mit TNF- $\alpha$ , LPS oder IL-1 $\beta$ /IL-6/PGE<sub>2</sub>/TNF- $\alpha$  ausgereifte DC untersucht. In FFV-infizierten mDC kam es jedoch

nicht zu einer Aufhebung der Genexpressionsblockade. Auch reife FFV-infizierte DC waren lediglich zur Produktion von IE-Proteinen befähigt. Offenbar bewirkte die Ausreifung keine für die produktive Infektion mit FFV notwendigen zellulären Veränderungen, wie beispielsweise eine veränderte Expression zellulärer Transkriptionsfaktoren (Liu, et al., 1994; Sinclair, et al., 1992).

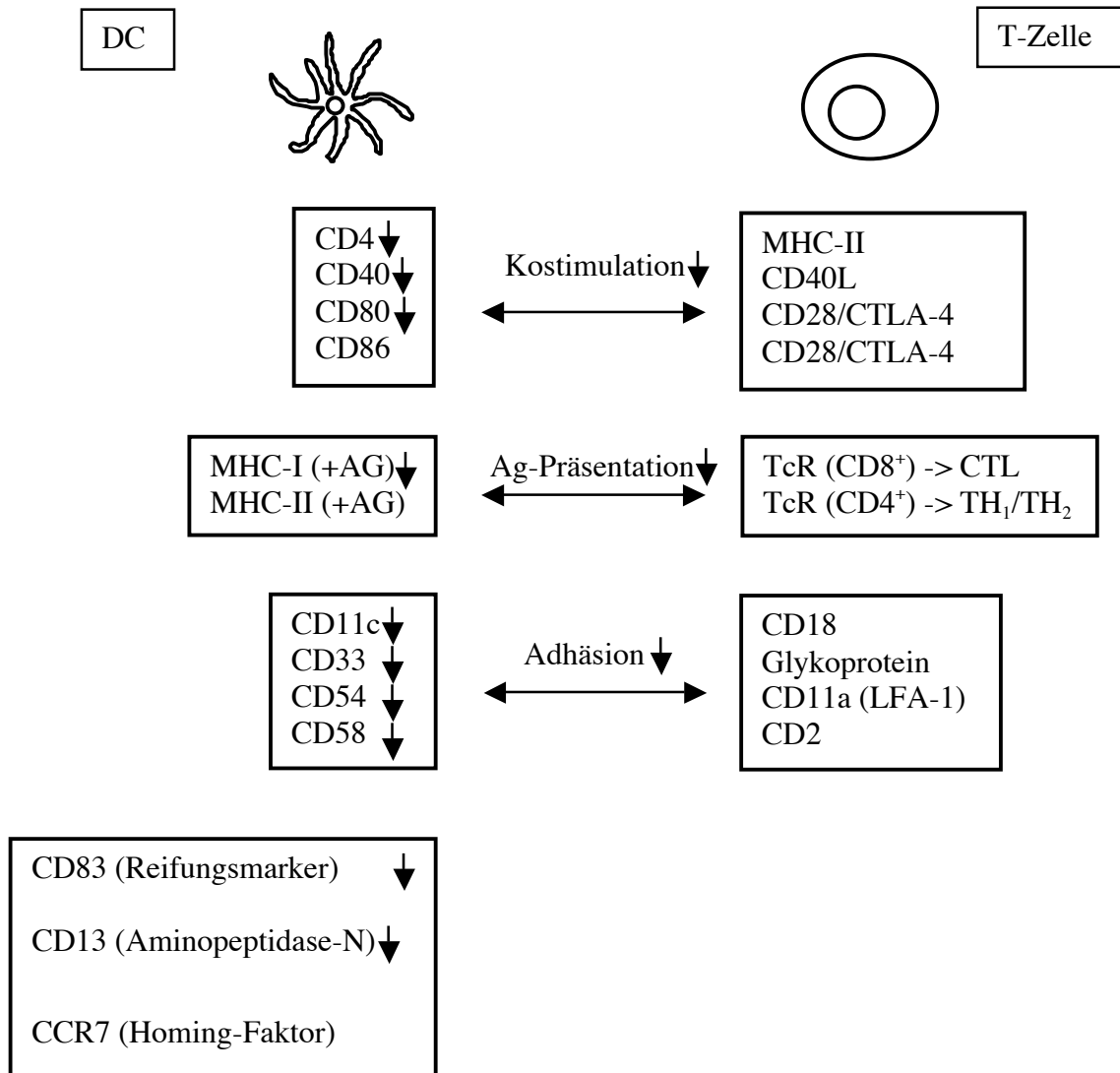
Das unterschiedliche Infektionsverhalten dieser Virenstämme ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Erste Veröffentlichungen zeigen jedoch, dass FFV-Stämme im Vergleich zu den ECV-Stämmen einige Gene verloren haben (Cha, et al., 1996). Es ist daher zu vermuten, dass eines dieser Gene für diesen Effekt verantwortlich ist. Weitere Arbeiten sind notwendig, um die genauen Genabschnitte zu identifizieren.

DC befinden sich in allen Organen und haben die Fähigkeit durch den gesamten Körper zu wandern. Damit verbunden sind intensive Zell-Zell-Kontakte (z.B. bei der Migration durch das Endothelium oder bei der Aktivierung von T-Zellen). Infizierte DC könnten daher als Transportvehikel von HCMV verwendet werden. Das Virus kann dabei auf weitere geeignete Zielzellen treffen und diese infizieren.

Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass HCMV in der Lage ist, myeloide DC zu infizieren. Eine produktive Infektion konnte allerdings nur bei ECV-infizierten DC nachgewiesen werden. Bei einer Infektion mit FFV wurde der Replikationszyklus nach der Bildung von HCMV-IE und vor der Bildung von HCMV-pp65-Proteinen unterbrochen.

## **4.2. Einfluss der HCMV-Infektion auf die Funktion von DC**

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass DC, unabhängig von ihrem Reifungsgrad, permissiv für HCMV sind. Es stellte sich daher die Frage, ob die HCMV-Infektion Auswirkungen auf die Funktion der DC hat. DC sind hochspezialisierte Zellen und können eine Immunantwort sehr effizient induzieren. Dafür benötigen sie die Oberflächenmoleküle CD11c, CD33, CD54, CD58 für die Adhäsion (Migration durch das Endothelium oder T-Zell-Aktivierung), MHC-Klasse-I, MHC-Klasse-II und CD1a für die Antigenpräsentation und CD4, CD40, CD80 und CD86 für die Kostimulation der T-Zellen (siehe auch Abbildung 4.1). Daher wurden reife und unreife DC durchflusszytometrisch auf phänotypische Veränderungen nach einer HCMV-Infektion analysiert. Zur Kontrolle wurden die verwendeten Zellen auf CD14 gefärbt. Dieses Molekül wird nicht auf DC sondern auf Monozyten oder Makrophagen exprimiert. Weder in den reifen, noch in den unreifen DC konnte



**Abbildung 4.1: Oberflächenmoleküle HCMV-infizierter dendritischer Zellen**

Hier sind einige der Oberflächenmoleküle von DC dargestellt, die für die Aktivierung des Immunsystems notwendig sind. Für die Aufrechterhaltung des Zell-Zell-Kontaktes mit T-Zellen sind die Adhäsionsmoleküle notwendig. Die Antigene werden auf den MHC-Molekülen präsentiert. Durch die Kostimulationsmoleküle erhalten die T-Zellen ihr zweites Signal, dass für ihre Aktivierung unerlässlich ist. Nach der Reifung werden der Reifungsmarker CD83 und der Homing-Faktor CCR7 exprimiert. Beide kennzeichnen reife DC, die eine Immunantwort initiieren können. Die schwarzen Pfeile zeigen die Moleküle, die auf HCMV-infizierten DC reduziert sind und weisen auf HCMV bedingte Funktionsstörungen bei DC hin.

dieses Molekül angefärbt werden. Auch nach einer Infektion mit HCMV konnte keine Expression von CD14 nachgewiesen werden. Daraus kann man schließen, dass sich in der Kultur weder Monozyten noch Makrophagen befanden und dass eine HCMV-Infektion bei DC keine Differenzierung in Richtung Monozyten oder Makrophagen bewirkt.

Nach einer HCMV-Infektion von DC konnte eine verminderte Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen festgestellt werden, wobei es bei der Anzahl der MHC-Klasse-II-Moleküle keine Unterschiede gab. Zusätzlich konnte eine verminderte Expression von CD1a (Antigenpräsentationsmolekül für Nicht-Protein basierte Antigene), den Adhäsionsmolekülen CD11c, CD33, CD54 und CD58, den Kostimulationsmolekülen CD4, CD40 und CD80, dem Reifungsmarker CD83 und der Aminopeptidase N (CD13) nachgewiesen werden. Die Expression des Kostimulationsmolekül CD86 dagegen wurde durch HCMV nicht beeinflusst (siehe Abbildung 4.1). Diese durchflusszytometrischen Ergebnisse konnten sowohl nach einer Infektion mit FFV als auch nach einer Infektion mit ECV-Stämmen erzielt werden. Da die Infektion mit einem FFV-Stamm nach der Expression von IE-Proteinen und vor der Bildung von pp65-Proteinen abbricht, muss das Gen, welches für die Hemmung der Expression dieser Oberflächenmoleküle verantwortlich ist, eines der IE und/oder E Gene von HCMV sein. Der Vorteil dieser viralen Strategie ist, dass HCMV unabhängig von seinem Zelltropismus den Phänotyp von DC beeinflussen kann.

Durch die verminderte Expression dieser Oberflächenmoleküle kann HCMV Einfluss auf mehrere Eigenschaften von DC nehmen (siehe Abbildung 4.1). DC können mittels Antigenen, die an MHC-Klasse-I-Moleküle gebunden sind, CD8<sup>+</sup> T-Zellen aktivieren und mittels Antigenen, die an MHC-Klasse-II-Moleküle gebunden sind, CD4<sup>+</sup> T-Zellen aktivieren (siehe Abbildung 4.2). Eines der wenigen Moleküle, dessen Expression von HCMV nicht inhibiert wird, ist das MHC-Klasse-II-Molekül. Die IFN- $\gamma$  abhängige MHC-Klasse-II Hochregulation wird in IFN- $\gamma$ -sensitiven Zellen über den JAK/STAT „Pathway“ reguliert (Darnell, et al., 1994). Es konnte gezeigt werden, dass in HCMV-infizierten Endothelzellen und Fibroblasten dieser „Pathway“ blockiert ist (Miller, et al., 1998). In einer weiteren Studie konnten Odeberg et al. zeigen, dass in HCMV-infizierten Makrophagen die MHC-Klasse-II-Expression vermindert ist. In diesem Fall gibt es eine von der Virusreplikation unabhängige sowie eine von der Virusreplikation abhängige MHC-Klasse-II Inhibition. Die virus-abhängige Hemmung wird von den HCMV-Genen US1-9 und US11 verursacht (siehe auch 1.2.7). Die Mechanismen, die eine MHC-Klasse-II-Hemmung auch bei UV-inaktivierten Viren auslösen, sind dagegen noch nicht bekannt (Odeberg, et al., 2001). In den HCMV-infizierten DC, die in der hier vorliegenden Arbeit verwendet wurden, konnte dagegen keine Hemmung der MHC-Klasse-II-Expression festgestellt werden. Es ist zu vermuten, dass die Blockierung der Expression durch die hohe Konzentration von MHC-Klasse-II-Molekülen, die in den MHC-Klasse-II-Kompartimenten gespeichert sind, aufgehoben wird. Vorstellbar ist auch, dass zelluläre Genprodukte eine Hemmung der MHC-Klasse-II-Expression verhindern, indem sie beispielsweise die Transkription der dafür verantwortlichen viralen Gene blockieren.



Eine verminderte Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen, wie sie in den HCMV-infizierten DC nachgewiesen werden konnte, hat zwei Konsequenzen zur Folge. Zum einen aktivieren an MHC-Klasse-I-Moleküle gebundene Peptide zytotoxische T-Zellen (CTL). Ist die Anzahl der MHC-Klasse-I-Moleküle vermindert, können weniger Peptide präsentiert und CTL damit schlechter aktiviert werden (siehe Abbildung 4.2). Zum anderen ist eine geringe MHC-Klasse-I-Konzentration auch ein Aktivierungssignal für NK-Zellen. NK-Zellen besitzen auf ihrer Zelloberfläche verschiedene aktivierende und hemmende Rezeptoren. Durch die Bindung an diese Rezeptoren wird entweder eine Zelllyse bzw. eine Apoptose der Zielzelle (aktivierendes Signal) oder keines von beidem (hemmendes Signal) induziert. MHC-Klasse-I-Moleküle binden normalerweise an einen hemmenden Rezeptor und blockieren damit die NK-Zell-vermittelte Zelllyse. Fehlt dieses hemmende Signal, wird die Zelle getötet. Weitere Moleküle, die ein aktivierendes Signal bei NK-Zellen auslösen können sind beispielsweise CD80 und CD58 (Chambers, et al., 1996; Fletcher, et al., 1998).

HCMV hat daher mehrere Strategien entwickelt, um die Wirtszelle vor einer Lyse durch NK-Zellen zu schützen. Das HCMV-Gen UL-18 beispielsweise kodiert für ein MHC-Klasse-I-Homologon (Reyburn, et al., 1997). Auch die Hemmung der CD80 und CD58 Expression passt zu dieser Strategie. Odeberg et al. konnten allerdings zeigen, dass dies nicht ausreicht, um einer NK-Zell-Antwort zu entgehen. Erst das HCMV-Gen UL-40, das an den NKG2A<sup>+</sup> Rezeptor der NK-Zellen bindet und damit ein Inhibitionssignal auslöst, verhindert eine Lyse durch NK-Zellen (Odeberg, et al., 2002; Wang, et al., 2002). Durch diese Strategie kann das Virus also nicht nur die T-Zell-Aktivierung vermindern, sondern kann auch geschützt vor CTL und NK-Zellen in der Wirtszelle replizieren.

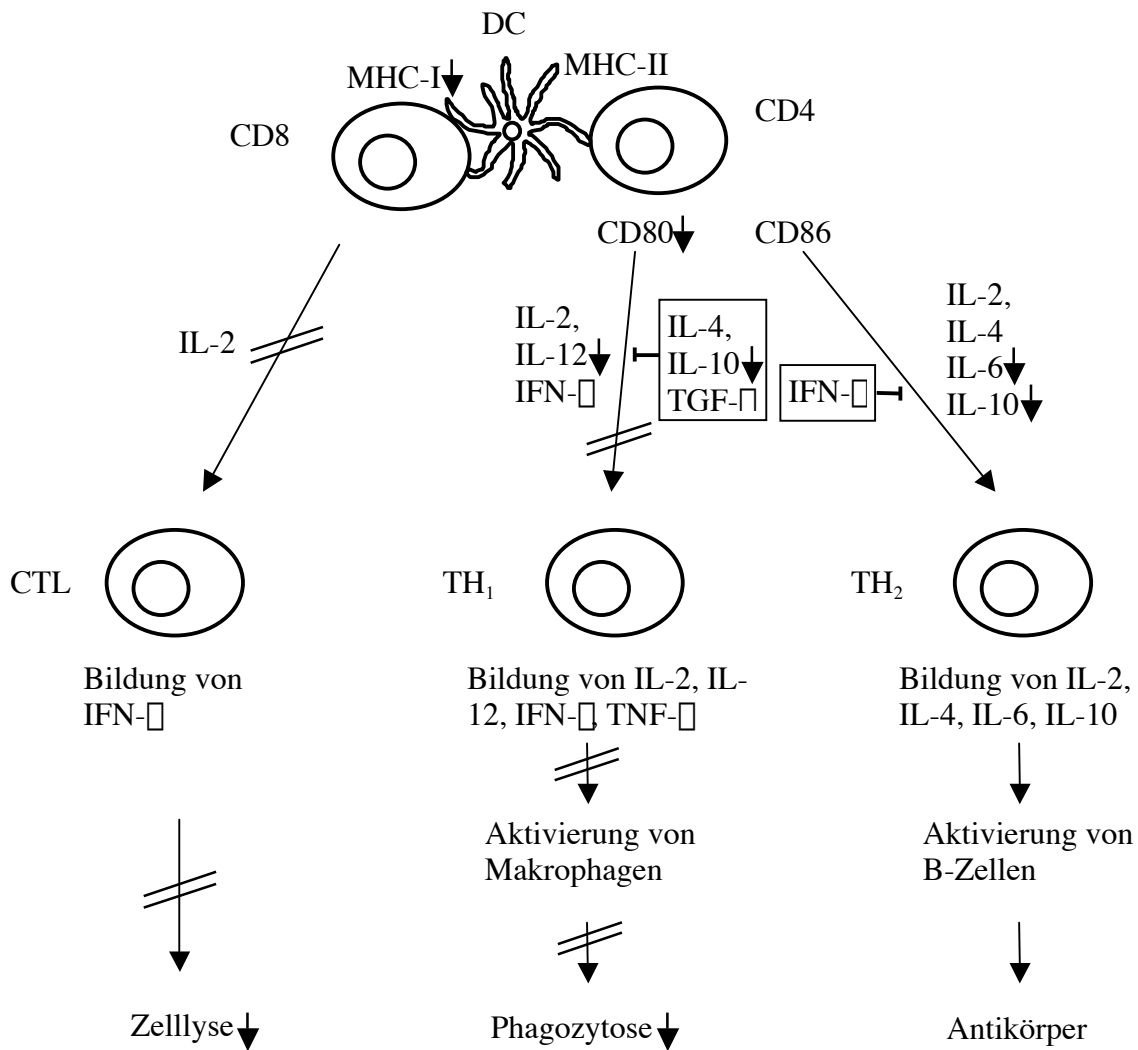
Ein weiterer Mechanismus, die T-Zell-Aktivierung zu verhindern, ist die Hemmung der Adhäsion zwischen DC und T-Zellen. Um eine T-Zelle aktivieren zu können, müssen DC in Zell-Zell-Kontakt mit T-Zellen treten. Dieser Kontakt wird durch Adhäsionsmoleküle vermittelt (Dustin, et al., 1989). In HCMV-infizierten DC konnte eine Expressionshemmung der Adhäsionsmoleküle CD11c, CD33, CD54 und CD58 beobachtet werden. HCMV kann damit den Zell-Zell-Kontakt zwischen DC und T-Zellen und somit auch die Aktivierung der T-Zellen verhindern.

Zusätzlich kann eine T-Zell-Aktivierung durch HCMV auch vermieden werden, wenn die Präsentation der Kostimulationsmoleküle verhindert wird (siehe auch Abbildung 4.1). Für die Aktivierung von T-Zellen sind 2 Signale notwendig. Die Erkennung des Antigen/MHC Komplexes durch den T-Zell-Rezeptor (TCR) und ein Kostimulationssignal (Coyle, et al., 2001). Dieses zweite Signal kann beispielsweise die Differenzierung in eine Effektorzelle auslösen oder bewirkt eine Apoptose dieser Zellen. Fehlt dieses kostimulierende Signal, werden die T-Zellen anerg. Dies bedeutet, dass die T-Zellen nicht mehr auf ein Antigen reagieren können und auch nicht mehr in Effektorzellen differenzieren können (Janeway, et al., 1997). In den, in dieser Arbeit verwendeten, HCMV-infizierten DC

konnte eine verminderte Expression der Kostimulationsmoleküle CD4, CD40 und CD80 nachgewiesen werden. Trifft nun eine infizierte antigenträgende DC auf eine T-Zelle, die gegen ein HCMV-Antigen gerichtet ist, wird diese T-Zelle anerg. Damit kann HCMV gezielt die T-Zellen hemmen, die spezifisch gegen das Virus gerichtet sind.

Die Expression des kostimulatorischen Moleküls CD86 wird durch HCMV nicht beeinflusst. CD86 kann, wie auch CD80 an CD28 und CTLA-4, auf der Oberfläche von T-Zellen binden. Die Bindung an CD28 löst sowohl die Expression von IL-2 und dem IL-2-Rezeptor als auch die Aktivierung des Zellzykluses aus. CTLA-4 dagegen wird erst nach der Aktivierung induziert und hemmt die Proliferation der aktivierten T-Zelle. Die Bindung an CTLA-4 löst daher nicht nur das Gegensignal zu CD28 aus, sondern ist auch ein wichtiges Signal zur Induktion von Toleranz (Coyle, et al., 2001). Verschiedene Untersuchungen zeigten, dass mit der Bindung von CD80 oder CD86 an CD28 die Art der Immunantwort beeinflusst werden kann. Die Interaktion zwischen CD28 und CD80 bewirkt bei CD4<sup>+</sup> T-Zellen eine Differenzierung in Richtung TH<sub>1</sub>-Antwort während die zwischen CD86 und CD28 eine TH<sub>2</sub>-Antwort auslöst (Bashian, et al., 1997; Chambers, et al., 1999; Fields, et al., 1998; Greenfield, et al., 1998; June, et al., 1994). Wird, wie bei den in dieser Arbeit verwendeten HCMV-infizierten DC, auf der Zelloberfläche nur CD86 exprimiert, wird eine TH<sub>2</sub>-Antwort bevorzugt. Dabei werden unter anderem die B-Zellen zur Bildung von Antikörpern angeregt (Abbildung 4.2). Außerdem konnten Coyle et al. zeigen, dass CD86 nur eine geringe Affinität besitzt CD28 zu binden, die Affinität zu CTLA-4 dagegen wesentlich höher ist (Coyle, et al., 2001). Es ist zu vermuten, dass durch die Bindung von CD86 an CTLA-4 zum einen die aktivierten T-Zellen gehemmt werden und zum anderen eine Toleranz gegenüber HCMV induziert werden könnte.

Eine weitere Möglichkeit der Immunmodulation, ist die Blockade der Wanderung von reifen DC in Richtung Lymphorgane. Wichtig dafür ist die Expression des Chemokinrezeptors CCR7 (Caux, et al., 2000) und die der Adhäsionsmoleküle CD11c, CD33, CD54 und CD58. Reife DC wandern entlang eines Chemokingradienten zu den T-Zell-Zonen der Lymphorgane. Dieser Chemokingradient kann von DC mit dem Rezeptor CCR7 erkannt werden und wird von hohen Endothelzellen, die sich in Venulen der Lymphknoten befinden („high endothelial venuels“), gebildet. Für die Migration durch das Endothelium zu den T-Zell-Zonen der Lymphorgane, sind die Adhäsionsmoleküle wichtig. Durch eine HCMV-Infektion wird zwar die Expression von CCR7 auf den hier untersuchten DC nicht beeinflusst, die der Adhäsionsmoleküle dagegen ist stark vermindert. Daraus lässt sich schließen, dass HCMV nicht den Eintritt in die Lymphorgane verhindert, sondern die Fähigkeit der DC vermindert durch das Endothelium zu den Lymphorganen zu wandern. Die gemessene



**Abbildung 4.2: Einfluss von HCMV auf die Funktion von DC**

Dendritische Zellen können über MHC-Klasse-II-Moleküle CD4<sup>+</sup> T-Zellen oder über MHC-Klasse-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen aktivieren. Aktivierte T-Zellen differenzieren sich anschließend in zytotoxische T-Zellen (CD8<sup>+</sup>), oder je nach Zytokinmilieu in TH<sub>1</sub> oder TH<sub>2</sub>-Zellen (CD4<sup>+</sup>). CTL sind zur Zelllyse fähig, während TH<sub>1</sub>-Zellen Makrophagen zur Phagozytose und TH<sub>2</sub>-Zellen B-Zellen zur Produktion von Antikörpern anregen können. Die Pfeile zeigen die Expressions- und Produktionshemmung von HCMV-infizierten DC auf.

geringere Expression von Oberflächenmolekülen kann mehrere Ursachen haben. Zuerst sollte daher die Frage untersucht werden, ob die verminderte Expression der Oberflächenmoleküle durch eine geringere Vitalität der infizierten Zellen erklärt werden könnte. Dazu wurden HCMV-infizierte und nicht-infizierte Zellen mit dem Farbstoff 7-Amino-Actinomycin D (7-AAD) gefärbt. Dieser Farbstoff kann nicht durch eine intakte Zellwand gelangen. Gelangt der Farbstoff aufgrund poröser

Zellwände in die Zelle, kann er mit der zellulären DNA interagieren. Diese Veränderung kann in einem Durchflusszytometer gemessen werden. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Vitalitätsraten der infizierten und die der nicht-infizierten Zellen nicht unterscheiden. Auch gab es keine Unterschiede zwischen DC, die mit FFV- oder ECV-Stämmen infiziert wurden. Daher kann die verminderte Expression der verschiedenen Oberflächenmoleküle nicht durch eine geringere Vitalitätsrate erklärt werden.

Als nächstes sollte untersucht werden, welcher Mechanismus der verminderten Expression der Oberflächenmoleküle der HCMV-infizierten DC zugrunde liegt. Die Expressionshemmung der MHC-Klasse-I-Moleküle ist schon beschrieben worden. Das virale US-3-Protein sorgt beispielsweise dafür, dass die gebildeten MHC-Klasse-I-Komplexe das endoplasmatische Retikulum nicht verlassen können (Ahn, et al., 1996), während das US-6-Protein dafür verantwortlich ist, dass der Import von Peptiden durch den TAP-Transporter in das ER blockiert ist (Ahn, et al., 1997). Die von US-2- und US-11 kodierte Glykoproteine exportieren membraninsertierte schwere Ketten von MHC-Klasse-I-Molekülen zurück in das Cytosol, in welchem sie vom Proteasom degradiert werden (Wiertz, et al., 1996; Wiertz, et al., 1996). Über die Expressionsblockierung der anderen Oberflächenmoleküle durch das Virus ist noch sehr wenig bekannt. Daher wurde untersucht, ob es sich bei der verminderten Expression von CD40-, CD54- und CD80-Molekülen um ein prä- oder posttranslationales Ereignis handelt. Zu diesem Zweck wurde die mRNA von nicht-infizierten sowie von ECV- und FFV-infizierten iDC und mDC an verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion isoliert und in cDNA umgeschrieben. Diese cDNA diente als „Template“ in einer quantitativen Real-Time PCR, die spezifisch eine Region aus dem CD40-, CD54- oder CD80-Gen amplifizierte. Gleichzeitig wurden die Zellen an diesen Zeitpunkten mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen CD40, CD54 und CD80 angefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Anschließend wurden die Ergebnisse der Real-Time PCR mit denen der Analyse im Durchflusszytometer verglichen. Die cDNA-Konzentrationen der infizierten und die der nicht-infizierten DC waren sehr ähnlich. Auch hier konnten keine Unterschiede zwischen nicht-infizierten und FFV- oder ECV-infizierten DC festgestellt werden. Die verminderte Expression kann also weder bei den FFV- noch bei den ECV-infizierten DC an einer geringeren Transkription dieser Gene liegen. Der Block muss also, wie auch die Expressionshemmung der MHC-Klasse-I-Moleküle, ein posttranslationales Ereignis sein. Da sich die ECV- und die FFV-infizierten DC gleich verhalten, liegt hier die Vermutung nahe, dass ein HCMV-IE und/oder E-Genprodukt für diese verminderte Expression verantwortlich ist.

Die beschriebene posttranslationale Manipulation, die bei HCMV-infizierten DC beobachtet werden konnte, hat zur Folge, dass DC nur noch bedingt in der Lage sind, T-Zellen zu aktivieren. Außerdem kann damit die Art der Immunantwort, die ausgelöst wird, beeinflusst werden (siehe Abbil-

dung 4.2). Um zu überprüfen, ob HCMV-infizierte DC noch in der Lage sind T-Zellen zur Proliferation anzuregen, wurden sie mit allogenen T-Zellen in einer „Gemischten-Lymphozyten-Reaktion“ (MLR) kokultiviert. Anschließend wurde die Proliferationsrate der T-Zellen gemessen. Da die DC und die T-Zellen von 2 verschiedenen Spendern stammten, reagierten die T-Zellen nicht auf ein präsentiertes Antigen, sondern auf die als fremd erkannten MHC-Moleküle. Die Teilungsraten der T-Zellen, die durch unreife DC ausgelöst wurden, ist also genauso groß, wie die, die durch reife DC initiiert wurde. Dabei konnte gezeigt werden, dass ECV- und FFV-infizierte DC nicht oder nur noch in geringem Maße in der Lage waren, T-Zellen in einer Allo-Reaktion zu stimulieren. Es konnten, wie erwartet, auch keine Unterschiede in der MLR zwischen reifen oder unreifen DC festgestellt werden. Wurden die DC dagegen mit UV-inaktivierten Viren infiziert, konnte nur eine verminderte Proliferationsrate der T-Zellen gemessen werden. Dies legt den Schluss nahe, dass für die geringere T-Zell-Stimulationsrate durch infizierte DC ein replikationskompetentes Virus notwendig ist. Da dieser Effekt sowohl bei einer Infektion mit ECV als auch FFV erzielt werden kann, muss auch hierfür ein HCMV-IE- und/oder E-Genprodukt verantwortlich sein. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass HCMV-infizierte DC nicht mehr in der Lage sind, T-Zellen zu stimulieren. Dies ist unabhängig vom verwendeten HCMV-Stamm.

Interessanterweise kann eine Hemmung der T-Zell-Proliferation auch beobachtet werden, wenn nur 0,1% der DC infiziert sind. Daher kann eine verminderte Expression von verschiedenen Oberflächenmolekülen auf der Zelloberfläche von HCMV-infizierten DC nicht der einzige Grund für dieses Phänomen sein. Die Vermutung lag nahe, dass für diesen Effekt ein löslicher Faktor, der von HCMV-infizierten DC gebildet wird, verantwortlich ist. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden Überstände von FFV- und ECV-infizierten DC gesammelt und UV-inaktiviert, so dass kein replikationskompetentes Virus mehr darin enthalten war. Nun wurden nicht-infizierte DC mit T-Zellen und diesen inaktivierten Überständen kokultiviert. Auch diese Überstände konnten die MLR hemmen. Dabei erzielten die Überstände von ECV-infizierten DC und die Überstände von FFV-infizierten DC die gleiche hemmende Wirkung. Daraus lässt sich schließen, dass für die verringerte Fähigkeit der T-Zellen zu proliferieren, ein löslicher Faktor verantwortlich ist. Da sowohl FFV als auch ECV in der Lage sind diesen löslichen Faktors zu produzieren, muss ein HCMV-IE- und/oder E-Genprodukt für dessen Bildung verantwortlich sein. Ein weiterer Hinweis für die Existenz eines löslichen Faktors ist die verminderte Expression von CD40 und CD54 bei nicht-infizierten DC, die mit dem UV-inaktivierten Überstand inkubiert wurden. Der lösliche Faktor ist also nicht nur für die Hemmung der T-Zell-Proliferation verantwortlich, sondern auch für die verminderte Expression einiger Oberflächenmoleküle. Damit hat HCMV eine weitere Strategie entwickelt, dass Immunsys-

tem zu manipulieren. Mit der Bildung dieses löslichen Faktors kann HCMV nicht nur die Funktion der infizierten DC, sondern auch die der nicht-infizierten DC in der Nachbarschaft vermindern.

Eine weitere wichtige Funktion von DC ist die Produktion von Zytokinen. Damit können die Zellen nicht nur die Proliferation der T-Zellen auslösen, sondern auch die Differenzierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen in TH<sub>1</sub>- oder TH<sub>2</sub>-Zellen beeinflussen (siehe auch Abbildung 4.2). Auch die Permeabilität einiger Moleküle durch das Endothel kann durch Zytokine erhöht werden (Paul, 1993). Da die Teilungsrate der T-Zellen in der MLR sehr gering war, sollte untersucht werden, ob die HCMV-infizierten DC noch in der Lage waren, ihre spezifischen Zytokine zu produzieren. Daher wurden unreife DC entweder unbehandelt gelassen oder mit FFV- oder ECV-Stämmen infiziert. Nach der Infektion wurden die Zellen mit LPS stimuliert und die Zytokinkonzentration von IL-2, IL6, IL-10, IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und TGF- $\beta$  in den Überständen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Stimulation gemessen. Die Sekretion von IL-6, IL-10, IL,12 und TNF- $\alpha$  nach einer Stimulation mit LPS waren bei den ECV- und FFV-infizierten DC stark reduziert. Da sich beide Virusstämme gleich verhalten und die Infektion bei FFV-infizierten DC aber nach der Bildung von HCMV-IE und vor der Produktion von pHCMV-pp65 abbricht, muss auch in diesem Fall wieder ein IE- und/oder E-Gen für diesen Effekt verantwortlich zu sein. Es konnte gezeigt werden, dass HCMV in der Lage ist, sowohl die Sekretion von TH<sub>1</sub> als auch die von TH<sub>2</sub> Zytokinen zu inhibieren. Damit können infizierte DC die T-Zell-Antwort nicht mehr effizient aktivieren. Die Zytokine IL-2, IFN- $\gamma$  und TGF- $\beta$  konnten nur in geringen Mengen in den Überständen der infizierten und nicht-infizierten iDC oder mDC nachgewiesen werden. DC sind grundsätzlich in der Lage diese Zytokine zu bilden. Allerdings wird je nach Antigen nur ein bestimmtes Zytokinmuster gebildet (de Saint-Vis, et al., 1998). Die Produktion von IL-2 (Proliferationsstimulus von T-Zellen) beispielsweise wird erst nach dem Zell-Zell-Kontakt mit T-Zellen angeregt. Da sich in unserem Versuchsansatz keine T-Zellen befanden, konnte die Sekretion von IL-2 auch nicht ausgelöst werden.

Auch mit der Hemmung der Zytokinproduktion hat HCMV einen Weg gefunden, sich der Immunantwort des Menschen zu entziehen. Durch die Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen können CD4<sup>+</sup> T-Zellen aktiviert werden. Eine Differenzierung dieser aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen in Effektorzellen erfolgt aber nur in Anwesenheit bestimmter Zytokine (siehe auch Abbildung 4.2). Produzieren HCMV-infizierte DC diese Zytokine nicht mehr in ausreichender Konzentration, können die aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen nicht mehr in Effektorzellen differenziert werden.

Um den löslichen Faktor, dessen Bildung nach einer HCMV-Infektion bei DC induziert wird, zu identifizieren, wurden verschiedene Zytokine in Betracht gezogen. Es ist bekannt, dass z.B. IL-10

oder auch TGF- $\beta$  eine immunmodulatorische Wirkung besitzen und auch von DC gebildet werden können. Allerdings können diese beiden, wie auch die Zytokine IL-6, IL12, INF- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  nach den Ergebnissen der Zytokin-ELISAs ausgeschlossen werden. HCMV ist allerdings in der Lage, ein IL-10-Homologon (vIL-10) zu bilden. Für die These, dass es sich bei diesem Protein um den löslichen Faktor handelt, spricht eine Arbeit von Spencer et al., in der sie zeigen konnten, dass dieses vIL-10 die Proliferation von PBMC inhibieren kann. Außerdem führte dieses Protein zu einer verminderten MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Expression auf der Zelloberfläche von Monozyten. Das virale IL-10 war ebenfalls in der Lage die Zytokinproduktion von Monozyten einzuschränken (Spencer, et al., 2002). Dagegen spricht allerdings eine Arbeit von Odeberg und Söderberg-Nauclér, die in HCMV-infizierten Makrophagen ebenfalls die Produktion eines löslichen Faktors feststellen konnten. In diesem Fall konnte der Faktor auch die Proliferationsrate von PBMC inhibiert werden. Allerdings konnten die Autoren durch ihre Versuche zeigen, dass dieser Effekt weder durch die Blockierung des IL-10-Rezeptors noch durch die Blockierung des TGF- $\beta$ -Rezeptors aufgehoben werden konnte (Odeberg, et al., 2001). Dies macht die Zytokine IL-10 und TGF- $\beta$  als Kandidaten für diesen löslichen Faktor unwahrscheinlich.

Andrews et al. konnten zeigen, dass auch das murine Zytomegalievirus (MCMV) die Funktion von DC in der Maus behindern kann. In diesem Fall sind infizierte DC nach der Stimulation mit einem Antigen (LPS) nicht mehr in der Lage, IL-2 zu produzieren. Außerdem konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass für diesen Effekt eine produktive Infektion notwendig ist (Andrews, et al., 2001). Diese Ergebnisse können aber nicht auf die Situation im Menschen übertragen werden. Erstens kann ein Mangel an IL-2 nicht übertragen werden, denn dies könnte durch die nicht-infizierten DC ausgeglichen werden. Und zweitens konnte gezeigt werden, dass DC, die *in vitro* aus Monozyten generiert wurden, kein IL-2 produzieren können (de Saint-Vis, et al., 1998). Dies erfolgt erst nach Zell-Zell-Kontakt mit T-Zellen. Der lösliche Faktor wurde aber *in vitro* von infizierten DC generiert, die nicht mit T-Zellen in Kontakt kamen. Dies macht die verminderte Produktion an IL-2 bei HCMV-infizierten menschlichen DC als Ursache für die verminderte T-Zell-Proliferation unwahrscheinlich. Der lösliche Faktor konnte bisher noch nicht identifiziert werden. Weiter Untersuchungen auf diesem Gebiet werden folgen und dann die Identifizierung des löslichen Faktors ermöglichen.

Plasmazytoiden DC wird eine große Rolle bei der Abwehr von Virusinfektionen zugeschrieben, da sie in der Lage sind, große Mengen des antiviral wirkenden Zytokins IFN- $\alpha$  zu bilden. IFN- $\alpha$  aktiviert beispielsweise eine Endonuklease, die virale RNA hydrolisiert und damit die Virusvermehrung inhibiert. Weiterhin kann INF- $\gamma$  eine Proteinphosphokinase induzieren, die eine Untereinheit des Proteinsynthese-Initiationsfaktors eIF2 phosphoryliert und damit die Syntheseinitiation viraler Pro-

teine hemmen kann (Paul, 1993). Daher wurden pDC aus Tonsillen isoliert und mit ECV-Stämmen infiziert. In den infizierten Zellen konnten sowohl IE- als auch Late-Proteine angefärbt werden. Es ist daher zu vermuten, dass auch diese Zellen produktiv mit HCMV infizierbar sind. Anschließend sollte überprüft werden, ob auch die Funktion von HCMV-infizierten pDC eingeschränkt ist. Daher wurden in den Überständen von nicht-infizierten und mit ECV-Stämmen infizierten pDC, fünf Tage nach der Infektion, die Konzentration an IFN- $\gamma$  bestimmt. Zur Kontrolle wurden die IFN- $\gamma$ -Konzentration ebenfalls in Überständen von pDC gemessen, die mit UV-inaktivierten ECV-Stämmen kokultiviert wurden. Es zeigte sich, dass HCMV in der Lage ist, die Produktion von IFN- $\gamma$  zu hemmen. Das Virus hat somit Mechanismen entwickelt, den antiviralen Effekten von IFN- $\gamma$  zu entgehen.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen erfolgten an DC, die *in vitro* hergestellt wurden. Um zu überprüfen, welche klinische Relevanz die erhaltenen Daten besitzen, wurden DC aus dem Blut HCMV-virämischer Patienten isoliert. Alle diese Patienten wiesen in der Antigenämie zwischen 190 und 500 pp65-positive Kerne pro  $2 \times 10^5$  Leukozyten auf. Die DNA wurde in einer nested PCR untersucht. In 3 von 4 Personen konnten positive PCR-Signale detektiert werden. Da der hohe Reinheitsgrad dieser Zellen eine zelluläre Kontamination unwahrscheinlich macht, kann man sagen, dass DC nicht nur *in vitro* sondern auch *in vivo* mit HCMV infizierbar sind. Dies legt den Schluss nahe, dass die beobachteten Ergebnisse der *in vitro* Versuche auch auf die Situation *in vivo* übertragen werden können.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass HCMV myeloide und plasmazytoide DC infizieren kann. Die oben erwähnten Immunmodulationen bei DC führen nicht nur zu einer Hemmung der NK-Zell-Antwort, sondern auch die Differenzierung in CTL und die Ausbildung einer TH<sub>1</sub>-Antwort (siehe Abbildung 4.2) wird inhibiert. Die Ausbildung einer TH<sub>2</sub>-Antwort dagegen wird von HCMV nicht vollständig blockiert. TH<sub>2</sub>-Effektorzellen stimulieren B-Zellen zur Produktion von Antikörpern. Allerdings hat HCMV Mechanismen entwickelt, sich den Antikörpern zu entziehen. Die meisten Epitope werden erst spät erkannt und richten sich gegen die Glykoproteine gB und gH. Die Zeit bis die Antikörperproduktion erfolgt, nutzt HCMV zur Infektion der Zielzelle und zur Ausbildung einer Latenz, in der das Virusgenom ruhend in der Zelle vorliegt und daher auch nicht erkannt werden kann. Die hier erhaltenen Daten zeigen eine neue Strategie von HCMV auf, der Immunantwort des Menschen zu entgehen. Dies könnte zu einer Virus-vermittelten Immunsuppression und zur Etablierung der lebenslangen Persistenz im Wirt führen. Durch die zunehmende Zahl an immunsupprimierten Patienten hat die Bedeutung von HCMV in den letzten Jahren stark zugenom-



men. Die hier erzielten Erkenntnisse sind daher wichtig für die zukünftige Entwicklung von Impfstoffen und anderer therapeutischer Maßnahmen.

## 5. Literaturverzeichnis

**Ahn, K., Angulo, A., Ghazal, P., Peterson, P.A., Yang, Y. and Fruh, K.** "Human cytomegalovirus inhibits antigen presentation by a sequential multistep process." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93(20), pp. 10990-5.

**Ahn, K., Gruhler, A., Galocha, B., Jones, T.R., Wiertz, E.J., Ploegh, H.L., Peterson, P.A., Yang, Y. and Fruh, K.** "The ER-luminal domain of the HCMV glycoprotein US6 inhibits peptide translocation by TAP." *Immunity*, 1997, 6(5), pp. 613-21.

**Alcami, J., Barzu, T. and Michelson, S.** "Induction of an endothelial cell growth factor by human cytomegalovirus infection of fibroblasts." *J Gen Virol*, 1991, 72(Pt 11), pp. 2765-70.

**Anderson, D.C., Miller, L.J., Schmalstieg, F.C., Rothlein, R. and Springer, T.A.** "Contributions of the Mac-1 glycoprotein family to adherence-dependent granulocyte functions: structure-function assessments employing subunit-specific monoclonal antibodies." *J Immunol*, 1986, 137(1), pp. 15-27.

**Andrews, D.M., Andoniou, C.E., Granucci, F., Ricciardi-Castagnoli, P. and Degli-Esposti, M.A.** "Infection of dendritic cells by murine cytomegalovirus induces functional paralysis." *Nat Immunol*, 2001, 2(11), pp. 1077-84.

**Banchereau, J. and Steinman, R.M.** "Dendritic cells and the control of immunity." *Nature*, 1998, 392(6673), pp. 245-52.

**Bashian, G.G., Braun, C.M., Huang, S.K., Kagey-Sobotka, A., Lichtenstein, L.M. and Essayan, D.M.** "Differential regulation of human, antigen-specific Th1 and Th2 responses by the B-7 homologues, CD80 and CD86." *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1997, 17(2), pp. 235-42.

**Becker, Y.D.G.H., E.A.** Molecular aspects of human cytomegalovirus disease. Springer-Verlag, 1993.

**Bender, A., Bui, L.K., Feldman, M.A., Larsson, M. and Bhardwaj, N.** "Inactivated influenza virus, when presented on dendritic cells, elicits human CD8+ cytolytic T cell responses." *J Exp Med*, 1995, 182(6), pp. 1663-71.

**Bender, A., Sapp, M., Schuler, G., Steinman, R.M. and Bhardwaj, N.** "Improved methods for the generation of dendritic cells from nonproliferating progenitors in human blood." *J Immunol Methods*, 1996, 196(2), pp. 121-35.

**Bhardwaj, N., Bender, A., Gonzalez, N., Bui, L.K., Garrett, M.C. and Steinman, R.M.** "Influenza virus-infected dendritic cells stimulate strong proliferative and cytolytic responses from human CD8+ T cells." *J Clin Invest*, 1994, 94(2), pp. 797-807.

Bodaghi, B., Jones, T.R., Zipeto, D., Vita, C., Sun, L., Laurent, L., Arenzana-Seisdedos, F., Virelizier, J.L. and Michelson, S. "Chemokine sequestration by viral chemoreceptors as a novel viral escape strategy: withdrawal of chemokines from the environment of cytomegalovirus-infected cells." *J Exp Med*, 1998, 188(5), pp. 855-66.

**Borysiewicz, L.K., Rodgers, B., Morris, S., Graham, S. and Sissons, J.G.** "Lysis of human cytomegalovirus infected fibroblasts by natural killer cells: demonstration of an interferon-independent component requiring expression of early viral proteins and characterization of effector cells." *J Immunol*, 1985, 134(4), pp. 2695-701.

**Bos, J.D. and Kapsenberg, M.L.** "The skin immune system: progress in cutaneous biology. [Review] [33 refs]." *Immunology Today*, 1993, 14(Label), pp. 75-78.

**Braathen, L.R., Ramirez, G., Kunze, R.O. and Gelderblom, H.** "Langerhans cells as primary target cells for HIV infection." *Lancet*, 1987, 2(8567), pp. 1094.

**Britt, W.J., Alford C.A.** "Cytomegalovirus," F.B. N., *Fields Virology*. Philadelphia: Raven Publishers, 1996,

**Britt, W.J.A., C.A.** "Cytomegalovirus," F.B.N.K.D.M.H. P.M., *Virology*. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996, 2493-523.

**Butcher, E.C. and Picker, L.J.** "Lymphocyte homing and homeostasis. [Review] [57 refs]." *Science*, 1996, 272(Label), pp. 60-66.

**Cameron, P.U., Pope, M., Gezelter, S. and Steinman, R.M.** "Infection and apoptotic cell death of CD4+ T cells during an immune response to HIV-1-pulsed dendritic cells." *AIDS Res Hum Retroviruses*, 1994, 10(1), pp. 61-71.

Caux, C., Ait-Yahia, S., Chemin, K., de Bouteiller, O., Dieu-Nosjean, M.C., Homey, B., Massacrier, C., Vanbervliet, B., Zlotnik, A. and Vicari, A. "Dendritic cell biology and regulation of dendritic cell trafficking by chemokines." *Springer Semin Immunopathol*, 2000, 22(4), pp. 345-69.

**Caux, C., Dezutter Dambuyant, C., Schmitt, D. and Banchereau, J.** "GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells." *Nature*, 1992, 360(Label), pp. 258-61.

Caux, C., Vanbervliet, B., Massacrier, C., Dezutter-Dambuyant, C., de Saint-Vis, B., Jacquet, C., Yoneda, K., Imamura, S., Schmitt, D. and Banchereau, J. "CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha." *J Exp Med*, 1996, 184(2), pp. 695-706.

**Cella, M., Jarrossay, D., Facchetti, F., Alebardi, O., Nakajima, H., Lanzavecchia, A. and Colonna, M.** "Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon." *Nat Med*, 1999, 5(8), pp. 919-23.

- Cha, T.A., Tom, E., Kemble, G.W., Duke, G.M., Mocarski, E.S. and Spaete, R.R.** "Human cytomegalovirus clinical isolates carry at least 19 genes not found in laboratory strains." *J Virol*, 1996, 70(1), pp. 78-83.
- Chambers, B.J., Salcedo, M. and Ljunggren, H.G.** "Triggering of natural killer cells by the costimulatory molecule CD80 (B7-1)." *Immunity*, 1996, 5(4), pp. 311-7.
- Chambers, C.A. and Allison, J.P.** "Costimulatory regulation of T cell function." *Curr Opin Cell Biol*, 1999, 11(2), pp. 203-10.
- Chee, M.S., Bankier, A.T., Beck, S., Bohni, R., Brown, C.M., Cerny, R., Horsnell, T., Kouzarides, T., Martignetti, J.A. and et al. "Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. [Review]." *Current Topics in Microbiology & Immunology*, 1990, 154(Label), pp. 125-69.
- Chee, M.S., Satchwell, S.C., Preddie, E., Weston, K.M. and Barrell, B.G.** "Human cytomegalovirus encodes three G protein-coupled receptor homologues [see comments]." *Nature*, 1990, 344(Label), pp. 774-77.
- Cinatl, J., Jr., Cinatl, J., Radsak, K., Rabenau, H., Weber, B., Novak, M., Benda, R., Kornhuber, B. and Doerr, H.W.** "Replication of human cytomegalovirus in a rhabdomyosarcoma cell line depends on the state of differentiation of the cells." *Arch Virol*, 1994, 138(3-4), pp. 391-401.
- Coyle, A.J. and Gutierrez-Ramos, J.C.** "The expanding B7 superfamily: increasing complexity in costimulatory signals regulating T cell function." *Nat Immunol*, 2001, 2(3), pp. 203-9.
- Crowley, M., Inaba, K., Witmer-Pack, M. and Steinman, R.M.** "The cell surface of mouse dendritic cells: FACS analyses of dendritic cells from different tissues including thymus." *Cellular Immunology*, 1989, 118(Label), pp. 108-25.
- Darnell, J.E., Jr., Kerr, I.M. and Stark, G.R.** "Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins." *Science*, 1994, 264(5164), pp. 1415-21.
- de Saint-Vis, B., Fugier-Vivier, I., Massacrier, C., Gaillard, C., Vanbervliet, B., Ait-Yahia, S., Banchereau, J., Liu, Y.J., Lebecque, S. and Caux, C. "The cytokine profile expressed by human dendritic cells is dependent on cell subtype and mode of activation." *J Immunol*, 1998, 160(4), pp. 1666-76.
- Dieu-Nosjean, M.C., Vicari, A., Lebecque, S. and Caux, C.** "Regulation of dendritic cell trafficking: a process that involves the participation of selective chemokines." *J Leukoc Biol*, 1999, 66(2), pp. 252-62.
- Dustin, M.L., Garcia-Aguilar, J., Hibbs, M.L., Larson, R.S., Stacker, S.A., Staunton, D.E., Wardlaw, A.J. and Springer, T.A.** "Structure and regulation of the leukocyte adhesion receptor

LFA-1 and its counterreceptors, ICAM-1 and ICAM-2." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 1989, 54(Pt 2), pp. 753-65.

**Facchetti, F., Candiago, E. and Vermi, W.** "Plasmacytoid monocytes express IL3-receptor alpha and differentiate into dendritic cells." *Histopathology*, 1999, 35(1), pp. 88-9.

**Fanger, N.A., Wardwell, K., Shen, L., Tedder, T.F. and Guyre, P.M.** "Type I (CD64) and type II (CD32) Fc gamma receptor-mediated phagocytosis by human blood dendritic cells." *J Immunol*, 1996, 157(2), pp. 541-8.

Fields, P.E., Finch, R.J., Gray, G.S., Zollner, R., Thomas, J.L., Sturmhoefel, K., Lee, K., Wolf, S., Gajewski, T.F. and Fitch, F.W. "B7.1 is a quantitatively stronger costimulus than B7.2 in the activation of naive CD8+ TCR-transgenic T cells." *J Immunol*, 1998, 161(10), pp. 5268-75.

**Fish, K.N., Britt, W. and Nelson, J.A.** "A novel mechanism for persistence of human cytomegalovirus in macrophages." *Journal of Virology*, 1996, 70(Label), pp. 1855-62.

**Fish, K.N., Stenglein, S.G., Ibanez, C. and Nelson, J.A.** "Cytomegalovirus persistence in macrophages and endothelial cells." *Scand J Infect Dis Suppl*, 1995, 99, pp. 34-40.

**Fletcher, J.M., Prentice, H.G. and Grundy, J.E.** "Natural killer cell lysis of cytomegalovirus (CMV)-infected cells correlates with virally induced changes in cell surface lymphocyte function-associated antigen-3 (LFA-3) expression and not with the CMV- induced down-regulation of cell surface class I HLA." *J Immunol*, 1998, 161(5), pp. 2365-74.

**Fraser, J.D., Irving, B.A., Crabtree, G.R. and Weiss, A.** "Regulation of interleukin-2 gene enhancer activity by the T cell accessory molecule CD28." *Science*, 1991, 251(4991), pp. 313-6.

**Fugier-Vivier, I., Servet-Delprat, C., Rivaller, P., Rissoan, M.C. and Liu, Y.J.R.C.** "Measles virus suppresses cell-mediated immunity by interfering with the survival and functions of dendritic and T cells." *Journal of Experimental Medicine*, 1997, 186(Label), pp. 813-23.

**Geelen, J.L., Walig, C., Wertheim, P. and van der Noordaa, J.** "Human cytomegalovirus DNA. I. Molecular weight and infectivity." *J Virol*, 1978, 26(3), pp. 813-6.

**German, R.N., Castellino, F., Han, R., Reis e Sousa, C., Romagnoli, P., Sadegh-Nasseri, S. and Zhong, G.M.** "Processing and presentation of endocytically acquired protein antigens by MHC class II and class I molecules." *Immunol Rev*, 1996, 151, pp. 5-30.

**Gerna, G., Revello, M.G., Percivalle, E. and Morini, F.** "Comparison of different immunostaining techniques and monoclonal antibodies to the lower matrix phosphoprotein (pp65) for optimal quantitation of human cytomegalovirus antigenemia." *Journal of Clinical Microbiology*, 1992, 30(Label), pp. 1232-37.

- Gibson, W., Baxter, M.K. and Clopper, K.S.** "Cytomegalovirus "missing" capsid protein identified as heat-aggregable product of human cytomegalovirus UL46." *J Virol*, 1996, 70(11), pp. 7454-61.
- Gilbert, M.J., Riddell, S.R., Plachter, B. and Greenberg, P.D.** "Cytomegalovirus selectively blocks antigen processing and presentation of its immediate-early gene product." *Nature*, 1996, 383(Label), pp. 720-22.
- Greenfield, E.A., Nguyen, K.A. and Kuchroo, V.K.** "CD28/B7 costimulation: a review." *Crit Rev Immunol*, 1998, 18(5), pp. 389-418.
- Grosjean, I., Caux, C., Bella, C., Berger, I., Wild, F. and Banchereau, J.K.** "Measles virus infects human dendritic cells and blocks their allostimulatory properties for CD4+ T cells." *Journal of Experimental Medicine*, 1997, 186(Label), pp. 801-12.
- Haagmans, B.L., Teerds, K.J., van den Eijnden-van Raaij, A.J., Horzinek, M.C. and Schijns, V.E.** "Transforming growth factor beta production during rat cytomegalovirus infection." *J Gen Virol*, 1997, 78(Pt 1), pp. 205-13.
- Hahn, G., Jores, R. and Mocarski, E.S.** "Cytomegalovirus remains latent in a common precursor of dendritic and myeloid cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, 95(Label), pp. 3937-42.
- Hart, D.N.** "Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response." *Blood*, 1997, 90(9), pp. 3245-87.
- Hart, D.N. and Fabre, J.W.** "Major histocompatibility complex antigens in rat kidney, ureter, and bladder. Localization with monoclonal antibodies and demonstration of Ia-positive dendritic cells." *Transplantation*, 1981, 31(Label), pp. 318-25.
- Hengel, H., Brune, W. and Koszinowski, U.H.** "Immune evasion by cytomegalovirus--survival strategies of a highly adapted opportunist. [Review] [60 refs]." *Trends in Microbiology*, 1998, 6(Label), pp. 190-97.
- Hengel, H., Esslinger, C., Pool, J., Goulmy, E. and Koszinowski, U.H.** "Cytokines restore MHC class I complex formation and control antigen presentation in human cytomegalovirus-infected cells." *Journal of General Virology*, 1995, 76(Label), pp. 2987-97.
- Hengel, H., Koopmann, J.O., Flohr, T., Muranyi, W., Goulmy, E., Hammerling, G.J.K. and Momburg, F.** "A viral ER-resident glycoprotein inactivates the MHC-encoded peptide transporter." *Immunity*, 1997, 6(Label), pp. 623-32.
- Hengel, H., Lindner, M., Wagner, H. and Heeg, K.** "Frequency of herpes simplex virus-specific murine cytotoxic T lymphocyte precursors in mitogen- and antigen-driven primary in vitro T cell responses." *Journal of Immunology*, 1987, 139(Label), pp. 4196-202.

- Hengel, H., Lucin, P., Jonjic, S., Ruppert, T. and Koszinowski, U.H.** "Restoration of cytomegalovirus antigen presentation by gamma interferon combats viral escape." *Journal of Virology*, 1994, 68(Label), pp. 289-97.
- Howard, J.C.** "Supply and transport of peptides presented by class I MHC molecules." *Curr Opin Immunol*, 1995, 7(1), pp. 69-76.
- Inaba, K., Inaba, M., Naito, M. and Steinman, R.M.** "Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including bacillus Calmette-Guerin organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens in vivo." *Journal of Experimental Medicine*, 1993, 178(Label), pp. 479-88.
- Inaba, K., Romani, N. and Steinman, R.M.** "An antigen-independent contact mechanism as an early step in T cell- proliferative responses to dendritic cells." *J Exp Med*, 1989, 170(2), pp. 527-42.
- Jahn, G. and Mach, M.** "Human cytomegalovirus phosphoproteins and glycoproteins and their coding regions." *Curr Top Microbiol Immunol*, 1990, 154, pp. 171-85.
- Jahn, G., Scholl, B.C., Traupe, B. and Fleckenstein, B.** "The two major structural phosphoproteins (pp65 and pp150) of human cytomegalovirus and their antigenic properties." *J Gen Virol*, 1987, 68(Pt 5), pp. 1327-37.
- Jain, J., Loh, C. and Rao, A.** "Transcriptional regulation of the IL-2 gene." *Curr Opin Immunol*, 1995, 7(3), pp. 333-42.
- Janeway, C.A. and Travers, P.** *Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford, 1997.
- Jenkins, M.K.** "The ups and downs of T cell costimulation." *Immunity*, 1994, 1(6), pp. 443-6.
- Jiang, W., Swiggard, W.J., Heufler, C., Peng, M., Mirza, A., Steinman, R.M. and Nussenzweig, M.C.** "The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing." *Nature*, 1995, 375(6527), pp. 151-5.
- Jonuleit, H., Kuhn, U., Muller, G., Steinbrink, K., Paragnik, L., Schmitt, E., Knop, J. and Enk, A.H.** "Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions." *Eur J Immunol*, 1997, 27(12), pp. 3135-42.
- Jonuleit, H., Schmitt, E., Schuler, G., Knop, J. and Enk, A.H.** "Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells." *J Exp Med*, 2000, 192(9), pp. 1213-22.
- June, C.H., Bluestone, J.A., Nadler, L.M. and Thompson, C.B.** "The B7 and CD28 receptor families. [Review] [93 refs]." *Immunology Today*, 1994, 15(Label), pp. 321-31.

- Kast, W.M., Boog, C.J., Roep, B.O., Voordouw, A.C. and Melief, C.J.** "Failure or success in the restoration of virus-specific cytotoxic T lymphocyte response defects by dendritic cells." *Journal of Immunology*, 1988, 140(Label), pp. 3186-93.
- Keay, S. and Baldwin, B.** "Anti-idiotypic antibodies that mimic gp86 of human cytomegalovirus inhibit viral fusion but not attachment." *Journal of Virology*, 1991, 65(Label), pp. 5124-28.
- Keller, R.** "Dendritic cells: their significance in health and disease." *Immunol Lett*, 2001, 78(3), pp. 113-22.
- Knight, S.C., Balfour, B.M., O'Brien, J., Buttifant, L., Summerska, T. and Clarke, J.** "Role of veiled cells in lymphocyte activation." *European Journal of Immunology*, 1982, 12(Label), pp. 1057-60.
- Kondo, K. and Mocarski, E.S.** "Cytomegalovirus latency and latency-specific transcription in hematopoietic progenitors. [Review] [24 refs]." *Scandinavian Journal of Infectious Diseases - Supplementum*, 1995, 99(Label), pp. 63-67.
- Langenkamp, A., Messi, M., Lanzavecchia, A. and Sallusto, F.** "Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells." *Nat Immunol*, 2000, 1(4), pp. 311-6.
- Langerhans, P.** "Über die Nerven der menschlichen Haut." *Virchows Arch*, 1868, 44, pp. 325-27.
- Lanzavecchia, A.** "Mechanisms of antigen uptake for presentation. [Review] [93 refs]." *Current Opinion in Immunology*, 1996, 8(Label), pp. 348-54.
- Larsen, C.P., Ritchie, S.C., Pearson, T.C., Linsley, P.S. and Lowry, R.P.** "Functional expression of the costimulatory molecule, B7/BB1, on murine dendritic cell populations." *Journal of Experimental Medicine*, 1992, 176(Label), pp. 1215-20.
- Larsen, C.P., Steinman, R.M., Witmer-Pack, M., Hankins, D.F., Morris, P.J. and AustynJM.** "Migration and maturation of Langerhans cells in skin transplants and explants." *Journal of Experimental Medicine*, 1990, 172(Label), pp. 1483-93.
- Lazarotto, T., Furlini, G., Re, M.C., Ramazzotti, E., Campisi, B. and Landini, M.P.** "Human cytomegalovirus replication correlates with differentiation in a hematopoietic progenitor cell line and can be modulated by HIV-1." *Arch Virol*, 1994, 135(1-2), pp. 13-28.
- Leach, C.T., Detels, R., Hennessey, K., Liu, Z., Visscher, B.R., Dudley, J.P. and Cherry, J.D.** "A longitudinal study of cytomegalovirus infection in human immunodeficiency virus type 1-seropositive homosexual men: molecular epidemiology and association with disease progression." *J Infect Dis*, 1994, 170(2), pp. 293-8.
- Lehner, P.J. and Cresswell, P.** "Processing and delivery of peptides presented by MHC class I molecules." *Curr Opin Immunol*, 1996, 8(1), pp. 59-67.



- Lipscomb, M.F. and Masten, B.J.** "Dendritic cells: immune regulators in health and disease." *Physiol Rev*, 2002, 82(1), pp. 97-130.
- Liu, R., Baillie, J., Sissons, J.G. and Sinclair, J.H.** "The transcription factor YY1 binds to negative regulatory elements in the human cytomegalovirus major immediate early enhancer/promoter and mediates repression in non-permissive cells." *Nucleic Acids Res*, 1994, 22(13), pp. 2453-9.
- Macatonia, S.E., Edwards, A.J. and Knight, S.C.** "Dendritic cells and the initiation of contact sensitivity to fluorescein isothiocyanate." *Immunology*, 1986, 59(Label), pp. 509-14.
- Margulies, B.J., Browne, H. and Gibson, W.** "Identification of the human cytomegalovirus G protein-coupled receptor homologue encoded by UL33 in infected cells and enveloped virus particles." *Virology*, 1996, 225(1), pp. 111-25.
- Medzhitov, R.** "Toll-like receptors and innate immunity." *Nat Rev Immunol*, 2001, 1(2), pp. 135-45.
- Michelson, S., Alami, J., Kim, S.J., Danielpour, D., Bachelerie, F., Picard, L., Bessia, C., Paya, C. and Virelizier, J.L.** "Human cytomegalovirus infection induces transcription and secretion of transforming growth factor beta 1." *J Virol*, 1994, 68(9), pp. 5730-7.
- Miller, D.M., Rahill, B.M., Boss, J.M., Lairmore, M.D., Durbin, J.E., Waldman, J.W. and Sedmak, D.D.** "Human cytomegalovirus inhibits major histocompatibility complex class II expression by disruption of the Jak/Stat pathway." *J Exp Med*, 1998, 187(5), pp. 675-83.
- Mocarski, E.S.** *Cytomegaloviruses and their replication*. Philadelphia: Raven Publishers, 1996.
- Modrow, S., Falke, D.** *Molekulare Virologie*. Spektrum, 1997.
- Mosmann, T.R. and Coffman, R.L.** "TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. [Review]." *Annual Review of Immunology*, 1989, 7, pp. 145-73.
- Navarro, D., Paz, P., Tugizov, S., Topp, K., La Vail, J. and Pereira, L.** "Glycoprotein B of human cytomegalovirus promotes virion penetration into cells, transmission of infection from cell to cell, and fusion of infected cells." *Virology*, 1993, 197, pp. 143-58.
- Nonacs, R., Humborg, C., Tam, J.P. and Steinman, R.M.** "Mechanisms of mouse spleen dendritic cell function in the generation of influenza-specific, cytolytic T lymphocytes." *Journal of Experimental Medicine*, 1992, 176, pp. 519-29.
- O'Doherty, U., Peng, M., Gezelter, S., Swiggard, W.J., Betjes, M., Bhardwaj, N. and Steinman, R.M.** "Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature." *Immunology*, 1994, 82(3), pp. 487-93.
- O'Rourke, A.M. and Mescher, M.F.** "Cytotoxic T-lymphocyte activation involves a cascade of signalling and adhesion events." *Nature*, 1992, 358(6383), pp. 253-5.

- Odeberg, J., Cerboni, C., Browne, H., Karre, K., Moller, E., Carbone, E. and Soderberg-Naucler, C.** "Human cytomegalovirus (HCMV)-infected endothelial cells and macrophages are less susceptible to natural killer lysis independent of the downregulation of classical HLA class I molecules or expression of the HCMV class I homologue, UL18." *Scand J Immunol*, 2002, 55(2), pp. 149-61.
- Odeberg, J. and Soderberg-Naucler, C.** "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), pp. 5174-81.
- Onorato, I.M., Morens, D.M., Martone, W.J. and Stansfield, S.K.** "Epidemiology of cytomegaloviral infections: recommendations for prevention and control." *Rev Infect Dis*, 1985, 7(4), pp. 479-97.
- Pachl, C., Probert, W.S., Hermsen, K.M., Masiarz, F.R., Rasmussen, L. and Merigan, T.C.S.** "The human cytomegalovirus strain Towne glycoprotein H gene encodes glycoprotein p86." *Virology*, 1989, 169, pp. 418-26.
- Poland, S.D., Bambrick, L.L., Dekaban, G.A. and Rice, G.P.** "The extent of human cytomegalovirus replication in primary neurons is dependent on host cell differentiation." *J Infect Dis*, 1994, 170(5), pp. 1267-71.
- Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M.Y., Huffel, C.V., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B. and Beutler, B. "Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene." *Science*, 1998, 282(5396), pp. 2085-8.
- Prickett, T.C., McKenzie, J.L. and Hart, D.N.** "Characterization of interstitial dendritic cells in human liver." *Transplantation*, 1988, 46, pp. 754-61.
- Prickett, T.C., McKenzie, J.L. and Hart, D.N.** "Adhesion molecules on human tonsil dendritic cells." *Transplantation*, 1992, 53(2), pp. 483-90.
- Pugh, C.W., MacPherson, G.G. and Steer, H.W.** "Characterization of nonlymphoid cells derived from rat peripheral lymph." *Journal of Experimental Medicine*, 1983, 157, pp. 1758-79.
- Reddy, A., Sapp, M., Feldman, M., Subklewe, M. and Bhardwaj, N.** "A monocyte conditioned medium is more effective than defined cytokines in mediating the terminal maturation of human dendritic cells." *Blood*, 1997, 90(9), pp. 3640-6.
- Reschke, M., Reis, B., Noding, K., Rohsiepe, D., Richter, A., Mockenhaupt, T.G. and Radsak, K.** "Constitutive expression of human cytomegalovirus glycoprotein B (gpUL55) with mutagenized carboxy-terminal hydrophobic domains." *Journal of General Virology*, 1995, 76, pp. 113-22.

- Rescigno, M., Granucci, F. and Ricciardi-Castagnoli, P.** "Dendritic cells at the end of the millennium." *Immunol Cell Biol*, 1999, 77(5), pp. 404-10.
- Reyburn, H.T., Mandelboim, O., Vales-Gomez, M., Davis, D.M. and Pazmany, L.S.** "The class I MHC homologue of human cytomegalovirus inhibits attack by natural killer cells [see comments]." *Nature*, 1997, 386, pp. 514-17.
- Reynolds, D.W., Stagno, S., Hosty, T.S., Tiller, M. and Alford, C.A., Jr.** "Maternal cytomegalovirus excretion and perinatal infection." *New England Journal of Medicine*, 1973, 289, pp. 1-5.
- Riddell, S.R., Greenberg, P.D., Overell, R.W., Loughran, T.P., Gilbert, M.J., Lupton, S.D., Agosti, J., Scheeler, S., Coombs, R.W. and Corey, L. "Phase I study of cellular adoptive immunotherapy using genetically modified CD8+ HIV-specific T cells for HIV seropositive patients undergoing allogeneic bone marrow transplant. The Fred Hutchinson Cancer Research Center and the University of Washington School of Medicine, Department of Medicine, Division of Oncology." *Human Gene Therapy*, 1992, 3, pp. 319-38.
- Robert, C., Fuhlbrigge, R.C., Kieffer, J.D., Ayehunie, S., Hynes, R.O., Cheng, G., Grabbe, S., von Andrian, U.H. and Kupper, T.S. "Interaction of dendritic cells with skin endothelium: A new perspective on immunosurveillance." *J Exp Med*, 1999, 189(4), pp. 627-36.
- Rock, K.L.** "A new foreign policy: MHC class I molecules monitor the outside world." *Immunol Today*, 1996, 17(3), pp. 131-7.
- Romani, N., Gruner, S., Brang, D., Kampgen, E., Lenz, A., Trockenbacher, B.K., Fritsch, P.O., Steinman, R.M. and Schuler, G. "Proliferating dendritic cell progenitors in human blood." *Journal of Experimental Medicine*, 1994, 180, pp. 83-93.
- Rummelt, V., Rummelt, C., Jahn, G., Wenkel, H., Sinzger, C., Mayer, U.M. and Naumann, G.O.** "Triple retinal infection with human immunodeficiency virus type 1, cytomegalovirus, and herpes simplex virus type 1. Light and electron microscopy, immunohistochemistry, and in situ hybridization." *Ophthalmology*, 1994, 101(2), pp. 270-9.
- Salio, M., Cella, M., Suter, M. and Lanzavecchia, A.** "Inhibition of dendritic cell maturation by herpes simplex virus." *Eur J Immunol*, 1999, 29(10), pp. 3245-53.
- Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C. and Lanzavecchia, A.** "Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products [see comments]." *Journal of Experimental Medicine*, 1995, 182, pp. 389-400.
- Sallusto, F. and Lanzavecchia, A.** "Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha." *J Exp Med*, 1994, 179(4), pp. 1109-18.

- Schnorr, J.J., Xanthakos, S., Keikavoussi, P., Kampgen, E. and ter Meulen, V.S.S.** "Induction of maturation of human blood dendritic cell precursors by measles virus is associated with immunosuppression." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, 94, pp. 5326-31.
- Schwartz, R.H.** "A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy." *Science*, 1990, 248(4961), pp. 1349-56.
- Siegal, F.P., Kadowaki, N., Shodell, M., Fitzgerald-Bocarsly, P.A., Shah, K., Ho, S., Antonenko, S. and Liu, Y.J.** "The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood." *Science*, 1999, 284(5421), pp. 1835-7.
- Sinclair, J.H., Baillie, J., Bryant, L.A., Taylor-Wiedeman, J.A. and Sissons, J.G.** "Repression of human cytomegalovirus major immediate early gene expression in a monocytic cell line." *J Gen Virol*, 1992, 73(Pt 2), pp. 433-5.
- Sinzger, C., Grefte, A., Plachter, B., Gouw, A.S., The, T.H. and Jahn, G.** "Fibroblasts, epithelial cells, endothelial cells and smooth muscle cells are major targets of human cytomegalovirus infection in lung and gastrointestinal tissues." *Journal of General Virology*, 1995, 76, pp. 741-50.
- Sinzger, C., Muntefering, H., Loning, T., Stoss, H., Plachter, B. and Jahn, G.** "Cell types infected in human cytomegalovirus placentitis identified by immunohistochemical double staining." *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*, 1993, 423(4), pp. 249-56.
- Sinzger, C., Schmidt, K., Knapp, J., Kahl, M., Beck, R., Waldman, J., Hebart, H., Einsele, H. and Jahn, G.** "Modification of human cytomegalovirus tropism through propagation in vitro is associated with changes in the viral genome." *J Gen Virol*, 1999, 80(Pt 11), pp. 2867-77.
- Slobedman, B. and Mocarski, E.S.** "Quantitative analysis of latent human cytomegalovirus." *J Virol*, 1999, 73(6), pp. 4806-12.
- Smith, M.g.** "Propagation in tissue cultures of a cytopathogenic virus from human salivary gland virus (SVG) disease." *Proc Soc Exp Biol Med*, 1956, 92, pp. 424-30.
- Soderberg-Naucler, C., Fish, K.N. and Nelson, J.A.** "Growth of human cytomegalovirus in primary macrophages." *Methods*, 1998, 16(1), pp. 126-38.
- Spencer, J.V., Lockridge, K.M., Barry, P.A., Lin, G., Tsang, M., Penfold, M.E. and Schall, T.J.** "Potent immunosuppressive activities of cytomegalovirus- encoded interleukin-10." *J Virol*, 2002, 76(3), pp. 1285-92.
- Spry, C.J., Pflug, A.J., Janossy, G. and Humphrey, J.H.** "Large mononuclear (veiled) cells like 'Ia-like' membrane antigens in human afferent lymph." *Clinical & Experimental Immunology*, 1980, 39, pp. 750-55.

- Stagno, S., Reynolds, D.W., Pass, R.F. and Alford, C.A.** "Breast milk and the risk of cytomegalovirus infection." *New England Journal of Medicine*, 1980, 302, pp. 1073-76.
- Steinman, R.M.** "The dendritic cell system and its role in immunogenicity." *Annu.Rev.Immunol.*, 1991, 9, pp. 271-96.
- Steinman, R.M., Adams, J.C. and Cohn, Z.A.** "Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. IV. Identification and distribution in mouse spleen." *J Exp Med*, 1975, 141(4), pp. 804-20.
- Steinman, R.M. and Cohn, Z.A.** "Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution." *Journal of Experimental Medicine*, 1973, 137, pp. 1142-62.
- Steinman, R.M. and Cohn, Z.A.** "Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro." *J Exp Med*, 1974, 139(2), pp. 380-97.
- Strobl, H., Scheinecker, C., Riedl, E., Csmarits, B., Bello-Fernandez, C., Pickl, W.F., Majdic, O. and Knapp, W.** "Identification of CD68+lin- peripheral blood cells with dendritic precursor characteristics." *J Immunol*, 1998, 161(2), pp. 740-8.
- Tan, M.C., Mommaas, A.M., Drijfhout, J.W., Jordens, R., Onderwater, J.J., Verwoerd, D., Mulder, A.A., van der Heiden, A.N., Scheidegger, D., Oomen, L.C., Ottenhoff, T.H., Tulp, A., Neefjes, J.J. and Koning, F. "Mannose receptor-mediated uptake of antigens strongly enhances HLA class II-restricted antigen presentation by cultured dendritic cells." *Eur J Immunol*, 1997, 27(9), pp. 2426-35.
- Taylor-Wiedeman, J., Sissons, J.G., Borysiewicz, L.K. and Sinclair, J.H.** "Monocytes are a major site of persistence of human cytomegalovirus in peripheral blood mononuclear cells." *J Gen Virol*, 1991, 72(Pt 9), pp. 2059-64.
- Tomasec, P., Braud, V.M., Rickards, C., Powell, M.B., McSharry, B.P., Gadola, S., Cerundolo, V., Borysiewicz, L.K., McMichael, A.J. and Wilkinson, G.W. "Surface expression of HLA-E, an inhibitor of natural killer cells, enhanced by human cytomegalovirus gpUL40." *Science*, 2000, 287(5455), pp. 1031.
- Tomazin, R., Boname, J., Hegde, N.R., Lewinsohn, D.M., Altschuler, Y., Jones, T.R., Cresswell, P., Nelson, J.A., Riddell, S.R. and Johnson, D.C. "Cytomegalovirus US2 destroys two components of the MHC class II pathway, preventing recognition by CD4+ T cells." *Nat Med*, 1999, 5(9), pp. 1039-43.
- Van Voorhis, W.C., Hair, L.S., Steinman, R.M. and Kaplan, G.** "Human dendritic cells. Enrichment and characterization from peripheral blood." *Journal of Experimental Medicine*, 1982, 155, pp. 1172-87.

von Laer, D., Meyer-Koenig, U., Serr, A., Finke, J., Kanz, L., Fauser, A.A., Neumann-Haefelin, D., Brugger, W. and Hufert, F.T. "Detection of cytomegalovirus DNA in CD34+ cells from blood and bone marrow." *Blood*, 1995, 86(11), pp. 4086-90.

**Walter, E.A., Greenberg, P.D., Gilbert, M.J., Finch, R.J., Watanabe, K.S., Thomas E.D. and Riddell, S.R.** "Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor [see comments]." *New England Journal of Medicine*, 1995, 333, pp. 1038-44.

**Wang, E.C., McSharry, B., Retiere, C., Tomasec, P., Williams, S., Borysiewicz, L.K., Braud, V.M. and Wilkinson, G.W.** "UL40-mediated NK evasion during productive infection with human cytomegalovirus." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(11), pp. 7570-5.

**Wiertz, E.J., Jones, T.R., Sun, L., Bogyo, M., Geuze, H.J. and Ploegh, H.L.** "The human cytomegalovirus US11 gene product dislocates MHC class I heavy chains from the endoplasmic reticulum to the cytosol." *Cell*, 1996, 84, pp. 769-79.

**Wiertz, E.J., Tortorella, D., Bogyo, M., Yu, J., Mothes, W., Jones, T.R., Rapoport T.A. and Ploegh, H.L.** "Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction [see comments]." *Nature*, 1996, 384, pp. 432-38.

**Wiley, C.A. and Nelson, J.A.** "Role of human immunodeficiency virus and cytomegalovirus in AIDS encephalitis." *American Journal of Pathology*, 1988, 133, pp. 73-81.

**Wurtzen, P.A., Nissen, M.H. and Claesson, M.H.** "Maturation of dendritic cells by recombinant human CD40L-trimer leads to a homogeneous cell population with enhanced surface marker expression and increased cytokine production." *Scand J Immunol*, 2001, 53(6), pp. 579-87.

**Xu, H., Friedrichs, U., Gieseler, R.K., Ruppert, J., Ocklind, G. and Peters, J.H.** "Human blood dendritic cells exhibit a distinct T-cell-stimulating mechanism and differentiation pattern." *Scandinavian Journal of Immunology*, 1992, 36, pp. 689-96.

Yang, R.B., Mark, M.R., Gray, A., Huang, A., Xie, M.H., Zhang, M., Goddard, A., Wood, W.I., Gurney, A.L. and Godowski, P.J. "Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling." *Nature*, 1998, 395(6699), pp. 284-8.

**York, I.A. and Rock, K.L.** "Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex." *Annu Rev Immunol*, 1996, 14, pp. 369-96.

**Zaia, J.A.** "Prevention and treatment of cytomegalovirus pneumonia in transplant recipients." *Clin Infect Dis*, 1993, 17 Suppl 2, pp. S392-9.

## 6. Lebenslauf

**Name:** Kerstin Beck

**Adresse:** Prinz-Eugen-Str. 21  
79102 Freiburg

**Tel.:** 0761-4760275

**geboren am:** 27.06.1973

**geboren in:** Freiburg i. Brsg

**Nationalität:** deutsch

### Schulbildung:

1979-1983 Grund- und Hauptschule Löffingen

1983-1992 Kreisgymnasium Titisee-Neustadt

5/1992 Abitur, Note: 2,3

### Studium:

10/1992-3/1999 Studium der Diplom-Biologie an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau

Hauptfach: Mikrobiologie

Nebenfächer: Genetik, Zoologie (Verhaltensökologie/Evolution), Klinische Chemie und Hämatologie

6/1998-3/1999 Diplomarbeit an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Brsg:  
“Isolierung und Charakterisierung eines riboflavinbindenden Proteins aus Membranen der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*”

3/1999 Abschluß als Diplom Biologin Note: “gut” (1,8)

seit 4/1999 Promotion am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Abteilung Virologie der Universitätsklinik Freiburg  
“Interaktion von dendritischen Zellen mit dem humanen Zytomegalievirus“

## 7. Anhang

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbständig und unter ausschließlicher Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt wurde.

Kerstin Beck

Freiburg, den 24.1.2002



**Teile dieser Arbeit sowie verwandte Themen wurden wie folgt veröffentlicht:**

Hufert F.T., Meyer-König U., Beck K., Nern C.

Infection of monocyte-derived dendritic cells with human cytomegalovirus leads to suppressed allostimulation and downregulation of MHC class I and CD80 molecules. *Journal of clinical virology* 2000; 18:13

Beck K., Meyer-König U., Weidmann M., Nern C., Hufert F.T.

Human Cytomegalovirus impairs dendritic cell function. A novel mechanism of HCMV immune escape. *European Journal of Immunology* in press

**Posterpräsentationen:**

K. Beck, C. Nern, F.T.Hufert, U.Meyer-König

Human Cytomegalovirus productively infects monocyte-derived cultured dendritic cells. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Wien 2000

K.Beck, C.Nern, U.Meyer-König, F.Hufert

Interaction between Human Cytomegalovirus and Monocyte-Derived Dendritic Cells. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Dresden 2001

Kerstin Beck, Christian Nern, Ursula Meyer-König, Frank Hufert.

Human Cytomegalovirus impairs dendritic cell function. A novel mechanism of HCMV immune escape. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Erlangen 2002

Kerstin Beck, Christian Nern, Ursula Meyer-König, Frank Hufert

Human Cytomegalovirus impairs dendritic cell function. A novel mechanism of HCMV immune escape. 7<sup>TH</sup> International Symposium on Dendritic Cells, Bamberg 2002

## **Vielen Dank!**

An Frank Hufert und Ursula Meyer-König für die wissenschaftliche Betreuung, die vielen Anregungen und Diskussionen und die Unterstützung während meiner Arbeit.

An Peter Scheurich für die Vertretung der Arbeit am Institut für Zellbiologie und Immunologie in Stuttgart.

An alle MitarbeiterInnen der Arbeitsgruppe für die hilfreiche Zusammenarbeit, die wertvollen Tipps und Ratschläge und die angenehme Atmosphäre.

Viele weitere Personen haben zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Nicht nur bei der Durchsicht und Korrektur der Arbeit, sondern auch durch ihre Unterstützung und Freundschaft. Ihnen allen gilt mein herzlichster Dank.