

Interaktion von Masernviren mit humanen Dendritischen Zellen

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Ingo M Klagge

aus

Bonn-Bad Godesberg

Würzburg, 2001

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter:

Gutachter:

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich diese Dissertation selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, daß diese Dissertation weder in gleicher noch in anderer Form bereits in einem Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher, außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlichen Graden, keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben gesucht.

Würzburg, den 08. Juni 2001

Ingo Klagge

INHALTSVERZEICHNIS

1	ZUSAMMENFASSUNG	1-1
2	SUMMARY	2-1
3	EINLEITUNG	3-1
3.1	BIOLOGIE DES MASERNVIRUS	3-1
3.1.1	AUFBAU DES MASERNPARTIKELS, REPLIKATION UND TRANSKRIPTION	3-1
3.1.2	KLINISCHES BILD EINER MASERNINFEKTION	3-4
3.1.3	IMMUNANTWORT WÄHREND EINER MASERNINFEKTION	3-5
3.1.4	MASERN-ASSOZIIERTE IMMUNSUPPRESSION	3-6
3.1.5	MODELLE DER MV-INDUZIERTEN IMMUNSUPPRESSION <i>IN VITRO</i>	3-7
3.2	DC-BIOLOGIE	3-8
3.2.1	DC-ABSTAMMUNG IN VIVO UND IN VITRO-MODELLE DER DC-GENERIERUNG	3-8
3.2.2	DC UND DIE POLARISIERUNG VON T-HELPERZELLANTWORTEN	3-10
3.3	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	3-12
4	MATERIAL	4-1
4.1	ZELLEN	4-1
4.2	VIREN	4-1
4.3	ANTIKÖRPER	4-3
4.4	MEDIEN, CHEMIKALIEN UND RADIOAKTIVITÄT	4-3
4.4.1	ZELLKULTUR	4-3
4.4.2	CHEMIKALIEN	4-4
4.4.3	RADIOAKTIV MARKIERTE VERBINDUNGEN	4-4
4.5	KITS, LÖSUNGEN UND PUFFER	4-4
4.6	VERBRAUCHSMATERIAL	4-5
4.7	GERÄTE	4-5
5	METHODEN	5-1
5.1	ZELLKULTUR	5-1
5.1.1	ZELLKULTUR ADHÄRENTER ZELLINIEN	5-1
5.1.2	ZELLKULTUR VON SUSPENSIONSZELLINIEN	5-1
5.1.3	EINFRIEREN UND AUFTAUEN VON ZELLINIEN	5-1
5.1.4	MYKOPLASMENTESTUNG	5-1
5.1.5	ISOLIERUNG PRIMÄRER HUMANER MONONUKLEÄRER ZELLEN AUS PERIPHEREM BLUT	5-1

5.1.6	ISOLIERUNG VON PRIMÄREN T-ZELLEN ÜBER ROSETTIERUNG MIT HAMMELERYTHROZYTEN AUS PBMC	5-2
5.1.7	DEPLETION HLA-DR-POSITIVER T-ZELLEN DURCH INDIREKTES „PANNING“	5-2
5.1.8	ISOLIERUNG VON MONOZYTEN	5-2
5.1.9	HERSTELLUNG HUMANER DENDRITISCHER ZELLEN IN VITRO AUS MONOZYTEN	5-3
5.2	VIRUSZUCHT	5-4
5.2.1	VIRUSSTOCKPRÄPARATIONEN AUF ADHÄRENTEN ZELLINIEN	5-5
5.2.2	VIRUSSTOCKPRÄPARATIONEN MIT SUSPENSIONSZELLINIEN	5-5
5.2.3	TITERBESTIMMUNG DER VIRUSSTOCKS MITTELS DES PLAQUETESTS	5-6
5.2.4	TITERBESTIMMUNG DER VIRUSSTOCKS MITTELS DER ENDPUNKTTITRATION NACH SPEARMAN UND KÄRBER	5-6
5.2.5	TITERBESTIMMUNG DER REKOMBINANTEN VIREN MGV UND MG/FV	5-7
5.2.6	ULTRAZENTRIFUGATION VON VIRUS- UND MOCK-PRÄPARATIONEN	5-8
5.3	AUFREINIGUNG MONOKLONALER ANTIKÖRPER	5-8
5.4	INFEKTION UND AKTIVIERUNG VON MODC	5-8
5.4.1	INFEKTION VON MODC	5-8
5.4.2	AUSREIFUNG DER MODC DURCH ZUSATZ VON MKM ODER LPS	5-9
5.4.3	INDUKTION DER IL-12-PRODUKTION DURCH MODC	5-9
5.4.4	INDUKTION DER TNF- α -SEKRETION DURCH MODC	5-10
5.4.5	KOKULTUR VON MODC IN EINEM ZWEIKAMMERZELLKULTURSYSTEM	5-10
5.4.6	INKUBATION VON MODC MIT UV-INAKTIVIERTEM VIRUS	5-11
5.5	DURCHFLUßZYTOMETRIE	5-11
5.5.1	FACS-OBERFLÄCHENFÄRBUNGEN	5-11
5.5.2	INTRAZELLULÄRE FACS-FÄRBUNGEN	5-11
5.5.3	INTRAZELLULÄRE IL-12-IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNGEN	5-12
5.5.4	QUANTITATIVE DURCHFLUßZYTOMETRIE	5-12
5.5.5	POPULATIONSENTWICKLUNGSUNTERSUCHUNGEN	5-12
5.6	T-ZELLPROLIFERATIONSTESTS	5-15
5.6.1	„MIXED LEUKOCYTE REACTION“	5-15
5.6.2	MITOGENER T-ZELLPROLIFERATIONSTEST MIT PHA	5-15
5.6.3	MITOGENER T-ZELLPROLIFERATIONSTEST MIT SEA	5-16
5.7	SDS-POLYACRYLAMIDGELELEKTROPHORESE UND „WESTERN BLOT“-ANALYSE	5-16
5.7.1	HERSTELLUNG VON ZELLYSATEN	5-16
5.7.2	SDS-POLYACRYLAMIDGELELEKTROPHORESE	5-17
5.7.3	„WESTERN BLOT“-ANALYSE	5-17
5.8	ZYTOKINKONZENTRATIONSBESTIMMUNG ÜBER „ELISA“	5-18

6 ERGEBNISSE **6-1**

6.1	INFEKTION VON HUMANEN MODC MIT MASERNVIRUS	6-1
6.1.1	AUSBILDUNG EINES ZYTOPATHISCHEN EFFEKTS NACH INFEKTION MIT MV	6-1
6.1.2	VIRUSPRODUKTION VON MODC NACH INFEKTION MIT ED-B ODER WTF	6-2
6.1.3	AUSWIRKUNGEN DER MV-INFEKTION AUF DIE VIABILITÄT DER MODC	6-2
6.1.4	AKTIVIERUNGSZUSTAND VON MODC NACH INFEKTION MIT MV	6-3
6.1.5	EINFLUSS DER ZUR INFEKTION EINGESetzten VIRUSMENGE AUF DEN GRAD DER MODC-AUSREIFUNG	6-5
6.1.6	AUSREIFUNG VON MODC NACH INFEKTION MIT VERSCHIEDENEN MV-STÄMMEN	6-6
6.2	MECHANISMEN DER MODC-AKTIVIERUNG NACH MV-INFEKTION	6-8
6.2.1	MODC-AUSREIFUNG DURCH UV-INAKTIVIERTES MV	6-8
6.2.2	MxA-INDUKTION IN MODC-KULTUREN NACH INFEKTION MIT MV UND NACH INKUBATION MIT UV-MV	6-11

6.2.3	MoDC PRODUZIEREN EINEN MXA-INDUZIERENDEN, LÖSLICHEN FAKTOR NACH INFEKTION MIT ED-B	6-11
6.2.4	SEMIQUANTITATIVE BESTIMMUNG DER TYP I-INTERFERON-PRODUKTION NACH INFEKTION VON MoDC MIT ED-B	6-14
6.2.5	MXA-INDUKTION IN MoDC NACH INFEKTION MIT ED-B UND WTF	6-14
6.2.6	ROLLE DER TYP I-INTERFERONE IN DER AKTIVIERUNG UNREIFER MoDC	6-15
6.2.7	PRODUKTION VON TNF- α DURCH MoDC NACH INFEKTION MIT MV	6-17
6.3	FUNKTIONALITÄT VON MoDC NACH INFEKTION MIT MV	6-18
6.3.1	IL-12-PRODUKTION IN MoDC NACH INFEKTION MIT MV – NACHWEIS DURCH INTRAZELLULÄRE FACS-FÄRBUNG	6-19
6.3.2	BESTIMMUNG VON IL-12p40 UND IL-12p70 PRODUZIERT VON MoDC NACH INFEKTION MIT MV UNTER VERSCHIEDENEN STIMULATIONSBEDINGUNGEN – NACHWEIS DURCH ELISA	6-20
6.3.3	WECHSELWIRKUNG VON MoDC MIT ALLOGENEN T-ZELLEN	6-21
6.3.4	MV-INFIZIERTE MoDC IN EINER „MIXED LEUKOCYTE REACTION“	6-23
6.3.5	AKTIVIERUNGSZUSTAND DER T-ZELLEN IN EINER ALLOGENEN MLR MIT MoDC	6-25
6.3.6	MV-INFIZIERTE MoDC INDUZIEREN KEINEN PROLIFERATIONSSINHIBITORISCHEN PHÄNOTYP IN NICHT-INFIZIERTEN MoDC	6-27
6.3.7	ZUGABE VON IL-12 KANN HEMMUNG DER MLR DURCH ED-B-INFIZIERTE MoDC NICHT AUFHEBEN	6-29
6.3.8	KINETIK DER T-ZELLPROLIFERATIONSSINHIBITION IN DER MLR	6-30
6.3.9	UV-INAKTIVIERTES ED-B HEMMT EINE ALLOGENE MLR	6-30
6.3.10	EINE MLR IST GEHEMT, WENN ALS APC MIT VIREN INFIZIERTE MoDC VERWENDET WERDEN, DIE DIE MV-GLYKOPROTEINE EXPRIEMIEREN	6-30
6.3.11	ED-B-INFIZIERTE MoDC KÖNNEN IN TRANS EINE PHA-STIMULIERTE T-PROLIFERATION HEMMEN, ABER NICHT MG/FV-INFIZIERTE MoDC	6-32
6.3.12	MV-INFIZIERTE MoDC HEMMEN EBENFALLS EINE SEA-INDUZIERTE T-ZELLPROLIFERATION	6-32

7 DISKUSSION **7-1**

8 LITERATURVERZEICHNIS **8-1**

9 ABKÜRZUNGEN **9-1**

10 VERÖFFENTLICHUNGEN **10-1**

10.1	PUBLIKATIONEN	10-1
10.2	VORTRÄGE	10-1
10.3	POSTERPRÄSENTATIONEN	10-2

11 LEBENS LAUF **11-1**

1 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß von Masernviren auf humane dendritische Zellen (DC) untersucht. Monozyten wurden durch Kultur in GM-CSF- & IL-4-haltigem Medium *in vitro* zu DC ausdifferenziert (MoDC). Die Infektionsversuche und funktionellen Tests fanden ebenfalls unter *in vitro*-Bedingungen statt. Das ED-B wurde als charakteristischer Vertreter der Vakzinevirusstämme verwendet, das WTF stellvertretend für die Wildtypstämme. Zusätzlich wurden noch weitere Vakzine- oder Wildtypviren sowie einige rekombinante Masernviren eingesetzt.

Alle eingesetzten Masernstämme konnten MoDC-Kulturen infizieren. Allgemein konnte beobachtet werden, daß die verwendeten, über die Zelllinie BJAB gezogenen Wildtypstämme einen stärkeren DC-Tropismus aufwiesen als die verwendeten Wildtyp- oder Vakzinestämme, die auf Verozellen passagiert worden waren. Dies zeigte sich vor allem in der schnelleren Infektionskinetik und dem Ausbilden eines deutlicheren CPE bei Infektion mit Wildtypstämmen. Generell war der MV-CPE in den MoDC-Kulturen durch die Bildung von Riesenzellen gekennzeichnet. MV-Infektionen waren nur bedingt produktiv, da kaum infektiöses Virus nachzuweisen war und die gefundenen Virustiter deutlich unter den zur Infektion eingesetzten Virusmengen lagen.

Als Reaktion auf eine Infektion produzieren Körperzellen proinflammatorische Zytokine, die die unspezifische Immunabwehr, aber auch die *in situ* vorliegenden DC-Populationen aktivieren und mobilisieren. Infizierte MoDC-Kulturen zeigten eine Aufregulation von kostimulatorischen und DC-typischen Aktivierungsmarkern. Hierbei konnte eine phänotypische Ausreifung sowohl der infizierten, aber auch der nicht-infizierten MoDC nachgewiesen werden. Somit wurde die Aktivierung der MoDC nicht nur direkt durch eine Infektion der einzelnen DC induziert, sondern auch durch indirekte Mechanismen, die auf nicht-infizierte MoDC wirken können. Mittels Zellkultureinsätzen konnte gezeigt werden, daß infizierte MoDC-Kulturen proinflammatorische Zytokine wie Typ I-Interferone und TNF- α produzieren und daß die Typ I-Interferone für die Aufregulation des kostimulatorischen CD86 direkt verantwortlich sind.

Die phänotypische Aktivierung der MoDC nach Infektion mit MV wurde jedoch nicht von einer erhöhten T-Zellaktivierungskapazität begleitet. Infizierte Kulturen zeigten trotz eines aktivierten Oberflächenphänotyps eine gehemmte allogene MLR, sowie einen hemmenden Einfluß auf eine PHA- oder SEA-stimulierte T-Zellproliferation. Es konnte gezeigt werden, daß diese Hemmung mit der Expression der MV-spezifischen Glykoproteine H und F korrelierte. Eine deutliche Hemmung trat erst auf, wenn ca. 25 % der MoDC die Glykoproteine exprimierten. Virale Replikation war für die Hemmung der T-Zellproliferation nicht notwendig, da UV-inaktiviertes Virus eine allogene MLR hemmen konnte. Rekombinante MV-Chimären, die keine funktionellen MV-Glykoproteine mehr exprimierten, infizierten weiterhin MoDC-Kulturen, diese waren aber in einer allogenen MLR aktiv. Somit kann das Modell der Kontakt-vermittelten Immunsuppression auch auf die Wechselwirkung zwischen einer T-Zelle und einer Masern-infizierten MoDC übertragen werden. Auch in diesem *in vitro*-Testsystem erwiesen sich die WTF-infizierten MoDC als stärker immunsuppressiv als die ED-B-infizierten.

DC sind *in vivo* die Hauptproduzenten von IL-12, das während der T-Zellaktivierung eine T_H1/T_H0 -Polarisierung hervorruft. Es konnte gezeigt werden, daß MV-infizierte MoDC weiterhin IL-12 produzieren können. Allerdings zeigten sich Stamm-spezifische Unterschiede. ED-B-infizierte MoDC produzierten verglichen mit nicht-infizierten MoDC stets deutlich geringere Mengen an IL-12 nach Stimulation mit LPS oder SAC. WTF induzierte durch eine Infektion ohne weitere Stimulation sowohl das immunmodulatorische IL-12p40 als auch das immunaktivierende IL-12p70. Durch LPS wurde dieser Effekt noch drastisch verstärkt, hingegen trat eine ebenso drastische Hemmung der IL-12-Produktion nach Stimulation mit SAC auf.

Durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß MV-infizierte MoDC über die Expression der MV-Glykoproteine eine Hemmung der T-Zellproliferation induzieren können. Allerdings könnten die infizierten MoDC auch immunmodulatorisch wirken, da sie Zytokine sezernieren (Typ I-Interferone und IL-12p70 nach WTF-, nur Typ I-Interferone nach ED-B-Infektion), die eine T_H1/T_H0 -polarisierende Wirkung besitzen. Ob in dieser Hinsicht ein qualitativer Unterschied zwischen WTF- und ED-B-infizierten MoDC-Kulturen besteht, müssen erst weitere *in vitro*-T-Zellpolarisierungsanalysen zeigen.

2 Summary

In the present study, the influence of measles virus on human dendritic cells was investigated. Culturing Monocytes in GM-CSF & IL-4 containing medium resulted in differentiation into DC *in vitro* (MoDC). Infections and functional assays were done *in vitro*. The measles virus ED-B was used as a typical representative of a vaccine strain, and WTF was used as a typical wildtype strain. Additionally, further vaccine and wildtype strains as well as some recombinant measles viruses were used.

All measles strains used were able to infect MoDC cultures. In general, those wildtype strains which were propagated using the cell line BJAB showed a stronger DC tropism compared to the wildtype or vaccine strains which were passaged on Vero cells. The wildtype viruses grown on BJAB cells showed faster infection kinetics and a pronounced CPE. In MoDC cultures, the CPE generally was characterized by the formation of giant cells. The MV infection was not really productive as only few infectious virus was detectable and the virus titers recovered remained clearly under the titers of the input virus.

As a reaction on infection cells start to produce proinflammatory cytokines which activate the unspecific immune system but also activates and mobilizes DC populations at the site of inflammation. Infected MoDC cultures showed upregulation of costimulatory and typical DC maturation markers. Phenotypical maturation of infected as well as uninfected MoDC was demonstrable. Thus, the activation of the MoDC culture was not induced by the infection of each single cell but was mediated by indirect mechanisms acting also on uninfected MoDC. Using cell culture inserts it was demonstrated that infected MoDC cultures produce proinflammatory cytokines like type I interferon and TNF- α and that the type I interferons were directly responsible for the upregulation of the costimulatory molecule CD86.

The phenotypical activation of MoDC was not accompanied by an increase in T cell stimulatory capacity after infection with MV. In spite of an activated cell surface phenotype, infected cultures showed an inhibited allogenic MLR as well as an inhibiting phenotype on SEA or PHA stimulated T cell proliferation. It was shown that this inhibition correlated with the expression of the measles virus glycoproteins H and F. A clear cut inhibition occurred only in the presence of MoDC of which about 25 % were positive for the glycoproteins. For inhibition of T cell proliferation viral replication was not necessary as UV inactivated virus could also inhibit an allogenic MLR. MoDC cultures infected with recombinant MV chimerae which do not express any functional MV glycoproteins but remained infective for MoDC were active in inducing a MLR. Thus, the model of contact mediated-immunosuppression could also be used for the interactions taking place between a T cell and a MV-infected MoDC. In this *in vitro*-assay system, again the WTF infected MoDC were more severe immunosuppressive than the ED-B infected ones.

In vivo, DC are the main source for IL-12 which induces a T_H1/T_H0 polarization during T cell activation. It was shown that MV infected MoDC could still produce IL-12 but with certain strain specific differences. ED-B infected MoDC always clearly secreted less IL-12 after stimulation with LPS or SAC compared with uninfected MoDC. Without any further stimulation, just the infection by WTF induced production of IL-12p40 as well as the bioactive IL-12p70. This effect was drastically enhanced by LPS but also completely inhibited after stimulation with SAC.

With the results of the present work it was shown that MV infected MoDC induce an inhibition of T cell proliferation via the expression of the MV glycoproteins. But the infected MoDC could act immunomodulatory as well because they secrete cytokines (type I interferon and IL-12p70 after WTF infection, type I interferon only after ED-B infection) which are known to possess a T_H1/T_H0 polarizing capacity. Future experiments analyzing *in vitro* T cell polarization must provide experimental data whether there exists a true qualitative difference in this regard between WTF and ED-B infected MoDC cultures.

3 Einleitung

Die akuten Masern sind eine hochansteckende Erkrankung, deren ätiologisches Agens das Masernvirus (MV) ist. Das Virus ist evolutionsgeschichtlich gesehen relativ jung und entstand vor ca. 4.000 bis 5.000 Jahren im Bereich des fruchtbaren Halbmonds oder im Indusgebiet. Möglicherweise entwickelte sich MV aus dem eng verwandten Rinderpestvirus (McNeill, 1976). Das Virus infiziert neben Menschen einige Primatenarten, jedoch ist der Mensch das natürliche Reservoir von MV. Nach anfänglicher Beteiligung der respiratorischen Epithelien breitet sich das Virus systemisch aus und infiziert vor allem Zellen des retikuloendothelialen Systems und die Leukozyten des Immunsystems (Riley *et al.*, 1978; Esolen *et al.*, 1993; Ruckle und Rogers, 1957). Eine Maserninfektion löst eine effiziente und protektive Immunantwort aus, die zu einer lebenslangen Immunität führt (Panum 1938). Begleitet wird die Erkrankung von einer generellen Immunsuppression, die in erster Linie Funktionen der T-Zellimmunantwort betrifft (von Pirquet 1908). Neben den MV-assoziierten Komplikationen kann es aufgrund dieser Immunsuppression zu bakteriellen oder viralen Superinfektionen kommen. Besonders in Verbindung mit mangelnder medizinischer Versorgung und Hygiene führt dies zu einer erhöhten Sterblichkeitsrate (Beckford *et al.*, 1985).

Die Grundlagen der MV-assoziierten Immunsuppression sind noch weitgehend ungeklärt. Da vor allem eine Störung der T-Zellimmunantwort zu beobachten ist, könnte das MV auch über Infektion der APCs („antigen presenting cells“) und/oder Interferenz mit deren Funktion eine Immunsuppression bedingen.

3.1 Biologie des Masernvirus

3.1.1 Aufbau des Masernpartikels, Replikation und Transkription

Das MV ist ein Mitglied der Familie der Paramyxoviridae aus dem Genus der Morbilliviridae (siehe zur Übersicht **Bild 3–1 A.** und **B.**). Das membranumhüllte Viruspartikel mit einer Größe von 100 bis 250 nm und pleomorpher Gestalt besteht aus den sechs Strukturproteinen H (Hämagglutinin), F (Fusionsprotein), M (Matrixprotein), N (Nukleoprotein), P (Phosphoprotein; kleine Untereinheit der RNS-abhängigen RNS-Polymerase) und L (Large; große Untereinheit der RNS-abhängigen RNS-Polymerase) sowie einer unsegmentierten, einzelsträngigen RNS negativer Polarität.

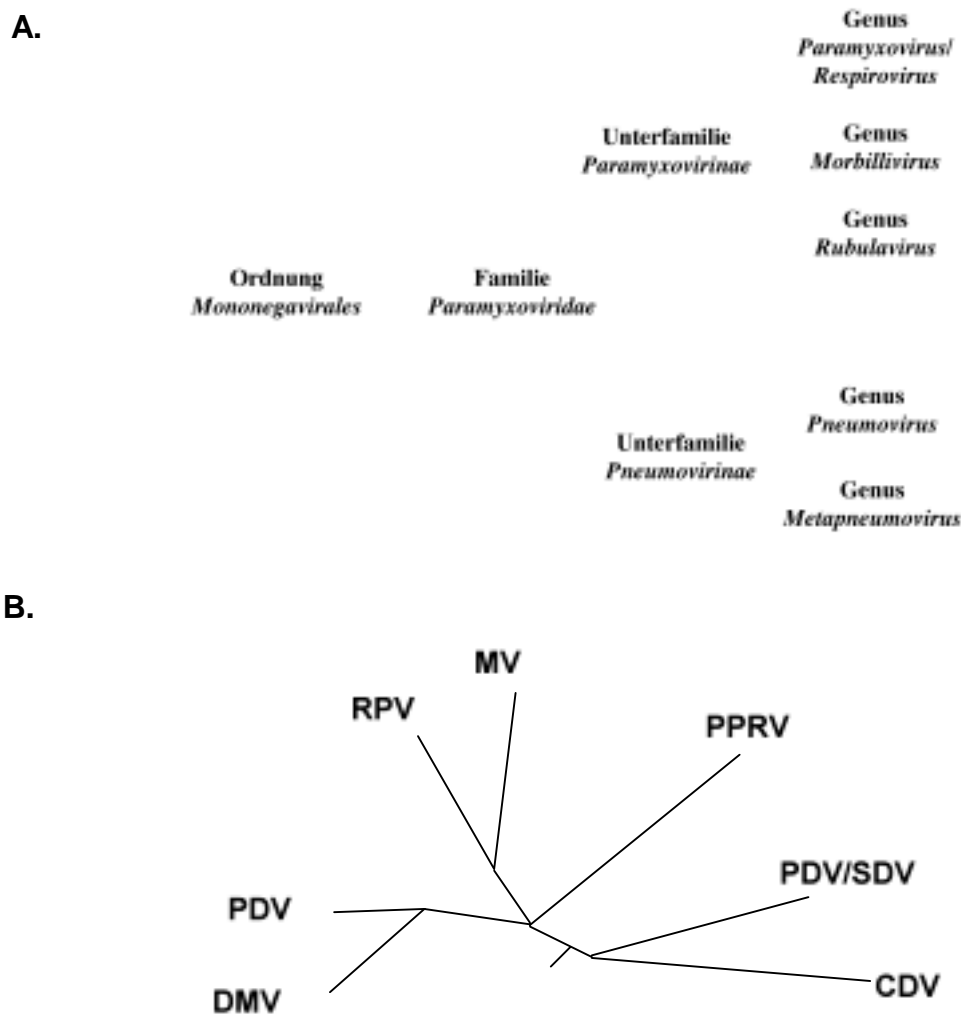


Bild 3–1 Überblick über Taxonomie und Verwandtschaftsverhältnisse des MV innerhalb der Mononegavirales.

A. Übersicht über die Taxonomie der Ordnung Mononegavirales und speziell der Familie der Paramyxoviridae. Das MV ist ein Mitglied des Genus der Morbilliviren innerhalb der Unterfamilie der Paramyxovirinae. B. Verwandtschaftsverhältnisse der Morbilliviren. MV Masernvirus; CDV canine distemper virus; DMV dolphine morbilli virus; PPRV peste-des-petits-ruminants virus; PDV/SDV phocine/seal distemper virus; PDV porpoise distemper virus; RPV Rinderpestvirus.

Die RNS bildet mit dem N-Protein das Nukleokapsid, an das die RNS-abhängige RNS-Polymerase L und das P-Protein assoziiert sind. Wahrscheinlich über das M-Protein, das sich an der Innenseite der Virusmembran anlagert und zumindest mit dem glykosylierten Transmembranprotein F interagiert (Cathomen *et al.*, 1998), ist das Nukleokapsid mit der Hüllmembran verbunden (Wild und Buckland, 1995; Griffin und Bellini, 1996). Eine schematische Übersicht über den Aufbau des MV-Virions bietet **Bild 3–2**.

Die viralen Hüllproteine, das H- und das F-Protein, sind beide an der Fusion der viralen Hüllmembran mit der zellulären Zielmembran beteiligt (Wild *et al.*, 1991). Das H-Protein bildet Tetramere, bestehend aus zwei Homodimeren, die über Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind (Hu *et al.*, 1995). Das F-Protein wird als F₀-Vorläuferprotein exprimiert, das im *trans*-Golgi-Kompartiment durch Furin gespalten wird (Watanabe *et al.*, 1995). Durch diese enzymatische Aktivierung entsteht eine transmembrane F₁-Untereinheit, die über eine Disul-

fidbrücke mit der freien F₂-Untereinheit verbunden ist. Der funktionelle F₁/F₂-Komplex wird als Homotrimer auf der Oberfläche infizierter Zellen exprimiert und in das Virion eingebaut (Russel *et al.*, 1994; Joshi *et al.*, 1998). Die Funktion des H-Proteins besteht hauptsächlich in der Bindung an den viralen Rezeptor, der für die Vakzinestämme als CD46 (Naniche *et al.*, 1993; Doerig *et al.*, 1993) bzw. für die Wildtypstämme als CD150 identifiziert wurde (Tatsuo *et al.*, 2000). Durch die Bindung des H-Proteins an den zellulären Rezeptor erfolgt wahrscheinlich eine Konformationsänderung des oligomeren H/F-Komplexes, die eine starke räumliche Veränderung des F-Proteins hervorruft. Der anschließende, durch das F-Protein vermittelte Fusionsprozeß der viralen Hüllmembran mit der zellulären Plasmamembran (zusammengefaßt in Joshi *et al.*, 1998, sowie Samuel und Shai, 2001) führt dazu, daß das Nukleokapsid in das Zytoplasma der Zelle gelangt.

Die enkapsidierte RNS wird nun von der RNS-abhängigen viralen RNS-Polymerase, einem Komplex aus dem L- und dem P-Protein im Zytoplasma der infizierten Zelle transkribiert und repliziert (zusammengefaßt in Horikami und Moyer, 1995). Das MV-Genom kodiert neben den sechs Strukturproteinen für mindestens zwei weitere, in infizierten Zellen zu findende Nichtstrukturproteine, das C- und das V-Protein, die im P-Gen kodiert sind. Das RNS-Genom des MV zeigt die Genanordnung 3'-N-P(C/V)-M-F-H-L-5' (siehe zur Übersicht **Bild 4-1**). Die Transkription startet durch Bindung an die als Promotor für die RNS-Polymerase dienende 3'-*leader*-Region (Crowley *et al.*, 1988). In den intergenischen Regionen, die sich sowohl zwischen den einzelnen Genen als auch nach der 3'-*leader*- bzw. vor der 5'-*trailer*-Region befinden, fällt die Polymerase vom Nukleokapsid ab und beginnt an der folgenden Initiationssequenz innerhalb der intergenischen Sequenz vor dem nächsten Gen erneut mit der Transkription der viralen mRNS (Crowley *et al.*, 1988). Mit zunehmender Entfernung von der 3'-*leader*-Region nimmt die Häufigkeit der Reinitiation der Transkription am folgenden Gen ab, so daß ein Transkriptionsgradient entsteht, über den wahrscheinlich auch die Häufigkeit der einzelnen Proteine in der infizierten Zelle festgelegt ist (Cattaneo *et al.*, 1987; Schneider-Schaulies *et al.*, 1989).

Die innerhalb des P-Gens kodierten weiteren Proteine C und V entstehen entweder durch Verwendung eines anderen Leserasters innerhalb der P-mRNS (C-Protein) (Bellini *et al.*, 1985) oder durch *mRNS-Editing* (V-Protein). Während des *mRNS-Editing* fügt die virale RNS-Polymerase innerhalb einer konservierten Sequenzabfolge ein G ein, so daß eine Leserasterverschiebung auftritt (Cattaneo *et al.*, 1989). Sowohl dem C- als auch dem V-Protein werden regulatorische Funktionen während der viralen Transkription und Replikation zugeschrieben. Für eine effiziente Infektion von PBMC *in vitro* wird das C-Protein von ED-B benötigt (Escoffier *et al.*, 1999), allerdings spielt es bei der MV-Replikation in Zelllinien keine Rolle (Radecke und Billeter, 1996). *In vivo*-Daten zeigen, daß das Fehlen des C-Proteins zu einem milden Krankheitsverlauf führt (Patterson *et al.*, 2000). Das V-Protein scheint *in vivo* über Regulation der RNS-Transkription und -Replikation die Ausbreitung in der Lunge von Baumwollratten (Tober *et al.*, 1998) und die Pathogenität in intracranial infizierten Mäusen zu steuern (Patterson *et al.*, 2000). Zudem konnte in einem SCID/hu-Mausmodell ein milderer Infektionsverlauf einer MV V-Rekombinanten im Vergleich zum Ausgangsvirusstamm im transplantierten humanen Thymus- und Lebergewebe gezeigt werden (Valsamakis *et al.*, 1998).

Möglicherweise nach Erreichen einer kritischen Konzentration an freien N/P-Komplexen im Zytosol der infizierten Zelle, die nicht an virale RNS gebunden sind, schaltet die virale RNS-Polymerase von Transkription auf Replikation um. Die Polymerase ignoriert die Abbruchsignale in den intergenischen Regionen und generiert eine komplette virale RNS positiver Polarität. Diese wird von den N-Proteinen enkapsidiert und dient als Vorlage für die Er-

stellung der einzelsträngigen und nicht-segmentierten viralen Genom-RNS negativer Orientierung, die von N-Proteinen umhüllt in reifende Viruspartikel eingebaut wird (zusammengefaßt bei Lamb und Kolakofsky, 1996).

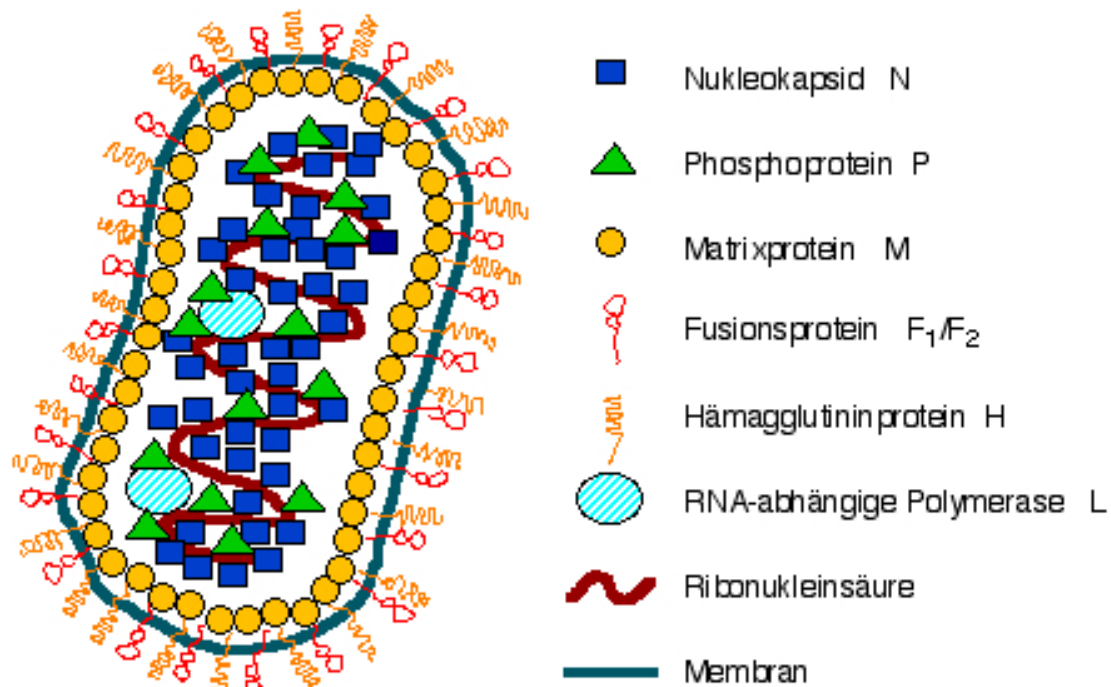


Bild 3-2 Schematische Übersicht über den Aufbau des Masernpartikels und die beteiligten Strukturproteine

Das Masernvirus ist ein membranumhülltes Virus. Die Membran entstammt der Plasmamembran der Wirtszelle, in die sich während der Replikation des Virus die membranständigen Proteine H und F einlagern. Der H/F-Komplex rekrutiert wahrscheinlich über das M-Protein das Nucleokapsid, an das weitere Proteine, nämlich das L- und das P-Protein gebunden sind, und wird so in das naszierende Viruspartikel gezogen.

3.1.2 Klinisches Bild einer Maserninfektion

Die Übertragung des MV erfolgt über Tröpfcheninfektion mit anschließender primärer Replikation des Virus in den Epithelien des unteren Respirationstrakts (Riley *et al.*, 1978). Vermutlich über Infektion von Leukozyten (Nakayama *et al.*, 1995; Esolen *et al.*, 1993), in denen während der ersten zwei Wochen nach einer MV-Infektion sowohl RNS (Schneider-Schaulies *et al.*, 1991) als auch die Expression von MV-Proteinen nachweisbar ist (Hyypiä *et al.*, 1985) breitet sich das Virus in lokale Lymphorgane aus, in denen sich das Virus stark vermehrt. Durch die folgende primäre Virämie kommt es zu einer systemischen Ausbreitung des MV, wobei Zellen des retikuloendothelialen Systems fast aller Organe infiziert werden (Ruckle und Rogers, 1957). Mit der folgenden sekundären Virämie erreicht das Virus Zellen der peripheren Endothelien und der Epithelien. Zu diesem Zeitpunkt, ca. 10 bis 12 Tage nach der Infektion, setzt eine starke zelluläre Immunantwort gegen MV und infizierte Zellen ein. Aufgrund einer mononukleären Infiltration können jetzt weißliche bis gräuliche Makula, die sogenannten Koplikschen Flecken im Rachenraum beobachtet werden (Koplik, 1896). Späte

Phasen der Virämie zeigen zudem eine periphere Leukopenie (Sergiev *et al.*, 1960). Mit Nachlassen des Enanthems im Rachenraum, etwa 12 bis 14 Tage nach der initialen Infektion, erfolgt ein innerhalb weniger Tage den ganzen Körper erfassender makulopapulärer Ausschlag. Dieses MV-charakteristische Exanthem wird durch Infektion der die Dermis versorgenden Endothelzellen mit anschließender Infektionsausbreitung auf die Zellen der Dermis und Epidermis hervorgerufen (Denton, 1925). Mit Einsetzen der zellulären Immunantwort in der Peripherie kommt es zur Bildung des Ausschlags an Orten der MV-Infektion der Epidermis und Dermis (Sergiev *et al.*, 1960). Nach Abklingen der Krankheitssymptome bleibt eine lebenslange MV-spezifische zelluläre und humorale Immunität zurück, die vor MV-Reinfektionen schützt. Eine MV-Übertragung auf andere Personen erfolgt vor Auftreten des typischen Ausschlags, da zu diesem Zeitpunkt Virus aus den Schleimhäuten des Nasenrachenraums und des Mundes sowie der Bindehaut des Auges isoliert werden kann (Enders, 1962).

In industrialisierten Ländern sind etwa 10% aller akuten MV-Infektionen mit Komplikationen verbunden, in Entwicklungsländern bis zu 80%. Daraus resultiert auch die hohe Mortalitätsrate gerade in Entwicklungsländern bei Kindern mit akuten Masern. Weltweit erkranken jährlich ca. 40 Millionen Menschen und ca. 1 Millionen dieser Patienten, vor allem Kinder, sterben an den Folgen einer Maserninfektion (Clements und Cutts, 1995). Die bei Masern zu beobachtenden akuten Komplikationen können sich direkt aus der Infektion durch das MV ergeben. So ruft MV gerade bei unterernährten oder immunsupprimierten Kindern Lungenentzündungen hervor (Mitus *et al.*, 1959). Neben Pneumonien werden auch Diarrhoeen, Bronchitiden, Otitis media, Stomatiden und Enzephalitiden als Komplikationen bei akuten Masern beobachtet. Gründe für diese Komplikationen sind einmal Infektionen der Gewebe durch MV (Pneumonien, Diarrhoeen, Otitis media) bzw. eine durch die MV-Infektion ausgelöste Autoimmunreaktion gegen das basische Myelinprotein (Enzephalitiden) oder Superinfektionen durch Viren oder Bakterien (siehe zur Übersicht Clements und Cutts, 1995). Das Auftreten von bakteriellen oder viralen Superinfektionen wird durch die MV-assoziierte Immunsuppression begünstigt, die vor allem Funktionen der zellulären Immunantwort hemmt (besprochen unter **3.1.4**).

3.1.3 Immunantwort während einer Maserninfektion

Zu Beginn einer Infektion setzt das Immunsystem gegen Pathogene zuerst unspezifische Abwehrmechanismen ein. Durch Chemokine und proinflammatorische Zytokine werden an den Ort der Entzündung phagozytierende Zellen (Granulozyten, Makrophagen, Dendritische Zellen (DC)) sowie natürliche Killerzellen (NK-Zellen) gelockt und aktiviert. Gerade bei Infektionen mit RNS-Viren wird Typ I-Interferon (IFN) freigesetzt, daß in infizierten und nicht-infizierten Zellen einen antiviralen Status induzieren kann (zusammengefaßt bei Stark *et al.*, 1998). Möglicherweise werden durch MV während einer akuten Maserninfektion diese Arme der unspezifischen Immunabwehr beeinflußt. Die Reaktivität von NK-Zellen bei akuten Masern scheint reduziert zu sein (Griffin *et al.*, 1990a). Desweiteren existieren widersprüchliche Daten über die Induktion von IFN nach Vakzinierung oder während akuter Masern (Petralli *et al.*, 1965; Crespi *et al.*, 1988; Shiozawa *et al.*, 1988; Tilles *et al.*, 1987). Die Bedeutung der APC (Makrophagen, DC) während der MV-Immunantwort werden unter **3.1.4** besprochen.

Der Beginn der klinischen Symptome einer MV-Infektion stimmt mit dem Einsetzen der spezifischen Immunantwort überein. Allgemein scheint die T-Zell-basierende Immunantwort gegenüber der B-Zell-basierenden für die Beherrschung der MV-Infektion von größerer Bedeutung zu sein. Patienten mit angeborener Agamma- oder Hypogammaglobulinämie zeigen einen deutlich mildereren Krankheitsverlauf als Patienten mit einer angeborenen oder erworbenen T-Zellimmundefizienz (Good und Zak, 1956). Mit Beginn des Exanthems werden erhöhte

Plasmawerte an löslichen T-Zellplasmamembranproteinen (sCD4, sCD8, sCD25, β -2-Mikroglobulin) gefunden (Griffin *et al.*, 1992; Griffin *et al.*, 1990b; Griffin *et al.*, 1989), einhergehend mit einer starken zytotoxischen Reaktion der CD8⁺-T-Zellen (van Binnendijk *et al.*, 1990). Bereits vor Einsetzen des Ausschlags steigt der Plasmaspiegel an IFN- γ an, gefolgt von IL-2 (Griffin *et al.*, 1990b). Nach Abklingen des Ausschlags steigen die Plasmawerte für IL-4 an (Griffin und Ward, 1993) und bleiben für einige Wochen erhöht. Dieser Wechsel der vorherrschenden Zytokine im Plasma könnte ein Indiz für einen Wechsel der Polarisierung der MV-spezifischen Immunantwort sein. Mit Beginn der Immunreaktion gegen MV wird eine T_H1-Polarisierung gefunden, die unter anderem die zelluläre Reaktion gegen MV unterstützt, zum Ende der akuten Masern mit nachlassendem Ausschlag findet man T_H2-typische Zytokine (zusammengefaßt bei Griffin, 1995). Dieses Bild des Wechsels in der Polarisierung der T-Zellantwort ist allerdings umstritten (besprochen bei Schnorr *et al.*, 2001; zusammengefaßt bei Schneider-Schaulies *et al.*, 2001).

Die humorale MV-spezifische Immunantwort setzt ebenfalls während des Exanthems ein. Sie ist charakterisiert durch das Auftreten von Immunglobulin (Ig) G₁ und IgG₄ (Mathiesen *et al.*, 1990). Möglicherweise helfen die MV-spezifischen Antikörper (AK) bei der endgültigen Eliminierung MV-infizierter Zellen und schützen langfristig vor Reinfektionen mit MV (Varsanyi *et al.*, 1984; Black, 1989). Unter den MV-Proteinen ist das N-Protein das immunogenste, gefolgt von MV-H und -F, die neutralisierende AK induzieren (Graves *et al.*, 1984).

3.1.4 Masern-assoziierte Immunsuppression

Bereits 1908 beobachtete von Pirquet ein Ausbleiben einer Tuberkulinreaktion bei Patienten mit akuten Masern (von Pirquet, 1908; Tamashiro *et al.*, 1987). Neben dem Fehlen einer DTH (delayed type hypersensitivity)-Reaktion können *in vivo* aber auch *ex vivo* andere Anomalien der T-Zellimmunantwort beobachtet werden. T-Lymphozyten proliferieren als Reaktion auf Antigene, Mitogene oder Allogene kaum oder nicht mehr (Greenstein und McFarland, 1983). Die zu beobachtende periphere Leukopenie betrifft zu gleichen Teilen CD4⁺- wie CD8⁺-T-Zellen (Arneborn und Biberfeld, 1983).

Ex vivo kann in allen Populationen der PBMC während einer akuten Masern mittels PCR („polymerase chain reaction“) Maserngenom nachgewiesen werden (Nakayama *et al.*, 1995), auch wenn in früheren Arbeiten nur in der Monozytenfraktion MV gefunden werden konnte (Esolen *et al.*, 1993). *In vitro* sind ebenfalls alle mononukleären Zellen des peripheren Bluts mit MV infizierbar (Vainionpää *et al.*, 1991; Joseph *et al.*, 1975). Myeloide Zellen zeigen abhängig von ihrem Differenzierungsstatus eine restringierte MV-Replikation. So ist eine MV-Infektion in Monozyten oder Makrophagen nicht produktiv (Helin *et al.*, 1999), allerdings scheinen Monozyten die einzigen PBMC zu sein, in denen MV ohne Aktivierung durch Mitogene wie PHA (Phytohämagglutinin) nach Infektion nachweisbar ist (Salonen *et al.*, 1988). Die restringierte Infektion der Monozyten durch MV mag auch durch die antivirale Wirkung von MxA erklärt werden können (Schnorr *et al.*, 1993). Hingegen findet man nach PHA-Stimulation (Hyypiä *et al.*, 1985) oder Stimulation mit TPA (12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat) und A23187 (Vainionpää *et al.*, 1991) Virusreplikation und Freisetzung infektiösen Virus aus T- und B-Zellen. Nach Infektion der Monozyten durch MV produzierten diese mehr Interleukin (IL)-1 β , aber weniger TNF (Tumornekrosefaktor)- α verglichen mit nicht-infizierten Monozyten (Leopardi *et al.*, 1992). Zusätzlich zeigen MV-infizierte Monozyten eine erhöhte MHC („major histocompatibility complex“) Klasse II-Expression, die allerdings nicht mit einer erhöhten Antigenpräsentation korreliert (Leopardi *et al.*, 1993).

Die Bedeutung dieser Befunde für die MV-assoziierte Immunsuppression sind allerdings unklar. So ist die Frequenz der infizierten PBMC sehr niedrig (Esolen *et al.*, 1993; Schneider-Schaulies *et al.*, 1991), die zu beobachtende Hemmung der Proliferation *ex vivo* nach Stimulation mit Mitogenen betrifft aber infizierte wie nicht-infizierte Zellen, so daß funktionelle Störungen nicht ausschließlich auf einer Infektion der PBMC („peripheral blood mononuclear cells“) beruhen können, sondern sehr wahrscheinlich auch über indirekte Mechanismen vermittelt werden.

3.1.5 Modelle der MV-induzierten Immunsuppression *in vitro*

Für die *in vivo* und *ex vivo* zu beobachtende Hemmung der T-Zellproliferation nach Stimulation mit Mitogenen, Antigenen oder Allogenen wurden basierend auf *in vivo*-, *ex vivo*- und *in vitro*-Daten vier Modelle der MV-induzierten Immunsuppression entwickelt. Zum einen wird ein löslicher, immunsuppressiver Faktor postuliert. Dieser Faktor wird sowohl von MV-infizierten B-Zellen als auch von T-Zellen produziert und hemmt die Proliferation nicht-infizierter Zellen. Eine genauere Charakterisierung oder Identifizierung dieses Faktors gelang jedoch nicht (Fujinami *et al.*, 1998; Sun *et al.*, 1998).

Die während einer akuten Masern zu beobachtende Abfolge verschiedener erhöhter Zytokinwerte im Plasma sowie das Ausbleiben von T_{H1} -abhängigen zellulären Immunantworten (siehe 3.1.3) führte zu der Hypothese, daß eine MV-Infektion einen Wechsel der Polarität der T-Zellantwort von T_{H1} nach T_{H2} induziert (dargestellt bei Griffin, 1995). Dies soll zu einer erhöhten Empfänglichkeit der Patienten gegenüber viralen und bakteriellen Superinfektionen führen, gegen die das Immunsystem aufgrund der MV-bedingten gestörten zellulären Immunabwehr keine geeigneten T_{H1} -unterstützten Antworten ausbilden kann. Als molekulare Grundlage für dieses MV-induzierte Zytokinungleichgewicht wird eine Hemmung der IL-12-Sekretion durch Monozyten angegeben, die durch Bindung der viralen Glykoproteine an den Vakzinestammrezeptor CD46 hervorgerufen wird (Karp *et al.*, 1996).

Zum anderen soll eine Infektion von T-Zellen in diesen einen Proliferationsblock induzieren, so daß diese nicht mehr auf Antigene, Allogene oder Mitogene reagieren können. Diese Blockade ist durch einen Arrest in der G_0/G_1 -Phase des Teilungszyklus gekennzeichnet (McChesney *et al.*, 1988; Nanche *et al.*, 1999).

Möglicherweise geht die bei akuten Masern zu beobachtende periphere Lymphopenie mit einer Depletion des T-Zellkompartiments einher. Dies könnte zu Störungen der zellulären Immunantwort führen. So konnten Okada und Kollegen zeigen, daß PBMC von Patienten mit akuten Masern *ex vivo* eine erhöhte Apoptoserate zeigen (Okada *et al.*, 2000). In einem SCID-Mausmodell mit transplantiertem humanem Thymusgewebe wurde nachgewiesen, daß MV die Epithelien des Thymus infiziert, was zu einer Apoptose der Thymozyten führt (Auwaerter *et al.*, 1996). Diese Effekte würden die zu beobachtende Leukopenie während der späten Phase der akuten Masern erklären, liefern aber keine Erklärung für das Ausbleiben einer T-Zellproliferation als Antwort auf Mitogene oder Allogene.

Nach dem Modell der Kontakt-vermittelten Immunsuppression ist bereits der Kontakt mit infizierten Zellen ausreichend, um ein dominant-inhibitorisches Signal zu generieren, das jegliche weitere Stimulation der kontaktierten Zellen blockiert (Sanchez-Lanier *et al.*, 1988; Yanagi *et al.*, 1992). Für die Übertragung dieses Signals reicht der Kontakt mit den viralen Glykoproteinen H und F aus, eine Infektion der Zelle ist nicht notwendig (Schlender *et al.*, 1997; Weidmann *et al.*, 2000b). Die kontaktierte Zelle zeigt einen Arrest vom Übergang aus der G_0/G_1 - in die S-Phase des Zellzyklus, was durch eine MV-induzierte Deregulation der Zellzyklusproteine charakterisiert ist (Schnorr *et al.*, 1997a; Engelking *et al.*, 1999). Ein durch

Maserninfektion bedingter Zellzyklusarrest nicht-infizierter PBMC kann auch *in vivo* in einem Kleintiermodell einer MV-Infektion gezeigt werden (Niewiesk *et al.*, 1999).

3.2 DC-Biologie

Dendritische Zellen scheinen funktionell von einem unreifen Zustand in einen aktivierten oder reifen Zustand wechseln zu können. Entsprechend den gängigen Modellen über die *in vivo*-Funktion von DC überwachen die unreifen DC in peripheren Geweben ihre Umgebung. Sie zeigen einen nicht-aktivierten Phänotyp mit geringer T-Zell-stimulatorischer Kapazität, aber hoher Phagozytose- und Endozytoseaktivität. Findet eine Gewebeverletzung oder eine Infektion statt, so werden von den Geweben oder den infizierten Zellen proinflammatorische Zytokine und Chemokine freigesetzt. Diese rekrutieren Leukozyten, unter anderem auch lokal vorhandene DC zum Ort der Infektion und es bildet sich eine Entzündung aus. Zusätzlich werden in einer inflammatorischen Situation wahrscheinlich Monozyten aus dem Blutstrom zum Ort einer Infektion über Chemokine und/oder proinflammatorische Zytokine rekrutiert. Kommt es im Anschluß zu einer erneuten Migration der Monozyten aus dem Gewebe in das Endothellumen, so differenzieren die transmigrierten Monozyten zu DC aus (Randolph *et al.*, 1998). In der Umgebung der Entzündung reifen die DC aus, d.h., sie verlieren ihre hohe Endozytosekapazität, exprimieren typische DC-Aktivierungsmarker (MHC II^{hi}, CD80, CD86 etc.) und prozessieren die aufgenommenen Antigene. Parallel zu diesen Vorgängen verlassen die aktivierten DC das periphere Gewebe und wandern in die T-Zell-reichen Regionen der lokalen Lymphgewebe ein. Dort präsentieren sie im Kontext von MHC-Produkten einen repräsentativen Ausschnitt an antigenen Peptiden. Diese Peptide wurden aus Antigenen generiert, die nach Kontakt mit proinflammatorischen Zytokinen, also zum Zeitpunkt der DC-Ausreifung, von den DC aufgenommen worden waren. Aufgrund der herausragenden Ausstattung mit T-Zell-kostimulatorischen Molekülen sind die DC als einzige APC in der Lage, sowohl Gedächtnis-Antworten als auch Immunreaktionen naiver T-Zellen zu induzieren und die Polarisierung der beginnenden T-Zellantwort zu beeinflussen (zusammengefaßt bei Banchereau und Steinman, 1998; Knight und Patterson, 1997; Steinman, 1991; eine Übersicht bietet **Bild 3–5**).

3.2.1 DC-Abstammung *in vivo* und *in vitro*-Modelle der DC-Generierung

DC-Populationen zeigen *in vivo* ein heterogenes Bild, gekennzeichnet durch unterschiedliche Entwicklungslinien und daraus resultierenden DC-Populationen mit verschiedenen Effektorfunktionen (zusammengefaßt in Banchereau und Steinman, 1998; Grabbe *et al.*, 2000). Prinzipiell entstehen DC aus hämatopoietischen Vorläuferzellen des Knochenmarks oder des peripheren Bluts. Die entstehenden DC werden in zwei große DC-Linien unterschieden, myeloide und lymphoide DC, deren Entwicklungslinien in **Bild 3–3** zusammengefaßt sind.

Lymphoide DC entwickeln sich wahrscheinlich aus CD11c⁻-Vorläufern des peripheren Bluts. Diese Vorläuferzellen sind identisch mit den sogenannten IPC („interferon-producing cells“). IPC oder plasmazytoide T-Zellen / plasmazytoide Monozyten (Müller-Hermelink *et al.*, 1983) vermögen über HEVs („high endothelial venules“) in sekundäre Lymphorgane direkt aus dem Blut einzuwandern und produzieren als Antwort auf Viren nach Infektion oder Bindung an virale Glykoproteine große Mengen an IFN (Kadowaki *et al.*, 1998; Cella *et al.*, 1999a). In den Lymphorganen differenzieren die IPC zu immunkompetenten, die T-Zellproliferation stimulierenden DC aus (Siegal *et al.*, 1997; Grouard *et al.*, 1997). Entsprechend ihres Stimulations- und Aktivierungsstatus scheinen diese lymphoiden DC über die Freisetzung von

Zytokinen das Milieu für die T-Zellpolarisierung zu regulieren (Cella *et al.*, 1999a; Cella *et al.*, 2000; Kadowaki *et al.*, 2000).

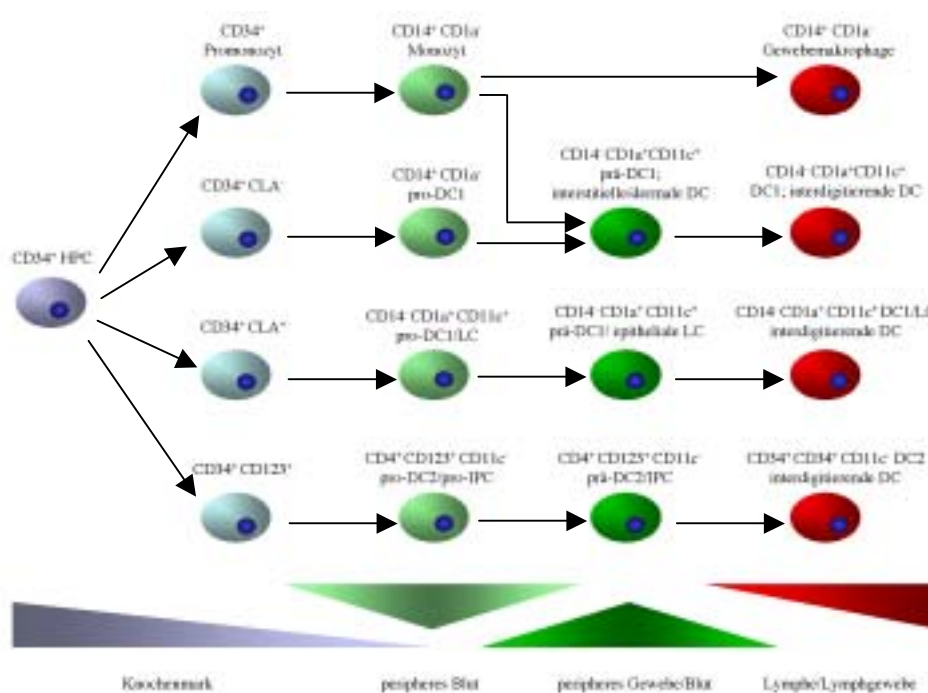


Bild 3–3 Schematische Darstellung der myeloiden und lymphoiden DC-Entwicklung

Ausgehend von einem gemeinsamen Vorläufer im Knochenmark ($CD34^+$ HPC) entwickeln sich aus verschiedenen Vorstufen myeloide (interstitielle/dermale DC, epitheliale LC) oder lymphoide DC-Populationen (IPC), die als unreife APC in der Peripherie oder im peripheren Blut zu finden sind. Entzündungen oder Infektionen mobilisieren die unreifen DC, sie werden aktiviert und wandern unter Ausbildung eines reifen Phänotyps in die lokalen Lymphgewebe ein. Dort aktivieren sie als reife DC-Populationen (interdigitierende DC/LC) die Zellen der adaptiven Immunabwehr, die T- und B-Zellen

Die myeloiden DC-Vorläufer entwickeln sich zu $CD11c$ -exprimierenden DC-Populationen, die wahrscheinlich über das Blut die peripheren Gewebe und Organe infiltrieren und ein Netz aus unreifen DC in diesen Geweben aufbauen. Zu diesen unreifen DC sind wahrscheinlich die Langerhans-Zellen (LC) in der Epidermis zu zählen, sowie die in der Dermis und die mit der Mukosa-assoziierten interstitiellen DC in Darm- und Lungenepithelien, sowie eine $CD11c$ -exprimierende DC-Population im peripheren Blut (Cella *et al.*, 1999a; Caux, 1998). Nach Infektion oder Kontakt mit Erregern oder nach Aktivierung durch proinflammatorische Zytokine verlassen diese unreifen myeloiden DC die Peripherie und wandern über die afferente Lymphe in die lokalen drainierenden Lymphgewebe ein und werden nun als interdigitierende DC bezeichnet. Während dieser Migration in die T-Zell-reichen Areale der Lymphorgane reifen die myeloiden DC aus und erwerben einen funktionellen Phänotyp mit hoher T-Zell-stimulatorischer Kapazität (Banchereau und Steinman, 1998). *In vitro* lassen sich myeloide DC durch Kultur aus $CD34^+$ -Vorläuferzellen oder $CD14^+$ -Monozyten in geeigneten Differenzierungsmedien generieren (Caux *et al.*, 1996; Romani *et al.*, 1996).

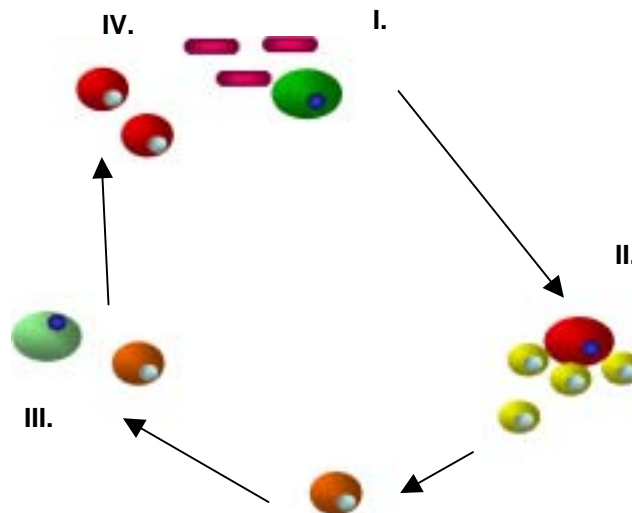


Bild 3–4 Schematischer Überblick über die Rolle myeloider DC/LC in der Generierung von antigenspezifischen Immunantworten

I. Unreife DC werden in der Peripherie durch eingedrungene Pathogene, deren Produkte oder durch Zytokine infizierter Zellen zusammen mit anderen Zellen der unspezifischen Immunantwort angezogen und nehmen Antigene auf. Gleichzeitig werden die DC durch die Entzündungssituation aktiviert. **II.** Die aktivierten DC verlassen den Infektionsort über die afferente Lymphe und gelangen in die lokalen drainierenden Lymphgewebe. Dort stimulieren sie antigenspezifisch die Proliferation und Differenzierung von Effektorzellen (T- und B-Zellen) und die Generierung von Gedächtniszellen. **III.** Die Effektorzellen verlassen das lymphatische Gewebe über den Blutstrom und zirkulieren zum Ort der Infektion. Weitere unreife DC/Monozyten können aus dem Blut in das entzündete Gewebe einwandern. **IV.** Über aktivierte Endothelzellen dringen die Effektorzellen der spezifischen zellulären Immunantwort zum Ort der Infektion vor und eliminieren das Pathogen.

3.2.2 DC und die Polarisierung von T-Helferzellantworten

Wie bereits unter 3.2.1 aufgeführt, handelt es sich bei DC um eine heterogene Zellpopulation entweder myeloiden oder lymphoiden Ursprungs. Den beiden DC-Populationen wurden verschiedene Fähigkeiten zugestanden, die Polarisierung der T-Zellen während der DC-T-Zellinteraktion zu kontrollieren. So sollten im humanen System myeloide DC T_H1 -Immunantworten und lymphoide DC T_H2 -Immunantworten induzieren und wurden entsprechend als DC1 oder DC2 bezeichnet (Rissoan *et al.*, 1999; zusammengefasst in Reid *et al.*, 2000). Dieses Konzept einer starren Limitierung der myeloiden und lymphoiden DC auf einen T_H1 - oder T_H2 -induzierenden Phänotyp kann allerdings nicht alle Befunde erklären. Entsprechend den Ausreifungsbedingungen der Vorläuferzellen können *in vitro* gezielt myeloide DC1 oder DC2 generiert werden. Gleiches gilt für die als DC2 bezeichneten IPC, die entsprechend ihrer Aktivierung oder nach einer Virusinfektion eine T_H2 - oder eine T_H1/T_H0 -Antwort auslösen können. Welcher Typ einer T-Zellantwort letztlich ausgelöst wird, hängt somit nicht nur von der DC-Population ab, sondern auch von der Art und dem Zeitpunkt der DC-Aktivierung (zusammengefasst in Lanzavecchia und Sallusto, 2001 und in **Bild 3–5** dargestellt).

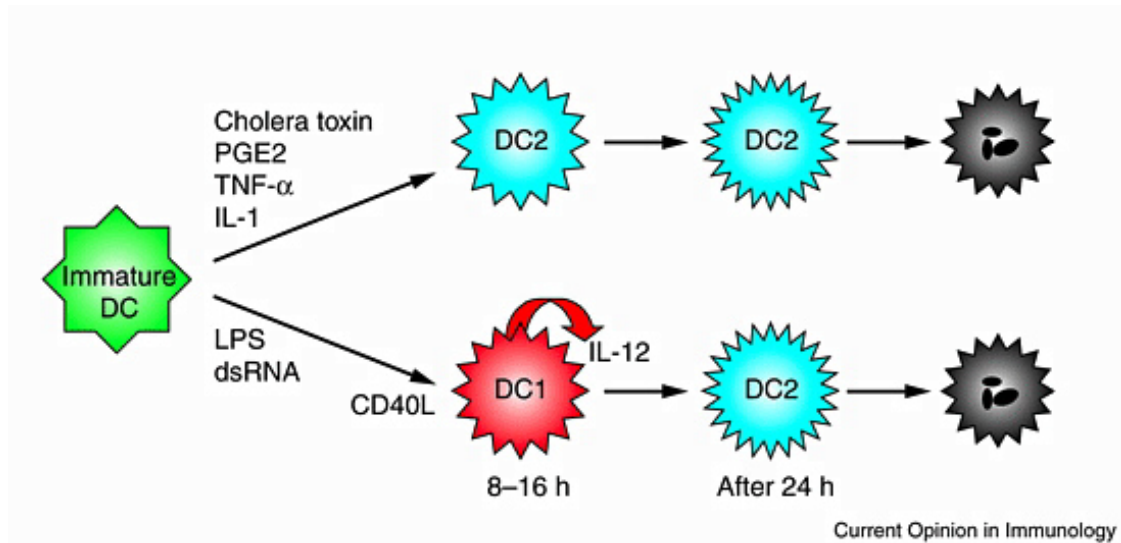


Bild 3–5 DC zeigen eine große Plastizität bei der Polarisierung einer T-Zellantwort (nach Lanzavecchia und Sallusto, 2001)

Unreife DC in der Peripherie erhalten Reifungssignale in Form von proinflammatorischen Zytokinen oder PAMPs, die die Anwesenheit von infektiösen Erregern signalisieren. Durch diese Signale reifen die DC aus, verlassen die Peripherie und wandern beladen mit den aufgenommenen antigenen Proteinen in die lokalen Lymphgewebe. Die Ausreifung, aber auch die Abstammung der DC definieren, welche Art der adaptiven T-Zellantwort unterstützt wird (genauere Beschreibung im Text).

Typ I-Interferone (IFN- α , - β , - ω) werden lokal an Orten der Infektion mit Viren induziert. Dort schützen sie umliegende Zellen und Gewebe vor Virus-bedingten zytopathischen Schäden und dämmen das Ausmaß der Infektion über Induktion eines antiviralen und antiproliferativen Stoffwechselstatus ein. Allerdings spielen die IFN auch eine bedeutende Rolle in der Auslösung, Ausrichtung und Aufrechterhaltung einer virusspezifischen Immunantwort. Das Vorkommen von Viren im peripheren Blut oder die Infektion mit Viren aktiviert eine zahlenmäßig sehr kleine Population an PBMC, die IPC (siehe 3.2.1). Das in den inflammatorischen Lymphgeweben freigesetzte IFN schützt die Zellen des Immunsystems, und hier v.a. die Gedächtnis-T-Zellen, vor einer viralen Infektion oder vor Apoptose durch die APC (Akbar *et al.*, 2000) und beeinflusst die Polarisierung der ausgelösten zellulären Immunantwort (Kadowaki *et al.*, 2000; Cella *et al.*, 2000).

Das während einer viralen Infektion freigesetzte IFN wirkt sich wahrscheinlich auch auf die myeloide DC1-Population aus. *In vitro*-Versuche mit DC1-Zellen zeigen hier zweierlei. Erstens hemmt die Anwesenheit von IFN während der Differenzierungsphase der Monozyten zu MoDC die Ausbildung einer immunkompetenten reifen DC-Population. Diese IFN-MoDC sezernieren weniger IL-12p70, stimulieren in einer allogenen MLR eine T-Zellproliferation schlechter als vergleichbare, nicht mit IFN behandelte MoDC und induzieren kaum IFN- γ -produzierende T-Zellen (McRae *et al.*, 2000; Bartholomé *et al.*, 1999). Andererseits scheint IFN auch die Ausreifung und stimulatorische Kapazität von DC steigern zu können (Luft *et al.*, 1998). Somit ist die Rolle, die IFN in der Beeinflussung der APC-Populationen und der daraus resultierenden Polarisierung der zellulären Immunantwort nach viralen Infektionen spielt, umstritten.

3.3 Zielsetzung der Arbeit

Während einer natürlichen Infektion mit MV, aber auch deutlich abgeschwächt nach Vakzinierung mit attenuierten MV-Stämmen kann eine MV-assoziierte Leukopenie und eine Störung der zellulären Immunreaktionen beobachtet werden. Am stärksten sind T-Zell-vermittelte Antworten betroffen, so daß PBMC von MV-Patienten *ex vivo* weder auf Mitogene noch auf Allogene oder *Recall*-Antigene reagieren. Desweiteren wird für das Ausbleiben einer zellulären Immunantwort gegen Superinfektionen ein durch das MV induziertes Zytokinungleichgewicht verantwortlich gemacht, so daß statt T_H1 -präferentiell T_H2 -Immunantworten ausgelöst werden. Für die Auslösung einer MV-spezifischen Immunantwort spielen DC höchstwahrscheinlich eine herausragende und einzigartige Rolle, da es sich bei diesen Zellen um spezialisierte APC handelt, die aus der Peripherie, also zumeist von Orten der Infektion, in lokale Lymphorgane auswandern und primäre Immunantworten der adaptiven Immunabwehr induzieren können. DC produzieren während einer Infektion als erste Zellen IL-12 in den Lymphorganen, den Orten der Induktion einer T-Zellimmunantwort (Reis e Sousa *et al.*, 1997). Im Modell der Kontakt-vermittelten Immunsuppression führt die Bindung an die Masernglykoproteine H und F zu einem Signal in der kontaktierten lymphoiden oder myeloiden Zelle, das die Proliferation der Zelle hemmt. Aus früheren Arbeiten ist bekannt, daß DC aus dem peripheren Blut durch MV infizierbar sind. Die Infektion führt zu einer Ausreifung der DC-Vorläuferzellen und zu einer IL-12p70-Induktion. Allerdings hemmen infizierte DC die Mitogen-abhängige Proliferation von T-Zellen (Schnorr *et al.*, 1997b). Die vorliegende Arbeit sollte unter Verwendung einer definierten DC-Population zeigen, welchen Einfluß eine MV-Infektion auf die Funktionalität der DC hat. Speziell sollte untersucht werden, ob eine Ausreifung der MoDC stattfindet, und wenn dies der Fall ist, welcher Mechanismus der Ausreifung zugrunde liegt. Weiterhin sollte bestimmt werden, ob die DC IL-12 produzieren können. Schließlich sollte die Rolle der MoDC in der Kontakt-vermittelten Immunsuppression nach MV-Infektion sowie die beteiligten Effektorstrukturen *in vitro* bestimmt werden. Aus Sicht des Virus sollte ermittelt werden, ob Wildtypviren gegenüber Vakzineviren *in vitro* andere Reaktionen der infizierten DC hervorrufen.

4 Material

4.1 Zellen

PBMC wurden aus Blutbeutelpräparaten („buffy coats“) aufgereinigt, die vom Blutspendedienst des Bayerischen Roten Kreuzes, Würzburg, oder von der Abteilung für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie, Universitätsklinik Würzburg, zur Verfügung gestellt wurden.

Die verwendeten Zelllinien waren alle im Institut verfügbar. Im einzelnen handelte es sich hierbei um die folgenden Zelllinien:

Zelllinie	Zelltyp	Herkunft
B95a	semiadhärenter Subklon der EBV-transformierten B-Zelllinie B95	Krallenaaffe (<i>Callithrix jacchus</i>); ATCC
BJAB	lymphoblastoide B-Zelllinie	human; Menezes <i>et al.</i> , 1975
BJABpED-B	persistent mit ED-B infizierte BJAB-Linie	Institut für Virologie, Universität Würzburg
BJABpWTF	persistent mit WTF infizierte BJAB-Zelllinie	Institut für Virologie, Universität Würzburg
HeLa	Zervixkarzinoma-epithelzelllinie	human; ATCC
Ltk ⁻	Fibroblastenzelllinie	murin; ATCC
CD40L-Ltk ⁻	stabil mit murinem CD40L transfizierte Ltk ⁻ Zelllinie	Schimpl, A; Insitut für Virologie, Universität Würzburg
Vero	Nierenfibroblastenzelllinie	afrikanische Grüne Meerkatze (<i>Cercopithecus aethiops</i>); ATCC

4.2 Viren

Alle Viren waren im Institut vorhanden und wurden entsprechend den unter **5.2** aufgeführten Bedingungen propagiert und gelagert. Der VSV-Stamm *Indiana* wurde mir von Jürgen Schneider-Schaulies zur Verfügung gestellt. Die rekombinanten Masernviren habe ich dankenswerterweise von Prof. Dr. MA Billeter erhalten (Radecke und Billeter, 1997). Die Genomstruktur der rekombinanten Viren ist in **Bild 4–1** schematisch dargestellt.

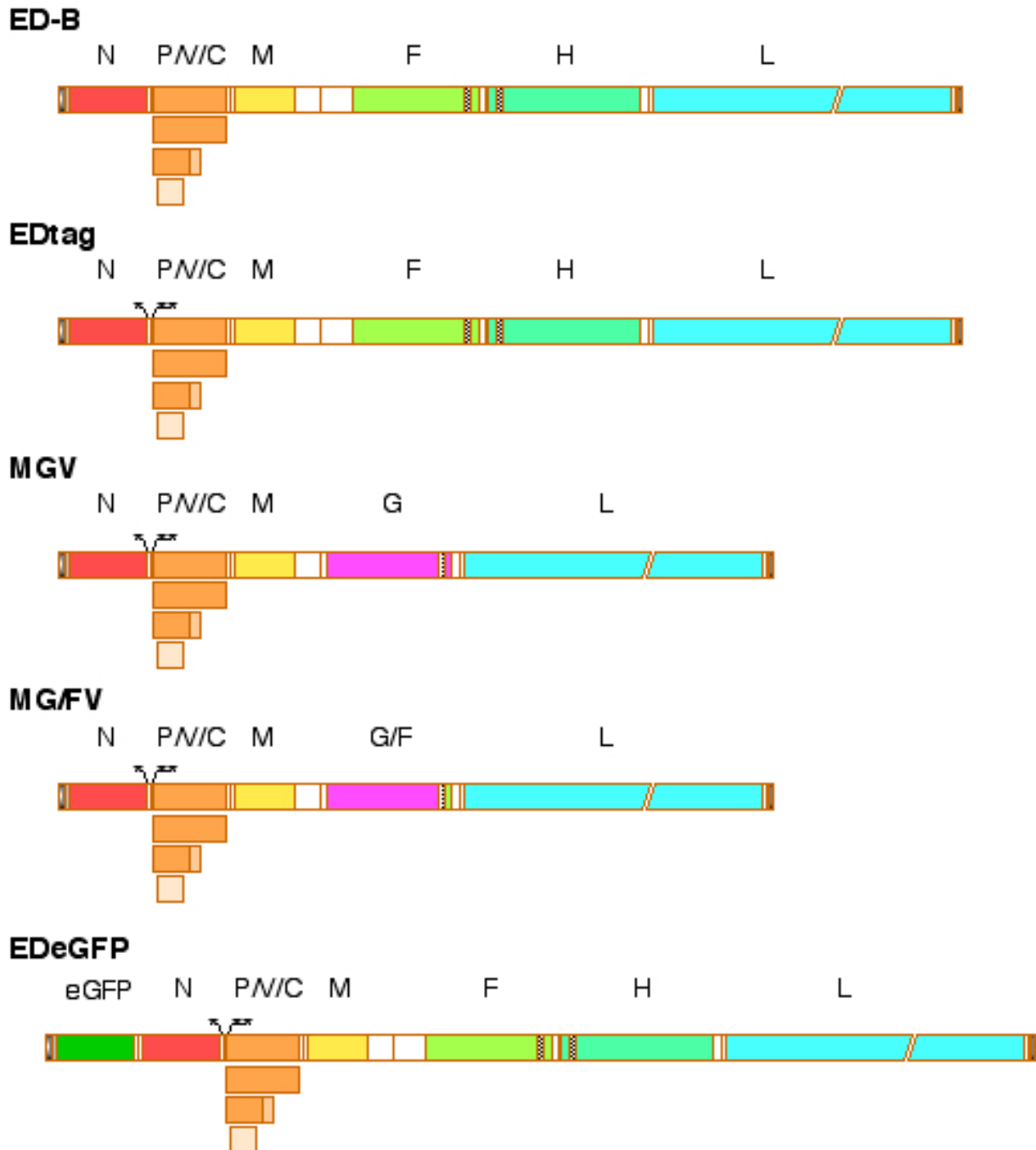


Bild 4–1 Überblick über die Genomstruktur der eingesetzten rekombinanten Masernviren basierend auf dem Vakzinestamm Edmonston-B

Angegeben sind die einzelnen ORFs in den jeweiligen Genomen, sowie die einzelnen Genprodukten des P-ORF. Die rekombinanten Masernviren sind durch drei Nukleotidaustausche gekennzeichnet (mit * markiert). Offene, farblose Boxen entsprechen nicht-translatierten 5'- und 3'-Regionen, während die gemusterten Boxen den Transmembrandomänen der MV-Glykoproteine bzw. des VSV-G-Proteins entsprechen.

4.3 Antikörper

Die Hybridoma aller verwendeten monoklonalen Antikörper gegen MV-Antigene wurden von Frau S Löffler, Institut für Virologie und Immunbiologie, hergestellt. Der gegen humanes MxA-Protein gerichtete monoklonale Antikörper wurde von Frau M Seuffert, Institut für Virologie und Immunbiologie, hergestellt.

Fluoreszenzfarbstoff-markierte Sekundärantikörper (Ziege-anti-Maus IgG (F_{ab}-Fragment)-FITC- oder R-PE-gekoppelt) für die Durchflußzytometrie wurden von Dianova bezogen. Folgende direkt-markierte Antikörper wurden in der Durchflußzytometrie eingesetzt:

Antikörperspezifität	Klonbezeichnung	Isotyp	Konjugat	Hersteller
CD1a	T6	Maus-IgG1	-	Coulter
CD3	UCHT1	Maus-IgG1	FITC/R-PE	Immunotech
CD4	13B8.2	Maus-IgG1	FITC	Immunotech
CD8	B9.11	Maus-IgG1	FITC	Immunotech
CD11a	G43-25B	Maus-IgG2b	-	Pharmingen
CD14	RMO52	Maus-IgG2a	FITC	Immunotech
CD19	J4.119	Maus-IgG1	FITC	Immunotech
CD25	B1.49.9	Maus-IgG2a	R-PE	Immunotech
CD40	mAb89	Maus-IgG1	R-PE	Immunotech
CD54	84H10	Maus-IgG1	-	Immunotech
CD58	AICD58	Maus-IgG2a	-	Immunotech
CD69	FN50	Maus-IgG1	R-PE	Pharmingen
CD71	YDJ.1.2.2	Maus-IgG1	-	Immunotech
CD80	MAB104	Maus-IgG1	FITC	Immunotech
CD83	HB15A	Maus-IgG2b	R-PE	Immunotech
CD86	IT2.2	Maus-IgG2b	R-PE	Pharmingen
CD95	UB2	Maus-IgG1	FITC	Immunotech
HLA-DR	IMMU 357	Maus-IgG1	PC5	Immunotech
HLA-DR	G46-6	Maus-IgG2a	CyChrome	Pharmingen
HLA-DR	B8.12.2	Maus-IgG2b	-	Immunotech
IL-12p40/70	C11.5	Maus-IgG1	R-PE	Pharmingen
-	MOPC-21	Maus-IgG1	R-PE	Pharmingen

4.4 Medien, Chemikalien und Radioaktivität

4.4.1 Zellkultur

Antibiotika
ATV

Medienküche
Medienküche

DMSO	Roth
Doppeltes MEM	Medienküche
FKS	Seromed
Genitacin-G418	GIBCO
MEM	Medienküche
NaHCO ₃	Medienküche

4.4.2 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden, falls nicht nachfolgend aufgeführt, in *pro analysi*-Qualität von den Firmen Sigma oder Roth bezogen.

Acrylamid	Sigma
Ammoniumperoxodisulfat	Biorad
Bisacrylamid	Sigma
BFA	Calbiochem
BSA	Sigma
ECL	Amersham
Ficoll-Paque	Pharmacia
GM-CSF	Krankenhausapotheke
IFN- γ	Strathmann Biotech
IL-4	Strathmann Biotech
Mitomycin C	Sigma
Monensin	Calbiochem
PHA	Sigma
PMSF	Sigma
Proteinbestimmungslösungen	Sigma
Saponin	Sigma
Tween 20	Sigma
Szintillisationsflüssigkeit	Wallac
TEMED	Biorad
TRIZMA® (Tris)	Sigma
Triton X-100	Sigma

4.4.3 Radioaktiv markierte Verbindungen

[Methyl- ³ H]-Thymidin (5 Ci/mmol)	Amersham
---	----------

4.5 Kits, Lösungen und Puffer

Anodenpuffer 30mM	30 mM Tris/HCl, 20 % Methanol, pH10,4
Anodenpuffer 300mM	300 mM Tris/HCl, 20 % Methanol, pH 10,4
FACS-Puffer	0,4 % BSA, 0,02 % NaN ₃ in Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -freiem PBS, pH 7,4
IL-12p40 DuoSet	R&D Systems
IL-12p70 Quantikine	R&D Systems
Kathodenpuffer	39,6 mM 6-Amino-n-Hexansäure, 25 mM Tris/HCl, 20 % (v/v) Methanol, pH 9,4
NTE-Puffer (10x)	0,1 M Tris/HCl, 1M NaCl, 0,01 M EDTA, pH 7,4
PBS/Tween	0,5 % Tween in PBS

Proteingelpuffer (10x)	250 mM Tris/HCl, 1,9 M Glycin, 1 % (w/v) SDS, pH 8,7
Saponinpuffer	0,33 % Saponin in FACS-Puffer, pH 7,4

4.6 Verbrauchsmaterial

Dialyseschläuche	Roth
Entwickler & Fixierer für Röntgenfilme	Kodak
Einmalküvetten	Roth
Einmalspritzen & -kanülen	Servopharma
FACS-Röhrchen	Elkay
3MM-Whatmanpapier	Schleicher&Schüll
Glasfasermatten	Wallac
Nitrozellulosematten	Schleicher & Schüll
Plastikmaterial für die Zellkultur	Greiner, Nunc, Falcon
Pipettenspitzen	Eppendorf, Roth
Röntgenfilme	Fuji Foto Film
Sterilfilter	Schleicher & Schüll
Zweikammerzellkultureinsätze	Nunc

4.7 Geräte

Biolinker	Vilber Lourmat
Brutschrank	Heraeus
Flüssigkeitsszintillisationszähler	Wallac
FACScan	Becton-Dickinson
Fluoreszenzmikroskop	Leica
Gelelektrophoresekammern	Institutswerkstatt
Halbtrockenblottingapparatur	Institutswerkstatt
Sterilwerkbank	Heraeus
Mikroskop	Leitz
Netzgeräte	Gibco, BioRad
pH-Meter	WTW
Rotoren SS34, JA20	Sorvall, Beckmann
Zellerntegerät	Wallac
Zentrifugen	Sorvall, Beckmann, Eppendorf

5 Methoden

5.1 Zellkultur

Alle Zellkulturen wurden mit Zellkulturplastikflaschen oder –multilochplatten in Brutschränken bei 37°C in einer humidifizierten Atmosphäre mit einem CO₂-Gehalt von fünf Prozent durchgeführt. Die verwendeten Medien waren mit NaHCO₃-gepuffert und mit Penicillin/Streptomycin versetzt.

5.1.1 Zellkultur adhärenter Zelllinien

Die adhärenente Zelllinie Vero wurde in MEM mit 5% FKS gezogen. Die stabil transfizierte Zelllinie CD40L-Ltk⁻ wurde in RPMI 1640 mit 5% FKS und 1 mg/ml Geneticin kultiviert. Die Zelllinien Ltk⁻ und B95a wurden in RPMI 1640 mit 5% FKS kultiviert. Nach Ausbildung konfluenter Zellrasen wurden die Zellen mit ATV oder mit Ca²⁺/Mg²⁺-freiem PBS/EDTA abgelöst, resuspendiert und 1:5 bis 1:10 verdünnt ausgesät.

5.1.2 Zellkultur von Suspensionszelllinien

Die Zelllinie BJAB wurde in RPMI 1640 mit 10% FKS kultiviert. Dichte Zellkulturen wurden 1:5 in neue Flaschen verdünnt.

5.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zelllinien

Für längere Lagerung von Zelllinien oder primären Zellisolaten wurden 5x10⁶ bis 1x10⁷ Zellen in 2 ml eiskaltem Einfriermedium (FKS/20% DMSO) resuspendiert und durch schrittweises Abkühlen (zwei Stunden bei -20°C, über Nacht bei -80°C und anschließender Transfer in flüssigen Stickstoff) schonend eingefroren. Um die Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden die eingefrorenen Zellsuspensionen schnell aufgetaut, mit einem Überschuß an entsprechendem Kulturmedium gewaschen und in frischem Medium ausgesät.

5.1.4 Mykoplasmentestung

Um eine Kontamination der Zellkulturen mit Mykoplasmen zu vermeiden, wurde regelmäßig auf Mykoplasmen getestet. Hierzu wurden die zu prüfenden Kulturen in Kulturmedium ohne Penicillin/Streptomycin überführt und drei Tage kultiviert. Zell-freier Überstand diente als Quelle für Mykoplasmen-DNS. Der Mykoplasmenachweis erfolgte mittels eines Mykoplasma-spezifischen PCR Primer Sets von Stratagene. Kontaminierte Kulturen wurden entsorgt und neue, nicht kontaminierte Kulturen von eingefrorenen Zellen angelegt.

5.1.5 Isolierung primärer humaner mononukleärer Zellen aus peripherem Blut

Als Quelle für primäre PBMC dienten „Buffy Coats“, die aus Blut gesunder Spender im Blutspendezentrum des Bayerischen Roten Kreuzes, Würzburg oder in der Abteilung für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie, Universitätsklinik Würzburg hergestellt worden waren. Die „Buffy Coats“ wurden mit einem Volumen Ca²⁺/Mg²⁺-freiem PBS verdünnt, auf ein Kissen Ficoll-Paque™ Plus geschichtet und bei Raumtemperatur durch Zentrifugation

mit 400xg für 30 min entsprechend der Dichte aufgetrennt. Die PBMC-haltige Interphase wurde abgenommen und mehrmals mit kaltem $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freiem PBS gewaschen. Entsprechend der weiteren Verwendung wurden die Zellen gezählt und in $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freiem PBS oder Kulturmedium resuspendiert. Zur Charakterisierung wurden standardmäßig Proben der PBMC mit einem mAk-Gemisch aus CD3-FITC, CD19-FITC, CD14-FITC, CD16-PE, CD56-PE und HLA-DR-CyChrome™ gefärbt und im FACS gemessen (siehe *Tabelle 5-1*).

5.1.6 Isolierung von primären T-Zellen über Rosettierung mit Hammelerythrozyten aus PBMC

PBMC setzen sich aus T-Zell-, B-Zell-, NK-Zell- und Monozytenpopulationen zusammen. Eine spezifische Anreicherung der T-Zellpopulation kann durch Rosettierung der T-Zellen mit Hammelerythrozyten und anschließender Dichtegradientenzentrifugation erreicht werden. Nach einer Inkubation der PBMC mit AET-aktivierten Hammelerythrozyten, wodurch sich die spezifische Bindung an das auf den T-Zellen exprimierte CD2 erhöht, für eine Stunde auf Eis wurden die pelletierten Zellen vorsichtig resuspendiert und auf Ficoll-Paque™ Plus geschichtet. Durch die folgende Zentrifugation (400xg, 30 min, RT) wurden die nun dichteren T-Zellen aus der PBMC-Interphase entfernt und pelletiert. Die Interphase wurde abgenommen und mehrmals mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freiem PBS gewaschen. Die pelletierten T-Zellen wurden mit Lysepuffer behandelt, um die Hammelerythrozyten zu entfernen. Die resultierenden Zellpopulationen wurden gezählt und zur durchflußzytometrischen Charakterisierung mit einem mAk-Gemisch aus CD3-FITC, CD19-FITC, CD14-FITC, CD16-PE, CD56-PE und HLA-DR-CyChrome™ markiert (siehe *Tabelle 5-1*). Die T-Zellen (E^+ -Population) wurden in RPMI 1640/5% FKS resuspendiert und in Kultur genommen.

5.1.7 Depletion HLA-DR-positiver T-Zellen durch indirektes „Panning“

Aktiviert humane T-Zellen exprimieren auf ihrer Zelloberfläche HLA-DR. Über dieses MHC Klasse II-Molekül können aktiviert T-Zellen in Anwesenheit des Superantigens SEA andere T-Zellen aktivieren (siehe **5.6.3**). Um T-Zellen in einem Proliferationstest unter Verwendung von SEA einsetzen zu können, müssen demnach alle HLA-DR-positiven T-Zellen depletiert werden.

Eine Bakterienkulturschale (\varnothing 10 cm) wurde o/n bei 4°C mit 10 ml eines Ziege-anti-Maus-spezifischen polyklonalen Serums (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) beschichtet. Die rosettierten T-Zellen (siehe **5.1.6**) wurden gezählt und 3×10^7 Zellen mit α -HLA-DR mAk (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) für 30 min auf Eis inkubiert. Die beschichtete Bakterienplatte wurde durch Zugabe von $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freiem PBS/5% FKS dreimal vorsichtig gespült. Die markierten T-Zellen wurden zweimal mit einem Überschuß an $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freiem PBS/5% FKS gewaschen (10 min, 400xg, 4°C), in 3 ml $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freiem PBS/5% FKS resuspendiert und auf die Schale gegeben. Unter wiederholtem vorsichtigem Schütteln der Platte wurden die Zellen bei 4°C 1-2 h inkubiert. Die nicht-adhärenente Zellfraktion wurde durch vorsichtiges Abnehmen des Überstandes gewonnen. Die Zellen wurden zentrifugiert (10 min, 400xg, 4°C), in Medium in der gewünschten Zelldichte resuspendiert und eingesetzt. Der Erfolg der Aufreinigung wurde durch eine FACS-Kontrollfärbung unter Einsatz direkt-markierter α -CD3-FITC und α -HLA-DR-PC5™ mAk überprüft.

5.1.8 Isolierung von Monozyten

Als Ausgangsmaterial für die Generierung von myeloiden humanen dendritischen Zellen können Monozyten verwendet werden. Nach Entfernen der T-Zellen aus der PBMC-Population durch Rosettierung verblieben v.a. B-Zellen, NK-Zellen und Monozyten in der Interpha-

sepopulation (E^- -Population). Die gewaschenen und pelletierten Zellen wurden in MACS-Färbepuffer resuspendiert ($1 \times 10^7/100 \mu\text{l}$) und mit CD56- und CD19-spezifischen Microbeads markiert. Die markierten NK- und B-Zellen wurden über einen Säulenschritt entsprechend den Herstellerangaben (MACS™ Miltenyi Biotech) depletiert. Die eluierte Zellfraktion wurde mit einem mAk-Gemisch aus CD3-FITC, CD19-FITC, CD14-FITC, CD16-PE, CD56-PE und HLA-DR-CyChrome™ markiert, um die Reinheit der Monozyten zu kontrollieren (siehe **Tabelle 5-1**). Diese Monozyten-angereicherte Zellpopulation (E^-d Population) diente als Ausgangsmaterial für die MoDC-Generierung.

Tabelle 5-1: Prozentuale Zusammensetzung der Zellpopulationen, die durch die unter 5.1.5, 5.1.6 und 5.1.8 beschriebenen Methoden aus „Buffy Coats“ präpariert wurden

	PBMC	E^+ -Population	E^- -Population	E^-d -Population
T-Zellen	~ 50-60%	~ 85-95%	~ <1%	~ <1%
B-Zellen	~ 12-18%	~ <1%	~ 12-16%	~ <1%
NK-Zellen	~ 10-15%	~ 5-15%	~ 12-16%	~ 10%
Monozyten	~ 10-16%	~ <1%	~ 70-75%	~ 75-85%

5.1.9 Herstellung humaner Dendritischer Zellen *in vitro* aus Monozyten

Monozyten differenzieren *in vitro* durch Kultur in GM-CSF & IL-4-haltigem Medium innerhalb von sechs bis sieben Tagen zu DC aus (Romani *et al.*, 1996). Monozyten wurden mit einer Zellzahl von $2-3 \times 10^7$ in RPMI 1640 ohne FKS in eine T80-Plastikzellkulturflasche ausgesät. Nach ein bis zwei Stunden wurden die nicht-adhären Zellen abgespült und die verbliebenen Zellen mit 20 ml frischem Medium versetzt (RPMI 1640/10% FKS, 2.000 U/ml GM-CSF und 3.000 U/ml IL-4). Nach drei Tagen Kultur wurden erneut 20 ml des GM-CSF & IL-4-Medium zugegeben. Wie aus **Bild 5-1** zu entnehmen ist, wurde im Laufe dieses Differenzierungsvorgangs CD14 auf der Oberfläche der Zellen nicht mehr exprimiert. Parallel nahm die Zelloberflächenexpression des MoDC-typischen Antigens CD1a zu. Nach sechs bis sieben Tagen wurden MoDC geerntet, die den Phänotyp unreifer, nicht aktivierter DC zeigten. Kostimulatorische Moleküle wie CD80, CD86 oder CD40 wurden nicht oder nur schwach exprimiert. Gleiches galt für die MoDC-Aktivierungs- und Reifungsmarker CD83 und CD25 sowie für die MHC Klasse II-Moleküle (**Bild 5-2**).

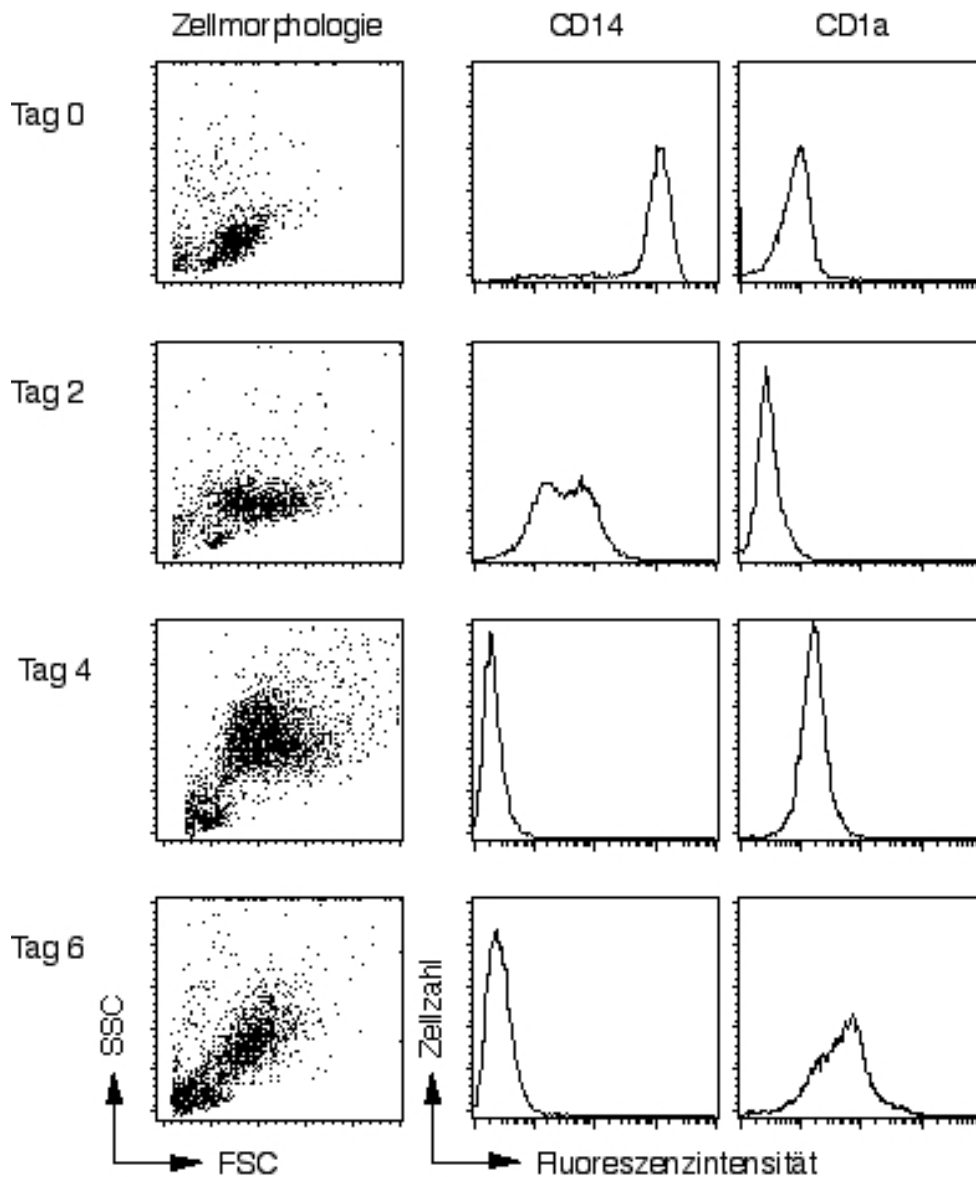


Bild 5–1 Entwicklung der Zellmorphologie und der Expression von CD1a und CD14 während der *in vitro*-Generierung von MoDC aus Monozyten durch Kultur in GM-CSF & IL-4-haltigem Medium

Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und die Oberflächenexpression der Antigene CD1a und CD14 nach Markierung mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten mAk durchflußzytometrisch bestimmt.

5.2 Viruszucht

Die Viruszucht der Masernstämmen ED-B, ED-Zagreb, Schwarz, Moraten, AIK-C und Chicago-1 erfolgte über Vero-Zellkulturen, die der Masernstämmen WTF und TC5679 über BJAB-Zellkulturen. Für VSV-Präparationen wurde die adhärenente Zelllinie HeLa verwendet. Die rekombinanten Masernstämmen Edtag (MVNse), MGv, MG/FV und EDeGFP wurden ebenfalls auf Verozellen gezogen. Die Zellkulturen waren Mykoplasmen-frei.

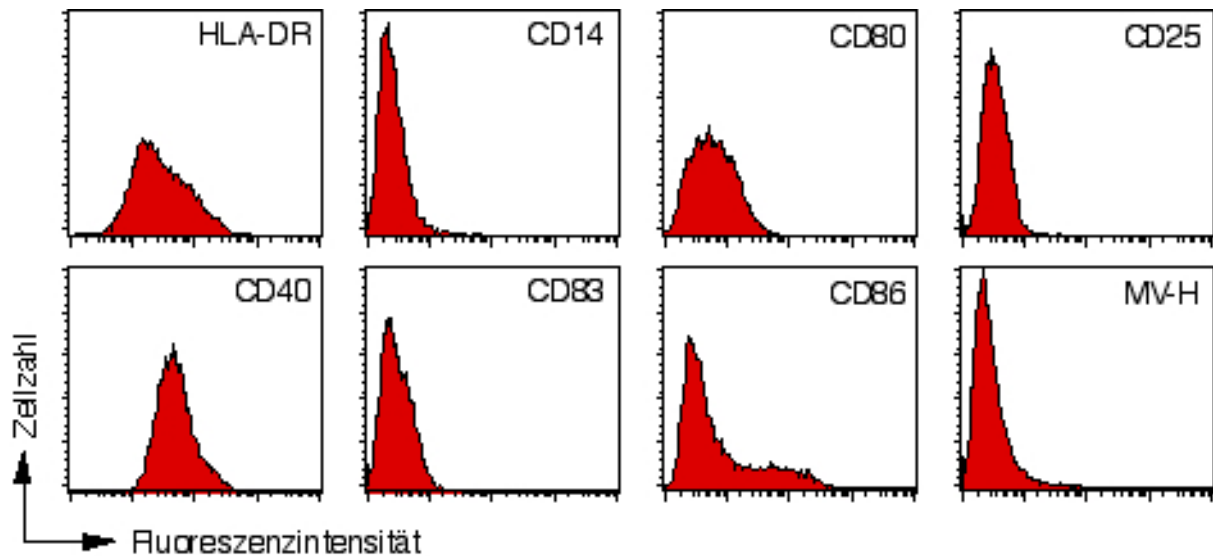


Bild 5–2 Phänotyp von unreifen MoDC nach Ende der Kultur in GM-CSF & IL-4-haltigem Medium

Die Zellen wurden nach sieben Tagen Kultur in MoDC-Differenzierungsmedium geerntet und mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten mAk direkt bzw. mittels spezifischen mAk und Fluoreszenzfarbstoff-markiertem Anti-Maus-IgG-Serum gefärbt.

5.2.1 Virusstockpräparationen auf adhärennten Zelllinien

Konfluente Verozellrasen in T180-Plastikzellkulturflaschen wurden mit den Masernstämmen ED-B, ED-Zagreb, Schwarz, Moraten, AIK-C und Chicago-1 sowie mit den rekombinanten Masernstämmen Edtag (MVNse), MGV, MG/FV und EDeGFP mit einer MOI von 0,01 infiziert. Im Fall einer MGV- oder MG/FV-Viruszucht wurden die Kulturen nach drei bis vier Tagen auf neue Flaschen aufgeteilt. Sobald 80 bis 90% der Zellen einen CPE zeigten, wurde der Kulturüberstand entfernt, die verbliebenen Zellen vorsichtig mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freiem PBS gespült und in 5-10 ml $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freiem PBS bei -20°C über Nacht eingefroren. Am nächsten Tag wurden die Kulturen vorsichtig aufgetaut und durch kräftiges Pipettieren die Zelltrümmer weiter geschert, um Zell-assoziiertes Virus freizusetzen. Durch Zentrifugation ($0 - 4^{\circ}\text{C}$, 10 min, $1.000\times g$) wurden die Zelltrümmer aus dem Überstand entfernt, der vorgereinigte klare Überstand aliquotiert und bei -80°C gelagert. Die VSV-Zucht erfolgte analog, allerdings wurden statt der Verozellen HeLa-Zellen verwendet. Als Mockpräparation wurden nicht-infizierte Vero- oder HeLa-Zellkulturen parallel zu Virusinfektionen angesetzt und wie diese geerntet.

5.2.2 Virusstockpräparationen mit Suspensionszelllinien

BJAB-Zellen wurden in T180-Zellkulturplastikflaschen zu hohen Zelldichten kultiviert und mit WTF oder mit TC5679 mit einer MOI von 0,01 infiziert. Gegebenenfalls wurden die Zellkulturen drei bis vier Tage p.i. auf neue Flaschen aufgeteilt. Nach Ausbildung eines deutlichen CPE wurden die Kulturen zentrifugiert ($0 - 4^{\circ}\text{C}$, 10 min, $1.000\times g$), das Zellpellet in $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freiem PBS resuspendiert und über Nacht bei -20°C eingefroren. Nach vorsichtigem Auftauen unter kräftigem Resuspendieren wurden die Zellfragmente durch Zentrifugation ($0 - 4^{\circ}\text{C}$, 10 min, $1.000\times g$) entfernt, der klare Überstand aliquotiert und bei -80°C gelagert. Mock-Präparationen wurden parallel zu diesem Infektionsschema hergestellt.

5.2.3 Titerbestimmung der Virusstocks mittels des Plaquetests

Pro Napf einer 6-Loch-Zellkulturplatte wurden 1×10^5 Verozellen in MEM/5% FKS ausgesät und über Nacht bis zur Konfluenz kultiviert. Virusstockverdünnungen (1:10-Verdünnungen in MEM/ohne FKS, 1 ml/Napf) wurden nach Entfernen des Mediums zugegeben und 2 h p.i. durch 2 ml/Napf Agarosemedium ersetzt. Pro Verdünnungsstufe wurden vier Näpfe verwendet. Nach drei bis fünf Tagen wurde erneut mit 2 ml/Napf Agarosemedium mit Kristallrot ($\sim 100 \mu\text{g/ml}$) überschichtet. Ein bis zwei Tage später wurde die Zahl der Plaques abgelesen und die PFU/ml entsprechend der **Formel 5-1** berechnet. Zur Bestimmung des Titers wurde die Verdünnungsstufe gewählt, bei der die Plaques am deutlichsten zu erkennen waren. Die Titerbestimmung mittels des Plaquetests wurde für die Viren ED-B, ED-Zagreb, Schwarz, Moraten, AIK-C, EDtag, EDeGFP und Chicago-1 eingesetzt.

Formel 5-1: Formel zur Berechnung der PFU/ml anhand der Auszählung von Plaques nach Infektion auf einem Verozellrasen

d ist die Verdünnungsstufe und p_d steht für die Anzahl an Plaques pro Verdünnungsstufe d . Mit n_d ist die Zahl an ausgezählten Näpfen pro Verdünnungsstufe d anzugeben.

$$PFU/ml = \frac{\sum (p_d \times d^{-1})}{n_d}$$

5.2.4 Titerbestimmung der Virusstocks mittels der Endpunkttitration nach Spearman und Kärber

Für die Bestimmung der $TCID_{50}/\text{ml}$ mittels der 50%-Endpunkttitration wurden B95a in einer 96-Loch-Zellkulturplatte mit 1×10^5 Zellen in $100 \mu\text{l}$ RPMI 1640/ohne FKS ausgesät. Virusstockverdünnungen wurden mit RPMI 1640/ohne FKS hergestellt und pro Verdünnungsstufe acht Näpfe mit je $100 \mu\text{l}$ versetzt. Ca. 16 h p.i. wurden pro Napf $25 \mu\text{l}$ FKS zugegeben. Die Anzahl der CPE-positiven Näpfe wurde lichtmikroskopisch bestimmt und die $TCID_{50}/\text{ml}$ und der Standardfehler entsprechend den Formeln nach Spearman und Kärber berechnet (**Formel 5-2** und **Formel 5-3**). Die Endpunkttitration wurde für alle Viren außer MGV und MG/FV eingesetzt.

Formel 5-2: Darstellung der Formel zur Berechnung der 50%-Endpunkttitration nach Spearman und Kärber

In der Formel steht $x_{p=1}$ für den dekadischen Logarithmus der höchsten Verdünnungsstufe, bei der noch in allen Nöpfen der Verdünnung ein CPE zu finden ist. d steht für den dekadischen Logarithmus des Verdünnungsfaktors. p entspricht dem Anteil an CPE-positiven Nöpfen pro Verdünnungsstufe. $\sum p$ ist die Summe aller p ab der Verdünnungsstufe $x_{p=1}$ und den p -Werten aller höheren Verdünnungen mit beobachtetem CPE. Es wird der dekadische Logarithmus der Verdünnungsstufe berechnet, bei der 50% der Zellen oder Nöpfe einen CPE aufweisen.

$$\log TCID_{50} = x_{p=1} + \frac{1}{2}d - d \sum p$$

Formel 5-3: Formel zur Berechnung des Standardfehlers der $TCID_{50}$ berechnet nach Spearman und Kärber

In der Formel steht d für den dekadischen Logarithmus der Verdünnungsstufe, p für den Anteil an CPE-positiven Nöpfen pro Verdünnungsstufe und n für die Anzahl der Nöpfe pro Verdünnungsstufe. Es wird der Standardfehler des dekadischen Logarithmus der $TCID_{50}$ berechnet.

$$SE \log TCID_{50} = \sqrt{d^2 \sum \frac{p(1-p)}{n-1}}$$

5.2.5 Titerbestimmung der rekombinanten Viren MG/ V und MG/FV

Die rekombinanten Viren MG/ V und MG/FV exprimieren keine funktionellen MV-Glykoproteine sondern VSV-G-Konstrukte, die bei neutralem pH keine Zell-Zell-Fusion induzieren können. Daher ist die Verwendung eines Plaquetests oder einer 50%-Endpunkttitration zur Bestimmung der Virustiter nicht möglich. Daher wurden Verozellen auf Deckgläser ausgesät und analog zu der unter 5.2.5 beschriebenen Vorgehensweise mit Virusstockverdünnungen infiziert. Nach Entwicklung eines MG/ V- oder MG/FV-typischen CPE wurden die Verozellen mit 3,7%iger Formaldehydlösung fixiert (30 min, RT) und mit 0,25%iger Triton X-100-Lösung permeabilisiert (10 min, RT). Anschließend wurden die infizierten Verozellen mit MV-N-spezifischem mAk gefärbt, und dieser mit einem B-PE-gekoppelten Sekundäntikörper detektiert. Mit einem Fluoreszenzmikroskop wurde die Anzahl an fluoreszierenden Zellaggregaten pro Verdünnungsstufe bestimmt und der Titer entsprechend der **Formel 5-4** berechnet.

Formel 5-4: Formel zur Berechnung der IU/ml für die Stocks der rekombinanten Viren MG/ V und MG/FV

d ist die Verdünnungsstufe und p_d steht für die Anzahl an fluoreszierenden Zellaggregaten pro Verdünnungsstufe d . Mit n_d ist die Zahl an ausgezählten Deckgläsern pro Verdünnungsstufe d anzugeben.

$$IU / ml = \frac{\sum (p_d \times d^{-1})}{n_d}$$

5.2.6 Ultrazentrifugation von Virus- und Mock-Präparationen

Virusstocks wurden wie unter 5.2.1 und 5.2.2 beschrieben hergestellt. Die gesammelten, in $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freiem PBS resuspendierten Zellfragmente mit dem Zell-assoziierten Virus wurden in einem Zellhomogenisator auf Eis homogenisiert und anschließend zentrifugiert (15 min, 1.000xg, 0 - 4°C, ohne Bremse). Durch diesen Schritt wurde das Zell-assoziierte Virus in Lösung überführt. Der Überstand wurde von den verbliebenen Zellfragmente getrennt (30 min, 5.000xg, 0 - 4°C, ohne Bremse) und auf ein 25%iges Sucrosekissen geschichtet. Das Virus wurde in einer anschließenden Ultrazentrifugation (90 min, 90.000xg, 0 - 4°C, ohne Bremse) pelletiert, in 10 ml NTE-Puffer resuspendiert und auf Eis 15 min äquilibriert. Die resultierende Virussuspension wurde auf einen diskontinuierlichen Sucrosegradienten geschichtet (5 ml 60%ige Sucrose/NTE (w/w), 10 ml 54%ige Sucrose/NTE (w/w), 10 ml 25%ige Sucrose/NTE (w/w)) und erneut ultrazentrifugiert (2 h, 90.000xg, 0 - 4°C, ohne Bremse). Das Material zwischen dem 54%igen und dem 25%igen Sucrosekissen wurde abgenommen und mit NTE-Puffer auf einen Sucroseanteil unter 25% (w/w) verdünnt. Nach abschließender Ultrazentrifugation (90 min, 100.000xg, 0 - 4°C, ohne Bremse) wurde das Viruspellet in $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freiem PBS auf Eis resuspendiert, aliquotiert und bei -80°C gelagert. Zur Kontrolle der Aufreinigung wurden die Zellfragmentpellets nach dem Homogenisieren im Überstand der ersten Ultrazentrifugation resuspendiert und ebenfalls eingefroren.

5.3 Aufreinigung monoklonaler Antikörper

Hybridomzelllinien, die monoklonale Antikörper gerichtet gegen Strukturproteine des Marnervirus (α -MV-H, α -MV-F, α -MV-N), des VSV (α -VSV-G) bzw. gegen das zelluläre MxA-Protein produzieren, wurden in RPMI 1640/10% FKS kultiviert. Bei Erreichen einer Zelldichte von $1-2 \times 10^6$ Zellen/ml wurden die Kulturen geerntet und der Antikörper-haltige Überstand von den Zellen getrennt (10 min, 1.000xg, 0 - 4°C). Durch wiederholte Ammoniumsulfatpräzipitation der Proteine (Zugabe von 15,8 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ auf 50 ml Überstand; 15 min 0 - 4°C 4.300xg; Zugabe von 15,8 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ auf 50 ml in $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freiem PBS resuspendiertes Protein; 15 min, 0 - 4°C, 4.300xg; Zugabe von 14 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ auf 50 ml Suspension; 15 min, 0 - 4°C, 4.300xg) wurden die Antikörper angereichert und durch Dialyse gegen $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freies PBS unter dreimaligem Pufferwechsel (48 h, 4°C) entsalzt. Nach Abschluß der Dialyse wurde der angereicherte Antikörper sterilfiltriert, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

5.4 Infektion und Aktivierung von MoDC

5.4.1 Infektion von MoDC

Unreife MoDC wurden für 1,5–2 h bei 37°C in einem kleinen Volumen RPMI 1640 ohne FKS mit GM-CSF & IL-4 resuspendiert und mit Viruspräparationen infiziert oder mit einem gleichen Volumen einer Mockpräparation inkubiert. Nach Ablauf der Infektionszeit wurden die Ansätze zweimal mit einem Überschuß an RPMI 1640 gewaschen (10 min, 250xg, 0 - 4°C) und in Kulturmedium resuspendiert (RPMI 1640/10% FKS mit 800 U/ml GM-CSF & 500 U/ml IL-4) und ausgesät.

5.4.2 Ausreifung der MoDC durch Zusatz von MKM oder LPS

Nach Ende der MoDC-Kultur an Tag sechs oder sieben handelt es sich bei den resultierenden MoDC um unreife, nicht-aktivierte MoDC (**Bild 5–2**). Durch Zugabe von MKM (10-20 % (V/V)) oder LPS (100 ng/ml) zum Medium wurden die MoDC aktiviert und ausgereift. Das MKM wurde durch Aktivierung von Monozyten über Quervernetzung der Fc-Rezeptoren hergestellt. Hierzu wurden Bakterienchalen (\varnothing 10 cm) mit humanem IgG o/n bei 4°C beschichtet (1 mg/ml in $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freiem PBS). Am nächsten Tag wurden 1×10^7 Monozyten in 10 ml RPMI 1640 mit 10% FKS zugegeben. Der Überstand wurde nach 24 h gegen frisches Medium ausgetauscht und eingefroren. Nach weiteren 24 h wurde erneut der Überstand abgenommen und bei -20°C gelagert. Die Reaktivität der einzelnen MKM-Präparationen wurde durch Kultur von unreifen MoDC in Kulturmedium versetzt mit zunehmenden Anteilen an MKM überprüft.

5.4.3 Induktion der IL-12-Produktion durch MoDC

Durch geeignete Stimulation mit bakteriellen Produkten oder durch Ligation von CD40 auf der MoDC-Oberfläche können unreife MoDC aktiviert und die Produktion von IL-12 induziert werden. Als bakterielle Stimulantien wurden LPS und SAC verwendet. Für eine CD40-Aktivierung wurden die MoDC mit Mitomycin C-inaktivierten Ltk^- -Fibroblasten, die stabil murines CD154 (CD40L) exprimieren, kokultiviert. Die Inaktivierung mit Mitomycin C erfolgte durch Inkubation von $2\text{--}5 \times 10^6$ Ltk^- -Zellen in 2 ml RPMI 1640/5% FKS mit 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Mitomycin C für 2 h bei 37°C . Nach mehrfachem intensivem Waschen der behandelten Zellen mit einem Überschuß an Medium wurden die Zellen in der gewünschten Zelldichte in 12-Loch-Zellkulturplatten ausgesät und über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurde der Überstand abgenommen und die zu stimulierenden MoDC zugegeben.

Zum Nachweis der IL-12-Produktion durch stimulierte MoDC über eine intrazelluläre Fluoreszenzfärbung mit anschließender durchflußzytometrischer Analyse wurden nach der Infektion der MoDC die Zellen ohne oder mit den jeweiligen Stimuli in 12- oder 24-Loch-Zellkulturplatten für 22 h kultiviert. SAC wurde mit 0,075% (w/V) und LPS mit 100 ng/ml zugegeben. Die CD154-exprimierenden Ltk^- -Zellen wurden mit den MoDC in einem Verhältnis von 2,5 : 1 kokultiviert. Pro Stimulation wurden 5×10^5 MoDC in 2 ml RPMI 1640/10% FKS mit 800 U/ml GM-CSF & 500 U/ml IL-4 und 1.000 U/ml IFN- γ eingesetzt. Als Proteintransportinhibitor wurde BFA verwendet, das im Falle der LPS- und SAC-Stimulationen mit 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ für die letzten 5 h der Kultur bzw. im Falle der CD40-Ligationen mit 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ für die letzten 2 h der Kultur zugesetzt wurde. Nach Ablauf der Stimulationszeit wurden die Ansätze geerntet und für eine intrazelluläre FACS-Färbung vorbereitet (siehe **5.5.3**).

Sezerniertes IL-12p40 bzw. IL-12p70 wurde im Überstand von MoDC-Kulturen mittels spezifischer ELISA-Systeme nachgewiesen (siehe **5.8**). Für die Stimulation der MoDC wurden 5×10^5 Ltk^- -Zellen mit oder ohne CD154 in 24-Loch-Zellkulturplatten ausgesät und o/n kultiviert. Am nächsten Tag wurde der Überstand abgenommen und MoDC im Verhältnis von 1 : 2,5 in 1 ml Medium (RPMI 1640/10% FKS mit 800 U/ml GM-CSF & 500 U/ml IL-4 & 1.000 U/ml IFN- γ) zugegeben. Parallel wurden 2×10^5 MoDC in 1 ml Medium mit oder ohne LPS (100 ng/ml) bzw. SAC (0,075% (w/V)) ausplattiert. Die Kulturen wurden nach 24 h oder nach 48 h geerntet, die Überstände durch Zentrifugation (10 min, $400 \times g$, $0 - 4^\circ\text{C}$) gewonnen und bei -80°C gelagert.

5.4.4 Induktion der TNF- α -Sekretion durch MoDC

Zum Nachweis einer TNF- α -Sekretion nach Infektion der MoDC wurden diese, wie unter 5.4.1 beschrieben, mit ED-B, WTF oder VSV infiziert und in einer Zelldichte von 2×10^5 /ml in 24-Loch-Zellkulturplatten in Doppelansätzen ausgesät. Die Kulturen wurden 24 h, 48 h und 72 h p.i. geerntet und die Überstände bei -80°C eingefroren. Als Kontrollen dienten Ansätze mit einer Mockinfektion der MoDC bzw. Ansätze mit einer Mockinfektion und anschließender Stimulation mit LPS (100 ng/ml).

5.4.5 Kokultur von MoDC in einem Zweikammerzellkultursystem

Unreife MoDC wurden mit verschiedenen behandelten MoDC-Populationen kokultiviert, wobei die Kulturen durch einen permeablen Zellkultureinsatz voneinander getrennt waren. Die verwendete Membran erlaubte mit einem Porendurchmesser von $0,02 \mu\text{m}$ den Durchtritt von löslichen Mediatoren, verhinderte aber die Diffusion von infektiösem Masernvirus (durchschnittliche Größe $\sim 200 \text{ nm}$). **Bild 5–3** zeigt schematisch das Prinzip des Zweikammerzellkultursystems. 2×10^5 unreife MoDC wurden in $500 \mu\text{l}$ in Näpfe einer 24-Loch-Zellkulturplatte vorgelegt. Nach Einsatz der Nunc Tissue Culture Inserts (Anapore-MembranTM, Porengröße $0,02 \mu\text{m}$) wurden MoDC ($2,5 \times 10^5/500 \mu\text{l}$; behandelt wie unter 5.4.1) in das obere Kompartiment gegeben. Die Kokulturen wurden bis zu 96 h durchgeführt. Die Zellen des unteren und des oberen Kompartiments wurden geerntet und durchflußzytometrisch untersucht. In einigen Versuchen wurden gegen Typ I-Interferon gerichtete Antiseren zum unteren Kompartiment zugegeben (täglich 1.000 NU/ml α -IFN- α , 1.000 NU/ml α -IFN- β oder 1.000 NU/ml α -IFN- α und α -IFN- β).

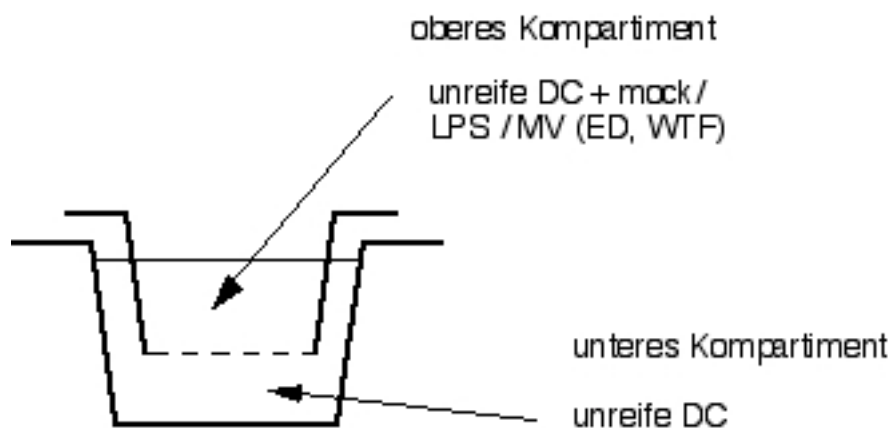


Bild 5–3 Schematische Übersicht über das eingesetzte Zweikammerzellkultursystem

Das untere Kompartiment wurde von dem oberen Kompartiment durch eine permeable AnaporeTM-Membran getrennt. Aufgrund des geringen Porendurchmessers ($\varnothing 0,02 \mu\text{m}$) konnten lösliche Mediatoren von einem zum anderen Kompartiment entsprechend ihres Konzentrationsgradienten diffundieren, den wesentlich größeren Masernpartikeln (Größe von $\sim 200 \text{ nm}$) wurde aber der Durchtritt verwehrt. Somit konnte dieses System eingesetzt werden, um den Aktivierungsvorgang von MoDC durch lösliche Stoffe unabhängig von einer Infektion zu untersuchen.

5.4.6 Inkubation von MoDC mit UV-inaktiviertem Virus

Um einen Einfluß der viralen Strukturproteine auf die Aktivierung der MoDC unabhängig von einer Virusreplikation untersuchen zu können, wurden unreife MoDC mit UV-inaktiviertem Virus kokultiviert. Die Virus- bzw. die entsprechenden Mockpräparationen wurden mit einer Energie von $1,5 \text{ J/cm}^2$ UV-inaktiviert und in den angegebenen Volumina zu den MoDC gegeben. Pro Zeitpunkt wurden in Doppelansätzen 2×10^5 MoDC/ml Medium in einen Napf einer 24-Loch-Zellkulturplatte ausgesät und nach 24 h, 48 h oder 72 h geerntet. Anschließend wurden die Zellen entweder mittels Durchflußzytometrie oder mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert.

5.5 Durchflußzytometrie

Immunfluoreszenzfärbungen wurden in einem Becton-Dickenson FACScan™ unter Verwendung der Lysis II™-Software aufgenommen und mittels der CellQuest-Software™ ausgewertet.

5.5.1 FACS-Oberflächenfärbungen

Allgemein wurden ~50.000 Zellen pro Färbung eingesetzt. Diese wurden in einem Volumen von 50 µl mit den jeweiligen Antikörpern 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem ersten Waschschrift mit FACS-Puffer wurden die Zellen in der entsprechenden Antikörperverdünnung resuspendiert. Hierbei wurden die Antikörper in Verdünnungen entsprechend den Angaben der Hersteller eingesetzt. Im Fall der im Labor präparierten monoklonalen Antikörper wurde die optimale Antikörperkonzentration durch Kontrollfärbungen festgestellt. Die nicht-markierten monoklonalen Antikörper wurden durch Fluoreszenzfarbstoff-markierte Sekundärantikörper nachgewiesen (30 min auf Eis, 50 µl Färbevolumen). Bei einer anschließenden Doppelfärbung wurden die Zellen nach einem Waschschrift mit 25 µl Mausserum (10% in FACS-Puffer) für 10 min auf Eis blockiert. Der fehlende, direkt-markierte Antikörper wurde in einem Volumen von 25 µl zugegeben. Nach erneuter Inkubation für 30 min auf Eis wurden die Ansätze gewaschen und in 50 µl Propidiumiodidlösung ($1 \mu\text{g/ml}$) resuspendiert. Pro Färbung wurden 10.000 morphologisch intakte, Propidiumiodid-negative Zellen aufgenommen. Zur Kontrolle der Hintergrundfärbung und Kompensation der Doppel- und Dreifachfärbungen wurden entsprechende Isotypantikörperfärbungen und Positivkontrollen eingesetzt.

5.5.2 Intrazelluläre FACS-Färbungen

Pro Färbung wurden ~100.000 Zellen eingesetzt. Nach Fixierung der Zellen mit PFA-Lösung (3,7% PFA in $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freiem PBS, 20 min, RT) wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen und durch Inkubation mit Permeabilisierungspuffer (0,33% Saponin in FACS-Puffer) für 10 min bei RT permeabilisiert. Nach Zentrifugation und Abnahme des Überstandes wurden die monoklonalen Antikörper in den entsprechenden Konzentrationen verdünnt in Permeabilisierungspuffer zugegeben (30 min, RT, 50 µl Färbevolumen). Nach einem Waschschrift mit Permeabilisierungspuffer wurden nicht-markierte Antikörper durch Färbung mit einem Sekundärantikörper detektiert (30 min, RT, 50 µl Färbevolumen). Zum Abschluß der Färbung wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen, um restliches Saponin zu entfernen, und mit einem Becton-Dickenson FACScan™ gemessen. Isotypantikörper dienten zur Bestimmung der Hintergrundfärbung.

5.5.3 Intrazelluläre IL-12-Immunfluoreszenzfärbungen

Nach Aktivierung mit entsprechenden Stimuli (siehe 5.4.3) wurden die Zellen geerntet und mit $\sim 5 \times 10^5$ Zellen pro Färbung mit PFA-Lösung fixiert (20 min bei RT). Nach einem Waschschriff mit FACS-Puffer wurden die Zellen 10 min mit Permeabilisierungspuffer behandelt. Nach erneutem Waschschriff erfolgte eine 30 minütige Inkubation der Zellen in Antikörperlösung. Hierzu wurden die Antikörper entsprechend den Herstellerangaben mit Permeabilisierungspuffer verdünnt. Nach einem Waschschriff mit Permeabilisierungspuffer und einem abschließenden Waschschriff mit FACS-Puffer wurden etwa 200.000 morphologisch intakte Zellen pro Färbung aufgenommen. Eine Infektion der Zellen mit EDeGFP wurde über die Expression des eGFP und die daraus resultierende Grünfluoreszenz der Zellen nachgewiesen. Durch Färbung mit einem VSV-G-spezifischen mAk konnten VSV-infizierte MoDC charakterisiert werden. Zur Feststellung der Hintergrundfluoreszenzen und der Einstellung der Kompensation wurden entsprechende Isotypantikörper und Positivfärbungen verwendet.

5.5.4 Quantitative Durchflußzytometrie

Durch den Einsatz eines quantitativen Durchflußzytometriesystems unter Verwendung von FITC-markierten Mikrokügelchen, die Bestandteil eines Kompensationswerkzeugs für Durchflußzytometer waren (Sigma-Aldrich Chemicals Corp., Deisenhofen, Deutschland), war es möglich, die Entwicklung der Zellzahlen von MoDC im Laufe einer Infektion zu verfolgen. Entsprechend der Methode von Jassoy und Mitarbeitern (Heinkelein *et al.*, 1997) wurden die zu färbenden Zellen aus der Zellkulturplatte direkt in FACS-Röhrchen überführt und wie unter 5.5.1 beschrieben mit monoklonalen Antikörpern, die gegen HLA-DR, CD71, CD83, CD86 oder MV-H gerichtet waren, gefärbt. Nach dem letzten Waschschriff mit FACS-Puffer wurden die Zellen in $\sim 300 \mu\text{l}$ einer 1 : 8-Verdünnung von FITC-markierten Mikrobeads resuspendiert. Die genaue Konzentration der Beads wurde für jedes Experiment zuvor in dreifachen Ansätzen im FACScan über die charakteristische Morphologie und das charakteristische Fluoreszenzmuster der Kügelchen bestimmt. Wie in **Bild 5-4** schematisch dargestellt, wurden parallel zu den MoDC die Beads morphologisch dargestellt und deren Fluoreszenzmuster in einem separaten Graphen abgebildet. Durch Kombination der morphologischen Auswahl der Beads mit der Auswahl der singulären Beads, die FITC-positiv und PE-negativ waren, konnte die Zahl der Beads bestimmt werden. Die Messung wurde abgebrochen, wenn ein Sechstel der Beads in einem Färbeansatz gemessen waren. Aufgrund der zufälligen Verteilung der Zellen in der jeweiligen Färbung wurde somit ebenfalls ein Sechstel der Zellen aufgenommen. Die absolute Zellzahl pro Färbung konnte durch Multiplikation der aufgenommenen Ereignisse in der morphologischen Zellauswahl mit sechs ermittelt werden. Gleichzeitig konnte das Fluoreszenz- und somit auch das Antigenexpressionsmuster auf der Zelloberfläche der MoDC ermittelt werden.

5.5.5 Populationsuntersuchungen

Blutproben von Patienten, die mit Wildtypmasern infiziert waren, oder von Freiwilligen, die sich mit dem Vakzinestamm ED-B haben impfen lassen, wurden in regelmäßigen Abständen durch Dr. med Ralf Nanan, Kinderklinik der Universität Würzburg, abgenommen. Aus diesen Proben wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation (siehe 5.1.5) die PBMC isoliert und mit drei verschiedenen direkt- oder indirekt-markierten mAk-Mischungen gefärbt. mAk-Mischung I umfaßte folgende mAk: α -CD3-FITC, α -CD14-FITC, α -CD19-FITC, α -HLA-DR-PC5 und α -MV-H (K83) detektiert mittels Ziege-anti-Maus-IgG-PE. Unter Verwendung dieser Antikörpermischung konnten die Hauptpopulationen der PBMC identifiziert werden.

Durch entsprechende Auswahl konnte zudem über die Morphologie und das Fluoreszenzmuster (HLA-DR⁺,CD3⁻, CD14⁺,CD19⁻) die Blut-DC-Population identifiziert und auf mögliche MV-H-Expression analysiert werden. MAk-Mischung II umfaßte die mAk α -CD3-FITC, α -CD14-FITC, α -CD19-FITC, α -HLA-DR-PC5 sowie α -pan-TCR γ -PE, mAk-Mischung III die mAk α -CD3-FITC, α -CD14-FITC, α -CD19-FITC, α -HLA-DR-PC5 sowie α -CD16-PE und α -CD56-PE und schließlich die Ak-Mischung IV, die die mAk α -CD3-FITC, α -CD14-FITC, α -CD19-FITC, α -HLA-DR-PC5 und α -CD38 detektiert mittels Ziege-anti-Maus-IgG-PE umfaßt. Mit den Mischungen II bis IV konnten spezifische Populationen der PBMC, nämlich die $\gamma\delta$ -T-Zellen (II), die NK-Zellen (III) sowie die Entwicklung der CD38-Expression innerhalb der Hauptzellpopulationen der PBMC (IV) verfolgt werden. Die Oberflächen-FACS-Färbungen erfolgten wie unter **5.5.1** beschrieben.

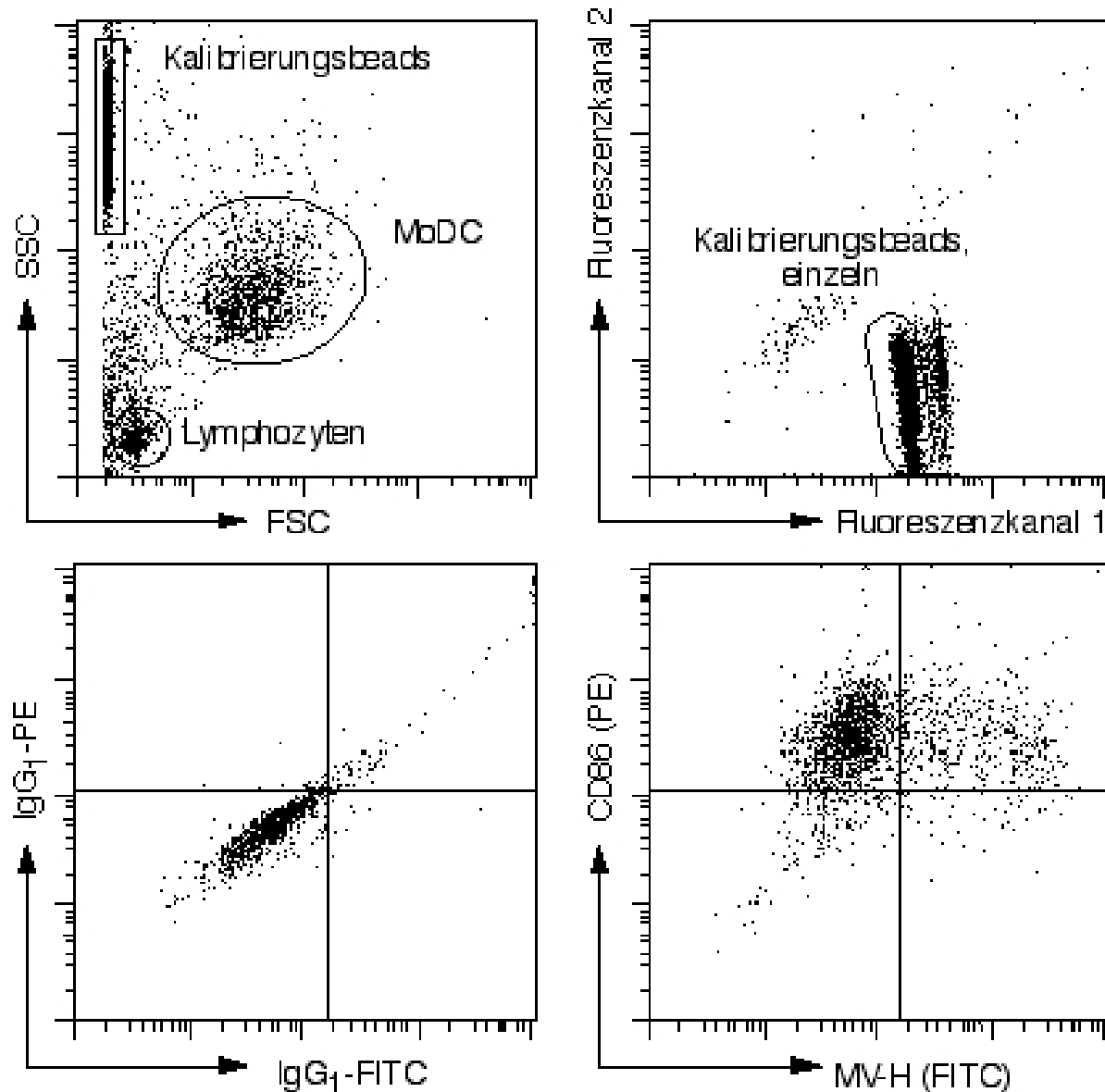


Bild 5–4 Schematisch Darstellung des Prinzips der quantitativen FACS-Analyse

Nach einer normalen Oberflächenfärbung mit direkt- oder indirekt-markierten monoklonalen Antikörpern wurden die MoDC nach dem letzten Waschschrift in einem definierten Volumen einer 1 : 8-Verdünnung von FACScan-Kompensationsbeads resuspendiert. Die Kügelchen sind aufgrund ihrer charakteristischen Morphologie in der Darstellung der Größe gegenüber der Granularität und in der Darstellung ihrer Fluoreszenzeigenschaften (FITC-positiv und PE-negativ) leicht zu identifizieren. Durch Kombination der Referenzauswahlen aus Morphologie und singulären Fluoreszenzsignalen konnte die genaue Anzahl an Beads bestimmt werden. Durch Festlegung der Aufnahme von einem Sechstel der Beads pro Färbung konnten je Ansatz gleiche Volumina aufgenommen werden. Da die Zellen zufällig verteilt waren, wurde unter diesen Bedingungen ebenfalls ein Sechstel der Zellen aufgenommen. So ist es möglich, daß sowohl die Zellzahl pro Ansatz als auch die entsprechende Morphologie der Zellen und ihre Fluoreszenzeigenschaften bestimmt werden konnten.

5.6 T-Zellproliferationstests

Eine wesentliche Funktion der DC ist die antigen-spezifische Stimulation von T-Zellen. Die Proliferation der aktivierten T-Zellen kann *in vitro* über den Einbau von radioaktiv-markiertem Thymidin in die DNS der Zellen bestimmt werden. Die markierten Zellen werden nach der Inkubation mit Tritium-haltigem Thymidin auf Glasfasermatten geerntet. Hierbei werden die Zellen lysiert und die markierte DNS bleibt an den Glasfasern haften. In einem Flüssigkeitsszintillisationszähler wird anschließend die Aktivität des inkorporierten ^3H -Thymidins gemessen. Der Thymidineinbau wurde als Stimulationsindex (SI) angegeben, wobei der Stimulationsindex definiert ist als:

$$\text{Formel 5-5} \quad SI = \frac{(^3\text{H} - \text{Thymidineinbau})_{\text{aktivierte T-Zellen}}}{(^3\text{H} - \text{Thymidineinbau})_{\text{ruhende T-Zellen}}}$$

5.6.1 „Mixed Leukocyte Reaction“

In einer „Mixed Leukocyte Reaction“ (MLR) werden Zellpopulationen von zwei Spendern kokultiviert, wobei eine Population durch entsprechende Behandlung die Fähigkeit verliert sich teilen zu können und als APC fungiert. In einem allogenen Kontext bedeutet dies, daß die APC den T-Zellrezeptoren der kokultivierten, teilungskompetenten T-Zellen Fremd-MHC-Moleküle, also Fremdanigene präsentiert. Aufgrund der hohen Frequenz an allogenen reaktiven T-Zellen kommt es zu einer T-Zellaktivierung und nachfolgenden Zellteilungen die sich über den Einbau von [Methyl- ^3H]-Thymidin in die DNS bestimmen läßt. Dendritische Zellen, in diesem Fall also MoDC, gelten als besonders gute APC, da sie mit ihrer Ausstattung an T-Zell-aktivierenden Molekülen als einzige APC die Fähigkeit besitzen naive, ruhende T-Zellen zu aktivieren. Aus diesem Grund zeigen Dendritische Zellen in einer allogenen MLR verglichen mit anderen APC-Populationen die höchsten Stimulationsindizes bei vergleichsweise niedrigen Kokultivierungsverhältnissen.

In die Näpfe einer 96-Loch-Rundbodenzellkulturplatte wurden in 100 μl RPMI 1640/10% FKS 5×10^4 allogene T-Zellen gegeben. Um eine Infektion oder eine Zell-Zell-Fusion der T-Zellen mit infizierten MoDC zu verhindern, wurde dem Medium FIP („fusion inhibiting protein“, Richardson *et al.*, 1980) in einer Endkonzentration von 200 μM zugesetzt. MoDC wurden in Dreifachansätzen in den Verhältnissen von 1:7, 1:20, 1:60, 1:180 und 1:540 ebenfalls in 100 μl Medium zugegeben. Als Kontrolle dienten T-Zellen ohne MoDC-Kokultur. Die Zellen wurden insgesamt fünf Tage kokultiviert, wobei während der letzten 16 h mit 50 μl [Methyl- ^3H]-Thymidin mit einer spezifischen Aktivität von 37 kBq/ml markiert wurde. Anschließend wurden die Ansätze mit einem Erntegerät auf Glasfasermatten übertragen, diese in einem Ofen getrocknet und der Tritiumeinbau mittels eines Flüssigkeitsszintillisationszählers bestimmt. Die entsprechend der **Formel 5-5** errechneten SI wurden in Abhängigkeit von der Anzahl an eingesetzten MoDC dargestellt.

5.6.2 Mitogener T-Zellproliferationstest mit PHA

Die Proliferation von T-Zellen kann durch allogene APC, aber auch durch die Inkubation der T-Zellen mit polyklonal wirkenden Mitogenen induziert werden. Eine Klasse der Mitogene, die zumeist pflanzlichen Lektine, binden unspezifisch an Kohlenhydratseitenketten von

Membranproteinen der T-Zellen. Dabei werden die Proteine kreuzvernetzt und transduzieren Signale, die die Zellteilung der T-Zellen aktivieren.

In die Näpfe einer 96-Loch-Flachbodenplatte wurden 1×10^5 allogene oder autologe T-Zellen in 100 μl RPMI 1640/10% FKS gegeben. Zu diesen Zellen kamen in 100 μl Medium $2,5 \times 10^4$ MoDC. Neben 200 μM FIP enthielt das Medium auch das polyklonal wirkende Mitogen PHA (2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Als Kontrollen dienten T-Zellen ohne Kokultur mit MoDC mit oder ohne PHA-Zugabe. Nach einer Kokultur von 72 h, wobei die Ansätze während der letzten 16 h mit 0,5 μCi [^3H]-Thymidin pro Napf (spezifische Aktivität 37 kBq/ml) markiert worden waren, erfolgte die Bestimmung des Einbaus an Tritium in die DNS mittels eines Flüssigkeitsszintillationszählers. Die SI wurden entsprechend der **Formel 5-5** berechnet.

5.6.3 Mitogener T-Zellproliferationstest mit SEA

Bei dem Mitogen SEA handelt es sich um ein oligoklonal wirkendes bakterielles Superantigen. Allgemein zeichnen sich Superantigene dadurch aus, daß sie antigen-unspezifisch durch Bindung an die α -Kette von MHC Klasse II-Molekülen und durch Bindung an konstante Abschnitte innerhalb der V_β -Domäne von TCR-Molekülen einen MHC-TCR-Kontakt zwischen einer APC und einer T-Zelle herstellen. Aufgrund der relativen Häufigkeit in Abhängigkeit vom Haplotyp des jeweiligen Spenders der durch die Superantigene erkannten V_β -Domänen innerhalb einer gegebenen T-Zellpopulation kann so eine ausgeprägte Proliferation der T-Zellen induziert werden.

Der angewendete Proliferationstest mit SEA wurde analog der unter **5.6.1** beschriebenen MLR durchgeführt. Autologe T-Zellen wurden durch „Panning“ mit HLA-DR-spezifischen Antikörpern von MHC Klasse II-exprimierende T-Zellen depletiert (siehe **5.1.7**). Von diesen aufgereinigten autologen T-Zellen wurden jeweils 5×10^4 Zellen in 100 μl RPMI 1640/10% FKS in die Näpfe einer 96-Loch-Rundbodenplatte ausgesät. Zu diesen Zellen wurden in den Verhältnissen MoDC zu T-Zelle von 1:7, 1:20, 1:60, 1:180 und 1:540 MoDC in 100 μl Medium zugegeben. Die Ansätze enthielten FIP (200 μM Endkonzentration) und SEA (1 ng/ml Endkonzentration). Als Kontrollen dienten Ansätzen ohne MoDC mit SEA und Ansätze mit MoDC ohne SEA. Die SI wurden entsprechend der **Formel 5-5** berechnet.

5.7 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und „Western Blot“-Analyse

Durch Verwendung einer diskontinuierlichen Polyacrylamidgelelektrophorese können Proteine in einem Gelträger nach Anlegen einer elektrischen Spannung entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden. Nach Transfer der Proteine aus dem Gel auf Protein-bindende Membranen können unter Einsatz von Antikörpern Proteinbanden spezifisch dargestellt und analysiert werden.

5.7.1 Herstellung von Zelllysaten

Pro Ansatz und Zeitpunkt wurden 1×10^6 bis $1,5 \times 10^6$ MoDC eingesetzt. Entsprechend den Angaben des Herstellers wurde zu den pelletierten Zellen (10 min, 400xg, 0 - 4°C) peqGOLD TriFast™-Reagenz zugegeben und die Zellen aufgearbeitet. Das präparierte Proteinpellet wurde in einer 1%igen SDS-Lösung gelöst und der Proteingehalt kolorimetrisch unter Verwendung des Proteinkonzentrationsbestimmungssets von Sigma bestimmt. Die Proteinpräparate wurden bei -20°C gelagert.

5.7.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die zu analysierenden Proben wurden in einem reduzierenden Probenpuffer aufgenommen und pro Spur gleiche Proteinmengen aufgetragen. Durch das denaturierende Agens SDS werden die Proteine in eine zylindrische Form aufgefaltet und mit einer Hülle aus SDS-Molekülen umgeben. Dadurch erhalten die Moleküle entsprechend ihrer Größe eine negative Ladung und können in einem elektrischen Feld innerhalb einer Gelmatrix aufgetrennt werden. Die Verwendung eines diskontinuierlichen Gelsystems erlaubt die Aufkonzentration der verschiedenen Proben an der Grenze zwischen dem sogenannten Sammelgel und dem folgenden Trenngel. Das im Sammelgel und im Probenpuffer enthaltene Glyzin liegt aufgrund des pH-Wertes im Sammelgel als Zwitterion vor. Somit werden die Proteine zwischen den sogenannten Leitonen, den Chloridionen, und den Folgeionen, den Glyzinionen, gefangen und unter dem Einfluß des elektrischen Feldes fokussiert. Bei Erreichen des Trenngels kommt es zu einem pH-Sprung von pH 6,8 auf pH 8,7. Das Glyzin liegt dann als Anion vor und wandert als kleines Molekül zusammen mit den Chloridionen den größeren Proteinationen voraus. Die Proteinationen sind nun nicht mehr zwischen den ehemaligen Leit- und Folgeionen gefangen und werden in dem Trenngel unter dem Einfluß des angelegten elektrischen Feldes innerhalb der Gelmatrix entsprechend ihrer Größe aufgetrennt.

Bei Verwendung der großen Gelapparatur wurde eine Stromstärke von 50 mA eingestellt und die Proben o/n aufgetrennt. In der Regel wurden pro Spur ~60 µg an Protein aufgetragen. Wurden die kleinen Gelapparaturen eingesetzt, so wurden die Proben (~25 µg pro Spur) bei einer Stromstärke von 30 mA innerhalb von drei bis fünf Stunden aufgetrennt.

5.7.3 „Western Blot“-Analyse

Nach Beendigung des Gellaufs müssen die im Gel aufgetrennten Proteine analysiert werden. Hierzu wurden die Proteine mittels einer semitrockenen „Blottingapparatur“ nach Anlegen eines Stromfeldes aus dem Gel auf eine Protein-bindende Nitrozellulosemembran transferiert.

Das Gel wurde zunächst in Kathodenpuffer äquilibriert. Auf die Kathode der „Blottingapparatur“ wurden drei mit Kathodenpuffer befeuchtete 3MM-Whatmanpapiere™ gelegt. Das äquilibrierte Gel wurde luftblasenfrei aufgelegt und mit einer in Kathodenpuffer befeuchteten Nylonmembran bedeckt. Anschließend folgten zwei Schichten 3MM-Whatmanpapiere™ mit je drei Lagen, die in 30 mM- bzw. in 300 mM-Anodenpuffer eingelegt waren. Der Transfer der Proteine aus einem großen Gel erfolgte bei unbegrenzter Spannung und einer Stromstärke von 100 mA für eine Stunde.

Nach Beendigung des Proteintransfers wurden unspezifische Proteinbindungsstellen auf der Nylonmembran mit Magermilchpuffer für 30 – 60 min bei RT oder bei 4°C o/n blockiert. Anschließend erfolgte ein Immunnachweis der MxA- bzw. der MV-H-Proteine auf der Nitrozellulosemembran mittels spezifischer mAk. Die Ak-Verdünnungen (1:50) wurden in PBS/Tween/10%Milchpulver angesetzt. Nach 1 h Inkubation bei RT wurde die Membran dreimal 10 min bei RT mit PBS/Tween gewaschen. Der Ak-Nachweis erfolgte über eine Inkubation der Membran mit einem Ziege-anti-Maus-IgG-spezifischen Antikörper (1:5.000 verdünnt in PBS/Tween/10%Milchpulver) gekoppelt an Meerrettichperoxidase. Nach erneuten Waschschritten wurden mittels des ECL™-Systems von Amersham die Proteine nachgewiesen. Die Meerrettichperoxidase setzte dabei ein Substrat um, wobei ein Röntgenfilm an der Stelle der spezifisch markierten Proteinbanden über die dabei erfolgende Freisetzung von Photonen geschwärzt wurde.

5.8 Zytokinkonzentrationsbestimmung über „ELISA“

Für die Ermittlung der Konzentrationen an IL-12p70 und IL-12p40 sowie des TNF- α wurden kommerzielle Testsysteme basierend auf dem „ELISA“-System verwendet. Unter „ELISA“, dem „enzyme-linked immuno-sorbent assay“, versteht man eine Methodik, bei der die Oberfläche der Näpfe einer 96-Loch-Plastikplatte mit spezifischen Antikörpern, in diesem Fall gegen die humanen Zytokine IL-12p70, IL-12p40 und TNF- α , bedeckt ist. An diese Antikörper binden die Zytokine aus der Probe. Nach mehreren Waschschritten werden diese gebundenen Zytokine durch einen zweiten Antikörper gebunden, an den ein Enzym gekoppelt ist, z.B. die Merrrettichperoxidase. Unter Umständen erfolgt eine Signalverstärkung über das Streptavidin/Biotinsystem. In diesem Fall ist der Sekundärantikörper mit Biotin markiert. An dieses bindet ein Enzym-Streptavidin-Konjugat, so daß die Enzymaktivität und somit auch die Signalstärke pro gebundenem Antikörper deutlich verstärkt wird. Zumeist entsteht durch die Enzymreaktion aus dem verwendeten Substrat ein farbiges Produkt. Durch Vergleich mit einem Referenzstandard kann die Zytokinkonzentration über die Intensität der Farbentwicklung kolorimetrisch festgestellt werden.

Die zu analysierenden Proben stammten von Ansätzen mit 2×10^5 MoDC in 1 ml MoDC-Kulturmedium kultiviert in 24-Loch-Zellkulturplatten (siehe 5.4.3 und 5.4.4). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Ansätze geerntet, die Zellen durch Zentrifugation (10 min, RT, 400xg) entfernt und die Überstände bis zur Analyse bei -80°C gelagert. Die Proben wurden entsprechend den Angaben des Herstellers (DuoSet[®] ELISA Development System, R&D Systems) verdünnt. Mittels linearer Regressionsanalyse der Messungen der mitgelieferten Referenzstandards konnten die Zytokinkonzentrationen berechnet werden.

6 Ergebnisse

6.1 Infektion von humanen MoDC mit Masernvirus

6.1.1 Ausbildung eines zytopathischen Effekts nach Infektion mit MV

Unreife MoDC wurden mit einer Mock-Präparation oder mit dem MV Vakzinestamm Edmonston (ED-B, MOI 0,1) infiziert. Die Hälfte der Mock-infizierten MoDC wurde durch Zugabe von LPS (0,1 µg/ml) ausgereift. Nach drei Tagen in Kultur wurden die Zellsuspensionen auf das Entstehen eines MV-induzierten zytopathischen Effekts untersucht und fotografiert (**Bild 6–1**). Die Riesenzellen waren in der ED-B-infizierten MoDC-Kultur deutlich zu erkennen. Ein ähnlicher, verglichen mit den ED-B-infizierten MoDC allerdings deutlicherer zytopathischer Effekt unter Ausbildung von Synzytien war nach Infektion der MoDC mit dem Wildtypstamm WTF zu beobachten (nicht gezeigt). In den Kontrollkulturen (Mock bzw. LPS) waren solche Fusionszellen nicht vorhanden. Durch die Aktivierung mit LPS konnte zudem in den Kulturen ein stärkere Tendenz Zellaggregate auszubilden beobachtet werden. Vergleichbare Aggregate waren in der Mock-infizierten Kultur auch zu finden, allerdings nur in niedrigerer Frequenz.

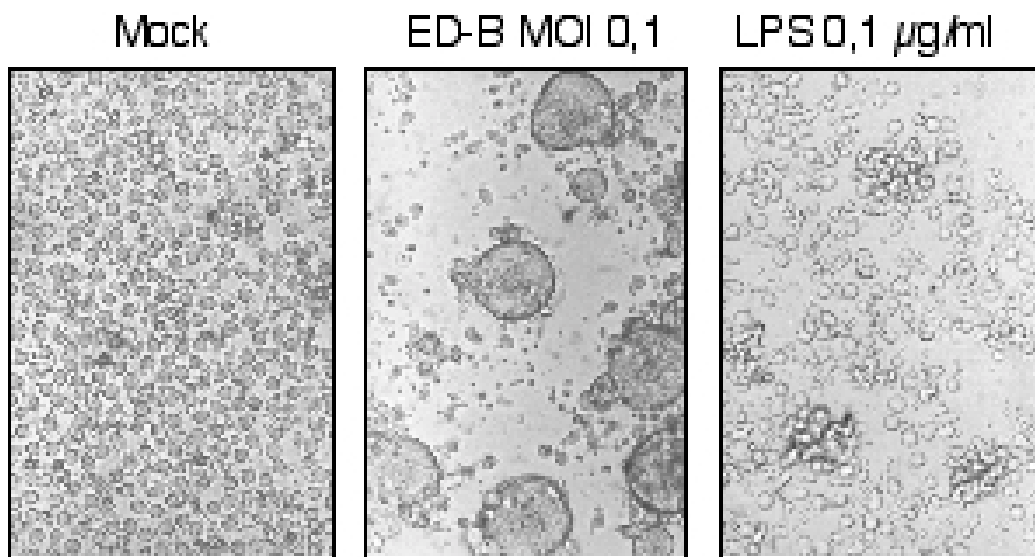


Bild 6–1 Kulturen von MoDC drei Tage nach Infektion mit ED-B (MOI 0,1) (Mitte) bzw. mit Mock mit (rechts) und ohne LPS-Zugabe (links)

Unreife MoDC wurden zur Kontrolle mit Mock oder mit dem Vakzinestamm ED-B mit einer MOI von 0,1 infiziert (Mitte). Die Mock-infizierten MoDC wurden entweder ohne (links) oder mit dem Aktivierungsstimulus LPS (rechts) kultiviert. Drei Tage p.i. wurden die Kulturen lichtmikroskopisch untersucht und fotografiert.

6.1.2 Virusproduktion von MoDC nach Infektion mit ED-B oder WTF

Um zu überprüfen, ob die Infektion der MoDC mit den Masernviren ED-B und WTF produktiv ist, das bedeutet, ob infektiöse Viruspartikel produziert werden, wurden MoDC (5×10^5 /ml) mit ED-B bzw. mit WTF infiziert (MOI 0,05) und in Kultur genommen. Die Infektion fand mit oder ohne LPS (0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) statt. Die Kulturüberstände bzw. die Zellpellets wurden zu den angegebenen Zeitpunkten gesammelt und bei -20°C eingefroren. Die Titer an Zell-assoziiertem und an löslichem Virus wurden unter Verwendung der Spearman & Kärber-Methode über eine Endpunkttitration auf B95a-Zellen berechnet. Wie in **Bild 6–2 (B)** zu erkennen ist, produzierten MoDC unter Einfluß von LPS nach Infektion mit ED-B oder mit WTF kaum infektiöses Virus (WTF: ca. 8 TCID₅₀/ml Gesamtvirus nach 48 h p.i.; ED-B: ca. 6 TCID₅₀/ml Gesamtvirus nach 24 h p.i.). Erhielten die MoDC kein Reifungssignal (**Bild 6–2 (A)**), so produzierten die infizierten Kulturen deutliche größere Virusmengen. WTF-infizierte MoDC produzierten 48 h p.i. 1570 TCID₅₀/ml Gesamtvirus, wobei ca. 85% des infektiösen Virus Zell-assoziiert vorlag. ED-B-infizierte MoDC zeigten 36 h p.i. ein Maximum an Virusfreisetzung, wobei das infektiöse Virus nur Zell-assoziiert nachweisbar war und mit ca. 316 TCID₅₀/ml im Vergleich zu einer WTF-Infektion einen um den Faktor fünf geringeren Titer aufwies. In keinem Fall wurde die zur Infektion der MoDC eingesetzte Menge an Virus ($2,5 \times 10^4$ PFU auf 5×10^5 MoDC) freigesetzt oder gar übertroffen.

6.1.3 Auswirkungen der MV-Infektion auf die Viabilität der MoDC

Um den Einfluß der MV-Infektion auf die Viabilität der MoDC-Kulturen zu untersuchen, wurden unreife MoDC mit ED-B MOI 0,1 infiziert und in Kultur genommen. Als Kontrolle dienten Mock-infizierte MoDC, die zum Teil mit MKM aktiviert wurden. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet und gegen ausgewählte Aktivierungsmarker und gegen MV-H gefärbt. Vor der durchflußzytometrischen Analyse wurden die Zellen in einem definierten Volumen einer Lösung Fluoreszenzfarbstoff-markierter Kalibrierungsbeads resuspendiert.

Die Infektion der MoDC mit ED-B MOI 0,1 führt innerhalb von 48 h p.i. zu einer deutlichen Abnahme der Zahl an lebenden MoDC auf 46 ± 2 % des Ausgangswertes (**Bild 6–3 (A)**). Gleichzeitig reifen die überlebenden MoDC in der infizierten Kultur aus (**Bild 6–3 (B)**). Die Infektion ist anhand der MV-H Expression an Tag 2 p.i. nachweisbar. Eine sehr deutliche Aufregulation der Aktivierungsmarker CD71 und CD86 sowie eine moderate CD83 Expression sind 48 h p.i. zu beobachten. Vergleicht man hingegen die Viabilität der MKM-ausgereiften MoDC mit der der ED-B-infizierten MoDC, so war der Unterschied in der Viabilität zwischen den beiden Ansätzen nicht mehr so ausgeprägt (MKM-MoDC 69 ± 2 % zu ED-B-MoDC 47 ± 2 %).

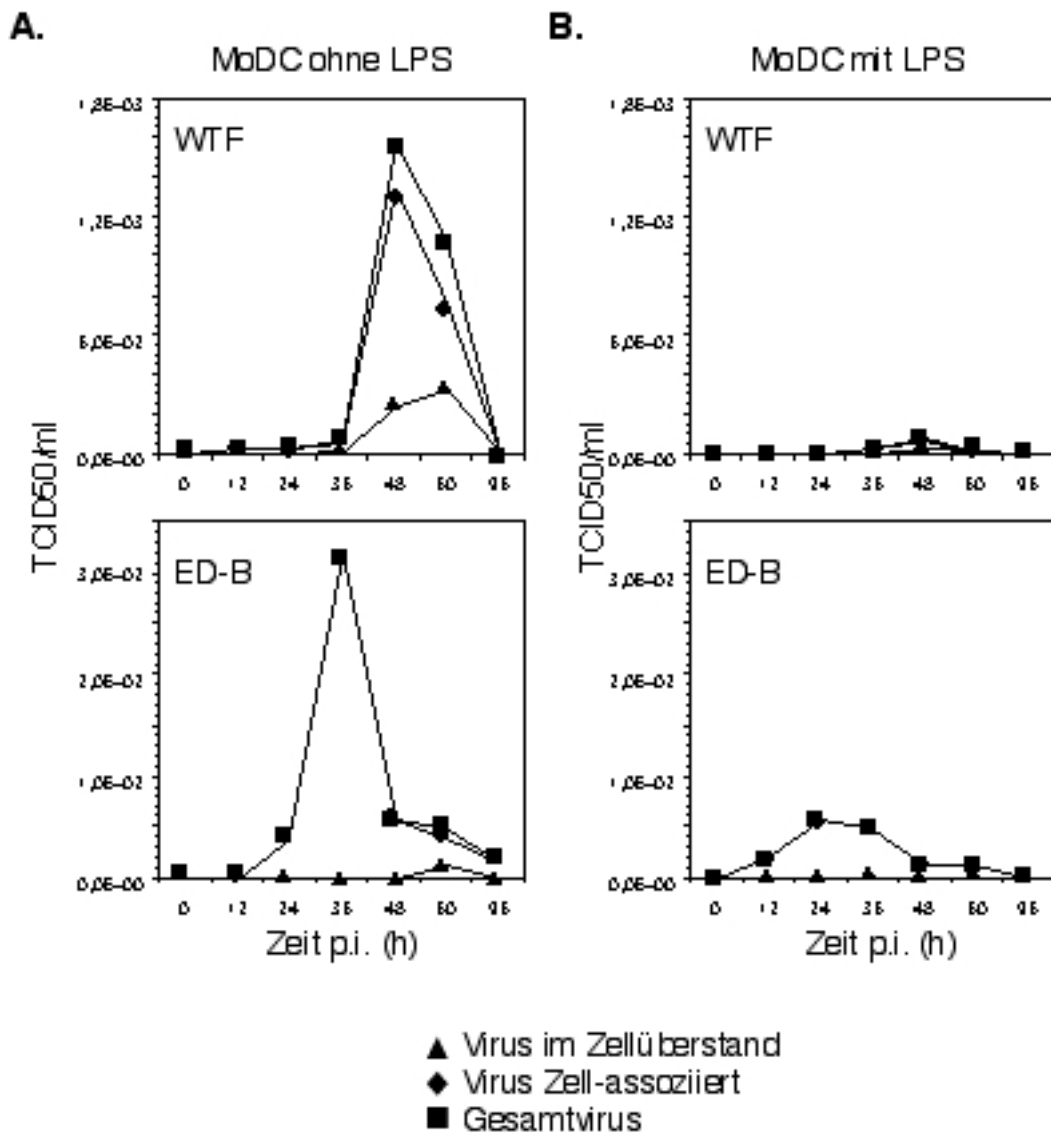


Bild 6–2 Unreife MoDC produzieren nach Infektion mit ED-B oder WTF infektiöses Virus, das v.a. Zell-assoziiert vorliegt

Unreife MoDC ($5 \times 10^5/\text{ml}$) wurden mit ED-B bzw. WTF (MOI 0,05) infiziert und ohne (A) oder mit LPS (0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (B) in Kultur genommen. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Kulturüberstände und die Zellen geerntet und bei -20°C gelagert. Die Titerbestimmung erfolgte nach der Methode von Spearman & Kärber auf B95a-Zellen.

6.1.4 Aktivierungszustand von MoDC nach Infektion mit MV

Wie in **Bild 6–3** bereits zu erkennen war, scheint die Infektion unreifer MoDC mit dem Vakzinestamm ED-B die Zellen der Kultur zu aktivieren, was durch eine Aufregulation einiger MoDC-Aktivierungsmarkern (CD83, CD71 und CD86) festgestellt werden konnte. Dieses Phänomen wurde nun genauer untersucht. Unreife MoDC wurden mit dem Vakzinestamm ED-B oder mit dem Wildtypstamm WTF mit einer MOI von 0,05 infiziert und anschließend in Kultur genommen. Parallel wurden MoDC zur Kontrolle mit Mock infiziert und mit oder ohne LPS als Reifungsstimulus kultiviert. Zwei Tage *post infectionem* wurden die Kulturen geerntet und die Infektion und der Reifungszustand der MoDC durch Oberflächenfärbungen

mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten mAk und anschließender FACS-Analyse bestimmt. Es wurden DC-Aktivierungsmarker (HLA-DR, CD25, CD83) und kostimulatorische Oberflächenantigene (CD40, CD80, CD86) überprüft. Deren Aufregulation oder Neuexpression auf den mit LPS aktivierten MoDC im Vergleich zu den Mock-infizierten, nicht aktivierten MoDC ist kennzeichnend für reife oder aktivierte MoDC. Die Infektion mit MV wurde über den Nachweis von MV-H auf der Zelloberfläche nachgewiesen.

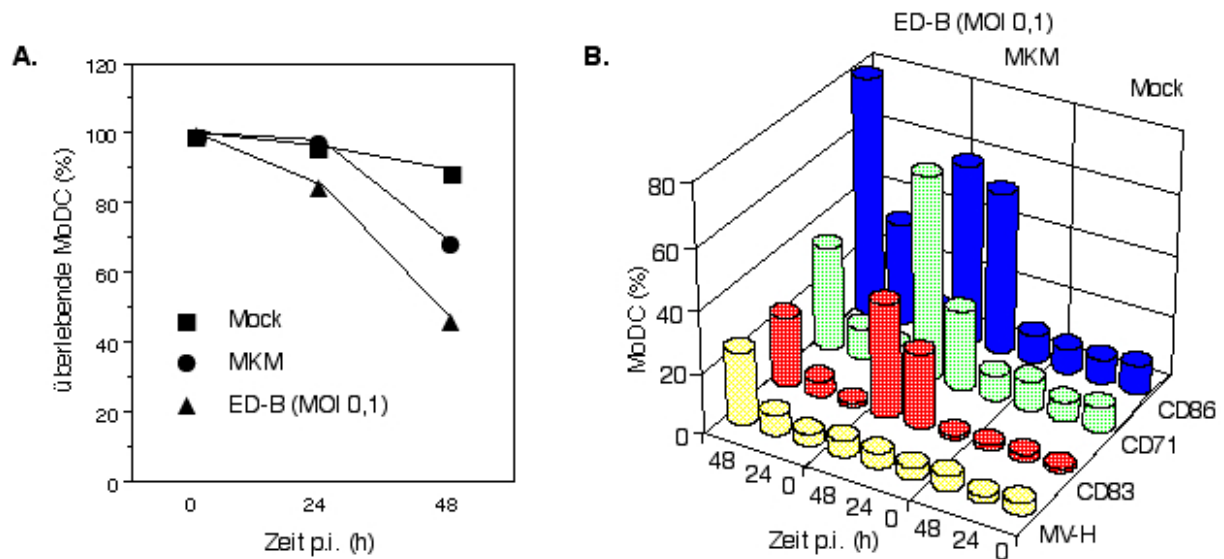


Bild 6–3 Durch eine Infektion mit ED-B MOI 0,1 sinkt die Zahl der lebenden Zellen auf unter 50% der Ausgangszahl (A), während die überlebenden MoDC ausreifen (B)

Unreife MoDC wurden Mock-infiziert oder mit ED-B MOI 0,1. Ein Teil der Mock-infizierten MoDC wurde mit MKM (20 % V/V) aktiviert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet, mit mAk gegen MV-H, CD71, CD83 oder CD86 markiert und nach Zugabe von Kalibrierungsbeads im FACS gemessen. (A) Dargestellt ist der Anteil an überlebenden MoDC in Prozent aus drei unabhängigen Experimenten. Die Standardabweichung betrug unter zehn Prozentpunkte. (B) Entwicklung der MV-H-, CD83-, CD86- oder CD71-Expression auf den lebenden MoDC dargestellt als Prozent positive Zellen.

Wie in **Bild 6–4** zu erkennen ist, führte die Kultivierung unreifer MoDC in Gegenwart von LPS (**Bild 6–4** zweite Reihe) im Vergleich zu Mock-infizierten MoDC (**Bild 6–4** erste Reihe) zu einer verstärkten Expression von HLA-DR, CD40, CD80 und CD86). Das als allgemeiner DC-Aktivierungsmarker geltende CD83 wurde auf den LPS-MoDC neu exprimiert. Eine Expression von MV-H war weder bei den Mock-MoDC noch bei den LPS-MoDC nachzuweisen.

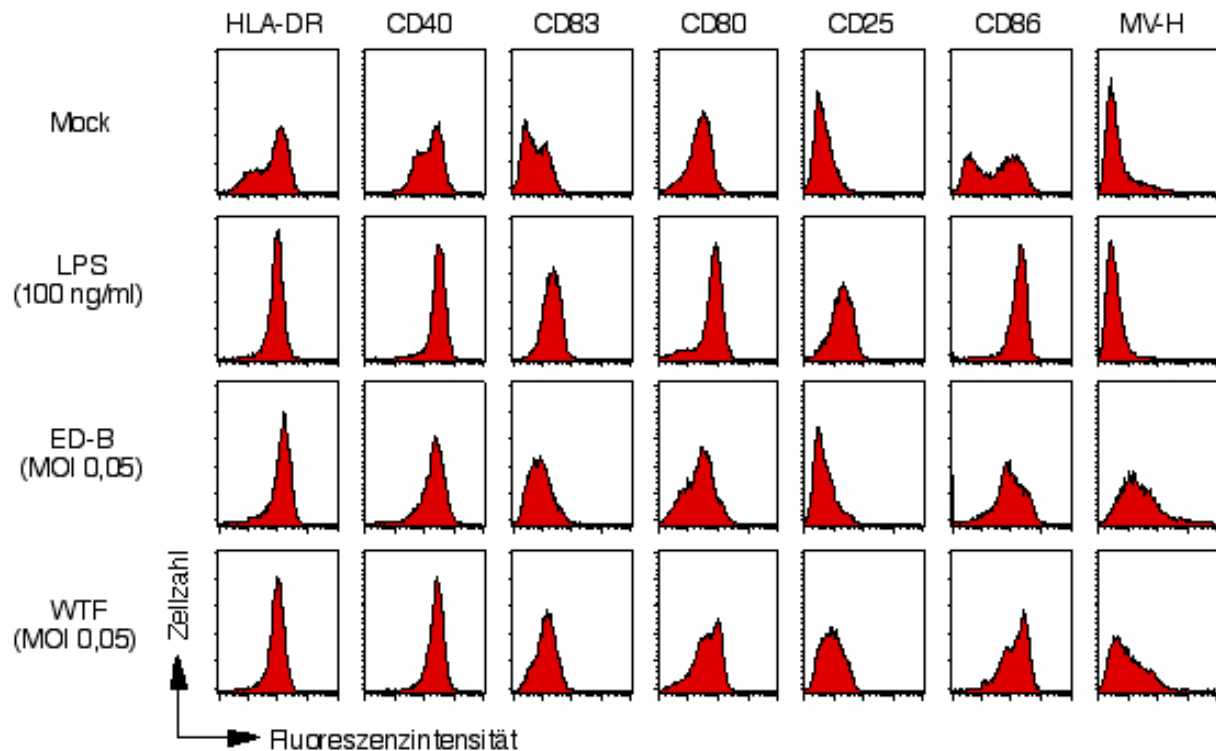


Bild 6–4 Die Ausreifung von nicht-aktivierten MoDC nach Infektion mit dem Wildtypstamm WTF ist im Vergleich zum Vakzinestamm ED-B verstärkt

Unreife MoDC wurden zur Kontrolle mit Mock infiziert und ohne oder mit Reifungsstimulus (LPS 0,1 µg/ml, erste Reihe bzw. zweite Reihe) in Kultur genommen. Parallel wurden unreife MoDC mit einer MOI von 0,05 mit dem Vakzinestamm ED-B (dritte Reihe) oder mit dem Wildtypstamm WTF (vierte Reihe) infiziert. Zwei Tage p.i. wurden die Zellen geerntet und durchflußzytometrisch die Expression von MoDC-Aktivierungsmarkern, von kostimulatorischen Antigenen und der Grad der Infektion unter Verwendung von direkt oder indirekt mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten mAk bestimmt.

Sowohl die Infektion der MoDC mit ED-B als auch mit WTF konnte über die MV-H Expression nachgewiesen werden. Beide Virusstämme induzierten eine Ausreifung der infizierten MoDC-Kultur, wobei die Aufregulation an Aktivierungs- und kostimulatorischen Antigenen auf der Oberfläche der WTF-infizierten MoDC verglichen mit der der ED-B-infizierten MoDC deutlicher war und dem Expressionsmuster LPS-aktivierter MoDC gleich. Besonders klar wurde dieser Unterschied zwischen ED-B- und WTF-infizierten MoDC, wenn das Expressionsniveau der Antigene CD83, CD80 und CD25 miteinander verglichen wurde. WTF-infizierte MoDC zeigten in allen Fällen ein Expressionsmuster, das dem der LPS-aktivierten MoDC ähnelte. Hingegen kam es nur zu einer schwachen CD25- und CD83-Aufregulation nach Infektion mit ED-B. CD80 wurde sogar kaum stärker exprimiert verglichen mit Mock-infizierten Kulturen.

6.1.5 Einfluß der zur Infektion eingesetzten Virusmenge auf den Grad der MoDC-Ausreifung

Um den Einfluß der Virusmenge auf den Reifungszustand der MoDC zu bestimmen, wurden unreife MoDC mit steigenden Mengen an ED-B infiziert und in Kultur genommen. Zur Kontrolle wurden unreife MoDC Mock-infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellkulturen geerntet und die Zellen mit direkt- oder indirekt-markierten mAk gegen aus-

gewählte MoDC-Aktivierungsmarker und zum Nachweis der Infektion gegen MV-H gefärbt. In **Bild 6–5** sind die Ergebnisse für die nach der Morphologie intakten MoDC dargestellt. Die Anzahl der CD86, CD25, CD83 oder MV-H exprimierenden MoDC ist in Prozent, die Stärke der CD80-Expression als mittlere Fluoreszenzintensität angegeben.

Mit zunehmender Menge an eingesetztem Virus wurde auch mehr MV-H auf der Oberfläche der infizierten MoDC-Kulturen nachgewiesen, wobei das MV-H Protein erst 48 h p.i. mittels der FACS-Färbung deutlich detektierbar war. Die zunehmende Expression von CD80 im Laufe der Infektion scheint ebenfalls von der zur Infektion der MoDC eingesetzten Menge an ED-B abhängig zu sein, da die mittlere Fluoreszenzintensität für CD80 mit der Menge des zur Infektion eingesetzten Virus korrelierte.

Keine direkte Korrelation bestand hingegen bei der Expressionsentwicklung von CD25, CD83 und CD86, die weitestgehend unabhängig von der Zahl an MV-H-positiven Zellen bzw. von der Menge an Virus zum Zeitpunkt der Infektion war. So war die Aufregulation von CD25, CD83 und CD86 bereits 24 h p.i. zu beobachten, als MV-H noch nicht auf der Oberfläche der MoDC nachweisbar war.

6.1.6 Ausreifung von MoDC nach Infektion mit verschiedenen MV-Stämmen

Unreife MoDC wurden mit Vakzinestämmen (ED-B, ED-Zagreb, AIK-C, Moraten und Schwarz) oder mit Wildtypstämmen (WTF, TC5679 und Chicago-1) mit einer MOI von 0,1 infiziert und in Kultur genommen. Die Expression der Oberflächenantigene MV-H, CD83, CD86 und pan-HLA-D wurden durchflußzytometrisch zu den angegebenen Zeiten p.i. bestimmt. Die Ergebnisse sind in **Bild 6–6** zusammenfassend dargestellt. Zum Vergleich dienten Mock-infizierte MoDC, die zum Teil mit LPS (0,1 µg/ml) aktiviert wurden.

Die Mock-infizierten MoDC zeigten in Abwesenheit von LPS über den beobachteten Zeitraum von drei Tagen p.i. nur eine geringe Aufregulation der pan-HLA-D- (als mittlere Fluoreszenzintensität angegeben), CD83- und CD86-Expression (jeweils in Prozent positive MoDC angegeben). Durch Zugabe von LPS konnte eine Aktivierung der MoDC erzielt werden, die sich in einer Aufregulation der gefärbten Aktivierungsmarker und stimulatorischen Moleküle zeigte (**Bild 6–6**, erste Reihe).

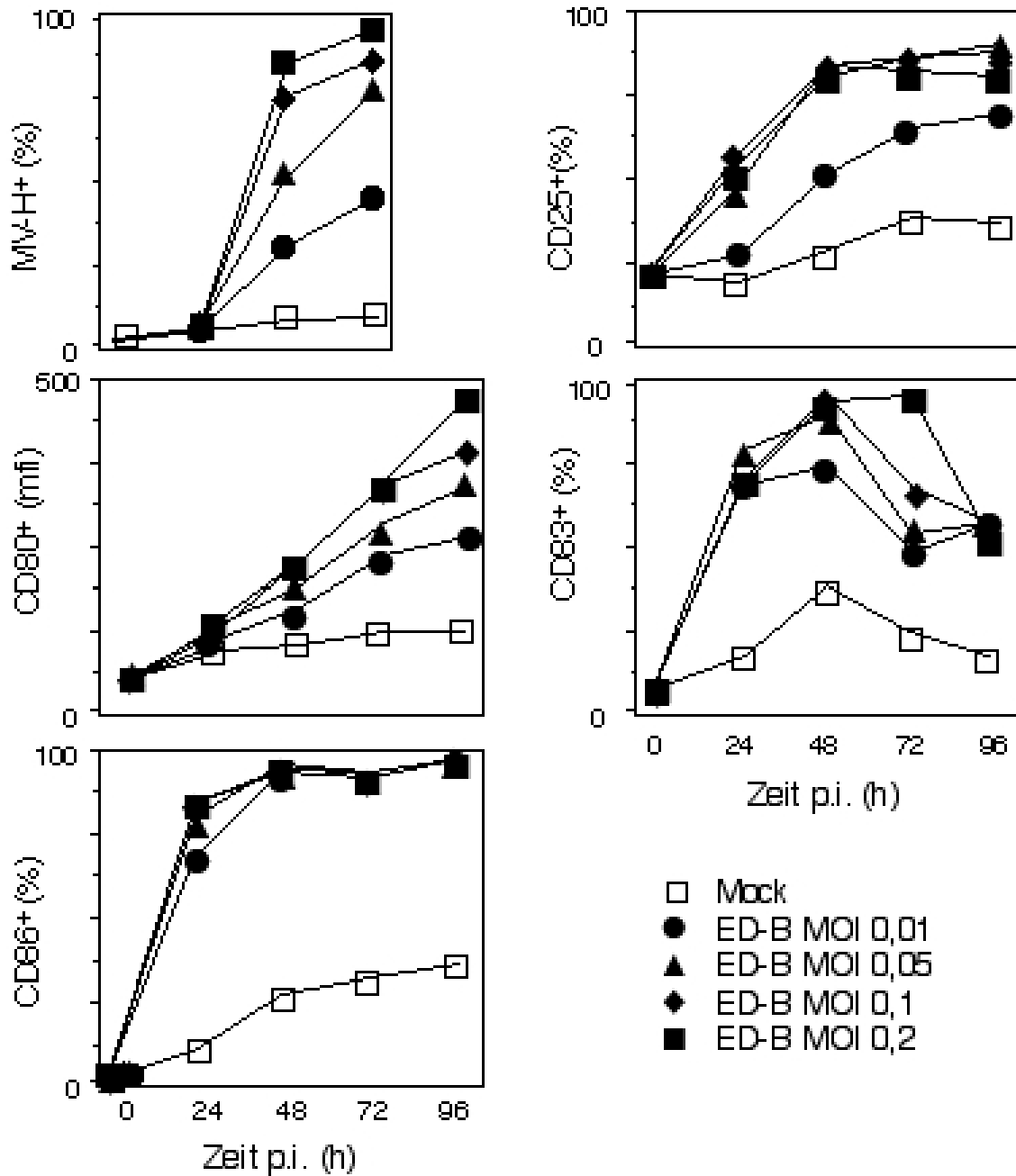


Bild 6–5 Die Ausreifung der MoDC nach Infektion mit ED-B nimmt zum Teil mit der eingesetzten Menge an infektiösem Virus zu bzw. ist von dieser unabhängig, je nachdem welcher Aktivierungsmarker betrachtet wird

Unreife MoDC wurden mit zunehmender MOI an ED-B infiziert und mit einer Mock-Infektion in Kultur genommen. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet und mAk gegen CD86, CD80, CD83, CD25 und MV-H gefärbt. Die Ergebnisse der durchflußzytometrischen Messungen sind in Prozent positive Zellen an morphologisch intakten MoDC (CD25, CD83, CD86, MV-H) oder als mittlere Fluoreszenzintensität (mfi, CD80) angegeben.

Die verwendeten Vakzinestämme ED-B, ED-Zagreb und AIK-C sowie Schwarz und Moraten wiesen unterschiedliche Infektionskinetiken auf (**Bild 6–6**, zweite bzw. dritte Reihe). ED-B, ED-Zagreb und AIK-C zeigten eine kontinuierliche Zunahme in der Zahl MV-H positiver MoDC mit einer sehr ähnlichen Kinetik (72 h p.i. ca. 50 – 70% positive MoDC, zweite

Reihe). Die Stämme Moraten und Schwarz hingegen erreichten ab 24 h p.i. ein Infektionsniveau von ca. 20 – 30% positive MoDC, das auch zwei oder drei Tage p.i. nicht weiter anstieg. Unabhängig von der beobachteten Infektionskinetik zeigten alle MoDC-Kulturen nach Infektion mit den verschiedenen Vakzinestämmen eine deutliche Aufregulation der Aktivierungsmarker HLA-D, CD83 und CD86, wobei der Vakzinestamm Schwarz im Vergleich zu den anderen Vakzinestämmen die infizierte MoDC-Kultur mit Ausnahme der HLA-D-Expressionsentwicklung schneller ausreifen ließ.

Deutlich unterschiedlich verhielten sich die auf BJAB-Zellen gezogenen Wildtypviren WTF und TC5679 (**Bild 6–6** vierte Reihe). Sie zeigten im Vergleich zu allen getesteten Vakzinenviren eine schnellere Infektionskinetik, die sich u.a. darin äußerte, daß 72 h p.i. alle MoDC in den WTF- bzw. TC5679-infizierten Kulturen einen fortgeschrittenen CPE mit zahlreichen Riesenzellen zeigten. Einzelzellen waren kaum noch vorhanden, und die Kulturen konnten durchflußzytometrisch nicht mehr analysiert werden. Zudem zeigten diese Kulturen im Vergleich zu den Vakzinestamm-infizierten MoDC-Kulturen eine schnellere und stärkere Aufregulation von CD83 und CD86.

Ein intermediäres Verhalten zeigte der auf Verozellen gezogene Wildtypstamm Chicago-1 (**Bild 6–6**, vierte Reihe). Seine Infektionskinetik ähnelte in ihrem Verlauf der eines Vakzinestammes. Die Ausbildung eines CPE verlief nicht so dramatisch wie bei den beiden anderen Wildtypviren, so daß eine durchflußzytometrische Analyse auch 72 h p.i. noch möglich war. Allerdings induzierte eine Infektion mit Chicago-1 eine sehr starke Ausreifung der MoDC-Kultur vergleichbar mit der durch WTF oder TC5679. Hier wurde sehr deutlich, daß 72 h p.i. praktisch alle Zellen der MoDC-Kultur aktiviert waren, obwohl nur ca. 35 % der MoDC MV-H auf der Oberfläche exprimierten.

6.2 Mechanismen der MoDC-Aktivierung nach MV-Infektion

6.2.1 MoDC-Ausreifung durch UV-inaktiviertes MV

Virusstockpräparationen von ED-B wurden durch UV-Bestrahlung inaktiviert. Zur Kontrolle der Inaktivierung wurde der ED-B-Virusstock auf einem konfluenten Verozellrasen ausplattiert und auf Plaquebildung überprüft. Die mit einem UV-Crosslinker behandelten ED-B-Präparationen ($1,5 \text{ J/cm}^2$) zeigten auf Verozellen keinen CPE.

Unreife MoDC wurden Mock-infiziert und mit oder ohne LPS kultiviert. Parallel dazu wurden MoDC-Kulturen mit ED-B MOI 0,1 infiziert (**Bild 6–7**, linke Spalte) bzw. mit UV-inaktiviertem ED-B inkubiert entsprechend einer MOI von 0,1 bzw. 1,0 (**Bild 6–7**, rechte Spalte).

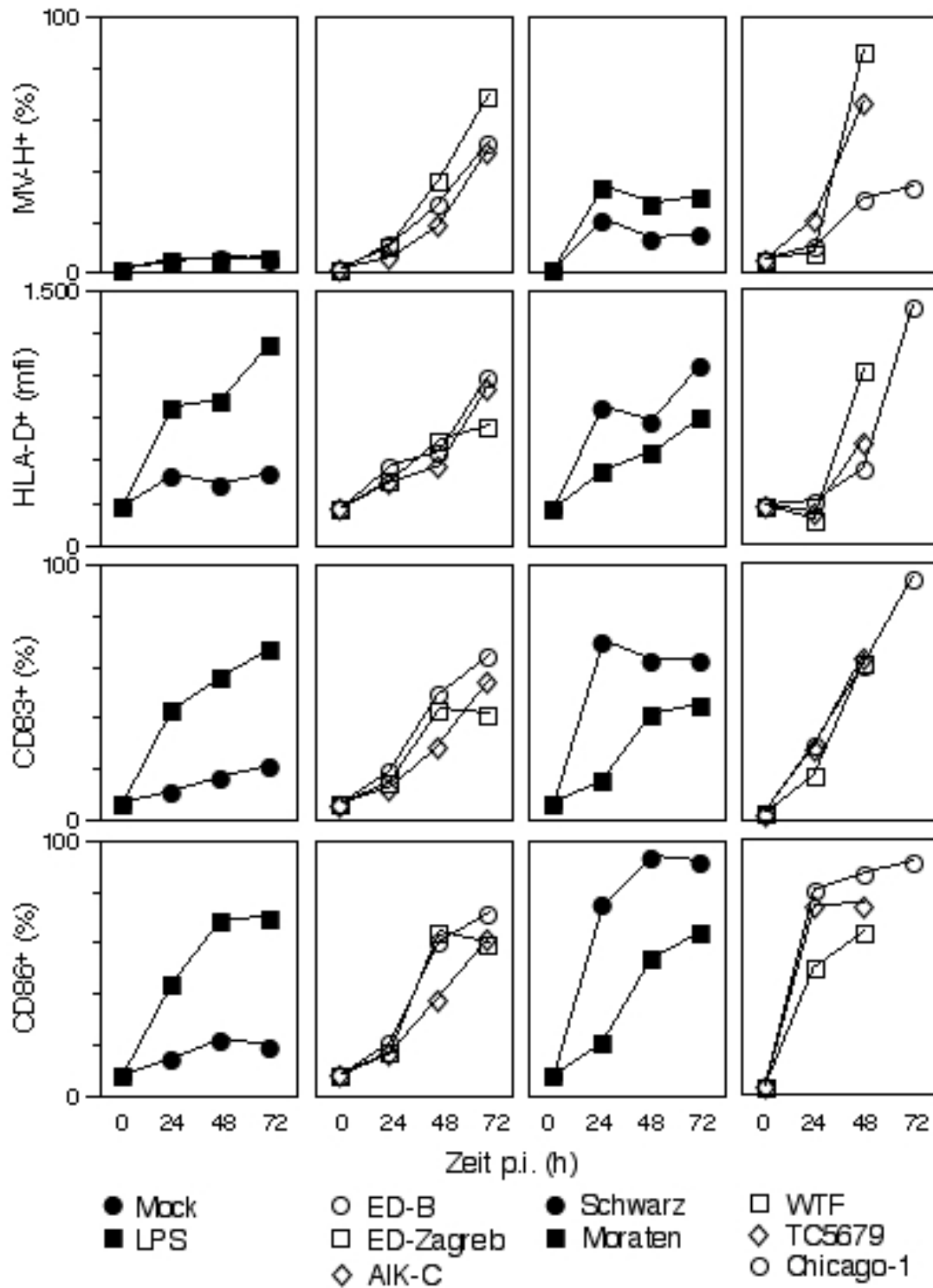


Bild 6-6 Infektion und Ausreifung von MoDC erfolgt mit Wildtypviren, die über BJAB-Zellen gezogen wurden, schneller und deutlicher als mit Vakzineviren, die Vero-adaptiert sind

Unreife MoDC wurden mit einer MOI von 0,1 mit verschiedenen Vakzine- oder Wildtypviren infiziert oder zur Kontrolle mit Mock infiziert oder durch LPS-Zugabe aktiviert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet und mit mAk gegen ausgewählte Oberflächenantigene markiert und im FACS analysiert. Die Ergebnisse sind in Prozent Antigen-positive Zellen bzw. als mittlere Fluoreszenzintensität (mfi) der lebenden Zellen angegeben.

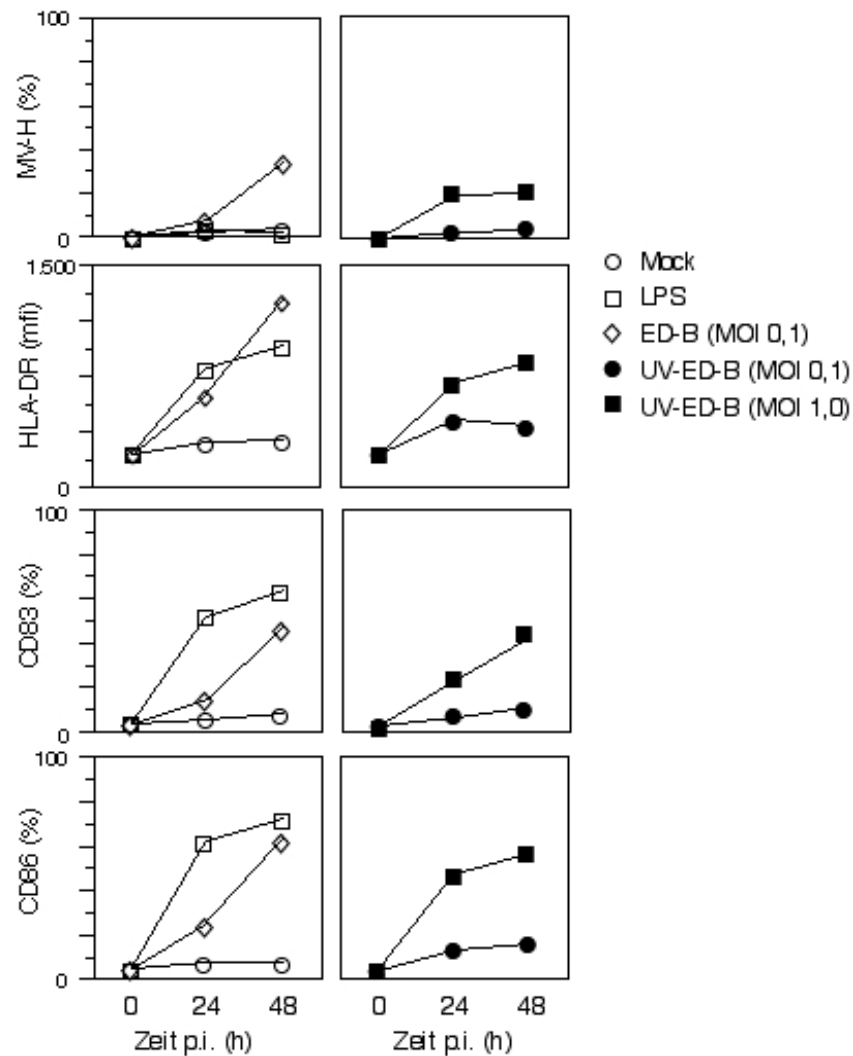


Bild 6–7 Inkubation mit UV-inaktiviertem MV führt zu einer Aktivierung von unreifen MoDC

Unreife MoDC wurden über einen Zeitraum von 48 h mit UV-inaktiviertem ED-B (Inaktivierung auf Verozellrasen getestet) inkubiert. Parallel wurden Kontrollkulturen mit Mock-infizierten MoDC ohne/mit LPS-Zugabe (0,1 µg/ml) bzw. mit ED-B-infizierten MoDC (MOI 0,1) angesetzt. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und mit mAk gegen ausgewählte Oberflächenantigene gefärbt und im FACS analysiert. Dargestellt sind die unter den morphologisch intakten MoDC für die jeweiligen Antigene positiven Zellen in Prozent oder die mittlere Fluoreszenzintensität (mfi).

Eine Ausreifung der MoDC-Kultur konnte sowohl durch Zugabe von LPS, durch Infektion mit ED-B MOI 0,1 als auch durch Inkubation mit UV-inaktiviertem ED-B beobachtet werden. Hierbei korrelierte die Aktivierung gemessen an der Aufregulation von CD83, CD86 und HLA-DR mit der zugegebenen Menge an UV-inaktiviertem Virus. Eine Infektion der MoDC durch das inaktivierte Virus war auszuschließen, da zum einen kein CPE im Plaquetest auf Verozellen gefunden wurde (siehe oben) und zum zweiten der Anteil an MV-H positiven Zellen mit der Zeit nicht zunahm. Somit scheint eine Ausreifung der MoDC auch durch Replikations-inkompetentes Virus induziert zu werden.

6.2.2 MxA-Induktion in MoDC-Kulturen nach Infektion mit MV und nach Inkubation mit UV-MV

MxA ist ein 78 kDa großes, GTP-bindendes Protein, das durch Typ I-Interferone (IFN- α und - β) in humanen Zellen induziert wird. In einigen Virus-Zellsystemen konnte für MxA eine antivirale Wirkung *in vitro* nachgewiesen werden (zusammengefaßt in Haller *et al.*, 1998). Typ I-Interferone werden von fast allen Zelltypen nach Infektionen insbesondere mit RNS-Viren produziert. Um zu überprüfen, ob auch MoDC nach Infektion oder Kontakt mit UV-inaktiviertem MV MxA exprimieren, was gleichzeitig auch auf die Anwesenheit von Typ I-Interferon hindeuten würde, wurden unreife MoDC mit steigenden Mengen an infektiösem oder UV-inaktiviertem Virus inkubiert und in Kultur genommen. Als Kontrolle dienten Mock-infizierte MoDC. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet und mit mAk gegen MV-H in einer Oberflächenfärbung oder gegen MxA in einer intrazellulären Färbung markiert. Die Analyse erfolgte mit einem Durchflußzytometer und die Ergebnisse sind in **Bild 6–8** als Prozent positive Zellen dargestellt.

MxA wurde nach Infektion mit ED-B unabhängig von der eingesetzten Virusmenge und unabhängig von der über die MV-H-Färbung bestimmten Infektionskinetik in den MoDC induziert, erreichte bereits 24 h p.i. sein Expressionsmaximum (**Bild 6–8, (A) und (B)**) und wurde in nahezu allen Zellen exprimiert. Im Gegensatz dazu konnte UV-inaktiviertes Virus MxA nur transient in ca. 75 % aller MoDC zwischen 24–48 h p.i. induzieren (**Bild 6–8 (C)**). Allerdings schien auch hier die Menge des eingesetzten Virus keinen Einfluß auf die MxA-Induktion zu haben. Bereits geringe Mengen an UV-inaktiviertem ED-B (MOI 0,1), die noch keine deutliche Aktivierung der MoDC hervorriefen (vgl. **Bild 6–7, rechte Spalte**), induzierten eine klare MxA-Expression.

6.2.3 MoDC produzieren einen MxA-induzierenden, löslichen Faktor nach Infektion mit ED-B

Verozellen können kein Typ I-Interferon produzieren, möglicherweise aber andere Mediatoren, die eine MxA-Induktion direkt oder indirekt bewirken könnten. Um auszuschließen, daß die Viruspräparationen einen oder mehrere MxA-induzierende(n) Faktor(en) aus den für die Viruszucht verwendeten Zelllinien enthalten, wurden ED-B-Präparationen und Mock-Präparationen aus Verozellen ultrazentrifugiert. Der Überstand mit dem/den potentielle(n) MxA-induzierendem/n Faktor(en) wurde abgenommen und das resultierende Pellet in PBS resuspendiert. Unreife MoDC wurden mit den Überständen bzw. den Pelletsuspensionen aus ultrazentrifugierten Mock- und ED-B-Präparationen inkubiert. Verwendet wurden die einer MOI von 0,2 äquivalenten Volumina. Die MoDC wurden in Kultur genommen, zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und die Oberflächenexpression des MV-H oder die intrazelluläre Expression des MxA durchflußzytometrisch untersucht. Eine Induktion des MxA-Proteins fand weder durch den Mock- noch durch den ED-B-Überstand (**Bild 6–9, linke Spalte**), noch durch die Suspension des pelletierten Mock-Materials statt. MxA konnte nur nachgewiesen werden, wenn der infektiöse Teil der ED-B-Präparation, das nach der Ultrazentrifugation resuspendierte Pellet, mit den MoDC inkubiert wurde (**Bild 6–9, mittlere Spalte**). Der Nachweis, daß infektiöses ED-B nur im resuspendierten Material der ultrazentrifugierten ED-B-Präparation zu finden ist, gelang über die FACS-Färbungen gegen das Hämagglutinin (**Bild 6–9, rechte Spalte**). Eine MV-H Expression konnte nur in den MoDC-Kulturen nachgewiesen werden, die mit pelletiertem Material aus dem Virusstock inkubiert worden waren. Somit konnte ausgeschlossen werden, daß die für die ED-B-Zucht verwendeten Verozellen einen MxA-induzierenden Faktor produzierten. Gleichzeitig bedeuteten diese Ergebnisse, da die

MxA-Expression über Typ I-Interferone reguliert wird, daß MoDC Typ I-Interferon als Reaktion auf eine Infektion mit ED-B produzieren.

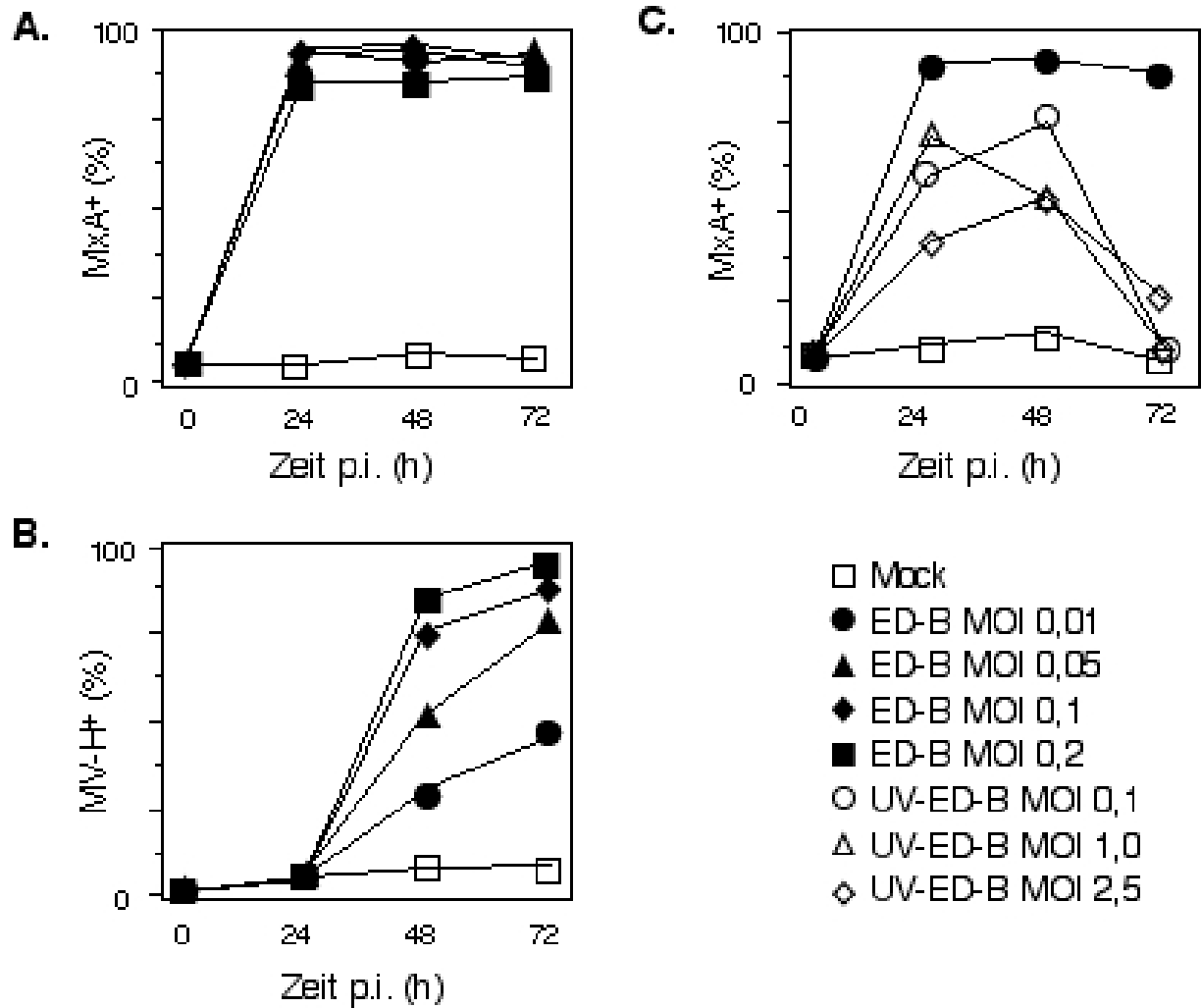


Bild 6–8 Infektion von unreifen MoDC mit ED-B induziert eine stabile MxA-Expression unabhängig von der verwendeten Virusmenge, während UV-inaktiviertes ED-B nur transient MxA induziert

Unreife MoDC wurden mit Mock oder mit ED-B (verschiedene MOI) infiziert oder mit UV-inaktiviertem ED-B (unterschiedliche Mengen) inkubiert und in Kultur genommen. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet und mit mAk gegen MV-H (Oberflächenfärbung) oder gegen MxA (intrazelluläre Färbung) markiert. Dargestellt ist der Anteil an Antigen-positiven Zellen in Prozent.

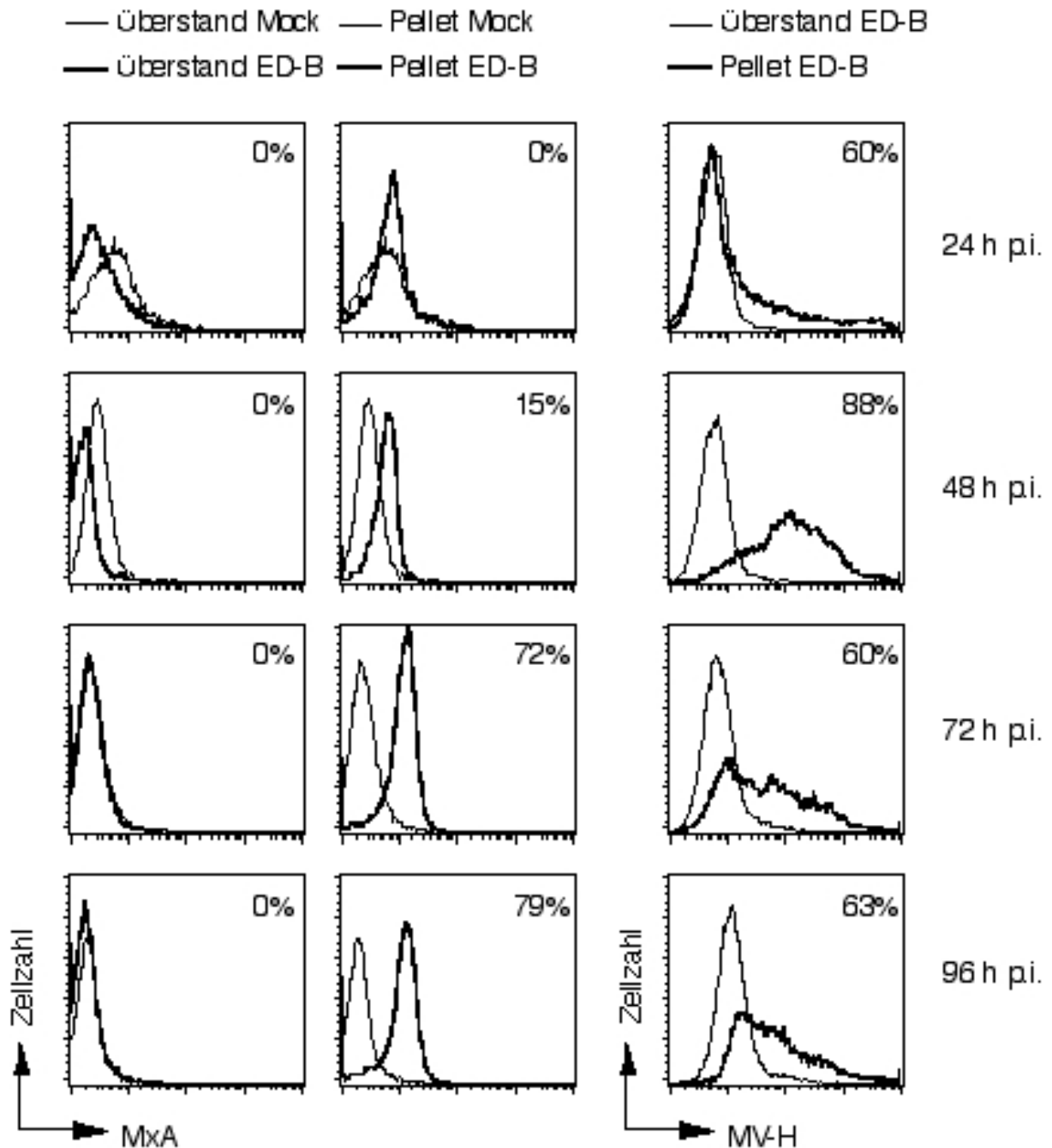


Bild 6–9 Verozellen produzieren keinen MxA-induzierenden Faktor; die MxA-Produktion in MoDC erfolgt nur nach Inkubation mit pelletiertem, infektiösem Virus

Mock- und ED-B-Präparationen aus Verozellen wurden durch Ultrazentrifugation in einen löslichen und einen pelletierten Anteil getrennt. Linke Spalte: Unreife MoDC wurden mit Überständen der Mock- (dünne Linie) oder der ED-B-Präparation (dicke Linie) inkubiert. Mittlere Spalte: Unreife MoDC wurden mit resuspendiertem Pelletmaterial aus Mock- (dünne Linie) oder ED-B-Präparationen (dicke Linie) inkubiert. Rechte Spalte: Unreife MoDC wurden mit Überstand (dünne Linie) oder mit resuspendiertem Pelletmaterial (dicke Linie) aus einer ultrazentrifugierten ED-B-Präparation inkubiert. Die Zellen wurden in Kultur genommen und zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet. Mittels mAk wurde die MxA-Expression (linke und mittlere Spalte) bzw. die MV-H-Expression (rechte Spalte) der MoDC festgestellt. Die Zahl in den Histogrammen gibt jeweils den Anteil an positiven Zellen in Prozent an.

6.2.4 Semiquantitative Bestimmung der Typ I-Interferon-Produktion nach Infektion von MoDC mit ED-B

Wie in 6.2.3 gezeigt, produzieren MoDC nach Infektion mit ED-B einen Faktor, der in der MoDC-Kultur MxA induziert. Eine Induktion von MxA ist strikt Typ I-Interferon-abhängig, so daß davon auszugehen ist, daß infizierte MoDC Typ I-Interferon sezernieren. Unter Verwendung eines semiquantitativen Bioassays konnte die Menge an Typ I-Interferon abgeschätzt werden, die von MoDC nach einer Infektion mit ED-B sezerniert wurde. Als Indikatorzelllinie dienten BJAB-Zellen, die mit definierten Konzentrationen an rekombinantem Typ I-Interferon oder mit konditionierten Überständen aus MoDC-Kulturen kultiviert wurden. Diese Überstände waren MV-frei und stammten aus dem unteren Kompartiment des unter 5.4.5 beschriebenen Zweikammerzellkultursystems. Nach zwei Tagen wurden die BJAB-Zellen geerntet, Lysate hergestellt und die Proteine mittels einer SDS-haltigen Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt. Die aufgetrennten Proteine wurden auf eine Nylonmembran transferiert und das MxA-Protein mit einem mAk und der ECLTM-Methodik nachgewiesen.

Unreife MoDC wurden entweder Mock- oder ED-B infiziert (MOI 0,05 und MOI 0,1) oder mit LPS nach entsprechender Mock-Infektion stimuliert (**Bild 6–10, (B)**). Die Virus-freien Überstände der MoDC-Kulturen wurden ein bis drei Tage p.i. abgenommen und auf BJAB-Kulturen auf ihren Typ I-Interferongehalt getestet (pro Kultur 200µl). Parallel wurden BJAB mit steigenden Konzentrationen an rekombinanten humanem IFN-β inkubiert (**Bild 6–10, (A)**). Aus dem Vergleich der Bandenintensität konnte abgeschätzt werden, daß unabhängig von der eingesetzten Virusmenge die infizierten MoDC bereits nach 24 h p.i. mit ca. 50–500 U/ml IFN ihre maximale IFN-Sekretion erreichten und diese über drei Tage p.i. aufrechterhielten.

6.2.5 MxA-Induktion in MoDC nach Infektion mit ED-B und WTF

Unreife MoDC wurden nach unterschiedlichen Behandlungen (Mock-Infektion, Infektion mit ED-B oder WTF mit MOI 0,05 oder MOI 0,1) in Kultur genommen. 24 h bzw. 48 h p.i. wurden die MoDC geerntet, Lysate hergestellt und über eine SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Proteine wurden anschließend auf eine Nylonmembran transferiert und mit mAk gegen MV-N (61kDa apparentes Molekulargewicht) und simultan MxA (79–81 kDa apparentes Molekulargewicht) getestet. Die markierten Banden wurden mit ECLTM detektiert.

Auch wenn ein Tag p.i. das MV-N Protein kaum oder nicht nachweisbar war, so wurde in diesen MoDC-Kulturen sowohl nach ED-B- als auch nach WTF-Infektion (**Bild 6–10 (C)**, 1 Tag p.i. Nummern 5 und 6) MxA bereits deutlich produziert. Zwei Tage p.i. war das MV-N Protein klar nachweisbar, wobei trotz gleicher MOI mehr MV-N nach Infektion mit ED-B produziert wurde als nach Infektion mit WTF.

Die Induktion von MxA ist sowohl nach einer ED-B- als auch nach einer WTF-Infektion mit MOI 0,05 nachweisbar. Allerdings scheint die WTF-Infektion in den MoDC-Kulturen verglichen mit den ED-B-infizierten MoDC-Kulturen geringfügig weniger MxA zu induzieren (**Bild 6–10 (C)**, 2 Tage, Nummern 3 und 4). Als Kontrollen wurden Lysate von Mock-infizierten oder LPS-stimulierten MoDC-Kulturen verwendet (**Bild 6–10 (C)**, Nummern 1 und 2). In diesen Spuren konnte keine 61 kDa-Proteinbande nachgewiesen werden. Die nicht-infizierten MoDC exprimierten nach Mock-Infektion in den beiden unabhängigen Versuchsreihen deutliche MxA-Proteinhintergründe, deren Intensität aber nach Infektion oder LPS-Stimulation stärker wurde.

6.2.6 Rolle der Typ I-Interferone in der Aktivierung unreifer MoDC

Wie in den vorigen Abschnitten bereits beschrieben führte eine Infektion der MoDC mit MV zu einer Ausreifung der MoDC-Kulturen. Es konnte beobachtet werden, daß dabei der Anteil an ausgereiften MoDC nicht immer mit der Zahl der MV-H positiven Zellen übereinstimmt (**Bild 6-4**, **Bild 6-5**, **Bild 6-6** und **Bild 6-7**). Neben dem bereits nachgewiesenen Typ I-IFN könnten auch andere Faktoren durch MoDC nach Kontakt oder Infektion mit MV gebildet werden, wie dies bereits für andere *in vitro*-Infektionsmodelle beschrieben ist (Ho *et al.*, 2001; Ignatius *et al.*, 2000; Kadowaki *et al.*, 2000; Kelleher *et al.*, 1999; Chougnnet *et al.*, 1999). Die sezernierten Faktoren würden dann auto- und parakrin wirken und zu einer allgemeinen Ausreifung der Zellkultur unabhängig vom Infektionsstatus der einzelnen MoDC führen. Um diese Hypothese zu testen, wurde ein *in vitro*-Zellkultursystem unter Verwendung von Filtereinsätzen entwickelt. Durch den Einsatz dieser Filter mit einer Porengröße von 20 nm war es möglich, ein Zweikammersystem aufzubauen, in dem niedermolekulare Verbindungen, aber nicht hochmolekulare Strukturen wie das Masernvirus (pleomorphe Struktur mit einer Größe von ~200 nm) von einem Kompartiment zum anderen Kompartiment diffundieren konnten (siehe **5.4.5**).

Unter Verwendung dieses Zellkammersystems konnte gezeigt werden, daß unreife MoDC unter dem Einfluß löslicher Faktoren, die von Virus-infizierten oder LPS-aktivierten MoDC-Kulturen sezerniert wurden, eine Aufregulation von CD83, CD86 sowie eine Induktion von MxA zeigten. Die Aktivierung der MoDC nach Kokultur mit den ED-B-infizierten MoDC erfolgte um ca. 24 h verzögert, verglichen mit der Aktivierung der MoDC unter Einfluß von Überstand LPS-aktivierter MoDC. Durch Verwendung des rekombinanten Masernvirus MG/FV (**Bild 4-1**), das ein Fusionsprotein aus der Transmembran- und extrazellulären Domäne des VSV-G Proteins sowie aus dem zytoplasmatischen Teil des MV-F Proteins als Hüllprotein exprimiert, konnte zudem ausgeschlossen werden, daß die Masernglykoproteine H und F eine besondere Rolle in der Induktion dieser Reifungsfaktoren spielen (**Bild 6-11 (A)**).

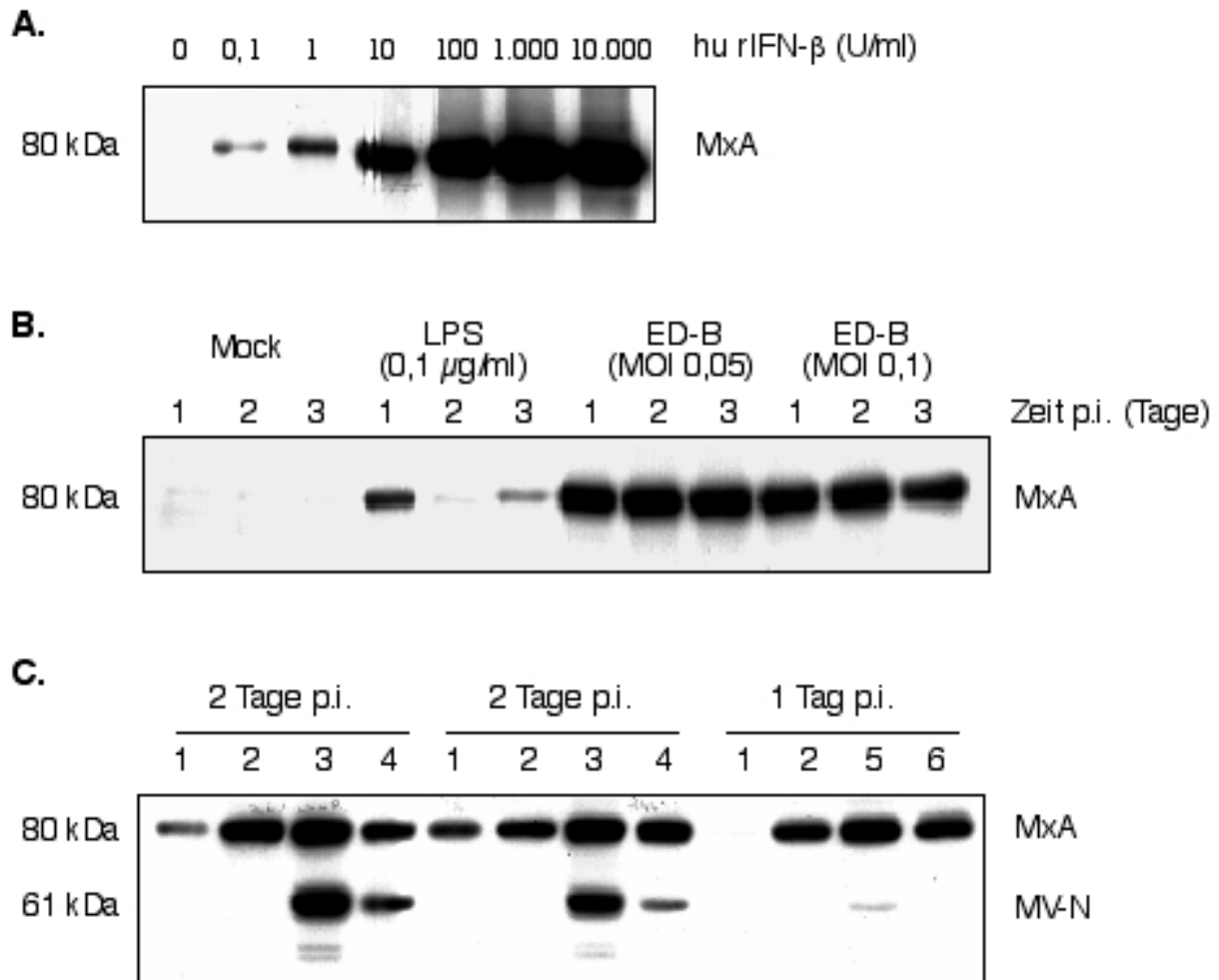


Bild 6–10 Infizierte MoDC produzieren über einen Zeitraum von drei Tagen kontinuierlich 50 – 500 U/ml IFN, wobei sowohl ED-B als auch WTF MxA induzieren

(A) Eine MxA-Induktion nach Inkubation von BJAB-Zellen mit definierten Mengen an IFN- β dient als Referenz für die Bestimmung des von MoDC nach ED-B-Infektion sezernierten IFN. Aufgetragen sind gleiche Proteinmengen der BJAB-Lysate. (B) BJAB-Zellen wurden mit konditionierten Zellkulturüberständen 36 h inkubiert (200 μ l Überstand aus Mock-infizierten, Mock-/LPS-behandelten und ED-B-infizierten MoDC-Kulturen (MOI 0,05 bzw. 0,1) mit 1×10^5 MoDC). Die MxA-Proteindetektion erfolgte durch einen MxA-spezifischen mAk. (C) Unreife MoDC wurden mit Mock (Spaltennummer 1), mit Mock und mit LPS (Spaltennummer 2), mit ED-B MOI 0,05 (Spaltennummer 3) bzw. mit MOI 0,1 (Spaltennummer 5) oder mit WTF MOI 0,05 (Spaltennummer 4) bzw. mit MOI 0,1 (Spaltennummer 6) behandelt. Die Zellen wurden nach 24 h oder 48 h geerntet, Lysate präpariert, die Proteine nach gelelektrophoretischer Auftrennung auf eine Nylonmembran transferiert und simultan mit mAk gegen MxA und MV-N getestet.

Durch tägliche Gabe von neutralisierenden Antisera gegen IFN- α oder IFN- β oder in Kombination gegen beide Typ I-Interferone zu den unbehandelten MoDC-Kulturen konnte gezeigt werden, daß Typ I-Interferone an der Expressionsverstärkung und Induktion von CD86 und MxA beteiligt waren (Bild 6–11 (B)). Die Induktion von CD86 durch das konditionierte Medium ED-B-infizierter MoDC konnte durch die synergistische Wirkung beider neutralisierender Antisera aufgehoben werden. Hingegen schien die CD86-Aufregulation durch konditioniertes Medium LPS-aktiverter MoDC durch diese Seren kaum beeinflusst zu werden. Nur α -IFN- α reduzierte den Anteil an CD86-exprimierenden MoDC geringfügig. Ähnlich verhielt es sich mit der MxA-Induktion. Konditioniertes Medium LPS-aktiverter

MoDC verlor seine MxA-induzierende Wirkung, wenn α -IFN- α zum Medium zugesetzt wurde. Erneut wurden beide neutralisierenden Antiseren benötigt, um den MxA-induzierenden Effekt von konditioniertem Medium ED-B-infizierter MoDC aufzuheben.

Möglicherweise wurden durch die LPS-Aktivierung neben IFN- α weitere Zytokine freigesetzt, die für die starke und anhaltende CD86-Expression auch in Anwesenheit der neutralisierenden Antiseren sorgten. Hingegen schienen die Typ I-Interferone im Falle konditionierten Mediums ED-B-infizierter MoDC für die beobachteten Effekte, Induktion von MxA und CD86, alleine verantwortlich zu sein. Die Neutralisierung der Typ I Interferone durch die eingesetzten Antiseren hatte keinen Einfluß auf die Expressionsentwicklung anderer Aktivierungsmarker oder kostimulatorischer Moleküle der MoDC (nicht gezeigt).

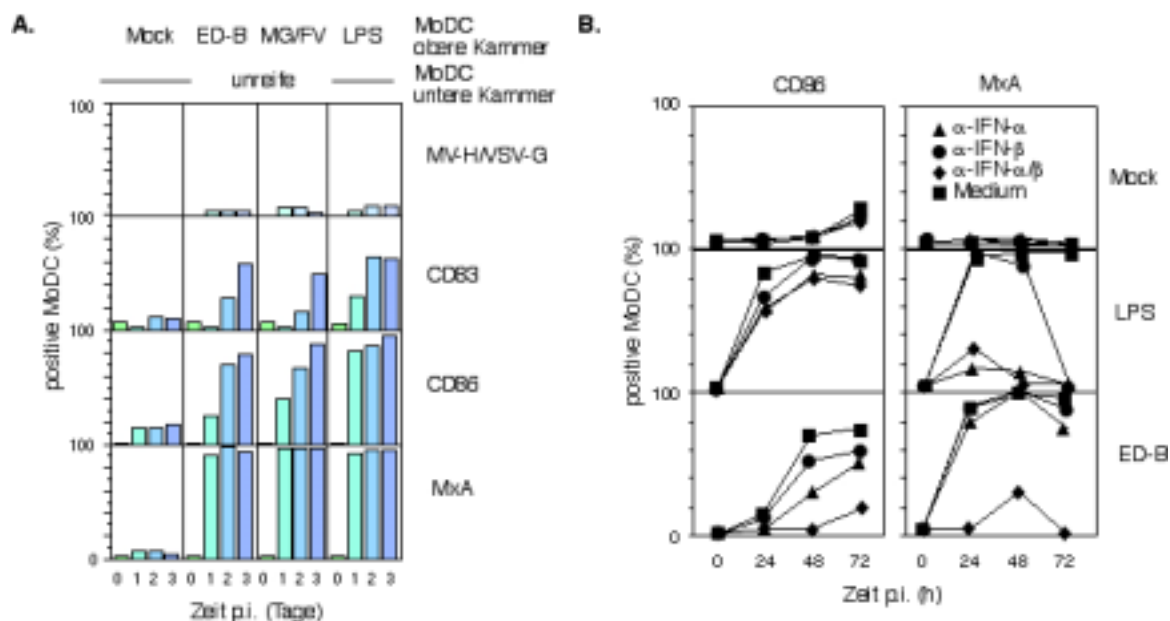


Bild 6–11 Konditioniertes Medium aus infizierten MoDC-Kulturen aktiviert unreife MoDC unabhängig von Kontakt oder Infektion mit MV, wobei einer der löslichen Faktoren, das Typ I-Interferon, für die Induktion von MxA und CD86 verantwortlich ist

(A) Unreife MoDC wurden durch eine Membran von unreifen MoDC-Populationen getrennt, die zuvor mit Mock, mit ED-B MOI 0,1 oder mit MG/FV MOI 0,5 infiziert wurden. Ein Teil der Mock-infizierten MoDC wurde durch Zugabe von LPS aktiviert. Zu den angegebenen Zeiten wurden die unbehandelten MoDC geerntet und mit mAk gegen die ausgewählten Antigene markiert und im FACS analysiert. Dargestellt sind die Antigen-positiven Zellen in Prozent der morphologisch intakten Zellen. (B) Unter Verwendung des gleichen experimentellen Aufbaus wurde die Rolle des Typ I-Interferons für die Ausreifung der MoDC untersucht. Unreife MoDC waren durch einen Membraneinsatz (Porengröße 20 nm) von MoDC getrennt, die mit Mock (obere Reihe) oder mit ED-B MOI 0,05 (untere Reihe) infiziert waren. Zusätzlich wurden unreife MoDC Mock-infiziert und anschließend mit LPS (0,1 μ g/ml) aktiviert (mittlere Reihe). Jeden Tag wurden neutralisierende Antiseren in verschiedenen Kombinationen (1.000 NU/ml α -IFN- α , 1.000 NU/ml α -IFN- β oder je 1.000 NU/ml α -IFN- α & α -IFN- β) oder entsprechende Volumenäquivalente an Medium zu den unbehandelten MoDC-Kulturen gegeben. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden diese MoDC geerntet, mit mAk gegen CD86 und MxA gefärbt und im FACS analysiert. Dargestellt sind Antigen-positiv MoDC in Prozent der morphologisch intakten Zellen.

6.2.7 Produktion von TNF- α durch MoDC nach Infektion mit MV

Ein proinflammatorisches Zytokin, das von MoDC nach Aktivierung freigesetzt wird, ist TNF- α . Um zu testen, ob unreife MoDC auch nach einer Infektion mit MV ebenfalls TNF- α

produzieren, wurden MoDC-Kulturen nach einer Mock-Infektion, nach einer Infektion mit ED-B MOI 0,05, mit WTF MOI 0,05 und als ein weiteres Virus mit VSV MOI 0,001 angesetzt. Als Positivkontrolle für die Bildung von TNF- α diente eine LPS-Aktivierung unreifer MoDC. Überstände dieser Kulturen (2×10^5 MoDC/ml) wurden 24 h, 48 h und 72 h p.i. abgenommen und mittels eines TNF- α -spezifischen ELISAs der Gehalt an TNF- α bestimmt. Wie in **Bild 6–12** zu erkennen ist, war sowohl nach Aktivierung mit LPS als auch durch die verschiedenen Infektionen mit MV-ED-B, MV-WTF oder VSV TNF- α in den Überständen nachweisbar (**Bild 6–12**). Dies deutet allgemein auf eine Aktivierung der MoDC hin, die durch eine Infektion mit MV oder VSV hervorgerufen wurde.

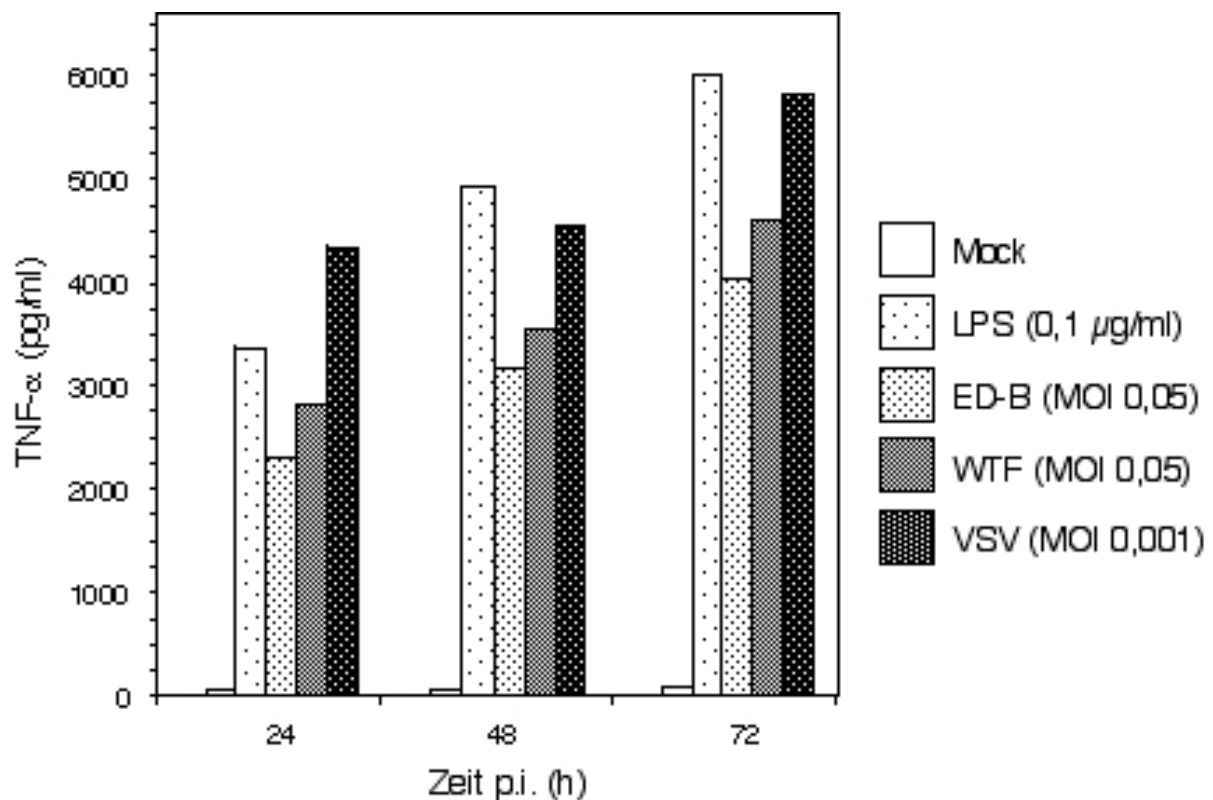


Bild 6–12 MoDC produzieren TNF- α nach Stimulation mit LPS oder nach Infektion mit WTF, ED-B oder auch VSV

Unreife MoDC wurden mit Mock infiziert oder nach Mock-Infektion mit LPS aktiviert und in Kultur genommen. Parallel wurden MoDC-Kulturen angelegt und mit ED-B (MOI 0,05), WTF (MOI 0,05) oder VSV (MOI 0,001) infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellkulturüberstände geerntet und in einem TNF- α -spezifischen ELISA die Konzentration an TNF- α bestimmt. Dargestellt sind die TNF- α -Konzentrationen produziert von 2×10^5 MoDC.

6.3 Funktionalität von MoDC nach Infektion mit MV

Bislang wurde nur der Aspekt der DC-Ausreifung nach Infektion mit MV betrachtet. Im folgenden wurde nun untersucht, ob eine Infektion von MoDC-Kulturen deren Funktionalität verändert im Hinblick auf T-Zellaktivierung und T-Zellproliferation oder auf die Fähigkeit der MoDC IL-12 zu sezernieren und somit Einfluß auf die T-Zellpolarisierung zu nehmen.

Des Weiteren wurde untersucht, ob die infizierten MoDC in einem Kokultivierungssystem mit T-Zellen interagieren, diese Zellen aktivieren und eine T-Zellproliferation induzieren können.

6.3.1 IL-12-Produktion in MoDC nach Infektion mit MV – Nachweis durch intrazelluläre FACS-Färbung

Unreife MoDC wurden mit Mock-, EDeGFP- oder UV-EDeGFP-Präparationen infiziert und in Anwesenheit eines Proteintransportinhibitors in Kultur genommen. Die infizierten MoDC wurden mit LPS, SAC oder mit CD40L stimuliert und 24 h p.i. geerntet. IL-12 wurde durch einen direkt-markierten mAk im FACS nachgewiesen. Die Infektion der MoDC mit EDeGFP wurde über die eGFP-Expression und die Infektion mit VSV über eine Färbung mit einem VSV-G-spezifischen mAk im FACS nachgewiesen.

Wie in **Tabelle 6-1** und in **Bild 6-13** dargestellt, nahm der Anteil an IL-12-produzierenden Zellen in einer MoDC-Kultur nach Infektion mit EDeGFP im Vergleich zur Mock-Infektion deutlich ab. Diese Abnahme konnte nach einer Infektion mit VSV, aber auch nach Inkubation mit UV-inaktiviertem EDeGFP beobachtet werden und war von der Art der MoDC-Stimulation unabhängig. Eine Ausnahme bildet hier die CD40L-Stimulation der MoDC nach VSV-Infektion; verglichen mit Mock-infizierten MoDC stieg der Anteil an IL-12-produzierenden Zellen nach Infektion mit VSV und anschließender CD40L-Stimulation deutlich von $24,5\% \pm 4,86$ auf $43,92\% \pm 2,17$ an.

Tabelle 6-1 Nachweis von IL-12 in MoDC nach Infektion mit EDeGFP (MOI 1,0), UV-EDeGFP (MOI 1,0) und VSV (MOI 0,005) unter verschiedenen Stimulationsbedingungen (Angaben in Prozent positive Zellen \pm SD von vier unabhängigen Experimenten).

	keine	Stimulation			Infektion eGFP/VSV-G ⁺
		LPS	SAC	CD40L	
Mock	0,36 \pm 0,09	7,06 \pm 2,34	14,19 \pm 1,2	20,26 \pm 8,05	0,18 \pm 0,19
EDeGFP	0,24 \pm 0,09	3,17 \pm 1,49	5,4 \pm 0,69	5,54 \pm 0,02	44,13 \pm 12,68
UV-EDeGFP	0,19 \pm 0,07	1,66 \pm 0,45	5,8 \pm 0,15	7,6 \pm 0,36	12,5 \pm 6,96
VSV	0,5 \pm 0,18	2,38 \pm 0,76	2,02 \pm 0,28	43,92 \pm 2,17	71,79 \pm 18,51

Durch die UV-Bestrahlung konnte das EDeGFP-Virus anscheinend nicht komplett inaktiviert oder die eGFP-Expression nicht völlig verhindert werden. Zumindest konnte das Ausmaß der Infektion bzw. der Anteil eGFP-positiven Zellen um mehr als 70 % reduziert werden. Allerdings nahm der Anteil an IL-12-produzierenden MoDC nicht im gleichen Maße zu, so daß für die Abnahme der Zahl IL-12-produzierender MoDC nicht nur eine Infektion der Zellen verantwortlich wäre, sondern wahrscheinlich auch noch weitere Faktoren wie kontaktvermittelte Inhibition der IL-12-Synthese eine Rolle spielen könnten (Karp *et al.*, 1996).

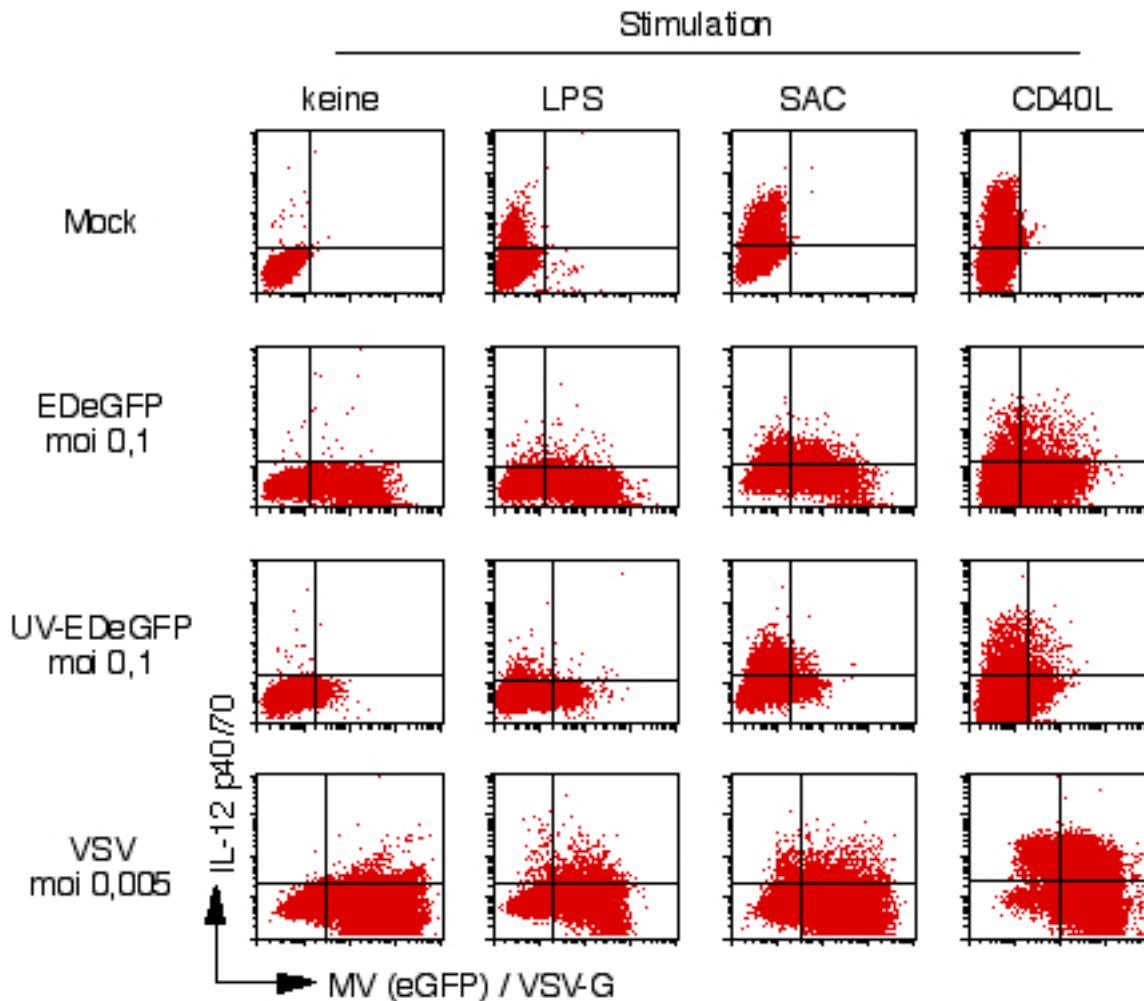


Bild 6–13 Intrazelluläre IL-12-Färbungen in MoDC nach Infektion mit EDeGFP oder VSV Stimulation

Unreife MoDC wurden nach Infektion mit Mock, EDeGFP (MOI 1,0), UV-EDeGFP (MOI 1,0) oder VSV (MOI 0,005) mit verschiedenen Stimuli in Gegenwart von BFA (5 µg/ml) kultiviert und anschließend auf intrazelluläres IL-12 gefärbt. Das akkumulierte IL-12, sowie die Infektionen mit dem EDeGFP (über die eGFP-Expression) bzw. mit dem VSV (über die VSV-G-Expression) wurden im FACS nachgewiesen. Dargestellt ist eine repräsentative Färbung aus vier Experimenten. Die Quadranten wurden anhand entsprechender Isotypkontrollfärbungen festgelegt.

6.3.2 Bestimmung von IL-12p40 und IL-12p70 produziert von MoDC nach Infektion mit MV unter verschiedenen Stimulationsbedingungen – Nachweis durch ELISA

Durch die in **Bild 6–13** dargestellten intrazellulären IL-12-Färbungen unter Verwendung eines IL-12p40-spezifischen mAk wurden sowohl die IL-12p40-Homodimerformen als auch das bioaktive IL-12 p70-Heterodimer nachgewiesen. Eine Aussage über die Qualität der IL-12-Antwort ist somit nicht möglich. Aus diesem Grunde wurden MoDC mit Mock-, ED-B-, WTF- oder VSV-Präparationen infiziert, unter verschiedenen IL-12-induzierenden Bedingungen in Kultur genommen und Zellkulturüberstände nach 24 h bzw 48 h gesammelt. Mittels IL-12p40- oder IL-12p70-spezifischer ELISA wurden die Konzentrationen dieser Zytokine im Zellkulturüberstand bestimmt. In **Tabelle 6-2** sind die Werte aus zwei unabhängigen Experimenten für 2×10^5 MoDC in pg/ml angegeben.

Tabelle 6-2: Übersicht über die IL-12p40- und IL-12p70-Produktion von MoDC nach Infektion mit ED-B (MOI 0,05), WTF (MOI 0,05) oder VSV (MOI 0,001) 2 Tage p.i.. Angegeben sind die Zytokinkonzentrationen in pg/ml sezerniert von 2×10^5 MoDC.

Stimulation		Experiment 1				Experiment 2			
		keine	LPS	SAC	CD40L	keine	LPS	SAC	CD40L
IL-12p40 (pg/ml)	Mock	2.729	44.590	101.090	82.375	0	30.246	37.750	28.800
	ED-B	0	24.065	20.915	69.973	0	23.836	36.386	29.517
	WTF	225	38.115	3188	97.357	1.383	21.356	6.476	38.575
	VSV	0	85.090	102.440	64.552	0	26.406	38.866	31.525
IL-12p70 (pg/ml)	Mock	0	1.475	3.303	4.645	0	535	1.470	4.529
	ED-B	0	667	116	4.896	0	300	229	4.665
	WTF	9	3.809	0	5.599	104	1.370	0	4.974
	VSV	0	1.544	1.059	2.954	0	487	1.106	3.268

Wie aus **Tabelle 6-2** zu ersehen ist, hatte eine Infektion mit ED-B, WTF oder VSV keinen Einfluß auf die durch CD40-Ligation induzierte IL-12p40- und IL-12p70-Produktion der MoDC-Kulturen. Allgemein hatte eine Infektion mit VSV weder nach Stimulation mit CD40L-transfizierten Zellen noch nach Stimulation mit LPS oder SAC einen wesentlichen Einfluß auf die IL-12-Produktion. Im Gegensatz dazu führte die Infektion mit ED-B nach Stimulation mit SAC oder LPS zu einer deutlichen Reduktion sowohl der IL-12p40- als auch der IL-12p70-Produktion. Eine Infektion mit WTF führte hingegen zu einem differenzierteren Bild: Bereits ohne Stimulation wurde sowohl IL-12p40 als auch das bioaktive IL-12p70 sezerniert. Eine Reduktion der IL-12-Synthese nach LPS-Stimulation trat nach einer WTF-Infektion nicht auf. Vielmehr wurde sogar die IL-12p70-Produktion nach einer WTF-Infektion verstärkt, also mehr bioaktives IL-12 sezerniert. Interessanterweise hatte die WTF-Infektion aber eine inhibitorische Wirkung auf die SAC-induzierte IL-12-Produktion. IL-12p70 wurde nicht mehr sezerniert und die Mengen an sezerniertem IL-12p40 sanken um ca. 90 % in den entsprechenden Zellkulturüberständen.

6.3.3 Wechselwirkung von MoDC mit allogenen T-Zellen

Verglichen mit nicht-aktivierten besitzen aktivierte MoDC *in vitro* die Fähigkeit T-Zellen sehr gut zu aktivieren und deren Proliferation zu induzieren. Da infizierte MoDC ebenfalls aktiviert werden, lag es nahe zu untersuchen, ob und wie infizierte MoDC mit T-Zellen interagieren und deren Zellteilung stimulieren könnten.

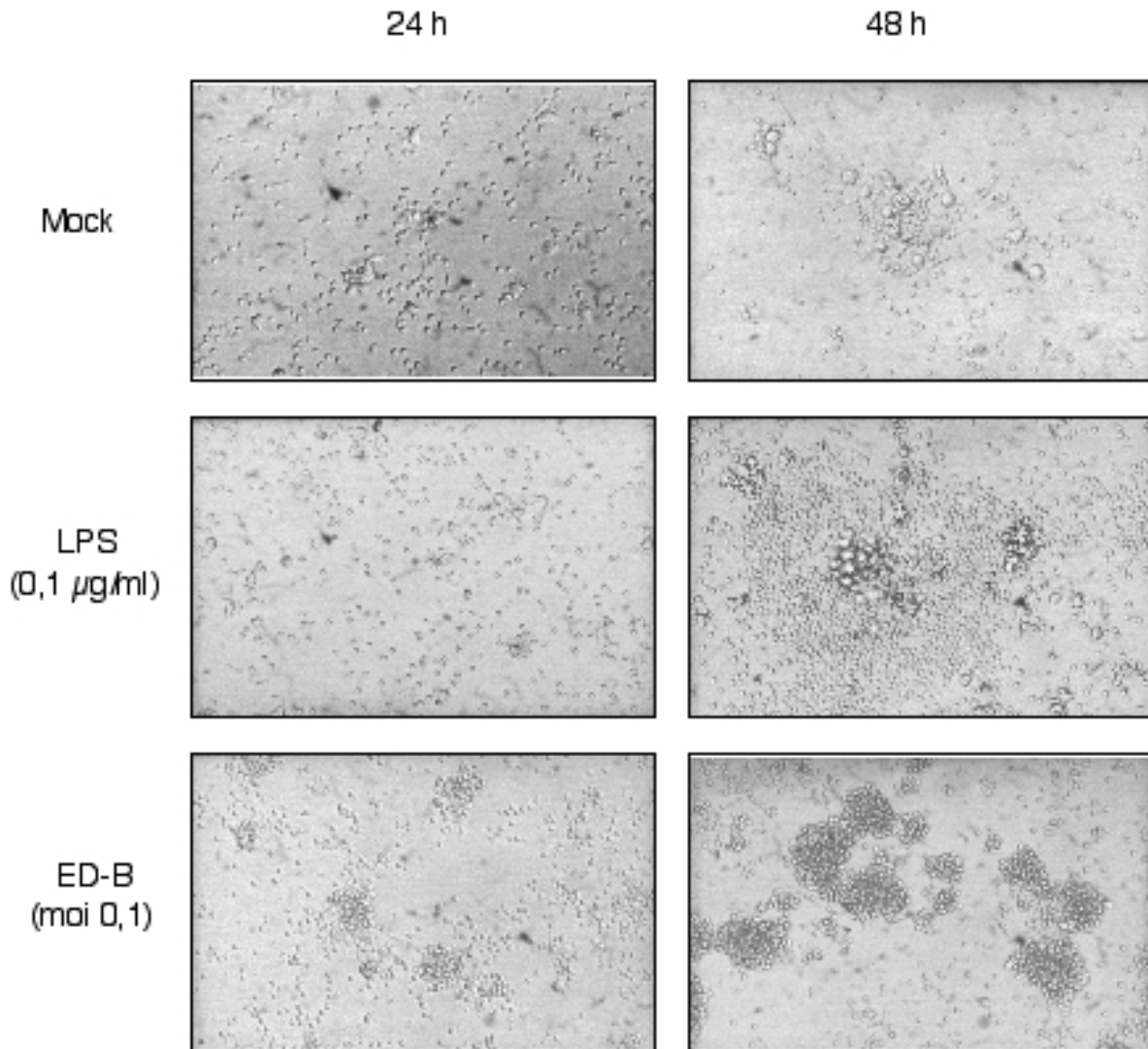


Bild 6–14 Kokulturen von ED-B-infizierten MoDC mit allogenen T-Zellen führen zur Ausbildung von Zellaggregaten innerhalb von 48 h, die sich deutlich von Aggregaten unterscheiden, die sich mit anderen MoDC bilden

Unreife MoDC wurden mit Mock, ED-B (MOI 0,1) oder mit Mock und anschließender Aktivierung durch LPS behandelt und 24 h in Kultur genommen. Anschließend wurden die Zellen geerntet und mit allogenen T-Zellen in einem Verhältnis von 1:20 kokultiviert. Die Kokulturen wurden über 48 h beobachtet und fotografiert.

Unreife MoDC wurden mit Mock- oder ED-B-Präparationen (MOI 0,1) infiziert und 24 h in Kultur genommen. Ein Teil der Mock-MoDC wurde mit LPS aktiviert. Anschließend wurden die Zellen geerntet, gewaschen und mit allogenen, nicht-aktivierten T-Zellen in einem Verhältnis von 1:20 kokultiviert.

Bild 6–14 zeigt die typische Entwicklung von Zellaggregaten, die sich nach 24 h bzw. 48 h Kokultur in den Ansätzen ausgebildet hatten. Unter Mock-Infektionsbedingungen, also unter Verwendung von kaum aktivierten MoDC bildeten sich nur kleinere Zellaggregate aus (**Bild 6–14** oben). Diese Zellaggregate besaßen aber genau wie die Zellaggregate aus T-Zellen und LPS-aktivierten MoDC einen Hof aus kleineren Zellen. Dieser Hof war bei den LPS-aktivierten MoDC sehr gut ausgeprägt. Hierbei handelte es sich wahrscheinlich um aktivierte und vielleicht proliferierende T-Zellen (**Bild 6–14** Mitte).

Ein anderes Bild boten die ED-B-infizierten MoDC. Wie in **Bild 6–14** unten zu erkennen ist, entstanden innerhalb der ersten 24 h der Kokultur deutliche Zellaggregate. Diese nahmen im Laufe der nächsten 24 h weiter an Größe zu. Von den Aggregaten aus T-Zellen und LPS-aktivierten MoDC unterschieden sich diese Zellansammlungen deutlich: Die Zellen schienen dichter gepackt zu sein. Zudem fehlte der charakteristische Hof aus umgebenden kleineren Zellen, bei denen es sich um aktivierte und proliferierende T-Zellen handeln könnte.

6.3.4 MV-infizierte MoDC in einer „Mixed Leukocyte Reaction“

Auch wenn MV-infizierte MoDC mit allogenen T-Zellen wechselwirken (**Bild 6–14**), scheinen sich die kontaktierten T-Zellen im Vergleich zu den T-Zellen aus Kokulturen mit Mock-infizierten oder LPS-aktivierten MoDC anders zu verhalten. Die Zellaggregate zeigten eine dichtere Zellpackung, und ein Hof aus kleineren, wahrscheinlich aktivierten, proliferierenden T-Zellen fehlte. Um zu testen, ob in diesen T-Zell/MoDC-Kokulturen unter allogenen Bedingungen eine T-Zellproliferation induziert wird, wurde ein klassischer Versuchsansatz gewählt, die sogenannte „Mixed Leukocyte Reaction“ oder „Mixed Leukocyte Culture“.

In **Bild 6–15** sind die Stimulationsindizes allogener T-Zellen nach Kokultur mit MoDC dargestellt, die unter verschiedenen Infektionsbedingungen in Anwesenheit von FIP kultiviert worden waren. Das „fusions-inhibitorische Peptid“ (FIP) verhindert eine Infektion der T-Zellen bzw. eine Fusion infizierter MoDC mit nicht-infizierten Zellen in den Kokulturen und wurde in der als optimal ausgetesteten Endkonzentration von 200 μM eingesetzt. Entsprechend dem Aktivierungszustand der MoDC zeigten die nicht-aktivierten, Mock-infizierten MoDC verglichen mit den MKM-ausgereiften, Mock-infizierten MoDC geringere Stimulationsindizes (**Bild 6–15 (A)**). Interessanterweise kam es in den T-Zellansätzen, die mit den ED-B- oder WTF-infizierten MoDC kokultiviert wurden, zu keinem Thymidineinbau und damit zu keiner Induktion einer T-Zellproliferation (**Bild 6–15 (B)** und **(C)**). Bei den ED-B-infizierten MoDC schien dabei das Ausmaß der Hemmung der MLR vom Grad der Infektion der MoDC abzuhängen. Je mehr Virus für die Infektion eingesetzt und je mehr Zellen infiziert waren, umso geringer war die T-Zellproliferation. Im Falle der WTF-infizierten MoDC konnte keine T-Zellproliferation mehr festgestellt werden. Die Hemmung war vollständig und war bereits mit der geringsten WTF-Menge, die zur Infektion der MoDC eingesetzt worden war, zu beobachten. Vergleicht man die WTF- mit den ED-B-infizierten MoDC, so reichten bereits ca. 800 MoDC aus, unter denen nur 24 bis 96 Zellen MV-N⁺ waren, um eine Hemmung der T-Zellproliferation zu erreichen. Mit den ED-B-infizierten MoDC wurde eine vergleichbare Inhibition erst bei einer Zahl von ca. 7.500 MoDC pro Ansatz mit etwa 1.900 MV-N⁺Zellen erreicht.

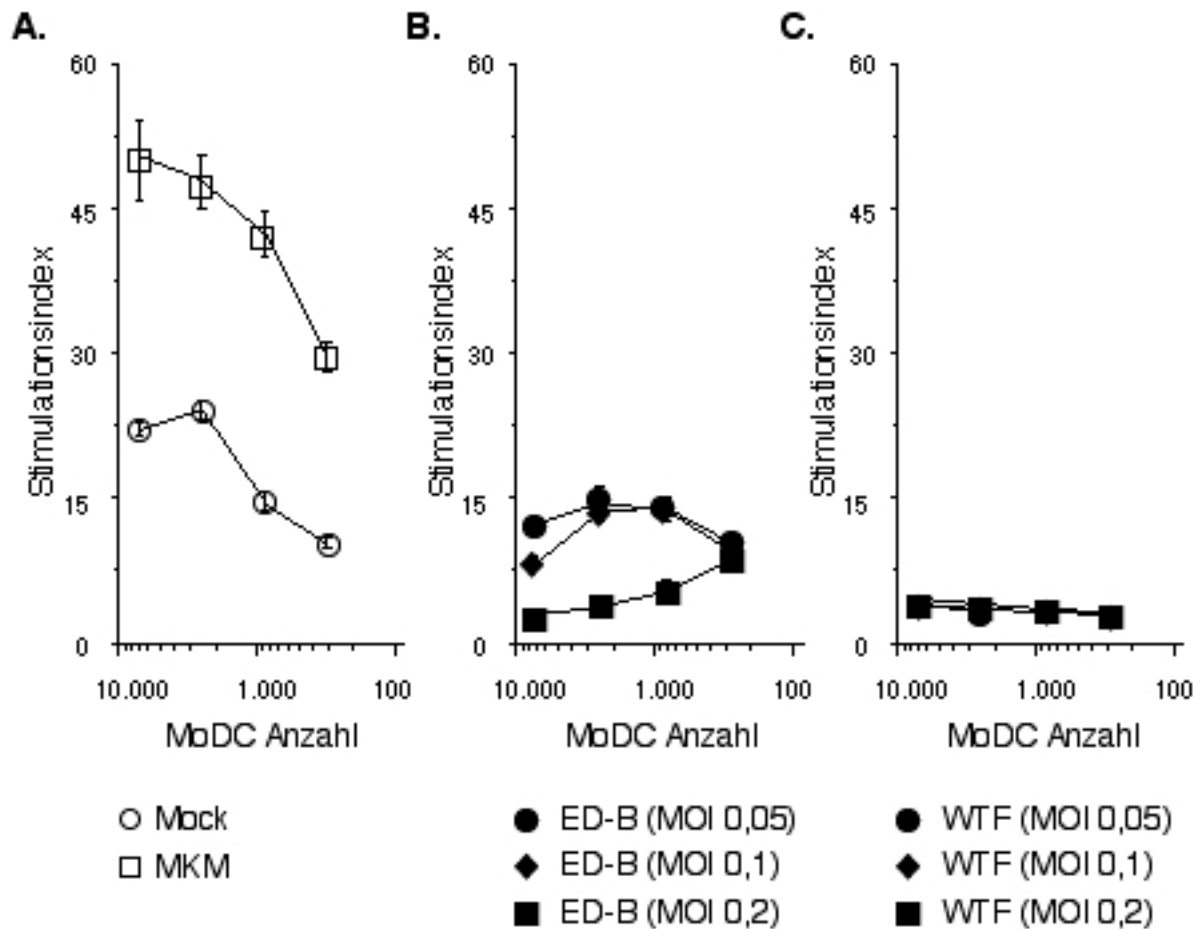


Bild 6–15 In einer allogenen MLR mit MV-infizierten MoDC kann die Proliferation der kokultivierten T-Zellen nicht mehr induziert werden

Unreife MoDC wurden mit Mock-Präparationen oder mit ED-B bzw. WTF (MOI 0,05, MOI 0,1 bzw. MOI 0,2) infiziert und zwei Tage kultiviert. Als Positivkontrolle für die Ausreifung der MoDC dienten Mock-infizierte MoDC aktiviert mit MKM (20 % V/V). Die Infektion und der Reifungszustand der MoDC wurde nach Abschluß der Infektion durch FACS-Färbungen bestimmt. Zwei Tage p.i. waren 8 % (MOI 0,05), 11 % (MOI 0,1) bzw. 25 % (MOI 0,2) der ED-B-infizierten MoDC MV-N-positiv, sowie 3 % (MOI 0,05), 6 % (MOI 0,1) und 12 % (MOI 0,2) der WTF-infizierten MoDC. Die MoDC und die T-Zellen wurden in Gegenwart von FIP (200 μ M) kultiviert, um eine Infektion oder Zell-Zellfusion zu verhindern. Für die letzten 16 h der fünftägigen Kokultur wurde [Methyl-³H]-Thymidin (0,5 μ Ci pro Ansatz) zugegeben. Der Einbau ist als Stimulationindex [(CpM T-Zellen kokultiviert mit MoDC) \div (CpM T-Zellen alleine)] \pm SD dargestellt.

6.3.5 Aktivierungszustand der T-Zellen in einer allogenen MLR mit MoDC

Um den Aktivierungszustand der T-Zellen nach Kokultur in einer allogenen MLR mit den entsprechenden MoDC zu überprüfen, wurden MoDC drei Tage p.i. mit nicht-aktivierten allogenen T-Zellen in Gegenwart von FIP kokultiviert. In **Bild 6–16 (A)** ist der Phänotyp der verwendeten MoDC-Kulturen drei Tage nach Infektion mit ED-B (MOI 0,1) bzw. mit Mock mit/ohne Zugabe von LPS dargestellt. Sowohl die LPS-aktivierten als auch die ED-B-infizierten MoDC zeigten verglichen mit den Mock-infizierten MoDC einen aktivierten Oberflächenphänotyp, wobei ca. 70 % der ED-B-infizierten MoDC MV-H auf ihrer Oberfläche exprimierten.

Nach fünf Tagen wurden die Kokulturen geerntet, die Zellen mit Antikörpern gegen CD3, CD25, CD69, HLA-DR, MV-H und MV-N gefärbt und in einem FACS-Gerät gemessen. In **Bild 6–16 (B)** ist der Anteil an Antigen-positiven Zellen innerhalb der morphologisch intakten CD3⁺ Zellpopulation angegeben. Die kokultivierten T-Zellen zeigten im Vergleich zu den T-Zellen ohne MoDC-Zugabe alle einen gewissen Grad an Aktivierung. Die durch LPS-MoDC aktivierten T-Zellen wiesen einen deutlichen Anteil an Zellen auf, die CD25, HLA-DR und CD69 exprimierten (20%, 22% und 20%). Gleiches gilt für T-Zellen nach Kultur mit Mock-MoDC. Allerdings exprimierten unter diesen Bedingungen weniger Zellen CD25 (7% CD25⁺, 16% HLA-DR⁺ und 22% CD69⁺). Mit ED-B-infizierten MoDC kultivierte T-Zellen zeigten eine verstärkte CD69-Expression (31% CD69⁺), sowie eine hohe HLA-DR- (21% positive MoDC) und eine erhöhte CD25-Expression (11% positive MoDC). Von den CD3⁺ Zellen waren 56% positiv für MV-H, allerdings nur 13% der Zellen positiv für MV-N. Wie in **Bild 6–17** zu sehen ist, bilden nur die T-Zellen Blasten aus, sind also aktiviert und beginnen zu proliferieren, die mit Mock-infizierten oder mit LPS-aktivierten MoDC kokultiviert worden waren. Insgesamt scheinen die T-Zellen nach Kokultur mit ED-B-infizierten MoDC einen intermediären Aktivierungszustand zu besitzen (HLA-DR⁺, CD25^{lo}, CD69^{hi}), ohne Anzeichen einer Proliferation (kaum Blastenbildung) oder einer starken Infektion (ca. 13% (abzüglich der Hintergrundfärbung nur ca. 10%) exprimieren MV-N).

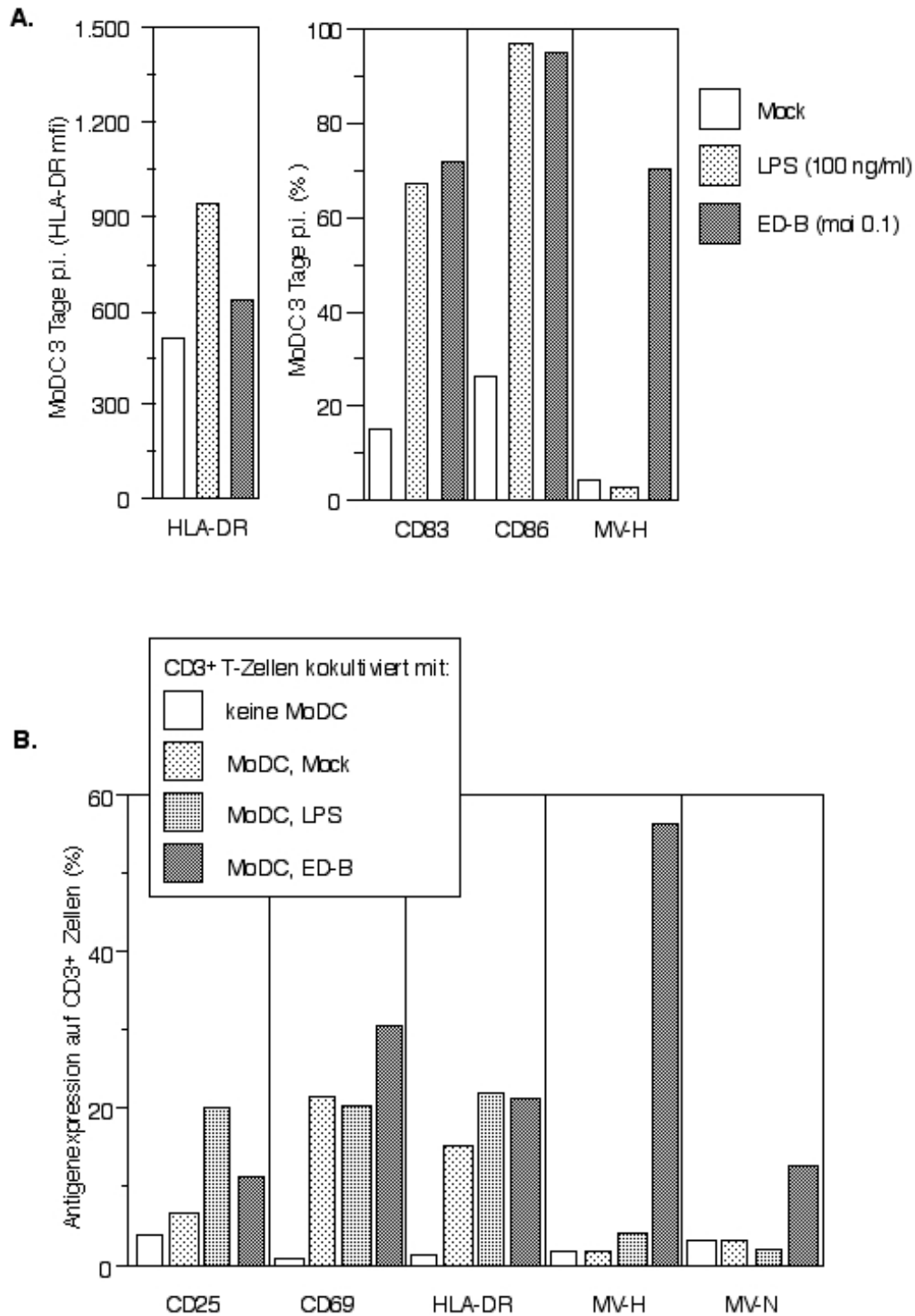


Bild 6–16 Aktivierungszustand von allogenen T-Zellen nach fünftägiger Kokultur mit MoDC infiziert mit Mock- oder mit ED-B-Präparationen (MOI 0,1) oder aktiviert mit LPS

(A) Unreife MoDC wurden Mock- oder ED-B-infiziert (MOI 0,1) und anschließend drei Tage kultiviert. Ein Teil der Mock-infizierten MoDC wurde mit LPS (100 ng/ml) aktiviert. Zur Überprüfung des MoDC-Aktivierungszustands und der Infektion wurde ein Teil der MoDC für eine nachfolgende FACS-Analyse mit mAk gefärbt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil an positiven Zellen innerhalb der morphologisch intakten Zellpopulation. (B) Drei Tage p.i. wurden die MoDC in einem Verhältnis von 1:20 mit allogenen T-Zellen in 48-Loch-Zellkulturplatten in Gegenwart von FIP (200 µM) kokultiviert. Nach fünf Tagen wurden die Zellen geerntet und mit mAk gegen CD3, CD25, CD69, HLA-DR, MV-N und MV-H gefärbt. Angegeben ist der Anteil an positiven Zellen in Prozent innerhalb der CD3⁺-Population.

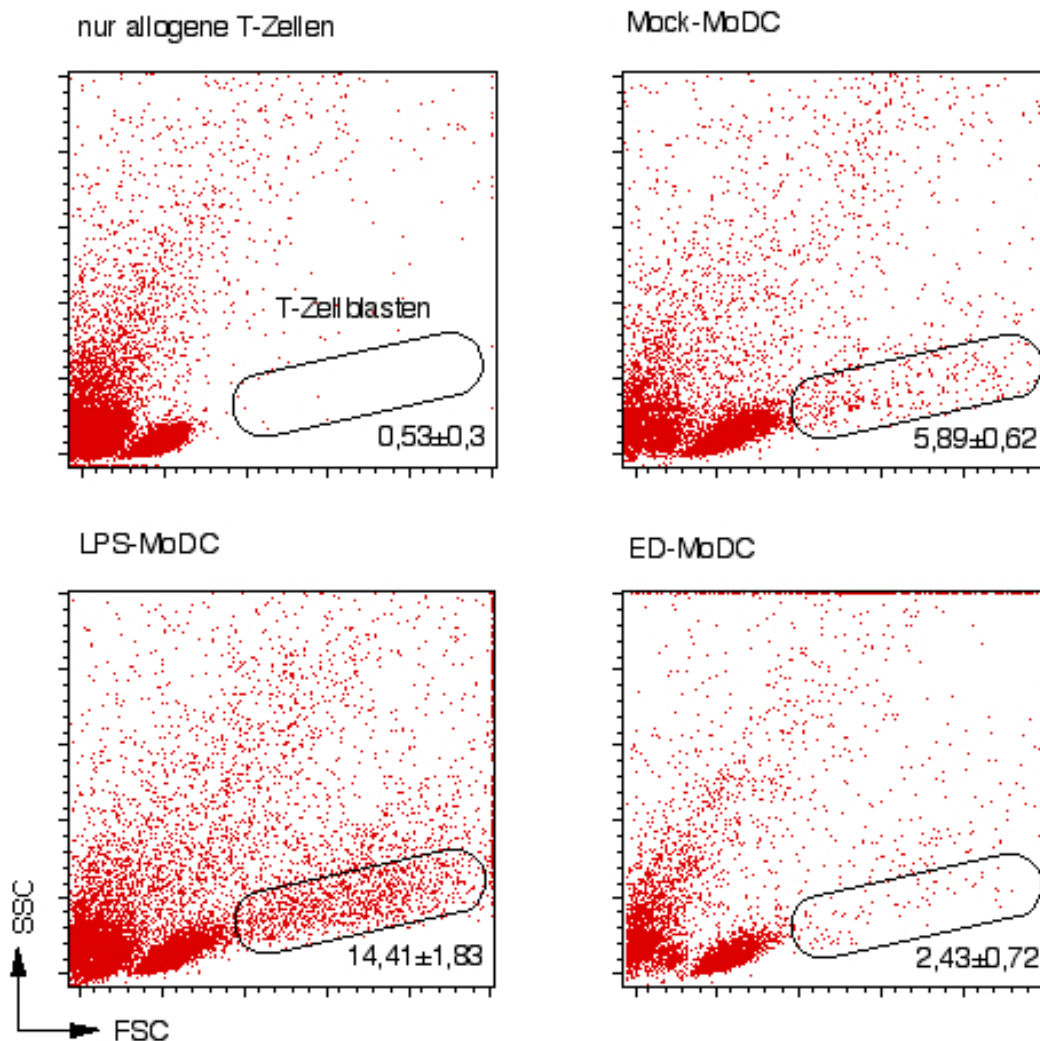


Bild 6–17 Allogene T-Zellen bilden nach Kokultur mit Mock- oder mit LPS-aktivierten MoDC, nicht aber nach Kokultur mit ED-B-infizierten MoDC Blasten aus

Unreife MoDC wurden mit ED-B MOI 0,1 infiziert und in Kultur genommen. Mock-infizierte MoDC, die ohne/mit LPS kultiviert wurden, dienen als Kontrollen. Drei Tage p.i. wurden die Zellen geerntet und mit allogenen T-Zellen im Verhältnis 1:20 kokultiviert. Nach fünf Tagen wurden die Kulturen geerntet und die Blastenbildung bestimmt. Der Rahmen in den morphologischen Darstellungen enthält die T-Zellblasten. Angegeben ist der prozentuale Anteil an Blasten innerhalb der CD3⁺-Zellpopulation (Mittelwert aus zehn Messungen ± SD).

6.3.6 MV-infizierte MoDC induzieren keinen proliferationsinhibitorischen Phänotyp in nicht-infizierten MoDC

Möglicherweise produzieren MoDC in Folge einer Infektion mit MV einen oder mehrere Faktoren, die einen MoDC-Phänotyp induzieren könnten, der inhibitorisch auf die Proliferation allogener T-Zellen in einer MLR wirkt. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurde als Quelle für MoDC das bereits unter 5.4.5 und 6.2.6 beschriebene Zweikammersystem verwendet. Unreife MoDC unter Einfluß von konditioniertem Medium Mock-infizierter, LPS-aktivierter oder ED-B (MOI 0,1)-infizierter MoDC wurden drei Tage p.i. aus der unteren Kammer geerntet. Eine Infektion der MoDC aus der unteren Kammer mit ED-B konnte durch eine MV-H-Färbung ausgeschlossen werden (nicht gezeigt, siehe auch Bild 6–11). Die MoDC

wurden in einer Standard-MLR mit allogenen T-Zellen fünf Tage kokultiviert, wobei während der letzten 16 h [Methyl-³H]-Thymidin zugegeben wurde. In **Bild 6–18** ist der Einbau an Thymidin in die DNS der T-Zellen als Stimulationsindex dargestellt. Die stärkste T-Zellproliferation gemessen am Thymidineinbau konnten MoDC induzieren, die unter Einfluß von LPS-aktivierten MoDC standen. Die beiden anderen MoDC-Populationen (Einfluß von Mock-infizierten MoDC oder Einfluß von ED-B-infizierten MoDC) zeigten eine sehr ähnliche T-Zellstimulationskapazität. Möglicherweise reichten die Mengen an Reifungsfaktoren nicht aus (IFN- α/β , TNF- α und vermutlich weitere Zytokine), die während einer ED-B-Infektion von den infizierten MoDC gebildet wurden, daß ein Aktivierungszustand der nicht-infizierten MoDC erreicht wurde, der dem ähnlich war, der durch den Überstand LPS-aktivierter MoDC induziert wurde (siehe **Bild 6–11**). Auf jeden Fall entwickelten die MoDC durch Inkubation mit dem Überstand der ED-B-infizierten MoDC einen Phänotyp, der die T-Zellproliferation nicht inhibierte.

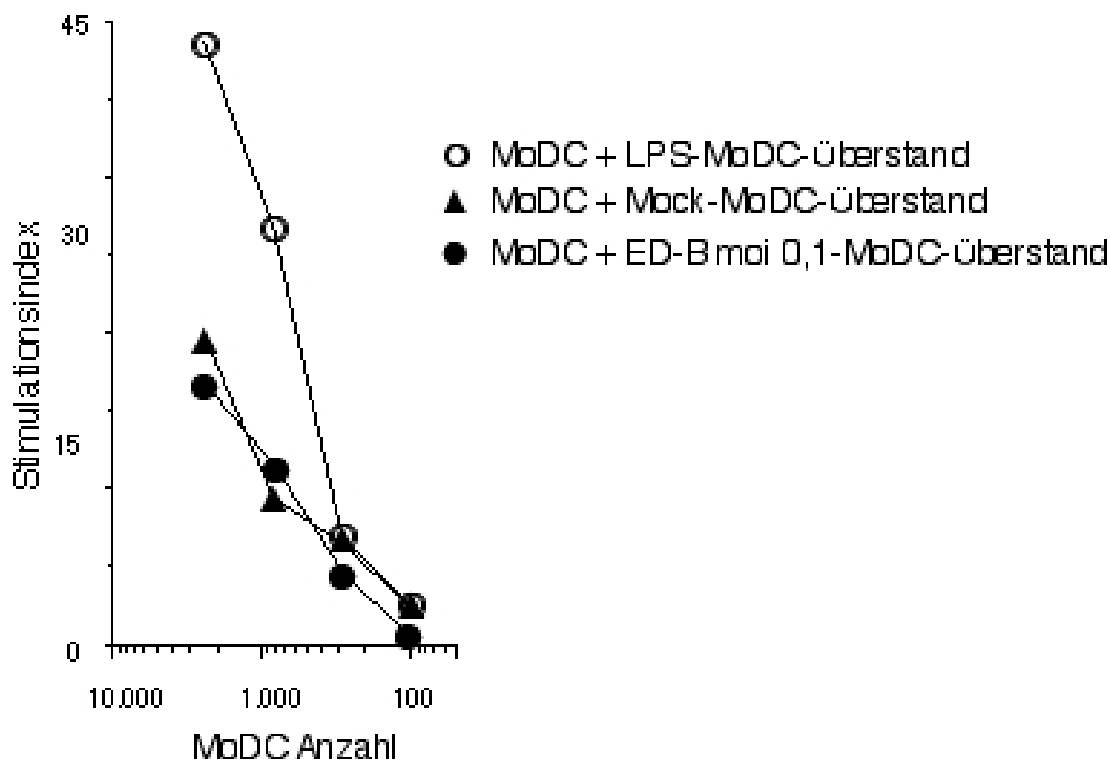


Bild 6–18 Unter dem Einfluß infizierter MoDC kultivierte MoDC entwickeln keinen T-Zellproliferationsinhibitorischen Phänotyp und sind in einer MLR aktiv

Unreife MoDC wurden in einem Zweikammersystem unter dem Einfluß von Mock-infizierten, LPS-aktivierten oder ED-B (MOI 0,1)-MoDC drei Tage kultiviert. Anschließend wurden die MoDC aus dem unteren Kompartiment des Zweikammerzellkultursystems geerntet, anhand einer MV-H-spezifischen FACS-Färbung eine Infektion mit ED-B ausgeschlossen und die Zellen in einer Standard-MLR mit allogenen T-Zellen eingesetzt. Angegeben ist der Einbau radioaktiv-markierten Thymidins über die letzten 16 h einer fünftägigen Kokultur als Stimulationsindex. Die Standardabweichung betrug unter 10 % und ist nicht angegeben.

6.3.7 Zugabe von IL-12 kann Hemmung der MLR durch ED-B-infizierte MoDC nicht aufheben

Aufgrund der immunostimulatorischen Eigenschaften von IL-12 und aufgrund von Beobachtungen, daß ED-B-kontaktierte Monozyten und PBMC bzw. ED-B-infizierte MoDC (Karp *et al.*, 1996; zusammengefaßt in Gately *et al.*, 1998) und **Bild 6–13**, **Tabelle 6-1** und **Tabelle 6-2** keine oder nur eine deutlich reduzierte IL-12-Produktion zeigen, wurde vermutet, daß das Fehlen von bioaktivem IL-12 eine Rolle in der MV-induzierten allgemeinen Immunsuppression spielt und mitverantwortlich ist für das Ausbleiben einer T-Zellproliferation, z.B. in einer MLR. Dies würde der durch RLV induzierten Immunsuppression gleichen (Kelleher *et al.*, 1999; Williams *et al.*, 1998).

In einer Standard-MLR wurde überprüft, ob durch Zugabe von rekombinanten humanen IL-12 eine Hemmung der T-Zellproliferation mit ED-B-infizierten MoDC ausblieb. Die verwendeten ED-B-infizierten MoDC exprimierten zwei Tage p.i. zu 34 % MV-H. **Bild 6–19** zeigt, daß die Zugabe von IL-12 zu einer MLR die Hemmung der T-Zellproliferation durch ED-B-infizierte MoDC nicht aufheben konnte. Das zugegebene IL-12 war bioaktiv, da die Thymidineinbaurate von IL-12-aktivierten T-Zellen gegenüber T-Zellen ohne IL-12 gesteigert war (T-Zellen ohne IL-12 $1306,4 \pm 213,5$ CpM gegenüber T-Zellen mit IL-12 $2497,2 \pm 242,6$ CpM). Vorinkubation der MoDC mit IL-12 (ohne, 10 ng/ml oder 100 ng/ml) mit anschließender Zugabe von IL-12 (ohne, 10 ng/ml oder 100 ng/ml) in die MLR konnte die Hemmung der T-Zellproliferation durch MV-infizierte MoDC ebenfalls nicht aufheben (nicht gezeigt).

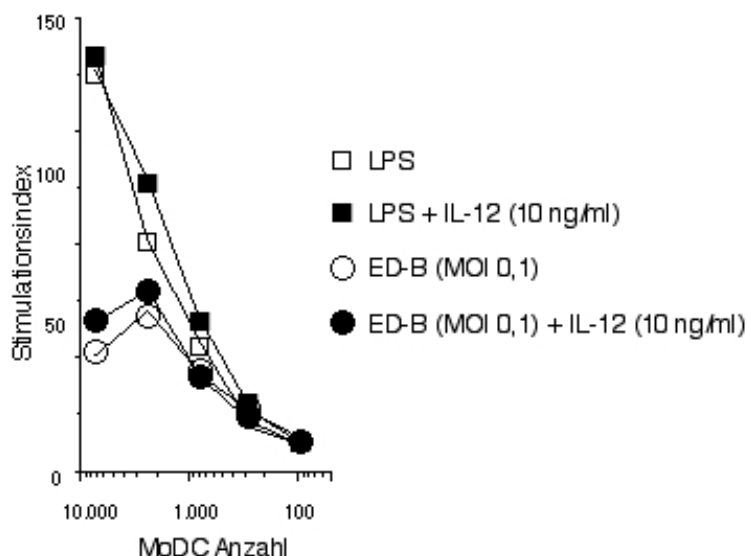


Bild 6–19 Eine Zugabe von IL-12 zu einer Standard-MLR mit ED-B-infizierten MoDC führt nicht zu einer Aufhebung der Hemmung der T-Zellproliferation

Unreife MoDC wurden mit Mock oder mit ED-B (MOI 0,1) infiziert, ein Teil der Mock-infizierten MoDC mit LPS (0,1 µg/ml) aktiviert und zwei Tage p.i. mit allogenen T-Zellen in einer Standard-MLR kokultiviert. Zu einem Teil der Absätze wurde rekombinantes humanes IL-12 zugegeben (10 ng/ml). Dargestellt ist der Thymidineinbau als Stimulationsindex. Die Standardabweichung betrug unter 10 % und ist nicht angegeben.

6.3.8 Kinetik der T-Zellproliferationsinhibition in der MLR

Um die Inhibition einer MLR durch MV-infizierte MoDC näher zu charakterisieren, wurden die MLR-Bedingungen verändert. Als APC in einer allogenen MLR dienten ED-B-infizierte MoDC (MOI 0,1 48 h-Infektion, 33 % MV-H⁺ MoDC), wobei die Kokultur nach 2 h, 24 h, 72 h, 120 h oder 168 h mit radioaktivem Thymidin markiert wurde. Parallel dazu wurden unreife MoDC mit ED-B (MOI 0,1) infiziert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten p.i. geerntet. Nach Bestimmung des Anteils infizierter Zellen (MV-H-Expression 6 h p.i. 3,5 %, 24 h p.i. 5,5 % und 48 h p.i. 26,2%) wurden die MoDC in Gegenwart von FIP in einer Standard-MLR mit allogenen T-Zellen kokultiviert.

In **Bild 6–20 (A)** ist dargestellt, daß eine Hemmung der MLR bereits nach 24 h Kokultur mit den infizierten MoDC im Vergleich zu den nicht-infizierten MoDC zu beobachten war. Diese Hemmung der MLR wurde nach 72 h Kokultur sehr deutlich und blieb über den beobachteten Zeitraum von 168 h Kokultur bestehen. Entsprechend den in **Bild 6–20 (B)** zusammengefaßten Daten tritt eine Hemmung der MLR bereits bei einer Infektion von 5 % der MoDC auf, eine deutliche MLR-Hemmung wurde beobachtet, wenn ca. ein Viertel der eingesetzten MoDC das MV-Hämagglutinin auf ihrer Oberfläche exprimieren.

6.3.9 UV-inaktiviertes ED-B hemmt eine allogene MLR

Möglicherweise war für die hemmende Wirkung von MV in einer MLR eine Replikation des Virus nicht notwendig. Oberflächenstrukturen, wie die MV-Glykoproteine, schienen auszureichen, um diesen Effekt hervorzurufen. Daher sollte es möglich sein, die T-Zellproliferation auch in Abwesenheit einer Infektion der MoDC alleine durch Zugabe von Replikationsinkompetentem ED-B zu hemmen. Nach UV-Inaktivierung der Viruspräparation (1,5 J/cm²) wurden nicht-infizierte, mit LPS aktivierte MoDC in einer allogenen MLR mit und ohne Zugabe von UV-inaktiviertem Virus (entsprechend einer MOI 1,0) eingesetzt. Wie in **Bild 6–20 (C)** zu erkennen ist, reichte die Zugabe des Replikationsinkompetenten ED-B aus, um eine MLR vollständig zu hemmen.

6.3.10 Eine MLR ist gehemmt, wenn als APC mit Viren infizierte MoDC verwendet werden, die die MV-Glykoproteine exprimieren

Unter Einsatz reverser Genetik wurden ein molekularer Klon des MV-Vakzinestamms ED-B, Edtag, sowie auf diesem molekularen Klon basierende rekombinante MV konstruiert (**Bild 4–1** und **5.2**). Das rekombinante MV MG/FV exprimiert anstelle der beiden MV Glykoproteine als Hüllprotein ein Hybridprotein aus der zytoplasmatischen Domäne des MV Fusionsproteins und der Transmembran- und extrazellulären Domäne des VSV Glykoproteins. Im rekombinanten MG/FV sind die beiden MV-Glykoprotein-ORFs vollständig durch einen VSV-G ORF ersetzt. Unter Verwendung dieser rekombinanten Viren konnte gezeigt werden, daß für die in der MLR zu beobachtende Hemmung der T-Zellproliferationsinduktion die Anwesenheit der extrazellulären Domänen der MV-Glykoproteine notwendig war.

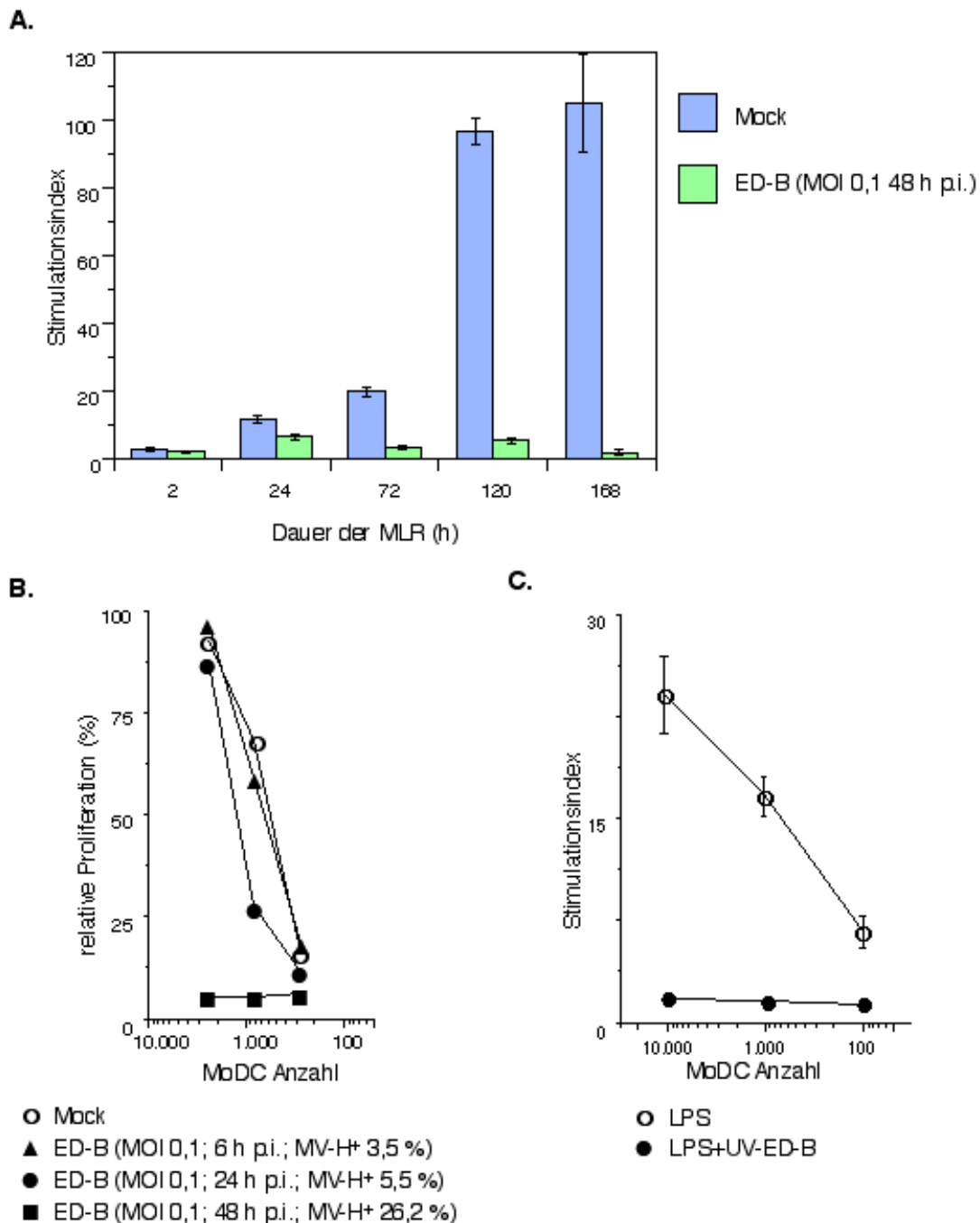


Bild 6–20 Die Induktion einer T-Zellproliferation in einer MLR ist bereits nach 24 h, spätestens aber nach 72 h Kokultur deutlich gehemmt und ist abhängig von der Anzahl MV-H-exprimierender MoDC in der allogenen Kokultur – zudem kann eine MLR auch durch Zugabe UV-inaktivierten Virus völlig gehemmt werden

(A) Unreife MoDC wurden mit Mock oder mit ED-B (MOI 0,1) infiziert, nach 48 h geerntet und das Ausmaß der Infektion 48 h p.i. mittels einer gegen das Hämagglutinin gerichteten Oberflächenfärbung bestimmt (33% MV-H⁺ MoDC). Die MoDC wurden in Gegenwart von FIP (200 µM) mit allogenen T-Zellen kokultiviert und die Ansätze zu den angegebenen Zeitpunkten mit [Methyl-³H]-Thymidin für 16 h markiert. Der Thymidineinbau ist als Stimulationsindex ± Standardabweichung angegeben. (B) Unreife MoDC wurden mit Mock oder mit ED-B (MOI 0,1) infiziert und zu verschiedenen Zeitpunkten p.i. geerntet, gegen MV-H gefärbt und mit T-Zellen in einer allogenen MLR in Gegenwart von FIP kokultiviert. Der Thymidineinbau ist als relative Proliferation der durch Mock-infizierte MoDC induzierten T-Zellproliferation (entspricht 100 %) angegeben. (C) LPS-aktivierte MoDC wurden in einer allogenen MLR mit oder ohne Zusatz von UV-inaktiviertem ED-B (entsprechend einer MOI von 1,0) mit T-Zellen kokultiviert und der Thymidineinbau nach fünf Tagen bestimmt.

In **Bild 6–21 (A)** erkennt man, daß mit MG/FV infizierte MoDC eine MLR ähnlich gut wie LPS-aktivierte, Mock-infizierte MoDC induzieren konnten, obwohl 31 % der MoDC das Hybridprotein exprimierten. Im Vergleich dazu war die MLR in Gegenwart ED-B-infizierter MoDC (31 % MV-H⁺) nahezu vollständig gehemmt. Ein ähnliches Bild ergab sich, wenn MGV-infizierte MoDC eingesetzt wurden (**Bild 6–21 (B)**). Der molekulare Klon von ED-B, Edtag, induzierte nach Infektion der MoDC ebenfalls eine klare Hemmung der T-Zellproliferationsinduktion. MGV-infizierte MoDC verhielten sich hingegen in der MLR stimulatorisch ähnlich gut wie Mock-infizierte MoDC.

6.3.11 ED-B-infizierte MoDC können in trans eine PHA-stimulierte T-Zellproliferation hemmen, aber nicht MG/FV-infizierte MoDC

Die Gegenwart der MV-Glykoproteine (als UV-inaktiviertes Virus oder deren Expression auf infizierten MoDC) war anscheinend ausreichend, um eine MLR-Induktion zu hemmen. Um zu testen, ob diese Wirkung dominant war, d.h., ob sie durch andere die T-Zellen aktivierende Behandlungen aufgehoben werden kann oder diese ebenfalls unterdrückt, wurden allogene und autologe T-Zellen mit MoDC nach einer Mock-Infektion, nach einer Mock-Infektion und anschließender LPS-Aktivierung oder nach einer Infektion mit ED-B (MOI 0,1) oder mit MG/FV (MOI 0,2) in einem Verhältnis von 4:1 kokultiviert. Etwa 37 % der ED-B-infizierten MoDC exprimierten MV-H bzw. 41 % der MG/FV-infizierten das VSV-G/MV-F-Fusionsprotein. Wie in **Bild 6–21 (C)** zu erkennen ist, konnten die ED-B-infizierten MoDC die PHA-stimulierte T-Zellproliferation deutlich hemmen. Hingegen zeigte die Kokultivierung mit MG/FV-infizierten MoDC keinen hemmenden, sondern eher einen stimulierenden Effekt, ähnlich dem, der nach Zugabe LPS-aktiverter MoDC zu beobachten war. Mit autologen T-Zellen wurden analoge Ergebnisse erhalten (nicht gezeigt).

6.3.12 MV-infizierte MoDC hemmen ebenfalls eine SEA-induzierte T-Zellproliferation

LPS-ausgereifte MoDC wurden mit SEA beladen und mit autologen T-Zellen kokultiviert. Die durch die MoDC stimulierte Proliferation autologer T-Zellen, die durch „Panning“ gegen HLA-DR von aktivierten T-Zellen und verbliebenen APCs depletiert worden waren (**5.1.7**), konnte durch Zugabe von Mitomycin C-inaktivierten BJAB bei geringeren DC-Zahlen leicht gesteigert werden (**Bild 6–22 A.**). Hingegen führte die Zugabe von BJAB-Zellen, die persistent mit ED-B infiziert sind, zu einer klaren Reduktion der SEA-induzierten T-Zellproliferation. Eine stärkere Hemmung der T-Zellproliferation konnte durch Zugabe von persistent mit WTF infizierten BJAB-Zellen induziert werden. Eine Infektion der MoDC oder der T-Zellen konnte ausgeschlossen werden, da der Test in Gegenwart von FIP durchgeführt wurde und persistent infizierte BJAB kaum infektiöses Virus freisetzen (Weidmann, 2000b). Die Proliferation der T-Zellen wurde über den Einbau an [³H]-Thymidin bestimmt.

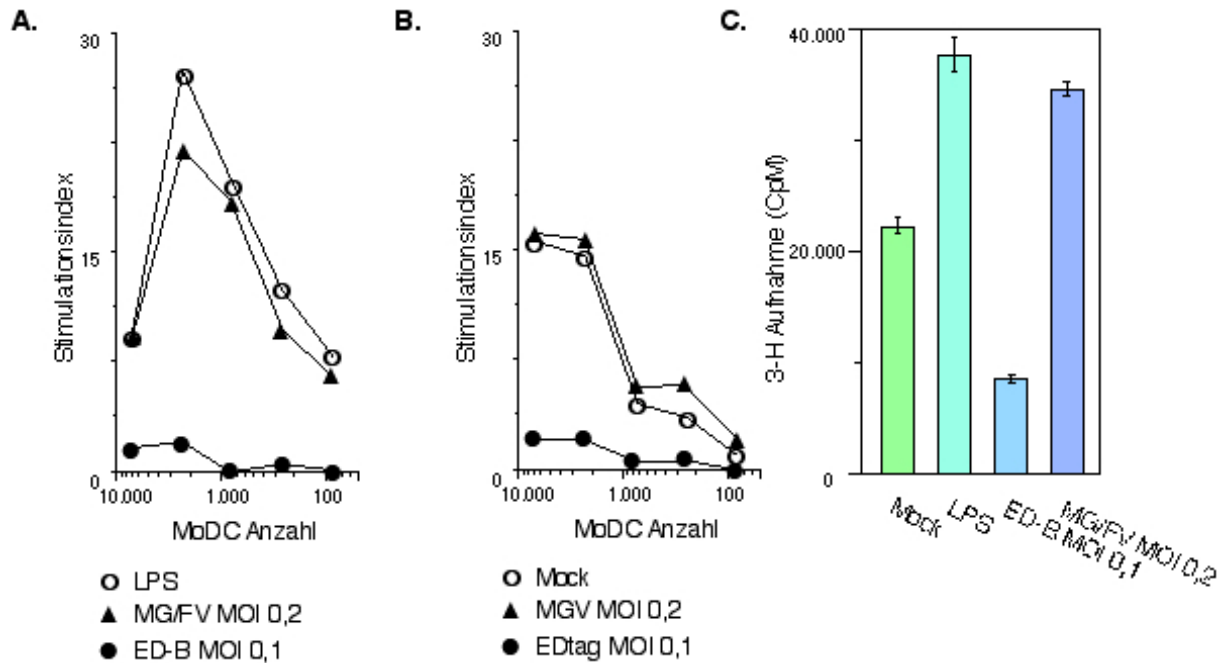
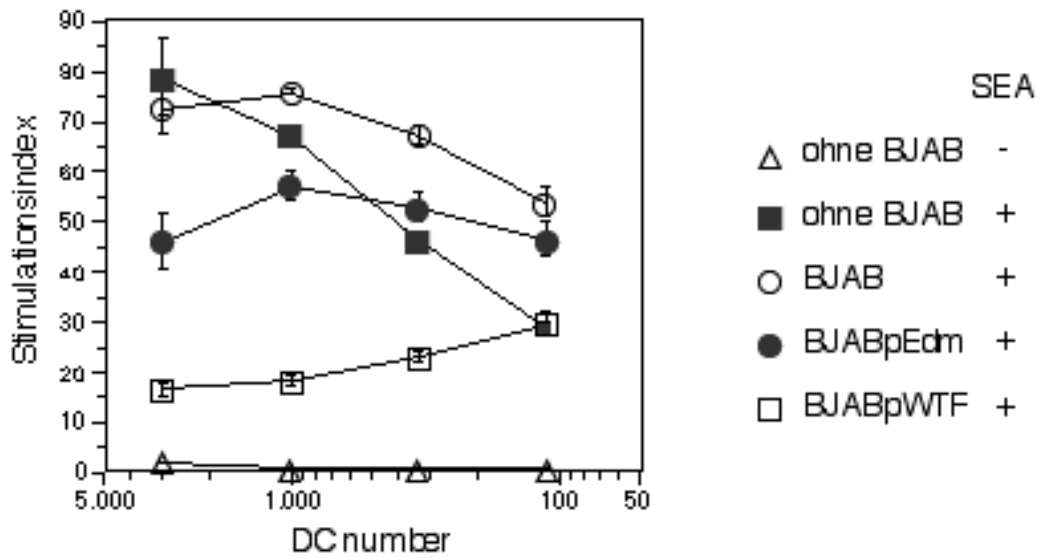


Bild 6–21 MV-infizierte MoDC hemmen sowohl die Induktion einer MLR als auch eine PHA-stimulierte T-Zellproliferation, wenn sie die MV-Glykoproteine exprimieren

(A) Unreife MoDC wurden mit ED-B (MOI 0,1) oder mit MG/FV (MOI 0,2) infiziert, zwei Tage p.i. gegen MV-H bzw. gegen die extrazelluläre Domäne des VSV-G-Proteins gefärbt und der Anteil an infizierten Zellen im FACS bestimmt (31 % ED-B- und 31 % MG/FV-infizierte MoDC). Die Zellen wurden zusammen mit Mock-infizierten, LPS-aktivierten MoDC in einer allogenen MLR in Gegenwart von FIP (200 μ M) eingesetzt und die T-Zellproliferation über den Einbau von Tritium-markiertem Thymidin bestimmt. **(B)** Ansatz wie in **(A)** nur unter Verwendung von Edtag- (MOI 0,1) und MG/MOI 0,2. **(C)** Allogene T-Zellen wurden in Gegenwart von PHA (2,5 μ g/ml) und FIP (200 μ M) mit Mock-infizierten MoDC, mit Mock-infizierten, LPS-aktivierten MoDC oder mit infizierten MoDC (ED-B MOI 0,1 oder MG/FV MOI 0,2) in einem Verhältnis von 4:1 kokultiviert und der Thymidineinbau nach 72 h bestimmt.

Nach Ausreifung mit LPS, um eine gleichförmige Expression an MHC Klasse II-Molekülen auf allen Zellen zu gewährleisten, wurden die Zellen mit ED-B unterschiedlicher MOI infiziert bzw. mit Mock inkubiert und zwei Tage p.i. in Gegenwart von FIP mit autologen T-Zellen kokultiviert. Durch die infizierten MoDC konnte die Proliferation der T-Zellen um bis zu 20 % gemessen am Kontrollwert der Mock-infizierten MoDC-Kokulturen reduziert werden (**Bild 6–22 B.**).

A.



B.

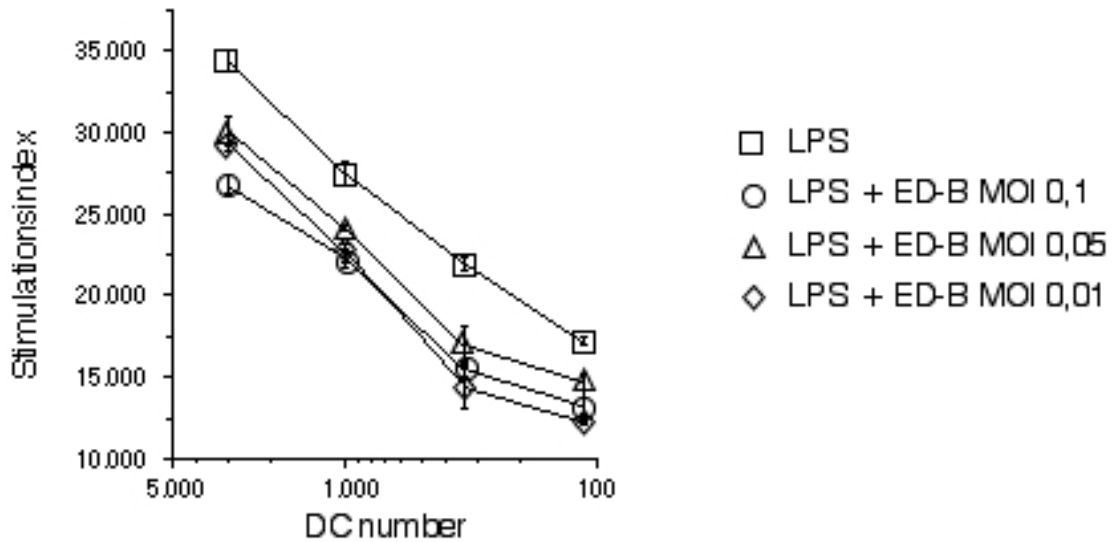


Bild 6–22 MV-infizierte BJAB oder MoDC können das Ausmaß der Proliferation SEA-stimulierter T-Zellen hemmen

(A) Analog einer Standard-MLR wurden SEA-beladene MoDC in absteigenden Zellzahlen mit 50.000 autologen nicht-aktivierten T-Zellen kokultiviert. Nach drei Tagen wurde die Kultur mit [3 H]-Thymidin markiert und der Einbau nach 16 h bestimmt. 50.000 Mitomycin-C-inaktivierte BJAB-Zelllinien, nicht infiziert oder persistent infiziert mit ED-B oder WTF, wurden in Gegenwart von 200 μ M FIP zu den Kulturen gegeben. (B) Mit ED-B-infizierte oder Mock-infizierte MoDC wurden mit 50.000 autologen T-Zellen kokultiviert. Die SEA-abhängige Proliferation der T-Zellen wurde nach drei Tagen durch eine 16 h-Markierung mit [3 H]-Thymidin bestimmt. Zu den Kulturen wurde 200 μ M FIP gegeben.

7 Diskussion

Akute Masern werden von einer generellen Immunsuppression begleitet, die sich dadurch auszeichnet, daß v.a. die zelluläre T-Zell-vermittelte Immunantwort ausbleibt (von Pirquet, 1908; Tamashiro *et al.*, 1987; Greenstein und McFarland, 1983; Fulginiti und Arthur, 1969; Arneborn and Biberfeld, 1983; Hirsch *et al.*, 1984; Wesley *et al.*, 1978). Die Patienten werden gegenüber Superinfektionen sehr empfänglich, was den Verlauf und Ausgang einer MV-Infektion komplizieren kann, in einigen Fällen mit fatalen Konsequenzen für den Patienten. Für das Ausbleiben einer zellulären Immunantwort gegenüber Superinfektionen wird unter anderem ein durch das MV induziertes Zytokinungleichgewicht verantwortlich gemacht, so daß statt T_H1- präferentiell T_H2-Immunantworten ausgelöst werden (Griffin und Ward, 1993; Karp *et al.*, 1996). Das *ex vivo* und *in vitro* zu beobachtende Ausbleiben der Aktivierung einer primären T-Zellantwort oder einer Gedächtniszellantwort wird durch Mechanismen erklärt, die sowohl infizierte als auch nicht-infizierte T-Zellen betreffen und in diesen eine Proliferationsblockade induzieren (Yanagi *et al.*, 1992; Schlender *et al.*, 1997; Schnorr *et al.*, 1997a; Engelking *et al.*, 1999; Weidmann *et al.*, 2000b). Eine natürliche MV-Infektion verläuft über Infektion der Epithelien der unteren Atemwege und breitet sich über lokale Lymphknoten systemisch aus (Riley *et al.*, 1978; Ruckle und Rogers, 1957). Innerhalb der Lungenepithelien bilden DC ein Netzwerk, dessen Zellen schnell auf Entzündungszeichen reagieren und mobilisiert werden. Die DC wandern in die lokalen, Mukosa-assoziierten Lymphknoten ein und sind dort in den T-Zell-reichen Gebieten zu finden (Holt *et al.*, 1988; Holt *et al.*, 1989; McWilliams *et al.*, 1994; Xia *et al.*, 1995; Vermaelen *et al.*, 2001). In *in vivo*-Modellen konnte eine Interaktion oder Infektion von DC-Populationen bislang nicht gezeigt werden (McChesney *et al.*, 1997; Zhu *et al.*, 1997; Rosic-Brkic *et al.*, 2001), dennoch könnte MV bereits zu einem frühen Zeitpunkt mit den DC in der Lunge in Kontakt kommen und diese infizieren. Als herausragende APC, die sowohl primäre T-Zellantworten und deren Polarisierung kontrolliert als auch sekundäre Immunantworten auslösen kann, könnte eine Infektion der DC durch das MV mit diesen Funktionen interferieren und zu den beobachteten Immunstörungen in MV-infizierten Patienten führen.

Unter *in vitro*-Bedingungen konnte bereits durch Schnorr und Mitarbeiter gezeigt werden, daß humane DC aus dem peripheren Blut sowohl mit Vakzine- als auch mit Wildtypviren infizierbar sind (Schnorr *et al.*, 1997b). Verglichen mit den DC aus dem peripheren Blut, die eine Mischpopulation aus lymphoiden und myeloiden reifen und unreifen DC darstellen, bilden die in der vorliegenden Arbeit verwendeten, aus Monozyten *in vitro* generierten MoDC eine homogene und klar definierte Population, die unreifen, myeloiden DC entspricht (**Bild 5–2**). Die MoDC sind mit allen eingesetzten MV-Stämmen infizierbar (**Bild 6–6**). Durch die Infektion bildet sich der für MV typische CPE mit Riesenzellbildung (**Bild 6–1**). Bereits Schnorr *et al.* beschrieben, daß PB-DC durch den Wildtypstamm WTF mit einer schnelleren Kinetik infiziert werden als mit ED-B, einem Vakzinestamm (Schnorr *et al.*, 1997b). Diese Beobachtung konnte in dieser Arbeit auf MoDC ausgedehnt werden. WTF infiziert MoDC schneller als ED-B (**Bild 6–4**, **Bild 6–5**), zudem produzieren MoDC nach WTF-Infektion mehr Virus als nach ED-B-Infektion (**Bild 6–2**). MoDC produzieren ca. das Fünffache an infektiösem WTF als an ED-B unter vergleichbaren Bedingungen, wobei das Virus v.a. Zell-assoziiert vorliegt. Dennoch ist die Virusreplikation in den MoDC nicht effizient, sondern

bleibt mit 1.570 TCID₅₀/ml im Falle von WTF bzw. 316 TCID₅₀/ml von ED-B deutlich unter der zur Infektion eingesetzten Virusmenge (25.000 TCID₅₀/ml).

Diese Befunde werden durch die Arbeiten anderer Gruppen bestätigt (Fugier-Vivier *et al.*, 1997; Servet-Delprat *et al.*, 2000a). Auch hier erfolgt nur eine mäßige Replikation der MV-Stämme in den MoDC, die kaum die zur Infektion der Zellen eingesetzten Virusmengen erreicht. Allerdings kann durch Stimulation mit CD40L-transfizierten Fibroblasten oder alternativ durch Kokultur mit voraktivierten, CD40L-exprimierenden T-Zellen die produzierte Virusmenge um das Sieben- (Fugier-Vivier *et al.*, 1997) bis Fünfundzwanzigfache gesteigert werden (Servet-Delprat *et al.*, 2000a). Dies steht im Widerspruch zu den Daten mit LPS-aktivierten MoDC. Nach LPS-Stimulation produzieren die infizierten MoDC sowohl nach WTF- als auch nach ED-B-Infektion kaum detektierbare Virusmengen (**Bild 6–2**). Möglicherweise werden durch die beiden unterschiedlichen Aktivierungssignale auch unterschiedliche Aktivierungszustände in den MoDC induziert, die sich hemmend (LPS) oder förderlich (CD40L) auf die Virusreplikation in den MoDC auswirken.

Neben WTF wurden die weiteren Wildtypviren TC5679 und Chicago-1 eingesetzt. TC5679 wurde wie WTF über die Zelllinie BJAB propagiert. Chicago-1 wurde durch Passage über Verozellen analog zu den Vakzinestämmen ED-B, ED-Zagreb, Schwarz, Moraten und AIK-C kultiviert (siehe **5.2**). Die schnellsten Infektionskinetiken zeigen die über BJAB propagierten Wildtypviren WTF und TC5679. Dies wird auch dadurch deutlich, daß zwei Tage p.i. keine Zellen in Kultur mehr intakt, sondern entweder abgestorben oder zu Riesenzellen fusioniert waren (**Bild 6–6**). Der Wildtypstamm Chicago-1 zeigt eine Infektionskinetik ähnlich den Vakzinestämmen ED-B, ED-Zagreb und AIK-C. Am langsamsten infizieren die beiden Vakzinestämme Schwarz und Moraten die MoDC (**Bild 6–6**). Der unterschiedliche MoDC-Tropismus zwischen Wildtyp- und Vakzineviren wird wahrscheinlich durch das Hämagglutinin bestimmt. Ohgimoto und Kollegen konnten zeigen, daß unter Verwendung molekularer Klone basierend auf ED-tag (**Bild 4–1**) die rekombinanten Viren am besten MoDC infizieren können, die statt des H-Proteins von ED-B das von WTF exprimierten (Ohgimoto *et al.*, 2001). Dies steht möglicherweise in Zusammenhang mit einer veränderten Rezeptornutzung. Es konnte gezeigt werden, daß WTF eine Adaption durchläuft, wenn es über Verozellen passagiert wird, die zu einer verstärkten Nutzung von CD46 als Rezeptor führt (Bartz *et al.*, 1998). Da CD150 der generelle Wildtypvirusrezeptor ist (Tatsuo *et al.*, 2000; Hsu *et al.*, 2001; Erlenhöfer *et al.*, 2001), müßte z.B. Chicago-1 einen Rezeptorwechsel nach Passage über Verozellen erfahren haben und statt CD150 nun CD46 auf den DC verwenden. Ob für die beobachteten Unterschiede auf MoDC tatsächlich ausschließlich die MV-Glykoproteine verantwortlich sind, müssen weiterführende Experimente zeigen. Möglicherweise verringert sich durch einen Rezeptorwechsel von CD150 auf CD46 die Geschwindigkeit der Virusaufnahme, was zu langsameren Infektionskinetiken führen könnte. Auch ist eine Rolle weiterer Virusproteine in der Kontrolle der Replikation nicht auszuschließen. So konnten Escoffier *et al.*, 1999 zeigen daß das C-Protein von ED-B für eine effiziente Replikation in PBMC von Bedeutung ist, allerdings keine Rolle bei der Replikation in Zelllinien spielt (Radecke und Billeter, 1996). *In vivo*-Daten zeigen, daß das Fehlen des C-Proteins zu einem milden Krankheitsverlauf führt (Patterson *et al.*, 2000). Zudem scheint das V-Protein *in vivo* über Regulation der RNS-Transkription und Replikation die Ausbreitung im Gewebe (Tober *et al.*, 1998) und die Pathogenität zu steuern (Patterson *et al.*, 2000). Zudem konnten Takeda *et al.*, 1998 zeigen, daß Mutationen in den Polymerasegenen (L- und P-Proteine) und im akzessorischen Gen für das C/V-Protein mit einer Abnahme der Replikation von MV in Zellkultur verantwortlich ist.

Aufgrund der zu beobachtenden Riesenzellbildung nach Infektion mit MV wurde die Viabilität der infizierten MoDC mittels quantitativer Durchflußzytometrie bestimmt (**5.5.4**). Innerhalb von zwei Tagen p.i. führt ED-B zu einer Zellzahlabnahme auf 46 ± 2 % des Ausgangswertes (**Bild 6–3 A.**). Eine Aktivierung der MoDC durch MKM führt ebenfalls zur Abnahme der Viabilität der Zellen (69 ± 2 %). Dies deutet daraufhin, daß eine Ausreifung der MoDC-Population, entweder durch Infektion oder durch MKM, an sich mit einer Abnahme der Viabilität der Zellen verbunden ist. Allerdings ist der Zellverlust in den infizierten Kulturen deutlich größer. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Studien anderer Gruppen. So beobachteten Grosjean und Mitarbeiter, daß aus $CD34^+$ -Vorläuferzellen generierte DC nach Infektion mit MV-Vakzine- oder -Wildtypstämmen ebenfalls an Viabilität verlieren und die Zellzahl vier Tage p.i. auf ca. 50 % der Ausgangszellzahl sinkt (Grosjean *et al.*, 1997). Fugier-Vivier und Kollegen zeigten, daß die Viabilität der MoDC zwei bis drei Tage p.i. ebenfalls auf ca. 50 % sinkt (Fugier-Vivier *et al.*, 1997). Sowohl Grosjean *et al.* als auch Fugier-Vivier *et al.* wiesen nach, daß eine MV-Infektion einer DC-Population zu einer Zunahme der Apoptose der MoDC führt. Daher ist die in **Bild 6–3 A.** gezeigte Abnahme der Zellviabilität sehr wahrscheinlich ebenfalls auf eine Zunahme der Apoptose zurückzuführen. Möglicherweise erfolgt die Apoptosezunahme aufgrund der Infektion an sich. Denkbar ist auch, daß durch den MV-bedingten CPE die in Kultur bereits als Hintergrund vorliegende Apoptose verstärkt wird, somit nicht direkt Folge der Infektion ist, wie dies auch für HIV-infizierte Zellen gezeigt werden konnte (Scheller und Jassoy, 2001). Was letztlich der Grund für die in diesem System zu beobachtende Zellzahlabnahme nach Infektion mit ED-B ist, müßte durch geeignete Versuche ermittelt werden.

Parallel zu der Abnahme der Viabilität in den infizierten MoDC-Kulturen kann eine allgemeine Aktivierung gemessen an der Aufregulation typischer DC-Aktivierungsmarker festgestellt werden (**Bild 6–3 B.**). **Bild 6–4** zeigt, daß eine Infektion mit WTF eine stärkere Ausreifung der MoDC hervorruft als eine Infektion mit ED-B. Diese Beobachtung konnte auf den Wildtypstamm TC5679 ausgedehnt werden. Verglichen mit den anderen Vakzinestämmen zeigten die beiden Wildtypen WTF und TC5679 die schnellste Induktion von CD83 und CD86 (**Bild 6–6**). Auch hier konnten Befunde von PB-DC auf MoDC ausgedehnt werden (Schnorr *et al.*, 1997b). Schnorr und Kollegen zeigten, daß WTF zu einer schnelleren und stärkeren Ausreifung der PB-DC führt verglichen mit ED-B-infizierten PB-DC. Daß eine MV-Infektion zu einer DC-Ausreifung führt, wird ebenfalls durch die Ergebnisse von Servet-Delprat und Mitarbeitern bestätigt (Servet-Delprat *et al.*, 2000a). Auch hier könnte ein Grund für die schnellere Ausreifung der MoDC nach Infektion mit WTF oder TC5679 der stärkere DC-Tropismus der Wildtypviren für MoDC verglichen mit Vakzineviren sein (Ohgimoto *et al.*, 2001).

Allgemein konnte in mehreren *in vitro*-Studien gezeigt werden, daß Infektionen zu einer Ausreifung der verwendeten DC-Populationen führen. So reifen MoDC nach Infektion mit dem Dengue Virus aus (Ho *et al.*, 2001), ebenso nach Infektion mit Adenoviren (Rea *et al.*, 1999), Canarypoxviren (Ignatius *et al.*, 2000) oder Vacciniavirus (Saurwein-Teissl *et al.*, 1998). Im Falle von MV konnte gezeigt werden, daß das Maß der Aufregulation von Aktivierungsmarkern zumindest teilweise von der eingesetzten MOI abhängig ist und somit mit der Zahl infizierter Zellen korreliert (**Bild 6–5**, Expressionsentwicklung von CD25 und CD80). Zum Teil scheint allerdings die Aufregulation nicht mit der Zahl infizierter Zellen zu korrelieren, sondern eine Folge der Infektion zu sein und indirekt vermittelt zu werden (**Bild 6–5**, Expressionsentwicklung von CD86).

Neben der Zahl infizierter MoDC könnte auch die Zahl der durch das MV kontaktierten MoDC für das Ausmaß der Reifung der DC-Population bestimmend sein. Tatsächlich kann

UV-inaktiviertes ED-B, wie in **Bild 6–7** gezeigt, unabhängig von einer Infektion der MoDC, aber abhängig von der inkubierten Virusmenge eine begrenzte MoDC-Aktivierung induzieren. Als mögliche Mechanismen kommen hier Rezeptor-vermittelte Signale in Frage, die zu einer Aktivierung der MoDC führen. So konnten Milone und Fitzgerald-Bocarsly 1998 zeigen, daß PB-DC durch umhüllte RNS- oder DNS-Viren über den Mannoserezeptor aktiviert werden können. Neben dem Mannoserezeptor werden auf DC weitere Mustererkennungsrezeptoren exprimiert, die sogenannten „Toll-like receptors“, TLR (Muzio *et al.*, 2000; Visintin *et al.*, 2001). Zumindest für das Fusionsprotein des RSV konnte gezeigt werden, daß es über CD14 und TLR4 Monozyten aktivieren kann (Kurt-Jones *et al.*, 2000). Ob und welche Rezeptoren an der Aktivierung der MoDC nach Inkubation mit UV-inaktiviertem MV beteiligt sind, müssen weitergehende Versuche zeigen. Denkbar sind hier Studien mit neutralisierenden Antikörpern, die selektiv Rezeptoren auf den DC oder Strukturen auf den Virionen abblocken.

Bereits Henderson und Kollegen sowie Ho und Kollegen konnten zeigen, daß DC pro-inflammatorische Zytokine nach einer Infektion produzieren (Henderson *et al.*, 1997; Ho *et al.*, 2001). Diese Zytokine könnten auto- oder parakrin die Reifung der DC induzieren. Nach Infektion mit MV produzieren MoDC Typ I-Interferone (**Bild 6–9**, **Bild 6–10**) und TNF- α (**Bild 6–12**). Die Induktion der Typ I-Interferone wurde über die Expression des IFN-induzierbaren Proteins MxA bestimmt. So konnte gezeigt werden, daß als Reaktion auf UV-inaktiviertes MV MxA und somit Typ I-Interferone nur transient induziert werden (**Bild 6–7**). Neben der alleinigen Kontakt-vermittelten Induktion durch UV-inaktiviertes MV scheinen somit weitere Signale für eine anhaltende Expression von Typ I-Interferonen nötig zu sein. Möglicherweise werden nur durch replizierendes Virus große Mengen Typ I-Interferon induziert. Durch die Virusreplikation entsteht dsRNS, die verschiedene Signaltransduktionswege in der Zelle aktivieren kann (siehe zur Übersicht **Bild 7–1** und Jordanov *et al.*, 2000 und Jordanov *et al.*, 2001). Cella und Kollegen konnten zeigen, daß dsRNS ein sehr potentes Reifungssignal für MoDC darstellt, das zudem einen antiviralen Status in den Zellen induziert und sie vor dem CPE durch Influenza A-Virus schützt (Cella *et al.*, 1999b). In diesem Zusammenhang müssen vielleicht auch die in **Bild 6–2 B.** dargestellten Ergebnisse gesehen werden. Durch die Aktivierung mit LPS wird in den MoDC möglicherweise ein antiviraler Status induziert, der die infizierten MoDC zwar nicht vor dem CPE durch MV schützt (**Bild 6–1**, **Bild 6–3 A.**), aber die Virusreplikation und vor allem die Bildung infektiösen Virus verhindert. Ob hier allerdings über LPS-induzierte IFNs eine Rolle spielen bzw. ob tatsächlich der Zusammenbau und die Freisetzung infektiösen Virus nach LPS-Stimulation gestört ist, müssen natürlich weitergehende Experimente zeigen. Denkbar sind hier der Einsatz von Inhibitoren von Kinasen der in **Bild 7–1** dargestellten Signaltransduktionswege, um den Einfluß der dsRNS-induzierten Signalwege in der Ausreifung der MoDC nach MV-Infektion zu untersuchen. Zudem müßte die Rolle von MxA in diesem System untersucht werden, das durch LPS induziert wird und dem bereits eine Rolle in der Eindämmung der MV-Ausbreitung in humanen monozytären Zelllinien (Schnorr *et al.*, 1993) und in humanen Gliazelllinien zugewiesen wurde (Schneider-Schaulies *et al.*, 1994). Möglicherweise wird MV in APC generell schlecht repliziert, obwohl sowohl eine Transkription als auch eine Translation stattfindet, wobei dies vom Aktivierungs- oder Differenzierungsstatus der APC abhängen könnte (Helin *et al.*, 1999).

Der Einfluß der gebildeten Zytokine auf die MoDC-Ausreifung wurde in einem Zweikammerzellkultursystem untersucht (**5.4.5**). Unreife MoDC werden durch den Überstand der infizierten MoDC aktiviert (**Bild 6–11 A.**). Sollten virale Glykoproteine ins Medium abgegeben werden und in Kontakt mit den nicht-infizierten MoDC gelangen, so wäre die beobachtete MoDC-Ausreifung nicht virusspezifisch, da sowohl Überstände ED-B- als auch MG/FV-

infizierter MoDC wirksam sind. Wahrscheinlicher ist eine Reifung der DC aufgrund der Wirkung von Zytokinen, die von den infizierten MoDC produziert werden. Allerdings ist die Ausreifung der nicht-infizierten MoDC, die mit den ED-B-infizierten MoDC kokultiviert wurden, gegenüber den mit LPS-aktivierten MoDC leicht verzögert. Möglicherweise liegt dies an einer effizienteren Ausreifung mit einhergehender stärkerer Zytokinproduktion durch die LPS-aktivierten MoDC. Eine alternative Erklärung wäre, daß das LPS den Filter passieren und die nicht-infizierten MoDC über Wechselwirkung mit TLR4 ausreifen läßt (Ardeschna *et al.*, 2000; siehe auch **Bild 6–4** und **Bild 6–6**).

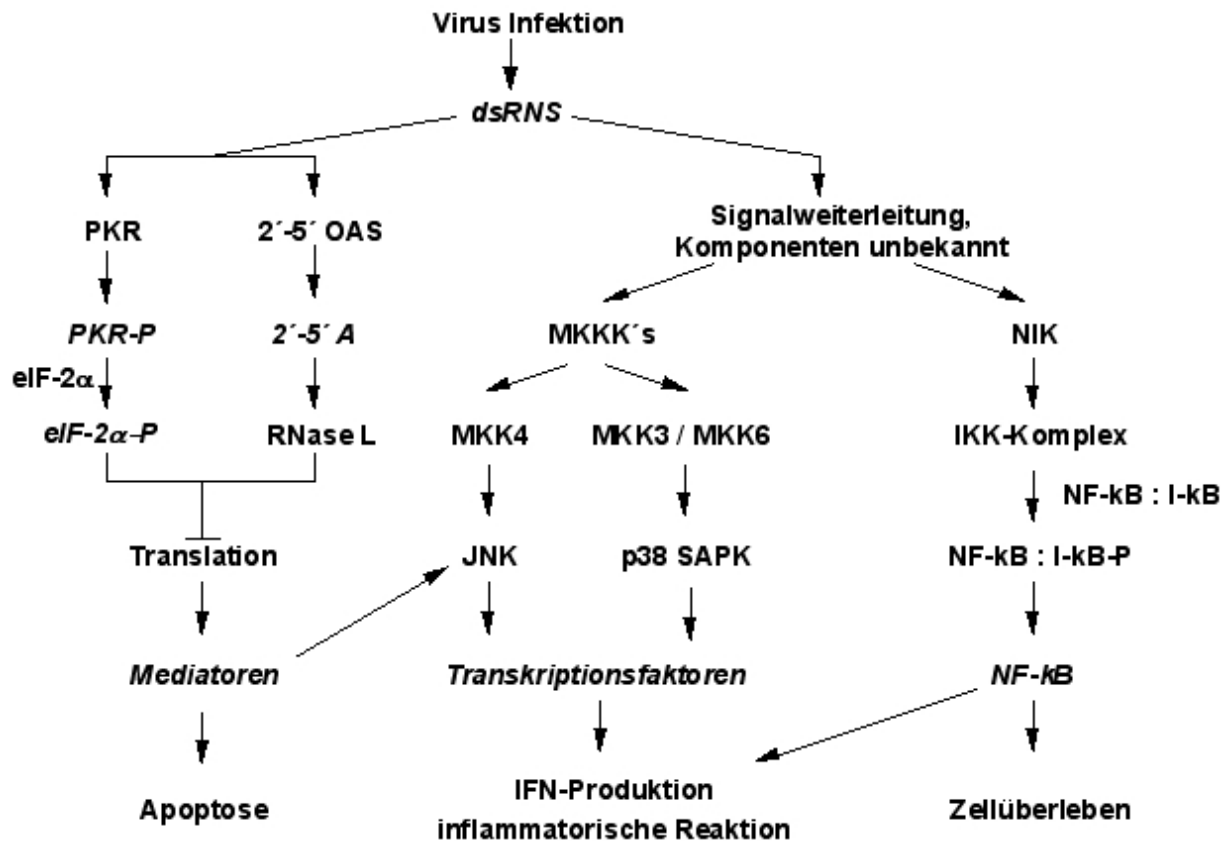


Bild 7–1 Übersichtsdarstellung der durch dsRNA aktivierten Signaltransduktionswege und die daraus resultierenden Zellreaktionen (modifiziert nach Iordanov *et al.*, 2001 & Iordanov *et al.*, 2000)

Als Nebenprodukt einer viralen Infektion entsteht dsRNS, die wahrscheinlich zwei voneinander unabhängige Signalwege aktiviert. Der über PKR und 2'-5' OAS laufende Signalweg wirkt pro-apoptotisch, der über Stresskinasen und NF-κB-Mobilisierung anti-apoptotisch und pro-inflammatorisch.

Durch Gabe neutralisierender Antikörper konnte gezeigt werden, daß Typ I-Interferone an der Induktion von CD86 und von MxA beteiligt sind (**Bild 6–11 B.**). Dies bestätigt auch Ergebnisse von Luft und Kollegen, die zeigen konnten, daß IFN die Ausreifung von DC aus CD34⁺-Vorläuferzellen und von LC *ex vivo* verstärkt (Luft *et al.*, 1998). Zusätzlich wird die Ausreifung von nicht-infizierten MoDC in Kulturen mit MV infizierten MoDC durch Arbeiten einer anderen Gruppe bestätigt (Servet-Delprat *et al.*, 2000b). Allerdings wird in diesen Arbeiten die Ausreifung der nicht-infizierten „Bystander“-MoDC über den Kontakt oder durch die Aufnahme apoptotischer Zellfragmente MV-infizierter MoDC erklärt. Eine Beteili-

gung aktivierender Zytokine wurde nicht untersucht. Ob und in welchem Umfang apoptotische Zellreste bei der MoDC-Ausreifung im hier verwendeten Zweikammersystem eine Rolle spielen (**Bild 5–3**, **Bild 6–11**) müßten weitergehende Versuche zeigen. Aufgrund der Ausschlußgröße des Filtereinsatzes von 20 nm sollten apoptotische Zellreste oder vesikuläre Zelltrümmer als Mediatoren einer DC-Aktivierung allerdings keine Rolle spielen (Mack *et al.*, 2001).

Interessanterweise konnte auch gezeigt werden, daß die MxA-Induktion durch LPS-aktivierte MoDC Typ I-Interferon-abhängig ist, die CD86-Induktion jedoch nicht. Möglicherweise werden durch LPS verschiedenste pro-inflammatorische Zytokine, u.a. auch IFN induziert. Diese Zytokine wirken synergistisch und können die Neutralisierung des IFN kompensieren, so daß die CD86-Expression unbeeinflusst ist, während das Ausbleiben der strikt durch IFN regulierten Expression des MxA nach Neutralisierung nicht kompensiert werden kann. Um dies zu überprüfen, müßten Versuche mit neutralisierenden Antikörpern gerichtet gegen TNF- α , IL-6 und IL-1 α/β durchgeführt werden. Da die Neutralisierung des IFN keinen Einfluß auf die Induktion anderer Reifungsmarker hat, könnte so auch festgestellt werden, ob und welchen individuellen Beitrag diese pro-inflammatorischen Zytokine in der Ausreifung der nicht-infizierten MoDC durch den Überstand infizierter MoDC leisten.

Für die in **Bild 6–6** zu findenden Variationen im Ausmaß und in der Kinetik der Ausreifung der infizierten MoDC-Kulturen abhängig vom verwendeten MV-Stamm könnten mehrere Mechanismen verantwortlich sein. Neben der für die beiden Wildtypviren WTF und TC5679 bereits diskutierten unterschiedlichen Rezeptornutzung und der daraus resultierenden schnelleren Infektionskinetik mit einhergehender schnellerer Ausreifung, induzieren die einzelnen Stämme nach Infektion der MoDC möglicherweise unterschiedliche Mengen an pro-inflammatorischen Zytokinen. Zumindest scheint ED-B im Vergleich mit WTF ähnliche Mengen an IFN oder TNF- α zu induzieren (vgl. **Bild 6–10 C**. und **Bild 6–12**), so daß hier für den zu beobachtenden Unterschied in der Ausreifung der Kulturen der stärkere DC-Tropismus der Wildtypviren alleine verantwortlich sein könnte. Die eng verwandten Virusstämme ED-B, ED-Zagreb und AIK-C weisen ähnliche Infektions- und Reifungskinetiken auf. Hingegen unterscheiden sich die Stämme Moraten und Schwarz nicht nur in ihrer Infektionskinetik von allen anderen Viren, sondern zeigen auch, gemessen an den Expressionsmustern der infizierten MoDC, andere Reifungskinetiken (**Bild 6–6**). Ihre Ausreifung gleicht der von Vakzinestämmen (Moraten) oder gar Wildtypstämmen (Schwarz). Da sie die MoDC langsamer infizieren als Vakzine- oder Wildtypstämmen, müßten sie mindestens gleiche oder höhere Mengen an aktivierenden Zytokinen sezernieren. Weiterführende Untersuchungen sollten Aufschlüsse über die durchschnittliche Zytokinproduktion von MoDC nach Infektion mit den verschiedenen Virusstämmen unter vergleichbaren Bedingungen erbringen.

Allgemein herrscht Unklarheit über die Fähigkeit von Wildtyp- oder Vakzineviren IFN *in vivo* induzieren zu können. So beschreiben Petralli *et al.* 1965 und Crespi *et al.*, 1988, daß sie IFN nach Vakzinierung bzw. direkt nach akuten Infektionen nachweisen können, hingegen finden Shiozawa *et al.*, 1988 und Tilles *et al.*, 1987 keine Anzeichen von bioaktivem IFN im Serum von MV-Erkrankten oder Vakzinierten. *In vitro*-Daten legen nahe, daß IFN sehr wohl durch MV induziert werden kann. Salonen *et al.* bemerkten die Sekretion von IFN- α nach Infektion PHA-stimulierter PBMC (Salonen *et al.*, 1989), ebenso konnten in ELISPOT-Assays IFN-produzierende Zellen aus PBMC nach MV-Kontakt identifiziert (Feldman *et al.*, 1994), sowie IFN-mRNS in Gliazelllinien nach MV-Infektion nachgewiesen werden (Schneider-Schaulies *et al.*, 1993). In Gliazellen scheint zudem das IFN- β für die MHC Klasse I-Induktion verantwortlich zu sein (Dhib-Jalbut und Cowan, 1993). Andererseits

konnten Naniche und Kollegen zeigen, daß Wildtypviren im Vergleich zu Vakzineviren nach Infektion von PBMC kaum IFN induzieren (Naniche *et al.*, 2000). Die zu beobachtenden Unterschiede mögen daraus resultieren, daß *in vivo* nach MV-Infektion oder -Vakzination nicht notwendigerweise die Serumlevel, sondern besonders in infizierten Geweben oder Kompartimenten die Konzentrationen an IFN deutlich erhöht sind. *In vitro* könnte die Verwendung unterschiedlicher Zelllinien und Viruspräparationen auch zu unterschiedlichen Ergebnissen führen. Naniche und Kollegen postulieren, daß MV-Isolate, die ausschließlich über PBMC oder die Zelllinie B95-8 propagiert wurden, eine IFN-Induktion unterdrücken und nur geringe Mengen an IFN in infizierten PBMC induzieren. Diese Eigenschaft verlieren die Isolate, wenn sie wiederholt wie Vakzinestämme über Verozellen passagiert werden. Verozellen, verglichen mit PBMC, produzieren aufgrund eines Defekts kein IFN als Reaktion auf Virusinfektionen. Somit besteht kein Selektionsdruck, der die Amplifikation eines IFN-unterdrückenden Virusphänotyps begünstigen würde. Die über Verozellen gezogenen MV sollen demnach die Fähigkeit verlieren, die endogene IFN-Produktion der Wirtszellen zu unterdrücken.

In **Bild 6–10** wird dargestellt, daß neben ED-B auch WTF IFN nach Infektion von MoDC induziert, gemessen an der MxA-Induktion durch Virus-freien Überstand in der Indikatorzelllinie BJAB. WTF kann als Wildtypvirus gelten, da es über die B-Zelllinie BJAB isoliert und seitdem propagiert wurde. Dadurch behielt WTF seine Rezeptorspezifität und infiziert Zellen über den Wildtyprezeptor CD150 (Erlenhöfer *et al.*, 2001 und Bartz *et al.*, 1998). Die von Naniche *et al.* beschriebene deutlich geringere IFN-Induktion durch Wildtypviren kann mit dem Wildtypvirus WTF nicht gezeigt werden. Möglicherweise sind die Unterschiede in der Art der Viruszucht zu suchen, einmal Zucht über PHA-aktivierte PBMC oder die B-Zelllinie B95-8 (Naniche *et al.*, 2000), zum anderen die Zucht über die B-Zelllinie BJAB (vorliegende Arbeit). Dies scheint als Grund für die zu beobachtenden Unterschiede wenig wahrscheinlich, da die für die WTF-Propagation verwendete B-Zelllinie BJAB der B-Zelllinie B95-8 ähnelt (in beiden Fällen wahrscheinlich Rezeptornutzung von CD150 und ein intaktes IFN-System vorhanden). Eher sind die Ursachen für die zu beobachtenden Unterschiede in der Infektion verschiedener Zellpopulationen zu suchen. Um diese Unklarheit zu beseitigen, müßten PHA-aktivierte PBMC mit WTF infiziert und anschließend die Produktion an Typ I-IFN bestimmt werden. Zumindest anhand der aktuellen Befunde muß festgehalten werden, daß ED-B- und WTF-infizierte MoDC vergleichbare Mengen an IFN produzieren und in diesem Punkt keine Unterschiede zwischen Wildtyp- und Vakzineviren bestehen.

Trotz der Ausreifung der MV-infizierten MoDC, gemessen an der Aufregulation von DC-typischen Aktivierungsmarkern, muß die Funktionalität der infizierten MoDC überprüft werden. Zunächst wurde bestimmt, ob und unter welchen Bedingungen die MV-infizierten MoDC IL-12 produzieren können. IL-12 wird als bioaktives IL-12p70, bestehend aus IL-12p40 und IL-12p35, oder als über die IL-12-Rezeptoren antagonistisch wirkendes IL-12p40 (IL-12p40-Homodimer) sezerniert. IL-12p70 gilt als ein Schlüsselzytokin, das die Polarisierung von naiven T-Zellen in T_{H1} -T-Zellen steuert (zusammengefaßt in Gately *et al.*, 1998). DC produzieren IL-12 als Reaktion auf mikrobielle Produkte oder Infektion mit Bakterien oder Viren oder nach CD40-Ligation (Henderson *et al.*, 1997; Cella *et al.*, 1999b; Cella *et al.*, 1996). Die Aktivierung durch mikrobielle Produkte (LPS, SAC, dsRNS) könnte *in vivo* in der Peripherie erfolgen, die Aktivierung über CD40 im Lymphgewebe während des Kontakts mit aktivierten T-Zellen. Bereits durch Schnorr *et al.*, 1997b wurde eine leichte Induktion der IL-12p70-Produktion durch PB-DC nach Infektion mit ED-B oder WTF und einhergehender Stimulation mit LPS oder SAC beschrieben. Allerdings liefern diese Daten keinen genauen Anhaltspunkt über den Einfluß einer MV-Infektion auf die IL-12-Produktion

von DC, da es sich bei PB-DC um mindestens drei verschiedene DC-Populationen handelt (Grabbe *et al.*, 2000).

Die Regulation der IL-12-Produktion in MoDC ist sehr komplex. Ausgehend von CD14⁺-Monozyten können durch Wahl geeigneter Differenzierungsbedingungen DC-Populationen *in vitro* generiert werden, die IL-12p70 produzieren und somit eine T_H1-Polarisierung steuern können (Chang *et al.*, 2000; Rissoan *et al.*, 1999) oder die diese Fähigkeit verlieren und eine T_H2-T-Zellpolarisierung unterstützen (Chang *et al.*, 2000; Kalinski *et al.*, 1998; Kalinski *et al.*, 2001). Zudem benötigen *in vitro*-generierte MoDC eine Voraktivierung, die eine optimale Induktion von IL-12p70 und einhergehend einer T_H1-T-Zellpolarisierung ermöglicht (Hilkens *et al.*, 1997). Dieser Stimulus muß während der ersten Phase der DC-Aktivierung vorhanden sein, ansonsten verlieren die ausgereiften MoDC die Fähigkeit auf IL-12-induzierende Stimuli reagieren zu können (Hilkens *et al.*, 1997; Kalinski *et al.*, 1999; Ebner *et al.*, 2001). Somit scheinen die *in vitro* definierten Bedingungen während der MoDC-Generierung und anschließenden Aktivierung eine *in vivo*-Infektionssituation nachzuahmen. Der Charakter der lokalen Entzündungsreaktion (pro-inflammatorische Zytokine, bakterielle Produkte, inflammatorische Mediatoren wie PGE₂ etc.) induziert die DC-Ausreifung und bestimmt die finale T-Zellpolarisierungskapazität der reifen DC (zusammengefaßt in Lanzavecchia und Sallusto, 2001).

Der Nachweis der IL-12-Produktion in MV-infizierten MoDC erfolgte mittels IL-12p40-spezifischer intrazellulärer FACS-Färbungen und IL-12p40- bzw. IL-12p70-spezifischer ELISA. In den intrazellulären Färbungen zeigen die EDeGFP-infizierten MoDC unter allen Stimulationsbedingungen einen Rückgang an IL-12p40⁺ Zellen. Der Rückgang an IL-12p40⁺-Zellen nach Inkubation mit UV-inaktiviertem EDeGFP (**Tabelle 6-1**, **Bild 6-13**) könnte aufgrund einer Interaktion der viralen Hüllproteine mit CD46 zustande kommen. Ein modulatorischer Effekt von CD46 auf die IL-12-Produktion wurde bereits bei Monozyten beschrieben, der sich nur inhibitorisch (Karp *et al.*, 1996) oder abhängig vom Ligand aktivierend oder inhibitorisch auswirkt (Kurita-Taniguchi *et al.*, 2000).

Mittels ELISA lassen sich differenziertere Aussagen über den Einfluß einer MV-Infektion auf die IL-12-Produktion machen (**Tabelle 6-2**). So hat weder eine WTF- noch eine ED-B-Infektion einen deutlichen Einfluß auf die Produktion von IL-12p40 oder IL-12p70 nach CD40-Stimulation. Dies scheint allerdings in Gegensatz zu Daten von Fugier-Vivier *et al.*, 1997 zu stehen, die eine klare Abnahme an IL-12p70 im Überstand MV-infizierter MoDC nach CD40L-Stimulation beobachten. Allerdings sind diese Daten nicht direkt miteinander zu vergleichen. Die von Fugier-Vivier *et al.*, 1997 registrierte Abnahme an IL-12p70 findet nicht 24h p.i. statt, sondern wird erst drei Tage p.i. deutlich. Zu diesem Zeitpunkt registrieren Fugier-Vivier und Kollegen allerdings auch eine starke Abnahme an vitalen DC, wie sie auch in **Bild 6-3** beschrieben ist. Somit ist es eher wahrscheinlich, daß die in dieser Arbeit beschriebenen Effekte einer MV-Infektion auf die IL-12p70-Sekretion nach CD40-Ligation auf eine Abnahme IL-12-produzierender Zellen zurückzuführen ist. Zudem finden die gleichen Autoren in einer späteren Arbeit, daß 24h p.i. mit MV die mRNA-Transkription für IL-12p35 nach CD40-Ligation im Vergleich zu nicht-infizierten MoDC kaum verändert ist und nur die Transkriptionsrate für IL-12p40-mRNA abgenommen hat (Servet-Delprat *et al.*, 2000a). Bedenkt man, daß für die Sekretion an bioaktivem IL-12p70 vor allem die Expression von IL-12p35 benötigt wird, so lassen sich die in diesen Veröffentlichungen beschriebenen Daten sehr gut mit den Daten der vorliegenden Arbeit in Übereinstimmung bringen. Die CD40-Ligation hat keinen oder nur geringen Einfluß auf die IL-12p35-Transkription (Servet-Delprat *et al.*, 2000a) und damit auf die IL-12p70-Sekretion (diese Arbeit), hingegen kann die Transkription von IL-12p40 betroffen sein (Servet-Delprat *et al.*, 2000a), was sich auch in

einem Fall in reduzierter Sekretion an IL-12p40 nach ED-B-Infektion bemerkbar macht (**Tabelle 6-2**).

Ein anderes Bild ergibt sich nach Stimulation MV-infizierter MoDC mit bakteriellen Produkten. Abhängig vom eingesetzten MV-Stamm ist die IL-12-Produktion generell stark reduziert (ED-B) oder der Einfluß der Infektion auf die IL-12p70- und IL-12p40-Produktion ergibt sich aus dem verwendeten Stimulus (WTF). Nach einer WTF-Infektion führt die Stimulation mit SAC zu reduzierten IL-12p40-Mengen und zu einer vollständigen Hemmung der IL-12p70-Sekretion. Hingegen wird nach LPS-Stimulation geringfügig weniger IL-12p40, dafür aber deutlich mehr bioaktives IL-12p70 produziert. Interessanterweise kann IL-12p40 und auch bioaktives IL-12p70 durch Infektion mit WTF induziert werden, ohne daß eine weitere Stimulation der Zellen vorliegt. Eine Induktion an IL-12p35- und IL-12p40-mRNS konnten auch Servet-Delprat *et al.*, 2000a nachweisen, allerdings nach Infektion mit dem Vakzinestamm MV-Hallé.

Über die Mechanismen, die den unterschiedlichen Einflüssen einer WTF- oder einer ED-B-Infektion auf die IL-12-Produktion nach Stimulation mit LPS oder SAC zugrundeliegen, kann nur spekuliert werden. Bemerkenswerterweise aktivieren beide bakteriellen Produkte Immunzellen über TLRs, LPS über TLR4 und SAC über TLR2 (zusammengefaßt in Aderem und Ulevitch, 2000). Über TLR2- (Thoma-Uszynski *et al.*, 2000) als auch über TLR4-Signaltransduktionswege (Weinmann *et al.*, 2001) kann IL-12p40 induziert werden. Zudem werden sowohl TLR2 als auch TLR4 auf MoDC exprimiert (Muzio *et al.*, 2000; Visintin *et al.*, 2001).

Somit sind mehrere Szenarien denkbar. Erstens, MV interferiert nach Infektion mit den Signaltransduktionswegen der TLRs über Interaktion von viralen Proteinen mit Komponenten der Transduktionsmaschinerie. Interessanterweise besitzt TLR4 zwei unabhängige Haupttransduktionswege (Kaisho *et al.*, 2001), wobei ein Weg, der abhängig vom Adaptormolekül MyD88 ist, auch von TLR2 und weiteren TLRs verwendet wird (zusammengefaßt in Daun und Fenton, 2000). MyD88 könnte also ein Ziel für eine MV-vermittelte Hemmung der TLR-Signalweiterleitung sein. ED-B würde sowohl den MyD88-abhängigen als auch den MyD88-unabhängigen Signalweg hemmen, WTF hingegen nur den MyD88-abhängigen. So könnte LPS nach WTF-Infektion weiterhin über TLR4 signalisieren, die Aktivierung durch SAC über den ausschließlich MyD88-abhängigen TLR2 würde aber nicht mehr stattfinden (Kaisho *et al.*, 2001). Da sowohl CD46 als auch CD150 Transmembranmoleküle sind, die extrazelluläre Signale über verschiedene Moleküle in das Zellinnere transduzieren können (Astier *et al.*, 2000; Shlapatska *et al.*, 2001; Wong *et al.*, 1997), könnten ED-B und WTF auch über Bindung an ihre jeweiligen Rezeptoren Signale transduzieren. Diese Signale könnten sich unterschiedlich auf die Signaltransduktion der TLRs auswirken. Interessanterweise scheint die Rolle von CD46 in der Regulation der IL-12-Produktion bei Monozyten von deren Aktivierungszustand abhängig zu sein, wobei CD46 nach Bindung an MV die IL-12-Produktion hemmt (Karp *et al.*, 1996) oder stimuliert (Kurita-Taniguchi *et al.*, 2000). Drittens, sowohl ED-B als auch WTF könnten direkt mit TLRs interagieren. Eine derartige Interaktion eines Virusproteins mit einem TLR ist bereits beschrieben worden (Kurt-Jones *et al.*, 2000). Als Konsequenz könnten TLR-spezifische Signalwege aktiviert (WTF aktiviert TLR4 und wirkt synergistisch mit LPS, hemmt aber die Bindung von SAC an TLR2) oder gehemmt werden (ED-B würde als Antagonist sowohl von LPS auf TLR4 als auch auf TLR2 für SAC wirken).

Die von Karp und Kollegen formulierte Hypothese, daß eine allgemeine Deregulation der IL-12-Produktion nach Kontakt oder Infektion mit MV auftritt und zu einer Zytokinderegulation führt, die T_H2 -Immunreaktionen bevorzugt (Karp *et al.*, 1996), kann durch die vorliegenden Ergebnisse nicht bestätigt werden. Eine alternative Erklärung für die *in vivo* nach einer MV-Infektion zu beobachtende Störung des Immunsystems T_H1 -Antwort auszulösen (u.a.

ersichtlich am Fehlen einer DTH-Reaktion im Tuberkulintest) liefern neueste Untersuchungen über das Expressionsmuster des MV-Wildtyp-Rezeptors CD150 (Tatsuo *et al.*, 2001, Hsu *et al.*, 2001, Erlenhöfer *et al.*, 2001). Hamalainen und Kollegen konnten zeigen, daß SLAM hauptsächlich auf Gedächtnis-T-Zellen oder aktivierten T-Zellen mit einem T_H1-Zytokinmuster exprimiert wird (Hamalainen *et al.*, 2000). Zudem führt die Bindung von SLAM auf aktivierten T-Zellen zu einer verstärkten Sekretion von IFN- γ , die sogar in T_H2-T-Zellklonen zu beobachten war (Aversa *et al.*, 1997), sowie zu einer allgemeinen Aktivierung der CD4⁺/CD150⁺-T-Zellen (Cocks *et al.*, 1995). Möglicherweise binden die Wildtypviren in einer akuten Maserninfektion über SLAM an Gedächtniszellen oder aktivierte T-Zellen und infizieren diese. Dies könnte zu Beginn der Infektion zu einer allgemeinen und unspezifischen Aktivierung des zellulären Immunsystems führen, wie dies auch bei akuten Masern zu beobachten ist (zusammengefaßt in Griffin, 1995), und während späterer Phasen einer MV-Infektion zu einer Eliminierung dieser Zellpopulation einhergehend mit einem Ausbleiben an T_H1-vermittelten Immunreaktionen führen. Ergänzend muß aber auch erwähnt werden, daß die während einer akuten Masern und der anschließenden Immunsuppression ausbleibenden Gedächtniszellantworten im Rekonvaleszenten wieder zu beobachten sind. Eine völlige Eliminierung des immunologischen T-Zellgedächtnisses kann daher nicht stattfinden. Außerdem konnte in einer Vakzinierungsstudie eine derartige postulierte T_H2-Polarisierung nicht beobachtet werden, allerdings fanden sich Hinweise auf eine generelle Aktivierung des T-Zellkompartiments (Schnorr *et al.*, 2001).

Eines der wichtigsten funktionellen Merkmale reifer DC ist ihre Fähigkeit, sehr effizient die Proliferation von allogenen T-Zellen zu stimulieren. Diese Fähigkeit kann in einer allogenen MLR (siehe **5.6.1**) getestet werden. Zuerst wurde überprüft, ob allogene T-Zellen mit DC interagieren können. Wie in **Bild 6–14** zu erkennen ist, bilden T-Zellen mit MV-infizierten MoDC sehr dichte Zellaggregate. Im Gegensatz zu LPS-ausgereiften oder Mock-infizierten MoDC, die einen Ring aus möglicherweise aktivierten T-Zellen aufweisen, fehlt diese Zellhäufung um die Aggregate aus infizierten MoDC und T-Zellen. Offensichtlich können allogene T-Zellen mit ED-B-infizierten MoDC interagieren, allerdings scheint diese Zell-Zell-Interaktion anderer Natur zu sein, als zwischen nicht-infizierten MoDC und T-Zellen. Möglicherweise weisen infizierte MoDC ein verändertes Expressionsmuster der Adhäsionsmoleküle auf, die die Bindung der T-Zellen an MoDC verstärken. Einen Einfluß auf die Expression von CD11a/CD18 oder CD54 durch Infektion mit verschiedenen MV-Vakzinestämmen wurde bereits für Endothelzellen bzw. für Monozyten beschrieben (Harcourt *et al.*, 1999; Hummel *et al.*, 1998). Zusätzlich könnte das auf den infizierten MoDC exprimierte H-Protein eine Interaktion zwischen den MoDC und den T-Zellen über CD46:H-Protein-Bindung vermitteln (Soilu-Hanninen *et al.*, 1996). Weitere Studien könnten unter Einsatz blockierender Antikörper gegen Adhäsionsmoleküle oder gegen das H-Protein die Gründe für die ausgeprägte Aggregatbildung zwischen infizierten MoDC und allogenen T-Zellen aufklären. Ergänzend könnte unter Einsatz von Kollagenmatrizes das Wanderungsverhalten MV-infizierten MoDC und die Interaktion mit T-Zellen untersucht werden (Gunzer *et al.*, 2000).

Das veränderte Bild in der Zell-Zell-Interaktion zwischen T-Zellen und infizierten bzw. nicht-infizierten MoDC spiegelt sich auch in einer MLR wider. Wie **Bild 6–15** anschaulich zeigt, können weder ED-B- noch WTF-infizierte MoDC eine MLR auslösen. Zusätzlich scheinen die durch WTF-infizierten MoDC stärker betroffen zu sein als die ED-B-infizierten MoDC. Das Ausbleiben einer MLR kann nicht aufgrund eines mangelnden Aktivierungszustands der infizierten MoDC erklärt werden. Wie bereits diskutiert, führt eine MV-Infektion zu einer MoDC-Ausreifung (siehe auch **Bild 6–3 B.**, **Bild 6–6**). MoDC, die nach Infektion mit ED-B einen ähnlichen Reifungsstatus aufweisen wie LPS-ausgereifte MoDC (siehe **Bild 6–16**

A.), können keine Blastenbildung in T-Zellen induzieren, wie in **Bild 6–17** dargestellt. Für das Ausbleiben der T-Zellproliferation muß einer Infektion der T-Zellen nur eine geringe Bedeutung zugestanden werden. Zum einen wurde das Fusions-inhibitorische Peptid (Richardson *et al.*, 1980; Weidmann, 2000a) standardmäßig in MoDC:T-Zellkulturen eingesetzt, um eine Infektion der T-Zellen oder eine Fusion mit DC zu verhindern. Zum anderen zeigt **Bild 6–16 B.**, daß die kokultivierten allogenen T-Zellen nur zu 13 % positiv für MV-N, also möglicherweise infiziert waren, allerdings in ihrer Gesamtheit keine Blastenbildung zeigten (**Bild 6–17**). Der hohe Anteil an MV-H-positiven T-Zellen erklärt sich wahrscheinlich durch einen Austausch von Membranmaterial von DC auf T-Zelle während einer Zell-Zell-Interaktion, wie sie auch schon für andere Moleküle beschrieben ist und durch Exosomen vermittelt wird (zusammengefaßt in Denzer *et al.*, 2000). Möglicherweise handelt es sich bei diesem Phänomen des Membranaustauschs während einer Zell-Zell-Interaktion um eine generelle Eigenschaft von Leukozyten (Mack *et al.*, 2001). Dieses Ergebnis wird durch die Arbeit von Fugier-Vivier *et al.*, 1997 bestätigt, die ebenfalls nur eine marginale Infektion von T-Zellen nach Kokultur mit MV-infizierten MoDC feststellen.

MV-infizierte MoDC produzieren keinen löslichen Faktor, der nicht-infizierte MoDC in ihrer allostimulatorischen Reaktivität hemmt. MoDC aus Zweikammerzellsystemen, die unter der Einwirkung des Überstands von ED-B-infizierten MoDC standen, können, wie in **Bild 6–18** zu sehen ist, eine MLR induzieren. Daß die nicht-infizierten MoDC eine schwächere MLR induzieren als die Kontroll-DC, die durch Überstand LPS-aktivierter MoDC aktiviert wurden, mag an der leicht verzögerten Ausreifung der „ED-B-Überstand-MoDC“ verglichen mit den „LPS-Überstand-MoDC“ liegen (vgl. **Bild 6–11**). Zudem könnte LPS den Filter passieren und die Zellen zusätzlich stimulieren (s.o.).

Als nächstes wurde die Rolle von IL-12 in MLRs mit MV-infizierten MoDC untersucht. Obwohl im vorliegenden *in vitro*-Modell durch die infizierten MoDC bioaktives IL-12 produziert werden kann (s.o. und **Tabelle 6-2**), so scheint die IL-12-Produktion *in vivo* zumindest bei MV-vakzinierten Kindern im Alter von sechs bis zwölf Monaten als Reaktion auf eine Restimulation mit MV-Antigenen ca. drei Monate später suboptimal zu sein (Gans *et al.*, 1999). Zudem verhindert das Rauscher Leukämie Virus (RLV) nach Infektion von Mäusen über die Hemmung der IL-12-Produktion in murinen DC eine MLR. Durch Gabe von IL-12 zum Zeitpunkt der Infektion konnte erneut trotz RLV-Infektion eine MLR induziert werden (Williams *et al.*, 1998). Ebenso verloren DC, die mit RLV inkubiert waren, *in vitro* die Fähigkeit IL-12, zu produzieren und eine allogene T-Zellproliferation zu induzieren. Durch IL-12-Gabe in die MLR konnte die IL-12-Produktion durch die DC wiederhergestellt werden, wie auch die T-Zellproliferation (Kelleher *et al.*, 1999). Allerdings konnte, wie in **Bild 6–19** gezeigt, die Zugabe von IL-12 in eine allogene MLR mit ED-B-infizierten MoDC die T-Zellproliferation nicht wiederherstellen. Gleiches gilt für MoDC, die mit unterschiedlichen Konzentrationen an IL-12 (0, 10, 100 ng/ml) während der Infektion vorinkubiert wurden und denen während der MLR IL-12 (0, 10, 100 ng/ml) zugesetzt wurde. Da eine MLR mit MV-infizierten MoDC durch Zugabe von IL-12 nicht wiederhergestellt werden konnte, spielt eine mögliche Hemmung oder suboptimale IL-12-Produktion in infizierten MoDC für das Ausbleiben einer allogenen MLR, im Gegensatz zum RLV-Infektionsmodell keine Rolle.

Die nähere Charakterisierung der Hemmung der allogenen MLR zeigt, wie in **Bild 6–20** dargestellt, daß bereits nach 24 h Kokultur ein Unterschied in der T-Zellproliferation zwischen T-Zellen stimuliert mit nicht-infizierten oder mit ED-B-infizierten MoDC auftritt (**Bild 6–20 B.**). Zudem wird für die Hemmung der MLR eine DC-Population benötigt, die zu einem gewissen Grad mit MV infiziert ist (**Bild 6–20 B.**). Interessanterweise konnte eine MLR eben-

falls durch Zugabe von UV-inaktiviertem ED-B gehemmt werden (**Bild 6–20 C.**). Diese Ergebnisse werden durch Grosjean *et al.*, 1997 mit DC aus CD34⁺-Vorläuferzellen und durch Steineur *et al.*, 1998 mit LC nach Infektion mit MV bestätigt. Die Zugabe infizierter DC zu einer MLR führt zu einer deutlichen Hemmung der T-Zellproliferation, die abhängig von der Zahl der infizierten DC ist. Zudem können UV-inaktivierte oder fixierte infizierte DC eine MLR hemmen. Daß die Autoren eine MLR nicht durch Zugabe von UV-inaktiviertem Virus hemmen konnten, mag daran liegen, daß sie im Vergleich zur vorliegenden Arbeit nur ein inaktiviertes MV-Partikel pro zwei T-Zellen statt ein Partikel auf eine T-Zelle eingesetzt haben. Sowohl in den Arbeiten von Grosjean *et al.*, 1997, von Steineur *et al.*, 1998 als auch in der vorliegenden Arbeit scheint eine ausreichende Infektion mit einhergehender Expression der MV-Glykoproteine (mindestens 25 % exprimieren MV-H) oder allgemein eine Inkubation mit ausreichend MV-Glykoprotein präsentierenden Strukturen (UV-inaktiviertes Virus) auszureichen, um eine allogene MLR zu hemmen.

Wie die folgenden Versuchen zeigen, beruht die Hemmung der allogenen MLR durch infizierte MoDC tatsächlich auf der Expression der MV-Glykoproteine. Werden MoDC mit rekombinanten Viren infiziert (**Bild 4–1**), die keine funktionellen MV-Glykoproteine mehr exprimieren, so ist eine MLR nicht mehr gehemmt (**Bild 6–21 A.** und **Bild 6–21 B.**). Zudem ist die Wirkung der MV-infizierten MoDC auf eine PHA-induzierte T-Zellproliferation dominant-inhibitorisch (**Bild 6–21 C.**). Dieses Ergebnis spiegelt auch die Befunde von Schnorr *et al.*, 1997b mit PB-DC wider, die ebenfalls nach Infektion, trotz nachgewiesener Aktivierung, eine PHA-stimulierte T-Zellproliferation blockieren konnten. Erweitert wird dieser Befund durch die in **Bild 6–22** dargestellten Ergebnisse. Persistent infizierte BJAB oder MV-infizierte MoDC können die durch das Superantigen SEA induzierte T-Zellproliferation reduzieren, wirken sich also auch direkt inhibitorisch auf Signale aus, die über den TCR in die T-Zelle vermittelt werden.

Somit ähnelt der *in vitro* gefundene Mechanismus der Inhibition einer MLR durch MV-infizierte MoDC dem bereits beschriebenen Mechanismus der Kontakt-vermittelten Immunsuppression. Wie bereits bei Schlender *et al.*, 1997 beschrieben, reicht der Kontakt mit UV-bestrahlten, die MV-Glykoproteine exprimierenden Zellen aus, um die Proliferation PHA-stimulierter PBMC, aber auch die Spontanproliferation lymphozytärer oder myeloider Zelllinien zu hemmen. Weidmann *et al.*, 2000b wies nach, daß für die Ausprägung der Kontakt-vermittelten Inhibition weder eine Fusion noch eine Hemifusion zwischen den beteiligten Zellen stattfinden muß, so daß folglich eine Infektion als Ursache für die Proliferationsinhibition der PHA-stimulierten PBMC ausgeschlossen werden kann. Im Kontaktsystem zeigen die proliferationsgehemmten T-Zellen einen Arrest in der G₀/G₁-Phase des Zellzyklus (Schnorr *et al.*, 1997a), der mit einer Deregulation der Zellzykluskontrollproteine assoziiert ist (Engelking *et al.*, 1999). Diese Befunde können auch auf die Situation der MV-infizierten MoDC in einer allogenen MLR ausgedehnt werden. Für eine effiziente Hemmung der MLR reicht die Expression der MV-Glykoproteine aus. Rekombinante Viren ohne diese Proteine können eine MLR nach Infektion der MoDC nicht hemmen.

Interessanterweise konnte in einem *in vivo*-System belegt werden, daß MV-Glykoproteine eine systemische Immunsuppression hervorrufen (Marie *et al.*, 2001). In dieser Arbeit wurden CD46^{tg}-Mäuse eingesetzt und die Hypersensitivitätsantworten gegen Antigene, die eine CD8-abhängige oder eine CD4-abhängige T-Zellreaktion induzieren, beobachtet. Durch Injektion von UV-inaktiviertem MV kann die Immunreaktion gegen diese Antigene vollständig inhibiert werden. Mittels adoptiver Transferexperimente wurde nachgewiesen, daß die Funktion der dendritischen Zellen durch die Behandlung mit UV-inaktiviertem Virus komplett ge-

hemmt ist. Der zugrundeliegende Mechanismus für diese Art der MV-vermittelten Immunsuppression scheint sich jedoch grundlegend von der hier beschriebenen Kontakt-vermittelten Immunsuppression über die MV-Glykoproteine zu unterscheiden. Die Inaktivierung der DC-Funktionen erfolgt über das transgene CD46 auf den DC. Dies führt u.a. zu einer Hemmung der IL-12-Produktion in diesen Zellen und allgemein zu einer funktionellen Inaktivität der DC, so daß die DC keine T-Zellproliferationen *in vivo* mehr induzieren können. Ob eine derartiger Effekt auch im humanen System zu beobachten ist, müßten entsprechende Versuche mit MoDC in einer allogenen MLR zeigen, die zuvor mit UV-inaktiviertem MV längere Zeit inkubiert worden sind.

Neben den Glykoproteinen spielt in diesem System auch das MV-N eine bedeutende immunsuppressive Rolle. Über Bindung des MV-N an den Fc γ R auf den DC werden diese ebenfalls immunsuppressiv und verlieren ihre T-Zell-stimulatorischen Funktionen und zeigen eine verringerte IL-12-Produktion. Dieser Mechanismus soll vor allem bei Wildtypviren zum Tragen kommen, die nicht oder nur niederaffin mit CD46 interagieren. Auch hier müßten *in vitro*-Versuche mit humanen MoDC zeigen, ob dieses *in vivo*-Modell unter Einsatz einer CD46^{tg}-Maus auf die Situation im Menschen übertragbar ist.

Für die *in vitro* zu beobachtende Hemmung der MLR durch MV-infizierte MoDC wird als Mechanismus durch Roubourdin-Combe und Mitarbeiter zudem noch durch MV-infizierte MoDC vermittelte Apoptose der kontaktierten T-Zellen angeführt (Fugier-Vivier *et al.*, 1997). Die Apoptose der T-Zellen soll durch TRAIL vermittelt werden (Vidalain *et al.*, 2000). Tatsächlich exprimieren myeloide DC nach Stimulation mit IFN- α TRAIL und können über sezerniertes TRAIL Apoptose-sensitive Zelllinien abtöten (Fanger *et al.*, 1999). Ob allerdings in nicht-infizierten, nicht-transformierten T-Zellen ebenfalls durch TRAIL Apoptose ausgelöst wird, wurde in dieser Studie nicht gezeigt. Somit bleibt der Beitrag, den eine TRAIL-Produktion durch MV-infizierte DC zu einer generellen Immunsuppression leistet, bislang fraglich.

Neben der TRAIL-vermittelten Apoptose der kontaktierten T-Zellen sollen die MV-infizierten MoDC über Ligation von CD95 durch Kontakt mit CD95L-exprimierenden aktivierten T-Zellen eliminiert werden (Fugier-Vivier *et al.*, 1997; Servet-Delprat *et al.*, 2000b). Dies würde allerdings voraussetzen, daß die für DC beschriebene Resistenz gegenüber Fas-vermittelter Apoptose, die auf der konstitutiven Expression von FLIP beruht (Rescigno *et al.*, 2000), durch eine MV-Infektion aufgehoben wird. Auch hier fehlen weitere Daten, wie eine MV-Infektion die Sensitivität von DC gegenüber Fas-vermittelter Apoptose verändert, um diese Befunde in ein Gesamtbild der MV-induzierten Immunsuppression einzuordnen.

Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, daß aus Monozyten generierte MoDC sowohl durch Vakzine- als auch durch Wildtypviren infizierbar sind. Die Infektion geht mit einer phänotypischen, allerdings nicht mit einer funktionellen Reifung der MoDC einher. Diese Ausreifung wird zumindest zu einem gewissen Teil durch pro-inflammatorische Zytokine vermittelt (IFN- α/β , TNF- α). Trotz der verstärkten Expression von typischen DC-Aktivierungsmarkern oder kostimulatorischen Molekülen sind die infizierten MoDC in einem funktionellen Test, einer MLR, nicht aktiv. Die Hemmung der MLR beruht auf der Expression der Glykoproteine von MV, des H- und des F-Proteins. Eine generelle Hemmung der IL-12-Produktion durch MV-infizierte MoDC konnte nicht festgestellt werden. Vielmehr erfolgt eine Modulation der IL-12p40- und IL-12p70-Sekretion in Abhängigkeit vom eingesetzten Virus und des verwendeten Stimulus.

Neben den bereits in der Diskussion angesprochenen möglichen Anknüpfungspunkte für weiterführende Arbeiten, scheinen folgende Gebiete von besonderem Interesse zu sein und sollen hier zusammenfassend aufgeführt sein:

1. Die durch die MV-Glykoproteine vermittelte Hemmung der T-Zellproliferation in einer allogenen MLR sollte genauer charakterisiert werden. Sind die T-Zellen ebenfalls leicht aktiviert, wie bereits in **Bild 6–16** angedeutet, und zeigen einen Zellzyklusarrest in der G₀/G₁-Phase, wie es für T-Zellen im Modell der Kontakt-vermittelten Proliferationshemmung charakteristisch ist (Engelking *et al.*, 1999)? Zudem sollte untersucht werden, ob die AKT-Kinase in den kontaktierten T-Zellen ebenfalls eine Rolle in der beobachteten Proliferationshemmung spielt, wie es der Fall in der Kontakt-vermittelten Proliferationsinhibition durch UV-inaktiviertes ED-B ist (Avota *et al.*, 2001).
2. Wie interferieren WTF bzw. ED-B mit der TLR-abhängigen Induktion von IL-12? Falls es sich dabei um ein Virusstamm-spezifisches Phänomen handelt, sollten die beteiligten Proteine und minimalen Effektorstrukturen bestimmt werden, die hier die Stimulus- und MV-Stamm-spezifische Interferenz mit dem TLR-Signalweg vermitteln. Der von Avota *et al.*, 2001 beschriebene Einfluß der MV-Glykoproteine auf die Aktivität der AKT-Kinase könnte auch Einfluß auf die Signalgebung über TLRs haben, zumindest beeinträchtigt die Hemmung der AKT-Kinase nach TLR4-Aktivierung das Überleben von MoDC und führt zu verstärkter Apoptose (Ardehna *et al.*, 2000).
3. Welchen Einfluß haben die durch die Infektion der MoDC freigesetzten Zytokine auf die Polarisierung einer T-Zellantwort? Sowohl IFN als auch IL-12 können zumindest *in vitro* eine T_H1-T-Zellpolarisierung ermöglichen (Sareneva *et al.*, 2000, Nguyen *et al.*, 2001; Farrar *et al.*, 2001). Zudem zeigen mit bestimmten Viren infizierte plasmacytoide DC *in vitro* deutlich eine T_H1-Induktion von naiven T-Zellen (Cella *et al.*, 2000, Kadowaki *et al.*, 2000). Eine vergleichende Analyse der T-Zellpolarisierungseigenschaften von MoDC und IPC-DC wäre denkbar, zumal nun Techniken vorhanden sind, größere Zellzahlen an plasmacytoiden DC *in vitro* zu generieren (Blom *et al.*, 2000).

8 Literaturverzeichnis

Aderem, A und Ulevitch, R, 2000, Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*, 406, 782-787

Akbar, AN, Lord, JM, Salmon, M, 2000, IFN- α and IFN- β : a link between immune memory and chronic inflammation. *Immunol Today*, 21, 7, 337-342

Ardeshna, KM, Pizzey, AR, Devereux, S, Khwaja, A, 2000, The PI3 kinase, p38 SAP kinase, and NF-kappaB signal transduction pathways are involved in the survival and maturation of lipopolysaccharide-stimulated human monocyte-derived dendritic cells. *Blood*, 96, 1039-1046

Arneborn, P, Biberfeld, G, 1983, T lymphocyte subpopulations in relation to immunosuppression in measles and varicella. *Infect Immun*, 39, 29-37

Astier, A, Trescol-Biémont, M-C, Azocar, O, Lamouille, B, Rabourdin-Combe, C, 2000, Cutting Edge: CD46, a new costimulatory molecule for T cells, that induces p120^{CBL} and LAT phosphorylation. *J Immunol*, 164, 6091-6095

Auwaerter, PG, Kaneshima, H, McCune, JM, Wiegand, G, Griffin, DE, 1996, Measles virus infection of thymic epithelium in the SCID-hu mouse leads to thymocyte apoptosis. *J Virol*, 70, 3734-3740

Aversa, G, Chang, CC, Carbadillo, JM, Cocks, BG, deVries, JE, 1997, Engagement of the signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) on activated T cells results in IL-2-independent, cyclosporin A-sensitive T cell proliferation and interferon-gamma production. *J Immunol*, 158, 4036-4044

Avota, E, Avots, A, Niewiesk, S, Kane, LP, Bommhardt, U, ter Meulen, V, Schneider-Schaulies, S, 2001, Disruption of Akt kinase activation is important for immunosuppression induced by measles virus. *Nat Med*, 7, 725-731

Banchereau, J, Steinman, RM, 1998, Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392, 245-252

Bartholomé, EJ, Willems, F, Crusiaux, A, Thielemans, K, Schandene, L, Goldman, M, J, 1999, IFN- β interferes with the differentiation of dendritic cells from peripheral blood mononuclear cells: selective inhibition of CD40-dependent interleukin-12 secretion. *Interferon Cytokine Res*, 19, 471-478

Bartz, R, Firsching, R, Rima, B, ter Meulen, V, Schneider-Schaulies, J, 1998, Differential receptor usage by measles virus strains. *J Gen Virol*, 79, 1015-1025

Beckford, AP, Kaschula, ROC, Stephen, C, 1985, Factors associated with fatal cases of Measles: a retrospective autopsy study. *S Afr Med J*, 68, 858-863

Bellini, WJ, Englund, G, Rozenblatt, G, Arnheiter, H, Richardson, CD, 1985, Measles virus P gene codes for two proteins. *J Virol*, 53, 908-919

Black, FL, 1989, Measles active and passive immunity in a worldwide perspective. *Prog Med Virol*, 36, 1-33

Blom, B, Ho, S, Antonenko, S, Liu, YJ, 2000, Generation of interferon alpha-producing predendritic cell (Pre-DC)2 from human CD34(+) hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 2000 Dec 18;192(12):1785-96

Cathomen, T, Naim, HY, Cattaneo, R, 1998, Measles virus with altered envelope protein cytoplasmic tails gain cell fusion competence. *J Virol*, 72, 1224-1234

Cattaneo, R, Kaelin, K, Baczko, K, Billeter, MA, 1989, Measles virus editing provides an additional cysteine-rich protein. *Cell*, 56, 759-764

Cattaneo, R, Rebmann, G, Baczko, K, ter Meulen, V, Billeter, MA, 1987, Altered ratios of measles virus transcripts in diseased human brains. *Virology*, 160, 523-526

Caux, C, 1998, Pathways of development of human dendritic cells. *Eur J Dermatol*, 8, 375-384

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

Cella, M, Facchetti, F, Lanzavecchia, A, Colonna, M, 2000, Plasmacytoid dendritic cells activated by influenza virus and CD40 L drive a potent TH1 polarization. *Nat Immunol*, 1, 305-310

Cella, M, Jarrossay, D, Facchetti, F, Alebardi, O, Nakajima, H, Lanzavecchia, A, Colonna, M, 1999a, Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med*, 5, 919-923

Cella, M, Salio, M, Sakakibara, Y, Langen, H, Julkunen, I, Lanzavecchia, A, 1999b, Maturation, activation, and protection of dendritic cells induced by double-stranded RNA. *J Exp Med*, 189, 821-829

Cella, M, Scheidegger, D, Palmer-Lehmann, K, Lane, P, Lanzavecchia, A, Alber, G, 1996, Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J Exp Med*, 184, 747-752

Chang, C-CJ, Wright, A, Ounnonen, J, 2000, Monocyte-derived CD1a⁺ and CD1a⁻ dendritic cell subsets differ in their cytokine profiles, susceptibilities to transfection, and capacities to direct Th cell differentiation. *J Immunol*, 165, 3584-3591

Chougnet, C, Cohen, SS, Kawamura, T, Landay, AL, Kessler, HA, Thomas, E, Blauvelt, A, Shearer, GM, 1999, Normal immune function of monocyte-derived dendritic cells from HIV-infected individuals: implications for immunotherapy. *J Immunol*, 163, 1666-1673

Clements, CJ, Cutts, FT, 1995, The epidemiology of measles: thirty years of vaccination. In: Billeter, MA, ter Meulen, V (eds): *Measles virus*. Springer Verlag KG, Berlin, 13-33

Cocks, BG, Chang, CC, Carbadillo, JM, Yssel, H, de Vries, JE, Aversa, G, 1995, A novel receptor involved in T-cell activation. *Nature*, 376, 260-263

Crowley, JC, Dowling, PC, Mennona, J, Silverman, JI, Schuback, D, Cook, SD, Blumberg, BM, 1988, Sequence variability and function of measles virus 3' and 5' ends and intercistronic regions. *Virology*, 164, 498-506

Crespi, M, Struthers, JK, Smith, AN, Lyons, SF, 1988, Interferon status after measles infection. *S Afr Med J*, 73, 711-712

Daun, JM, Fenton, MJ, 2000, Interleukin-1/Toll receptor family members: receptor structure and signal transduction pathways. *J Interferon Cytokine Res*, 20, 843-855

Denton, J, 1925, The pathology of fatal measles. *Am J Med Sci* 169, 531-543

Denzer, K, Kleijmeer, MJ, Heijnen, HF, Stoorvogel, W, Geuze, HJ, 2000, Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device. *J Cell Sci*, 113, 3365-3374

Dhib-Jalbut, SS, Cowan, EP, 1993, Direct evidence that interferon-beta mediates enhanced HLA-class I expression in measles virus-infected cells. *J Immunol*, 151, 6248-6258

Doerig, RE, Marcil, A, Chopra, A, Richardson, CD, 1993, The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain). *Cell*, 75, 295-305

Ebner, S, Ratzinger, G, Krösbacher, B, Schmuth, M, Weiss, A, Reider, D, Kroccek, RA, Herold, M, Heufler, C, Fritsch, P, Romani, N, 2001, Production of IL-12 by human monocyte-derived dendritic cells is optimal when the stimulus is given at the onset of maturation, and is further enhanced by IL-4. *J Immunol*, 166, 633-641

Enders, JF, 1962, Measles virus: historical review, isolation and behaviour in various systems. *Am J Dis Child*, 103, 282-287

Engelking, O, Federov, LM, Lilischkis, R, ter Meulen, V, Schneider-Schaulies, S, 1999, Measles virus-induced immunosuppression *in vitro* is associated with deregulation of G₁ cell cycle control proteins. *J Gen Virol*, 80, 1599-1608

Erlenhöfer, C, Wurzer, W, Löffler, S, Schneider-Schaulies, S, ter Meulen, V, Schneider-Schaulies, J, 2001, CD150 (SLAM) is a receptor for measles virus, but not involved in viral contact-mediated proliferation inhibition. *J Virol*, 75, 4499-4505

Escoffier, C, Manie, S, Vincent, S, Muller, CP, Billeter, M, Gerlier, D, 1999, The nonstructural C protein is required for efficient measles virus replication in human peripheral blood cells. *J Virol*, 73, 1695-1698

Esolen, LM, Ward, BJ, Moench, TR, Griffin, DE, 1993, Infection of monocytes during Measles. *J Infect Dis*, 168, 47-52

Ewing, J, 1909, *J Infect Dis*, The epithelial cell changes in measles, 6, 1-16

Fanger, NA, Maliszewski, CR, Schooley, K, Griffith, TS, 1999, Human dendritic cells mediate cellular apoptosis via tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *J Exp Med*, 190, 1155-1164

Farrar, JD, Smith, JD, Murphy, TL, Leung, S, Stark, GR, Murphy, KM, 2000, Selective loss of type I interferon-induced STAT4 activation caused by a minisatellite insertion in mouse *Stat2*. *Nature Immunol*, 1, 65-69

Feldman, SB, Ferraro, M, Zheng, HM, Patel, N, Gould-Fogerite, S, Fitzgerald-Bocarsly, P, 1994, Viral induction of low frequency interferon-alpha producing cells. *Virology*, 204, 1-7

Fugier-Vivier, I, Servet-Delprat, C, Rivaller, P, Rissoan, M-C, Liu, Y-J, Rabourdin-Combe, C, 1997, Measles virus suppresses cell-mediated immunity by interfering with the survival and functions of dendritic and T cells. *J Exp Med*, 186, 813-823

- Fujinami, RS, Sun, X, Howell, JM, Jenkin, JC, Burns, JB, 1998, Modulation of immune system function by measles virus infection: role of a soluble factor and direct infection. *J Virol*, 72, 9421-9427
- Fulginiti, VA, Arthur, JH, 1969, Altered reactivity to measles virus. *J Pediatr*, 75, 609-616
- Gans, HA, Maldonado, Y, Yasukawa, LL, Beeler, J, Audet, S, Rinki, MM, DeHovitz, R, Arvin, AM, 1999, IL-12, IFN- γ , and T cell proliferation to measles in immunized infants. *J Immunol*, 162, 5569-5575
- Gately, MK, Renzetti, LM, Magram, J, Stern, AS, Adorini, L, Gubler, U, Presky, DH, 1998, The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses. *Annu Rev Immunol*, 16, 495-521
- Good, RA, Zak, SJ, 1956, Disturbances in gammaglobulin synthesis as „experiments of nature.“ *Pediatrics*, 46, 30-32
- Grabbe, S, Kämpgen, E, Schuler, G, 2000, Dendritic cells: multi-lineal and multi-functional. *Immunol Today*, 21, 431-433
- Graves, M, Griffin, DE, Johnson, RT, Hirsch, RL, de Soriano, IL, Roedenbeck, S, Vaisberg, A, 1984, Development of antibody to measles virus polypeptides during complicated and uncomplicated measles virus infections. *J Virol*, 49, 409-12
- Greenstein, JI, McFarland, HF, 1983, Response of human lymphocytes to measles virus after natural infection. *Infect Immun*, 40, 198-204
- Griffin, DE, 1995, Immune responses during measles virus infection. In: ter Meulen, V, Billeter, MA (eds), *Measles virus*. Springer Verlag, Berlin, 117-134
- Griffin, DE, Ward, BJ, 1993, Differential CD4 T cell activation in measles. *J Infect Dis*, 168, 275-281
- Griffin, DE, Bellini, WJ, 1996, Measles Virus. In: Fields, BN, Knipe, PM, Howley, PM *et al.* (eds), *Fields Virology*, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1267-1311
- Griffin, DE, Ward, BJ, Jauregui, E, Johnson, RT, Vaisberg, A, 1989, Immune activation during measles. *N Engl J Med*, 320, 1667-1672
- Griffin, DE, Ward, BJ, Jauregui, E, Johnson, RT, Vaisberg, A, 1990a, Natural killer cell activity during measles. *Clin Exp Immunol*, 81, 218-224
- Griffin, DE, Ward, BJ, Jauregui, E, Johnson, RT, Vaisberg, A, 1990b, Immune activation during measles: interferon-gamma and neopterin in plasma and cerebrospinal fluid in complicated and uncomplicated disease. *J Infect Dis*, 161, 449-453
- Griffin, DE, Ward, BJ, Jauregui, E, Johnson, RT, Vaisberg, A, 1992, Immune activation during measles: beta-2-microglobulin in plasma and cerebrospinal fluid in complicated and uncomplicated disease. *J Infect Dis*, 166, 1170-1173
- Grosjean, I, Caux, C, Bella, C, Berger, I, Wild, F, Banchereau, J, Kaiserlian, D, 1997, Measles virus infects human dendritic cells and blocks their allostimulatory properties for CD4⁺ T cells. *J Exp Med*, 186, 801-812
- Grouard, G, Rissoan, M-C, Filgueira, L, Durand, I, Banchereau, J, Liu, Y-J, 1997, The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J Exp Med*, 185, 1101-1111

Gunzer, M, Schäfer, A, Borgmann, S, Grabbe, S, Zanker, KS, Brocker, EB, Kämpgen, E, Friedl, P, 2000, Antigen presentation in extracellular matrix: interactions of T cells with dendritic cells are dynamic, short lived, and sequential. *Immunity*, 13, 323-32

Haller, O, Frese, M, Kochs, G, 1998, Mx proteins: mediators of innate resistance to RNA viruses. *Rev Sci Tech*, 17, 220-230

Hamalainen, H, Meissner, S, Lahesmaa, R, 2000, Signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) is differentially expressed in human Th1 and Th2 cells. *J Immunol Methods*, 242, 9-19

Harcourt, BH, Rota, PA, Hummel, KB, Bellini, WJ, Offermann, MK, 1999, Induction of intercellular adhesion molecule 1 gene expression by measles virus in human umbilical vein endothelial cells. *J Med Virol*, 57, 9-16

Heinkelein, M, Müller, M, Kutsch, O, Sopper, S, Jassoy, C, 1997, Rapid and selective depletion of CD4+ T lymphocytes and preferential loss of memory cells on interaction of mononuclear cells with HIV-1 glycoprotein-expressing cells. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*, 16, 74-82

Helin, E, Salmi, AA, Vanharanta, R, Vainionpää, R, 1999, Measles virus replication in cells of myelomonocytic lineage is dependent on cellular differentiation stage. *Virology*, 253, 35-42

Henderson, RA, Watkins, SC, Flynn, JL, 1997, Activation of human dendritic cells following infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol*, 159, 635-643

Hilkens, CMU, Kalinski, P, de Boer, M, Kapsenberg, ML, 1997, Human dendritic cells require exogenous interleukin-12-inducing factors to direct the development of naive T-helper cells toward the Th1 phenotype. *Blood*, 90, 1920-1926

Hirsch, RL, Griffin, DE, Johnson, RT, Cooper, SJ, Lindo de Soriano, I, Roedenbeck, S, Vaisberg, A, 1984, Cellular immune responses during complicated and uncomplicated measles virus infections of man. *Clin Immunol Immunopathol*, 31, 1-12

Ho, L-J, Wang, J-J, Shaio, M-F, Kao, C-L, Chang, DM, Han, S-W, Lai, J-H, 2001, Infection of human dendritic cells by dengue virus causes cell maturation and cytokine production. *J Immunol*, 166, 1499-1506

Holt, PG, Schon-Hegrad, MA, Oliver, J, 1988, MHC class II bearing dendritic cells in pulmonary tissues of the rat. Regulation of antigen presentation activity by endogenous macrophage populations. *J Exp Med*, 167, 262-265

Holt, PG, Schon-Hegrad, MA, Phillips, MJ, McMennamin, PG, 1989, Ia-positive dendritic cells form a tightly meshed network within the human airway epithelium. *Clin Exp Allergy*, 19, 567-601

Horikami, SM, Moyer, SA, 1995, Structure, Transcription, and replication of measles virus. In: Billeter, MA, ter Meulen, V (eds): *Measles virus*. Springer Verlag KG, Berlin, 35-50

Hsu, EC, Iorio, C, Sarangi, F, Khine, AA, Richardson, CD, 2001, CDw150 (SLAM) is a receptor for a lymphotropic strain of measles virus and may account for the immunosuppressive properties of the virus. *Virology*, 279, 9-21

Hu, A, Cattaneo, R, Spielhofer, P, Orvell, C, Norrby, E, Messerli, M, Perriard, J, Billeter, MA, 1995, Role of N-linked oligosaccharide chains in the processing and antigenicity of measles virus haemagglutinin protein. *J Gen Virol*, 75, 1043-1052

Hummel, KB, Bellini, WJ, Offermann, MK, 1998, Strain-specific differences in LFA-1 induction on measles virus-infected monocytes and adhesion and viral transmission to endothelial cells. *J Virol*, 72, 8403-8407

Hyypiä, T, Korkiamäki, P, Vainionpää, R, 1985, Replication of measles virus in human lymphocytes. *J Exp Med*, 161, 1261-1271

Ignatius, R, Marovich, M, Mehlhop, E, Villamide, L, Mahnke, K, Cox, WI, Isdell, F, Frankel, Mascola, JR, Steinman, RM, Pope, M, 2000, Canarypox virus-induced maturation of dendritic cells is mediated by apoptotic cell death and tumor necrosis factor alpha secretion. *J Virol*, 74, 11329-11338

Iordanov, MS, Paranjape, JM, Zhou, A, Wong, J, Williams, BRG, Meurs, EF, Silverman, RH, Magun, BE, 2000, Activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-Jun NH2-terminal kinase by double-stranded RNA and encephalomyocarditis virus: involvement of RNase L, protein kinase R, and alternative pathways. *Mol Cell Biol*, 20, 617-627

Iordanov, MS, Wong, J, Bell, JC, Magun, BE, 2001, Activation of NF- κ B by double-stranded RNA (dsRNA) in the absence of protein kinase R and RNase L demonstrates the existence of two separate dsRNA-triggered antiviral programs. *Mol Cell Biol*, 21, 61-72

Joseph, BS, Lampert, PW, Oldstone, MBA, 1975, Replication and persistence of measles virus in defined subpopulations of human leukocytes. *J Virol*, 148, 1638-1649

Joshi, SB, Dutch, RE, Lamb, RA, 1998, A core trimer of the paramyxovirus fusion protein: parallels to influenza virus hemagglutinin and HIV gp41. *Virology*, 248, 20-34

Kadowaki, N, Antonenko, S, Lau, JY-N, Liu, Y-J, 2000, Natural α/β -producing cells link innate and adaptive immunity. *J Exp Med*, 192, 219-225

Kaisho, T, Takeuchi, O, Kawai, T, Hoshino, K, Akira, S, 2001, Endotoxin-induced maturation of MyD88-deficient dendritic cells. *J Immunol*, 166, 5688-5694

Kalinski, P, Schuitemaker, J, Hilkens, CMU, Kapsenberg, ML, 1998, Prostaglandin E₂ induces the final maturation of IL-12-deficient CD1a⁺CD83⁺ dendritic cells: the levels of IL-12 are determined during the final dendritic cell maturation and are resistant to further modulation. *J Immunol*, 161, 2804-2809

Kalinski, P, Schuitemaker, JHN, Hilkens, CMU, Wierenga, EA, Kapsenberg, ML, 1999, Final maturation of dendritic cells is associated with impaired responsiveness to IFN- γ and to bacterial IL-12 inducers: decreased ability of mature dendritic cells to produce IL-12 during the interaction with Th cells. *J Immunol*, 162, 3231-3236

Kalinski, P, Vieira, P, Schuitemaker, J, de Jong, E, Kapsenberg, ML, 2001, Prostaglandin E₂ is a selective inducer of interleukin-12 p40 (IL-12p40) production and an inhibitor of bioactive IL-12p70 heterodimer. *Blood*, 97, 3466-3469

Karp, CL, Wysocka, M, Wahl, LM, Ahearn, JM, Cuomo, PJ, Sherry, B, Trinchieri, G, Griffin, DE, 1996, Mechanism of suppression of cell-mediated immunity by measles virus. *Science*, 273, 228-231

Kelleher, P, Maroof, A, Knight, SC, 1999, Retrovirally induced switch from production of IL-12 to IL-4 in dendritic cells. *Eur J Immunol*, 29, 2309-2318

Knight, SC, Patterson, S, 1997, Bone marrow-derived dendritic cells, infection with human immunodeficiency virus, and immunopathology. *Annu Rev Immunol*, 15, 593-615

Koplik, H, 1896, The diagnosis of the invasion of measles from a study of exanthema as it appears on the buccal mucous membrane. *Arch Pediatr* 12, 918-920

Kurita-Taniguchi, M, Fukui, A, Hazeki, K, Hirano, A, Tsuji, S, Matsumoto, M, Watanabe, M, Ueda, S, Seya, T, 2000, Functional modulation of human macrophages through CD46 (measles virus receptor): production of IL-12 p40 and nitric oxide in association with recruitment of protein-tyrosine phosphatase SHP-1 to CD46. *J Immunol*, 165, 5143-5152

Kurt-Jones, EA, Popva, L, Kwinn, L, Haynes, LM, Jones, LP, Tripp, RA, Walsh, EE, Freeman, MW, Golenbock, DT, Anderson, LJ, Finberg, RW, 2000, Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nature Immunol*, 1, 398-401

Lamb, RA, Kolakofsky, D, 1996, Paramyxoviridae: The viruses and their replication. In: Fields, BN, Knipe, PM, Howley, PM et al. (eds), *Fields Virology*, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1177-1204

Lanzavecchia, A, Sallusto, F, 2001, The instructive role of dendritic cells on T cell responses: lineages, plasticity and kinetics. *Curr Opin Immunol*, 13, 291-298

Leopardi, R, Ilonen, J, Mattila, L, Salmi, AA, 1993, Effect of measles virus infection on MHC class II expression and antigen presentation in human monocytes. *Cell Immunol*, 147, 388-396

Leopardi, R, Vainionpää, R, Hurme, M, Siljander, P, Salmi, AA, 1992, Measles infection enhances IL-1 beta but reduces tumor necrosis factor-alpha expression in human monocytes. *J Immunol*, 149, 2397-2401

Luft, T, Pang, KC, Thomas, E, Hertzog, P, Hart, DNJ, Trapani, J, Cebon, J, 1998, Type I IFNs enhance the terminal differentiation of dendritic cells. *J Immunol*, 161, 1947-1953

Mack, M, Kleinschmidt, A, Bruhl, H, Klier, C, Nelson, PJ, Cihak, J, Plachy, J, Stangassinger, M, Erfle, V, Schlöndorff, D, 2001, Transfer of the chemokine receptor CCR5 between cells by membrane-derived microparticles: a mechanism for cellular human immunodeficiency virus I infection. *Nat Med*, 6, 769-775

Marie, JC, Kehrem, J, Trecol-Biémont, M-C, Evlashev, A, Valentin, H, Walzer, T, Tedone, R, Loveland, B, Nicolas, J-F, Roubardin-Combe, C, Horvat, B, 2001, Mechanism of measles virus-induced suppression of inflammatory immune responses. *Immunity*, 14, 69-79

Mathiesen, T, Hammarstrom, L, Fridell, E, Linde A, Wirsen, G, Smith, CI, Norrby, E, Wahren, B, 1990, Aberrant IgG subclass distribution to measles in healthy seropositive individuals, in patients with SSPE, and in immunoglobulin-deficient patients. *Clin Exp Immunol*, 80, 202-205

McChesney, MB, Altman, A, Oldstone, MBA, 1988, Suppression of T lymphocyte function by measles virus is due to cell cycle arrest in G₁. *J Immunol*, 140, 1269-1273

McChesney, MB, Miller, CJ, Rota, PA, Zhu, YD, Antipa, L, Lerche, NW, Ahmed, R, Bellini, WJ, 1997, Experimental measles. I. Pathogenesis in the normal and the immunized host. *Virology*, 233, 74-84

McNeill, WH, 1976, *Plaques and People*. Garden City, NJ, Anchor Press/Doubleday, 329

McRae, B, Nagai, T, Semnani, RT, van Seventer; JM, van Seventer, GA, 2000, Interferon- α and - β inhibit the *in vitro* differentiation of immunocompetent human dendritic cells from CD14⁺ precursors. *Blood*, 96, 1, 210-217

McWilliams, AS, Nelson, D, Thomas, JA, Holt, PG, 1994, Rapid dendritic cell recruitment as a hallmark of the acute inflammatory response at mucosal surfaces. *J Exp Med*, 179, 1331-1336

Menezes, J, Leibold, W, Klein, G, Clements, G, 1975, Establishment and characterization of an Epstein-Barr virus (EBV)-negative lymphoblastoid B cell line (BJA-B) from an exceptional, EBV-genome-negative African Burkitt's lymphoma. *Biomedicine*, 22, 276-84

Milone, MC, Fitzgerald-Bocarsly, P, 1998, The mannose receptor mediates induction of IFN-alpha in peripheral blood dendritic cells by enveloped RNA and DNA viruses. *J Immunol*, 161, 2391-2399

Mitus, A, Enders, JF, Craig, JM, Holloway, A, 1959, Persistence of measles virus and depression of antibody formation in patients with giant cell pneumonia after measles. *N Engl J Med*, 261, 882-889

Müller-Hermelink, HK, Stein, H, Steinmann, G, Lennert, K, 1983, Malignant lymphoma of plasmacytoid T-cells: Morphologic and immunologic studies characterizing a special type of T-cell. *Am J Surg Pathol*, 7, 849-862

Muzio, M, Bosisio, D, Polentarutti, N, D'Amico, G, Stoppacciaro, A, Mancinelli, R, van't Veer, C, Penton-Rol, G, Ruco, LP, Allavena, P, Mantovani, A, 2000, Differential expression and regulation of Toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J Immunol*, 164, 5998-6004

Nakayama, T, Mori, T, Yamaguchi, S, Asamura, S, Yamashita, R, Takeuchi, Y, Urano, T, 1995, Detection of measles virus genome directly from clinical samples by reverse transcriptase-polymerase chain reaction and genetic variability. *Virus Res*, 35, 1-16

Naniche, D, Varior-Krishnan, G, Cervoni, F, Wild, TF, Rossi, B, Roubardin-Combe, C, Gerlier, D, 1993, Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus. *J Virol*, 67, 6025-6032

Naniche, D, Reed, SI, Oldstone, MBA, 1999, Cell cycle arrest during measles virus infection: a G₀-like block leads to suppression of retinoblastoma protein expression. *J Virol*, 73, 1894-1901

Naniche, D, Yeh, A, Eto, D, Manchester, M, Friedman, RM, Oldstone, MBA, 2000, Evasion of host defenses by measles virus: wild-type measles virus infection interferes with induction of alpha/beta interferon production. *J Virol*, 74, 7478-74884

Nguyen, KB, Cousens, LP, Doughty, LA, Pien, GC, Durbin, JE, Biron, CA, 2000, Interferon α/β -mediated inhibition and promotion of interferon γ . STAT1 resolves a paradox. *Nature Immunol*, 1, 70-76

Niewiesk, S, Ohnismus, H, Schnorr, J-J, Götzelmann, M, Schneider-Schaulies, S, Jassoy, C, ter Meulen, V, 1999, Measles virus-induced immunosuppression in cotton rats is associated with a cell cycle retardation in uninfected lymphocytes. *J Gen Virol*, 80, 2023-2029

Ohgimoto, S, Ohgimoto, K, Niewiesk, S, Klagge, IM, Pfeuffer, J, Johnston, ICD, Schneider-Schaulies, J, Weidmann, A, ter Meulen, V, Schneider-Schaulies, S, 2001, The hemagglutinin protein is an important determinant for measles virus tropism for dendritic cells *in vitro* and immunosuppression *in vivo*. *J Gen Virol*, *in press*

Okada, H, Kobune, F, Sato, TA, Kohama, T, Takeuchi, Y, Abe, T, Takayama, N, Tsuchiya, T, Tashiro, M, 2000, Extensive lymphopenia due to apoptosis of uninfected lymphocytes in acute measles patients. *Arch Virol*, 145, 905-920

Panum, P, 1938, Observations made during the epidemic of Measles on the Faroe Islands in the year 1846. *Med Classics*, 3, 829-886

Patterson, JB, Thomas, D, Lewicki, H, Billeter, MA, Oldstone, MBA, 2000, V and C proteins of measles virus function as virulence factors *in vivo*. *Virology*, 267, 80-89

Petralli, JK, Merigan, TC, Wilbur, JR, 1965, Circulating interferon after measles vaccination. *N Engl J Med*, 273, 198-201

Radecke, F, Billeter, MA, 1996, The nonstructural C protein is not essential for multiplication of edmonston B strain measles virus in cultured cells. *Virology*, 217, 418-421

Radecke, F, Billeter, MA, 1997, Reverse genetics meets the nonsegmented negative-strand RNA viruses. *Med Virol*, 7, 49-63

Randolph, GJ, Beaulieu, S, Lebecque, S, Steinman, RM, Muller, WA, 1998, Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking. *Science*, 282, 480-483

Rea, D, Schagen, FHE, Hoeben, RC, Mehtali, M, Havenga, MJE, Toes, REM, Melief, CJM, Offringa, R, 1999, Adenovirus activate human dendritic cells without polarization toward a T-helper type 1-inducing subset. *J Virol*, 73, 10245-10253

Reid, SD, Penna, G, Adorini, L, 2000, The control of T cell responses by dendritic cell subsets. *Curr Opin Immunol*, 12, 114-121

Reis e Sousa, C, Hieny, S, Scharton-Kersten, T, Charest, H, Jankovic, D, Germain, RN, Sher, A, 1997, *In vivo* microbial stimulation induces rapid CD40L-independent production of IL-12 by dendritic cells and their re-distribution to T cell areas. *J Exp Med*, 186, 1819-1829

Rescigno, M, Piguet, V, Valzasina, B, Lens, S, Zubler, R, French, L, Kindler, V, Tschopp, J, Ricciardi-Castagnoli, P, 2000, Fas engagement induces the maturation of dendritic cells (DCs), the release of interleukin (IL)-1 β , and the production of interferon γ in the absence of IL-12 during DC-T cell cognate interaction: a new role for Fas ligand in inflammatory responses. *J Exp Med*, 192, 1661-1668

Richardson, CD, Scheid, A, Choppin, PW, 1980, Specific inhibition of paramyxovirus and myxovirus replication by oligopeptides with amino acid sequences similar to those at the N-termini of the F₁ or HA₂ viral polypeptides. *Virology*, 105, 205-222

Riley, EC, Murphy, G, Riley, RL, 1978, Airborne spread of Measles in a suburban elementary school. *Am J Epidemiol*, 107, 421-432

Rissoan, M-C, Soumelis, V, Kadowaki, N, Grouard, G, Briere, F, de Waal Malefyt, R, Liu, Y-J, 1999, Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science*, 283, 1183-1186

Romani, N, Reider, D, Heuer, M, Ebner, S, Kämpgen, E, Eibl, B, Niederwieser, D, Schuler, G, 1996, Generation of mature dendritic cells from human blood: an improved method with special regard to clinical applicability. *J Immunol Meth*, 196, 137-151

Rosic-Brkic, B, Schwendener, RA, Odermatt, B, Zuniga, A, Pavlovic, J, Billeter, MA, Cattaneo, R, 2001, Roles of macrophages in measles virus infection of genetically modified mice. *J Virol*, 75, 3343-3351

Ruckle, G, Rogers, KD, 1957, Studies with measles virus II. Isolation of virus and immunological studies in persons who have had natural disease. *J Immunol*, 78, 341-355

Russel, R, Paterson, RG, Lamb, RA, 1994, Studies with cross-linking reagents on the oligomeric form of the paramyxovirus fusion protein. *Virology*, 199, 160-168

Salonen, R, Ilonen, J, Salmi, A, 1988, Measles virus infection of unstimulated blood mononuclear cells *in vitro*: antigen expression and virus production preferentially in monocytes. *Clin Exp Immunol*, 71, 224-228

Salonen, R, Ilonen, J, Salmi, AA, 1989, Measles virus inhibits lymphocyte proliferation *in vitro* by two different mechanisms. *Clin Exp Immunol*, 75, 376-380

Samuel, O, Shai, Y, 2001, Participation of two fusion peptides in measles virus-induced membrane fusion: emerging similarity with other paramyxoviruses. *Biochemistry*, 40, 1340-1349

Sanchez-Lanier, M, Guerin, P, McLaren, LC, Bankhurst, AD, 1988, Measles virus-induced suppression of lymphocyte proliferation. *Cell Immunol*, 116, 367-381

Sareneva, T, Julkunen, I, Matikainen, 2000, IFN- α and IL-12 induce IL-18 receptor gene expression in human NK and T cells. *J Immunol*, 165, 1933-1938

Saurwein-Teissl, M, Zisterer, K, Schmitt, TL, Gluck, R, Cryz, S, Grubeck-Loebenstien, B, 1998, Whole virus influenza vaccine activates dendritic cells (DC) and stimulates cytokine production by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) while subunit vaccines support T cell proliferation. *Clin Exp Immunol*, 114, 271-276

Scheller, C, Jassoy, C, 2001, Syncytium formation amplifies apoptotic signals: a new view on apoptosis in HIV infection *in vitro*. *Virology*, 282, 48-55

Schlender, J, Schnorr, J-J, Spielhofer, P, Cathomen, T, Cattaneo, R, Billeter, MA, ter Meulen, V, Schneider-Schaulies, S, 1997, Interaction of measles virus glycoproteins with the surface of uninfected peripheral blood lymphocytes induces immunosuppression *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93, 13194-13199

Schneider-Schaulies, J, Schneider-Schaulies, S, ter Meulen, V, 1993, Differential induction of cytokines by primary and persistent measles virus infections in human glial cells. *Virology*, 195, 219-228

Schneider-Schaulies, S, Kreth, HW, Hofmann, G, Billeter, MA, ter Meulen, V, 1991, Expression of measles virus RNA in peripheral blood mononuclear cells of patients with measles, SSPE, and autoimmune diseases. *Virology*, 182, 703-711

Schneider-Schaulies, S, Niewiesk, S, Schneider-Schaulies, J, ter Meulen, V, 2001, Measles virus induced immunosuppression: targets and effector mechanisms. *Curr Mol Med*, 1, 163-181

Schneider-Schaulies, S, Schneider-Schaulies, J, Schuster, A, Bayer, M, Pavlovic, J, ter Meulen, V, 1994, Cell type-specific MxA-mediated inhibition of measles virus transcription in human brain cells. *J Virol*, 68, 6910-6917

Schneider-Schaulies, S, Liebert, UG, Baczko, K, Cattaneo, R, Billeter, MA, ter Meulen, V, 1989, Restriction of measles virus gene expression in acute and subacute encephalitis of Lewis rats. *Virology*, 171, 525-534

Schnorr, J-J, Cutts, FT, Wheeler, JG, Akramuzzaman, SM, Alam, MS, Azim, T, Schneider-Schaulies, S, ter Meulen, V, 2001, Immune modulation after vaccination of 6-9 months old Bangladeshi infants. *Vaccine*, 19, 1503-1510

Schnorr, J-J, Schneider-Schaulies, S, Simon-Jodicke, A, Pavlovic, J, Horisberger, MA, ter Meulen, V, 1993, MxA-dependent inhibition of measles virus glycoprotein synthesis in a stably transfected human monocytic cell line. *J Virol*, 67, 4760-4768

Schnorr, JJ, Seufert, M, Schlender, J, Borst, J, Johnston, ICD, ter Meulen, V, Schneider-Schaulies, S, 1997a, Cell cycle arrest rather than apoptosis is associated with measles virus contact-mediated immunosuppression *in vitro*. *J Gen Virol*, 78, 3217-3226

Schnorr, JJ, Xanthakos, S, Keikavoussi, P, Kämpgen, E, ter Meulen, V, Schneider-Schaulies, S, 1997b, Induction of maturation of human blood dendritic cell precursors by measles virus is associated with immunosuppression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94, 5326-5331

Sergiev, PG, Ryazantseva, NE, Shroit, IG, 1960, The dynamics of pathological processes in experimental measles in monkeys. *Acta Virol*, 4, 265-273

Servet-Delprat, C, Vidalain, P-O, Azocar, O, Le Deist, F, Fischer, A, Rabourdin-Combe, C, 2000b, Consequences of Fas-mediated human dendritic cell apoptosis induced by measles virus. *J Virol*, 74, 4387-4393

Servet-Delprat, C, Vidalain, P-O, Bausinger, H, Manié, S, Le Deist, F, Azocar, O, Hanau, D, Fischer, A, Rabourdin-Combe, C, 2000a, Measles virus induces abnormal differentiation of CD40 ligand-activated human dendritic cells. *J Immunol*, 164, 1753-1760

Shiozawa, S, Yoshikawa, N, Iijima, K, Negishi, K, 1988, A sensitive radioimmunoassay for circulating alpha-interferon in the plasma of healthy children and patients with measles virus infection. *Clin Exp Immunol*, 73, 366-369

Shlapatska, LM, Mikhalap, SV, Berdova, AG, Zelensky, OM, Yun, TJ, Nichols, KE, Clark, EA, Sidorenko, SP, 2001, CD150 association with either the SH2-containing inositol phosphatase or the SH2-containing protein tyrosine phosphatase is regulated by the adaptor protein SH2D1A. *J Immunol*, 166, 5480-5487

Siegal, FP, Kadowaki, N, Shodell, M, Fitzgerald-Bocarsly, PA, Shah, K, Antonenko, S, Liu, Y-J, 1999, The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science*, 284, 1835-7

Soilu-Hanninen, M, Hanninen, A, Ilonen, J, Salmi, A, Salonen, R, 1996, Measles virus hemagglutinin mediates monocyte aggregation and increased adherence to measles-infected endothelial cells. *Med Microbiol Immunol*, 185, 73-80

- Stark, GR, Kerr, IM, Williams, BRG, Silverman, RH, Schreiber, RD, 1998, How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem*, 67, 227-264
- Steineur, M-P, Grosjean, I, Bella, C, Kaiserlian, D, 1998, Langerhans cells are susceptible to measles virus infection and actively suppress T cell proliferation. *Eur J Dermatol*, 8, 413-420
- Steinman, R, 1991, The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol*, 9, 271-296
- Sun, X, Burns, JB, Howell, JM, Fujinami, RS, 1998, Suppression of antigen-specific T cell proliferation by measles virus infection: role of a soluble factor. *Virology*, 246, 24-33
- Takeda, M, Kato, A, Kobune, F, Sakata, H, Li, Y, Shioda, T, Sakai, Y, Asakawa, M, Nagai, Y, 1998, Measles virus attenuation associated with transcriptional impediment and a few amino acid changes in the polymerase and accessory proteins. *J Virol*, 72, 8690-8696
- Tamashiro, VG, Perez, HH, Griffin, DE, 1987, Prospective study of the magnitude and duration of changes in tuberculin reactivity during complicated and uncomplicated measles. *Pediatr Infect Dis J*, 6, 451-454
- Tatsuo, H, Ono, N, Tanaka, K, Yanagi, Y, 2000, SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature*, 406, 893-897
- Thoma-Uszynski, S, Kiertcher, SM, Ochoa, MT, Bouis, DA, Norgard, MV, Miyake, K, Godowski, PJ, Roth, MD, Modlin, RL, 2000, Activation of Toll-like receptor 2 on human dendritic cells triggers induction of IL-12, but not IL-10. *J Immunol*, 165, 3804-3810
- Tilles, JG, Balkwill, F, Davilla, J, 1987, 2',5'-Oligoadenylate synthetase and interferon in peripheral blood after rubella, measles, or mumps live virus vaccine. *Proc Soc Exp Biol Med*, 186, 70-74
- Tober, C, Seufert, M, Schneider, H, Billeter, MA, Johnston, ICD, Niewiesk, S, ter Meulen, V, Schneider-Schaulies, S, 1998, Expression of measles virus V protein is associated with pathogenicity and control of viral RNA synthesis. *J Virol*, 72, 8124-8132
- Vainionpää, R, Hyypiä, T, Akerman, KE, 1991, Early signal transduction in measles virus-infected lymphocytes is unaltered, but second messengers activate virus replication. *J Virol*, 65, 6743-6748
- Valsamakis, A, Schneider, H, Auwaerter, PG, Kaneshima, H, Billeter, MA, Griffin, DE, 1998, Recombinant measles viruses with mutations in the C, V, or F gene have altered growth phenotypes *in vivo*. *J Virol*, 72, 7754-7761
- van Binnendijk, RS, Poelen, MCM, Kuijpers, KC, Osterhaus, ADME, Uytdehaag, FGCM, 1990, The predominance of CD8⁺ T cells after infection with measles virus suggests a role for CD8⁺ class I MHC-restricted cytotoxic T lymphocytes (CTL) in recovery from measles. *J Immunol*, 144, 2394-2399
- Varsanyi, TM, Utter, G, Norrby, E, 1984, Purification, morphology, and antigenic characterization of measles virus envelope components. *J Gen Virol*, 65, 355-366
- Vermaelen, KY, Carro-Muino, I, Lambrecht, BN, Pauwels, RA, 2001, Specific migratory dendritic cells rapidly transport antigen from the airways to the thoracic lymph nodes. *J Exp Med*, 193, 51-60

- Vidalain, P-O, Azocar, O, Lamouille, B, Astier, A, Rabourdin-Combe, C, Servet-Delprat, C, 2000, Measles virus induces functional TRAIL production by human dendritic cells. *J Virol*, 74, 556-559
- Visintin, A, Mazzoni, A, Spitzer, JH, Wyllie, DH, Dower, SK, Segal, DM, 2001, Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells. *J Immunol*, 166, 249-255
- von Pirquet, C, 1908, *Dtsch Med Wochenschr*, Das Verhalten der kutanen Tuberkulinreaktion während der Masern. 30, 1297-1300
- Watanabe, M, Hirano, A, Stenglein, S, Nelson, J, Thomas, G, Wong, TC, 1995, Engineered serine protease inhibitor prevents furin-catalysed activation of the fusion glycoprotein and production of infectious measles virus. *J Virol*, 69, 3206-3210
- Weidmann, A, 2000a, Strukturelle und funktionelle Untersuchungen zur Interaktion von Masernvirus-Glykoproteinen mit lympho- und monozytären Zellen. Dissertationsschrift, Würzburg
- Weidmann, A, Maisner, A, Garten, W, Seufert, M, ter Meulen, V, Schneider-Schaulies, S, 2000b, Proteolytic cleavage of the fusion protein but not membrane fusion is required for measles virus-induced immunosuppression *in vitro*. *J Virol*, 74, 1985-1993
- Weinmann, AS, Mitchell, DM, Sanjabi, S, Bradley, MN, Hoffmann, A, Liou, H-C, Smale, ST, 2001, Nucleosome remodeling at the IL-12 p40 promoter is a TLR-dependent, Rel-independent event. *Nature Immunol*, 2, 51-57
- Wesley, AG, Coovadia, HM, Henderson, L, 1978, Immunological recovery after measles. *Clin Exp Immunol*, 32, 540-544
- Wild, FT, Malvoisin, E, Buckland, R, 1991, Measles virus: both the hemagglutinin and fusion glycoproteins are required for fusion. *J Gen Virol*, 72, 439-442
- Wild, FT, Buckland, R, 1995, Functional aspects of envelope-associated measles virus proteins. In: Billeter, MA, ter Meulen, V (eds): *Measles virus*. Springer Verlag KG, Berlin, 51-64
- Williams, NJ, Harvey, JJ, Duncan, I, Booth, RF, Knight, SC, 1998, Interleukin-12 restores dendritic cell function and cell-mediated immunity in retrovirus-infected mice. *Cell Immunol*, 183, 121-130
- Wong, TC, Yant, S, Harder, BJ, Korte-Sarfaty, J, Hirano, A, 1997, The cytoplasmic domains of complement regulatory protein CD46 interact with multiple kinases in macrophages. *J Leukoc Biol*, 62, 892-900
- Xia, W, Pinto, CE, Kradin, RL, 1995, The antigen presenting activities of Ia⁺ dendritic cells shift dynamically from lung to lymph nodes after airway challenge with soluble antigen. *J Exp Med*, 181, 1275-1283
- Yanagi, Y, Cubitt, BA, Oldstone, MBA, 1992, Measles virus inhibits mitogen-induced T cell proliferation but does not directly perturb the T cell activation process inside the cell. *Virology*, 187, 280-289
- Zhu, YD, Heath, J, Collins, J, Greene, T, Antipa, L, Rota, P, Bellini, W, McChesney, M, 1997, Experimental measles. II. Infection and immunity in the rhesus macaque. *Virology*, 233, 85-92

9 Abkürzungen

AET	2-Aminoethylisothiuroniumbromidhydrobromid
Ak	Antikörper
APC	antigen presenting cell
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BFA	Brefeldin A
BSA	bovines Serumalbumin
Bq	Becquerel
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD	cluster of differentiation
Ci	Curie
CPE	cytopathic effect
cpm	counts per minute
Da	Dalton
DC	Dendritische Zelle
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dsRNS	doppelsträngige RNS
DTH	delayed type hypersensitivity reaction
ECL	enhanced chemiluminescence
ED-B	Edmonston B-Masernvirusvakzinestamm
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFP	enhanced green fluorescent protein
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FACScan	fluorescence activated cell scanner
FIP	fusionsinhibitorisches Peptid
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
GM-CSF	granulocyte/makrophage-colony stimulating factor
h	Stunde

HIV	humanes Immundefizienzvirus
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
J	Joule
l	Liter
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
m	Milli- / Meter
μ	Mikro-
MACS	magnetic cell sorting
mAk	monoklonaler Antikörper
MEM	minimal essential medium
mfi	mittlere Fluoreszenzintensität
min	Minute
MKM	Makrophagen-konditioniertes Medium
MLC/MLR	mixed leukocyte culture/reaction
MoDC	monocyte-derived dendritic cells
MOI	multiplicity of infection
mRNS	messenger-Ribonukleinsäure
MV	Masernvirus
NK	natürliche Killerzelle
NTE	Natriumchlorid/Tris/EDTA
NU	neutralizing unit
o/n	over night
ORF	open reading frame
PB-DC	peripheral blood DC
PBL	peripheral blood lymphocytes
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PBS	phosphate-buffered saline
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PHA	Phytohämagglutinin
p.i.	<i>post infectionem</i>

PFU	plaque forming unit
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
SAC	<i>Staphylococcus aureus</i> -Cowan strain
SD	standard deviation
SDS	sodium dodecylsulfate
sek	Sekunde
SI	Stimulationsindex
TCID ₅₀	tissue culture infectious dose 50
TNF	Tumornekrosefaktor
UV	Ultraviolett
VSV	Vesikuläres Stomatitisvirus
WTF	Wildtyp Fleckenstein-Masernviruswildtypstamm

10 Veröffentlichungen

10.1 Publikationen

Ingo M Klagge, Schneider-Schaulies, S, 1999, Virus interactions with dendritic cells. *J Gen Virol*, 80, 823-833

Ingo M Klagge, ter Meulen, V, Schneider-Schaulies, S, 2000, Measles virus-induced promotion of dendritic cell maturation by soluble mediators does not overcome the immunosuppressive activity of viral glycoproteins on the cell surface. *Eur J Immunol*, 30, 2741-2750

Ohgimoto, S, Ohgimoto, K, Niewiesk, S, **Klagge, IM**, Pfeuffer, J, Johnston, ICD, Schneider-Schaulies, J, Weidmann, A, ter Meulen, V, Schneider-Schaulies, S, 2001, The hemagglutinin protein is an important determinant for measles virus tropism for dendritic cells *in vitro* and immunosuppression *in vivo*. *J Gen Virol*, *in press*

10.2 Vorträge

Ingo M Klagge, Schnorr, J-J, Xanthakos, S, Keikavoussi, P, Kämpgen, E, ter Meulen, V, Schneider-Schaulies, S, Immunosuppression as a result of the measles virus-dendritic cell interaction. Keystone Symposium on Cellular and Molecular Biology of Dendritic Cells, Santa Fe, NM, USA, 07. bis 13. März 1998

O Engelking, **Klagge, IM**, Weidmann, A, ter Meulen, V, Schneider-Schaulies, S, Masernvirus-induzierte Immunsuppression – Effektorstrukturen und Mechanismus. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Bremen, 09. bis 12. März 1999

Ingo M Klagge, ter Meulen, V, Schneider-Schaulies, S, Infektion dendritischer Zellen mit dem Masernvirus führt trotz phänotypischer Ausreifung zu funktionellen Störungen. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Wien, 26. bis 29. April 2000

Ingo M Klagge, Bieback, K, ter Meulen, V, Schneider-Schaulies, S, Infektion von dendritischen Zellen mit Masernvirus – Einfluß von MV Wildtyp- und Vakzinestämmen auf Ausreifung und Funktion von DC *in vitro*. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Dresden, 14. bis 17. März 2001

10.3 Posterpräsentationen

Ingo M Klagge, Schnorr, J-J, Kämpgen, E, ter Meulen, V, Schneider-Schaulies, S, Interaktion von Masernvirus und dendritischen Zellen. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Regensburg, 02. bis 05. März 1998

Ingo M Klagge, Schnorr, J-J, Xanthakos, S, Kämpgen, E, ter Meulen, V, Schneider-Schaulies, S, Induction of maturation of human blood dendritic cell precursors by measles virus is associated with immunosuppression. Keystone Symposium on Cellular and Molecular Biology of Dendritic Cells, Santa Fe, NM, USA, 07. bis 13. März 1998

Ingo M Klagge, Kämpgen, E, ter Meulen, V, Schneider-Schaulies, S, Einfluß von Masernvirus auf die Funktion von dendritischen Zellen. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Bremen, 09. bis 12. März 1999

11 Lebenslauf

Ingo Markus Klagge
geboren am 03. April 1971
in Bonn-Bad Godesberg

Schulbildung

1977-1981 Ev. Bodelschwingh-Grundschule, Bonn-Bad Godesberg
1981-1989 Ev. Amos-Comenius-Gymnasium, Bonn-Bad Godesberg
Mai 1990 Erwerb der allgemeinen Hochschulreife

Studium

1991-1996 Studium der Biologie an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn
04. Nov 1993 Vor-Diplomprüfung
15. Nov 1996 Diplomprüfung
Hauptfach: Zoologie
1. Nebenfach: Genetik
2. Nebenfach: Biochemie

Von Juni 1995 bis August 1996 Diplomarbeit am Institut für Zoologie, Abteilung Immunbiologie bei Herrn Prof. Dr. N Koch:

„Einfluß von Granulozyten / Makrophagen-Kolonie-stimulierendem Faktor (GM-CSF) auf die Expression der Invarianten Kette (CD74, Ii) in murinen myelomonozytischen Zelllinien“

Seit Februar 1997 Promotionsstudium am Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg bei Prof. Dr. S Schneider Schaulies:

„Interaktion von Masernviren mit humanen Dendritischen Zellen“

Würzburg, den 08. Juni 2001

Ingo Klagge

Und zu guter Letzt der Dank

Frau Prof. Dr. Sibylle Schneider-Schaulies danke ich für die Überlassung des sehr interessanten Themas und für die Betreuung meiner Doktorarbeit.

Herrn Prof. Dr. Jörg Hacker möchte ich für die Übernahme des Korreferats danken.

Herrn Prof. Dr. Volker ter Meulen danke ich für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes und für seine Unterstützung während meiner Doktorarbeit.

Ganz herzlich möchte ich allen Mitarbeitern, den alten wie den neuen, für die sehr gute und angenehme Arbeitsatmosphäre danken.

Natürlich bedanke ich mich auch bei allen, die mir Ihre Hilfe beim Korrekturlesen angeboten haben – leider war ich nicht schnell genug für Euch!

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie: meinen Eltern, die mir dieses Studium ermöglicht haben, mich stets unterstützten und an mich geglaubt haben, meiner Tante Vera, die immer ein nettes Wort für mich hatte und mir mit ihrem rheinischen Naturell viel Freude bereitet hat, meinem Bruder Holger, dessen Weine mir stets sehr gut geschmeckt haben und der so maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beitrug.

Von ganzem Herzen möchte ich Carolin danken, für die Überlassung Deines Computers, daß Du mich während der letzten Wochen ertragen hast, für alle Geduld und Unterstützung, die Du mir gegeben hast – Vielen, vielen Dank!