

**Interaktion von Masernviren mit Dendritischen Zellen:**

**Untersuchungen zur Rezeptorbenutzung,  
Regulation der Chemotaxis  
und T-Zellkommunikation**

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

vorgelegt von

**Marion Abt**

aus

Bremen

Würzburg, 2006

Eingereicht am:

.....

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

.....

Gutachter :

.....

Gutachter:

.....

Tag des Promotionskolloquiums:

.....

Doktorurkunde ausgehändigt am:

.....

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation in allen Teilen selbständig angefertigt und keine anderen als die genannten Hilfsmittel und Quellen benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, dass die vorliegende Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

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

Würzburg, 09.05.06

Marion Abt

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Masernvirus	1
1.1.1	Akute Masern	1
1.1.2	Morphologie und Struktur	3
1.1.3	Replikation und Transkription	7
1.1.4	Zelluläre Rezeptoren	9
1.1.5	Immunantwort während einer Masernvirus-Infektion	10
1.2	Dendritische Zellen	12
1.2.1	Entwicklung Dendritischer Zellen <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i>	13
1.2.2	Die Rolle Dendritischer Zellen bei der Maserninfektion	15
1.3	Chemokine und Chemokinrezeptoren	17
1.3.1	Chemokinrezeptoren auf Dendritischen Zellen	19
1.4	Struktur und Funktion des Oberflächenmoleküls DC-SIGN	22
1.5	Immunologische Synapse	25
1.6	Ziele der Arbeit	28
2	Material	30
2.1	Zellen	30
2.1.1	Zelllinien	30
2.1.2	Primäre Zellen	31
2.2	Viren	31
2.3	Zellkulturmedien und Zusätze	32
2.4	Oligonukleotide	33

---

2.5	Puffer und Lösungen	36
2.6	Antikörper	39
2.7	Enzyme	40
2.8	Chemikalien	41
2.9	Kits	42
2.10	Plastikwaren und Verbrauchsmaterial	42
2.11	Geräte	43
3	Methoden	44
3.1	Zellkultur	44
3.1.1	Zellkultur adhärenter Zelllinien	44
3.1.2	Zellkultur von Suspensionszelllinien	44
3.1.3	Bestimmung der Lebendzellzahl	45
3.1.4	Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	45
3.1.5	Mykoplasmentest	46
3.1.6	Isolierung humaner primärer mononukleärer Zellen aus Leukozytenkonzentrat	47
3.1.7	Isolierung humaner primärer T-Lymphozyten über Rosettierung von Hammelerythrozyten aus PBMC	48
3.1.8	Isolierung primärer humaner Monozyten	50
3.1.9	Differenzierung humaner Dendritischer Zellen <i>in vitro</i> aus Monozyten	52
3.2	Viruskultur	53
3.2.1	Präparation von Virusstocks	53
3.2.2	Bestimmung des Virustiters	54
3.3	Infektionen und Virusbindungstest	55
3.3.1	Infektion humaner Dendritischer Zellen	55

---

3.3.2	Infektion von CHO-Zellen	56
3.3.3	Virusbindungstest	57
3.3.4	Adhäsionsassay mit fluoreszierenden Mikrokügelchen	57
3.3.5	DC-SIGN-Fc-Bindungstest	58
3.4	T-Zell-Proliferationstest	59
3.4.1	Oxidative Mitogenese	59
3.4.2	CFSE-Markierung	60
3.4.3	Mixed Lymphocyte Reaction	61
3.5	Aufreinigung monoklonaler Antikörper	63
3.6	Molekularbiologische Methoden	64
3.6.1	RNA-Präparation	64
3.6.2	Reverse Transkription	64
3.6.3	Polymerase Kettenreaktion	65
3.6.4	Gelelektrophorese	67
3.7	Durchflusszytometrie	68
3.7.1	Oberflächenfärbungen	69
3.7.2	Intrazelluläre Färbungen	69
3.7.3	Quantitative Durchflusszytometrie	70
3.8	ELISA	71
3.9	Chemotaxis-Assays	72
3.9.1	Chemotaxis-Assays mit Dendritischen Zellen	73
3.9.2	Chemotaxis-Assays mit T-Zellen	73
3.10	Kokultur Dendritischer Zellen und T-Zellen in dreidimensionalen Kollagenmatrices	74
3.10.1	Videomikroskopie	75

---

4	Ergebnisse	76
4.1	Regulation der Chemokinrezeptoren CCR5 und CCR7 und chemotaktisches Verhalten MV-infizierter Dendritischer Zellen	76
4.1.1	Einfluss von Masernviren auf die Expression von CCR5	76
4.1.2	Mit MV infizierte DC-Kulturen exprimieren kein CCR7 auf der Oberfläche	80
4.1.3	Einfluss von Masernvirusinfektionen auf die Induktion von CCR7 mRNA	83
4.1.4	Migrationsverhalten Dendritischer Zellen	84
4.1.4.1	Migrationsverhalten reifer DC in Richtung verschiedener Chemokine	85
4.1.4.2	Vergleich des Migrationsverhaltens DC aus MV-infizierten Kulturen mit LPS-ausgereiften DC	86
4.1.4.3	Migrationsverhalten DC aus MV-infizierten Kulturen in Richtung CCL-3 im Vergleich zum Migrationsverhalten LPS-ausgereifter DC	89
4.1.4.4	Infizierte Zellen verbleiben im oberen Kompartiment	91
4.1.5	MV-induzierte Chemokinproduktion in DC	94
4.1.6	Bestimmung der Chemokin-Konzentration an CXCL-8 und CCL-20 in Überstand aus MV-infizierten DC-Kulturen	97
4.1.7	Experimente zur T-Zellchemotaxis	101
4.1.8	Experimente zur T-Zellchemotaxis mit Substitution von CCL-20	102
4.2	Untersuchungen zur Rolle von DC-SIGN als Rezeptor für Masernviren	104
4.2.1	Rekombinantes DC-SIGN interagiert mit WTF und ED	104
4.2.2	Zelluläres DC-SIGN als Rezeptor für MV	106

---

4.2.2.1	Untersuchungen zur Bindung von MV an DC-SIGN	106
4.2.2.2	Die Masernvirusglykoproteine F und H interagieren mit DC-SIGN	110
4.2.2.3	Masernviren benutzen DC-SIGN nicht als Eintrittsrezeptor	111
4.2.3	Die Rolle von DC-SIGN bei der Infektion von DC	115
4.2.3.1	Die Rolle von DC-SIGN bei der Bindung von MV an DC	115
4.2.3.2	Die Rolle von DC-SIGN bei der Infektion von DC	118
4.2.3.3	DC-SIGN verstärkt die Infektion unreifer DC	120
4.3	Interaktion zwischen MV-infizierten DC und T-Zellen in dreidimensionalen Kollagenmatrices	123
4.3.1	Analyse der Kontaktzeiten zwischen LPS-behandelten DC und T-Zellen	123
4.3.2	Analyse der Kontaktzeiten zwischen MV-infizierten DC und T-Zellen	125
4.3.3	Proliferation der T-Zellen in Kollagenmatrices	128
5	Diskussion	131
6	Zusammenfassung	151
7	Summary	153
8	Literaturverzeichnis	155
9	Abkürzungen	181
10	Filme	186
11	Veröffentlichungen	187
11.1	Publikationen	187
11.2	Vorträge	187
11.3	Posterpräsentationen	188
12	Lebenslauf	189

# **1 Einleitung**

## **1.1 Masernvirus**

### **1.1.1 Akute Masern**

Der Erreger der akuten Masern ist das Masernvirus (MV). Dabei handelt es sich um ein ausschließlich humanpathogenes Virus mit weltweiter Verbreitung. Trotz eines effektiven Lebendimpfstoffs gehört die Erkrankung bis heute weltweit zu den sechs häufigsten Todesursachen bei Kindern unter fünf Jahren. In der Zeit von 1999 bis 2004 konnte die Zahl der Todesfälle nach einer Masernvirusinfektion von geschätzten 871.000 im Jahr 1999 auf geschätzte 454.000 im Jahr 2004 gesenkt werden (WHO, 2006). Die meisten Erkrankungen treten in Afrika auf, es kommt aber auch in Europa immer wieder zu MV-Ausbrüchen. In der ersten Hälfte des Jahres 2005 wurden in Deutschland zwei MV-Ausbrüche in Hessen und Bayern registriert; dabei erkrankten insgesamt 465 Personen (Siedler, 2005). Im Januar 2006 wurde ein MV-Ausbruch aus Baden-Württemberg gemeldet (Steffens, 2006).

Bei der Erkrankung handelt es sich um eine hochkontagiöse Infektionskrankheit, die durch Tröpfchen übertragen wird (Riley et al., 1978). Die Ausbreitung im Körper erfolgt durch die Infektion des Respirationstraktes über die Lunge zu den lokalen lymphatischen Organen. Anschließend kommt es zu einer systemischen Ausbreitung des Virus in anderen lymphatischen Organen, Epi- und Endothelzellen verschiedener Organe, zum Beispiel Haut, Leber und den Konjunktiven. Innerhalb der Zellen des Immunsystems konnte das Virus vor allem in Monozyten, aber auch in Lymphozyten nachgewiesen werden (Esolen et al., 1993; Schneider-Schaulies et al., 1991).

Zu den ersten Anzeichen einer Erkrankung kommt es nach einer Inkubationszeit von ca. zehn Tagen, typische Symptome sind Husten, Schnupfen, Fieber, häufig begleitet von Entzündungen der Konjunktiven.

Gleichzeitig entwickelt sich ein charakteristisches Enanthem, das durch die Infektion der Endothelzellen hervorgerufen wird. Die so genannten „Koplikschen Flecken“ treten in der Mundschleimhaut auf (Koplik, 1896). Erst einige Tage später tritt das ebenfalls charakteristische Exanthem auf, das durch die Infektion und Zerstörung der Epithelzellen der Haut entsteht. Es breitet sich von der Stirn über den gesamten Körper aus. Diese Phase der Erkrankung wird begleitet von hohem Fieber. Mit Auftreten des Exanthems kommt es zum Einsetzen der Immunantwort, durch die das Virus schnell eliminiert wird. Trotz der effektiven Immunantwort, die zu lebenslanger Immunität führt, kann bei Patienten nach einer akuten MV-Infektion das Auftreten einer mehrere Wochen andauernden Immunsuppression beobachtet werden (siehe Abschnitt 1.1.5).

In industrialisierten Ländern kommt es bei etwa 10 Prozent der Erkrankten zu Komplikationen; diese Zahl ist in Entwicklungsländern aufgrund schlechter Ernährung und dem damit in Zusammenhang stehenden schlechten Immunstatus der Bevölkerung auf bis zu 80 Prozent erhöht (Clements and Cutts, 1995). Auftretende Komplikationen sind Pneumonien, Otitis media und Diarrhoe. Auch das Risiko von Sekundärinfektionen ist erhöht bedingt durch eine MV-induzierte Immunsuppression (siehe Abschnitt 1.1.5).

Weiterhin sind einige selten auftretende Komplikationen nach MV-Infektionen bekannt. Dazu gehören die akute postinfektiöse Enzephalitis (*post infectious encephalitis*, PIE), die Einschlusskörperchen Enzephalitis (*measles inclusion body encephalitis*, MIBE) sowie die subakute sklerosierende Panenzephalitis (SSPE). Während bei der MIBE und der SSPE die Replikation des Virus in bestimmten Zellen des Zentralen Nervensystems und im Gehirn nachgewiesen werden konnte, ist bei der PIE kein Virus im Gehirn nachweisbar. Sowohl MIBE als auch SSPE verlaufen stets tödlich.

### 1.1.2 Morphologie und Struktur

Masernviren (MV) besitzen ein nicht-segmentiertes RNA-Genom mit negativer Polarität. Dadurch gehören sie zur Ordnung der Mononegavirales. Die Vertreter dieser Ordnung haben eine konservierte Anordnung der Gene und zeigen große Ähnlichkeiten bei der Replikation.

MV gehören zur Familie der *Paramyxoviridae*, die in fünf Genera unterteilt ist. Sie bilden zusammen mit einigen anderen Erregern den Genus Morbilliviren (Tabelle 1.1—1).

**Tabelle 1.1—1: Übersicht über Mitglieder der Familie der Paramyxoviren. Vertreter der *Filoviridae* und *Rhabdoviridae* sowie Genera der Unterfamilie Pneumoviren sind nicht dargestellt.**

<b><u>Ordnung</u></b>	<b>Mononegavirales</b>
<b><u>Familie</u></b>	<i>Filoviridae</i>
	<i>Rhabdoviridae</i>
	<b><i>Paramyxoviridae</i></b>
	Pneumovirinae
	<b>Paramyxovirinae</b>
<b><u>Genera:</u></b>	Respirovirus (z .B. Sendai-Virus)
	Rubulavirus (z. B. Mumps-Virus)
	Henipavirus (z. B. Hendra-Virus)
	Avulavirus (z.B. Newcastle disease Virus)
	<b>Morbillivirus</b>
	<b>Masern</b>
	Rinderpest
	Hundestaube
	Seehundestaube
	Peste-des-Petits-Ruminantes
	Delphin Morbillivirus
	Tümmeler-Morbillivirus

MV bestehen aus sechs Strukturproteinen: Hämagglutininprotein (H), Fusionsprotein (F), Matrixprotein (M), Nukleokapsidprotein (N), Phosphoprotein (P) und dem L-Protein („Large“). Das P- und L-Protein bilden die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase. Das V-Protein ist ein Nichtstrukturprotein der MV, das C-Protein wurde in früheren Studien ebenfalls zu den Nichtstrukturproteinen des MV gezählt. In einer neueren Studie wurde jedoch eine Beteiligung des C-Proteins beim Zusammenbau neuer Viruspartikel beschrieben (Devaux and Cattaneo, 2004). Aus diesem Grund könnte das C-Protein auch zu den Strukturproteinen des MV gezählt werden.

Das MV-Partikel hat eine Größe von 120 bis 300 nm und ist von einer Lipidhülle umgeben, die aus der Wirtszellmembran entsteht. Die Lipidhülle umschließt den Ribonukleotidkomplex (RNP-Komplex), der aus genomischer RNA, dem Nukleokapsidprotein N und dem viralen Polymerasekomplex besteht.

Die beiden Glykoproteine F und H sind in der Lipidhülle des Virus lokalisiert und vermitteln den Eintritt der Viren in die Wirtszellen (Wild et al., 1991). Das H-Protein ist ein Typ-II-Glykoprotein. Es wird im Endoplasmatischen Reticulum in die endgültige Struktur gefaltet und dimerisiert zunächst (Plemper et al., 2001). Auf der Oberfläche der Viruspartikel liegt es als Tetramer vor, dabei sind jeweils zwei Dimere über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden (Hu and Norrby, 1994). Das H-Protein ist für die Bindung an die zellulären Rezeptoren verantwortlich (Stern et al., 1995) (1.1.4). Mehrere Aminosäuren konnten bisher als besonders wichtig für die Rezeptorbindung identifiziert werden (Bartz et al., 1996; Bartz et al., 1998; Hsu et al., 1998; Lecouturier et al., 1996; Patterson et al., 1999). Weiterhin hat das H-Protein unterstützende Funktion bei der Fusion mit der Wirtszellmembran (Nussbaum et al., 1995).

Für die Fusion mit der Wirtszellmembran ist in der Hauptsache das F-Protein verantwortlich (Joshi et al., 1998; Samuel and Shai, 2001). Dabei handelt es sich um ein Typ-I-Membranprotein, das zunächst als Vorläufer  $F_0$  gebildet wird und anschließend im Golgi-Apparat in zwei funktionelle Untereinheiten  $F_1$  und  $F_2$  proteolytisch gespalten und aktiviert wird (Bolt et al., 1999; Sato et al., 1988). Dabei ist die Glykosylierung des Proteins von Bedeutung für die Spaltung sowie

den Transport (Wild and Buckland, 1995). Das F-Protein liegt auf der Oberfläche der Virionen als Trimer vor.

Die beiden Glykoproteine bilden auf der Oberfläche von Viruspartikeln und infizierten Zellen funktionelle Komplexe (Wild et al., 1994; Wild et al., 1991). Die Interaktion zwischen dem F- und dem H-Protein sowie die fusogene Aktivität werden über den zytoplasmatischen Teil der Proteine und dessen Interaktion mit dem M-Protein reguliert (Moll et al., 2001; Moll et al., 2002) (Plempner et al., 2001).

Das Matrixprotein M ist an der Innenseite der Lipidhülle lokalisiert und stellt eine Verbindung zwischen den Glykoproteinen (Naim et al., 2000; Plempner et al., 2002) und dem RNP-Komplex dar. Das Matrixprotein spielt eine wichtige Rolle bei der Freisetzung neu gebildeter Viruspartikel (Cathomen et al., 1998). Weiterhin ist das M-Protein an der Transkriptionsregulation beteiligt (Suryanarayana et al., 1994).

Das Nukleokapsidprotein ist das am häufigsten vorkommende MV-Protein. Es bildet stabile Komplexe mit dem Phosphoprotein und ist für die Enkapsidierung des viralen Genoms verantwortlich.

Das Phosphoprotein ist ein Cofaktor der viralen Polymerase (L) und hat regulatorische Funktion bei der Transkription (Horikami and Moyer, 1995). Von der mRNA des P-Proteins werden auch das C- und das V-Protein translatiert. Die Sequenz für das C-Protein ist in einem anderen Leserahmen codiert als die des Phosphoproteins (Bellini et al., 1985), während das V-Protein durch das Editieren der mRNA entsteht. Dabei werden zusätzliche Nukleotide (G) in die mRNA-Sequenz eingefügt (Cattaneo et al., 1989; Wardrop and Briedis, 1991). Funktionell sind beide Proteine vermutlich an der Transkriptionsregulation beteiligt (Escoffier et al., 1999; Patterson et al., 2000; Tober et al., 1998; Valsamakis et al., 1998). Beide Proteine scheinen weiterhin an der Inhibition der Interferon- $\alpha$ -Signalleitung beteiligt zu sein (Palosaari et al., 2003; Shaffer et al., 2003; Takeuchi et al., 2003; Yokota et al., 2003). Tabelle 1.1—2 zeigt eine Übersicht über die Proteine des MV und deren Funktion.

Tabelle 1.1—2 Übersicht über Proteine und Funktion der Masernviren

	Protein	Größe	Funktionen
Strukturproteine	F <sub>0</sub>	60kDa	Membranfusion
	F <sub>1</sub> /F <sub>2</sub>	40kDa/22kDa	Trimer Typ-I-Glykoprotein Aktivierung durch proteolytische Spaltung des Vorläuferproteins im Komplex mit H in der Lipidhülle lokalisiert
	H	78kDa	Rezeptorbindung (Fusion) Tetramer Typ-II-Glykoprotein im Komplex mit F in der Lipidhülle lokalisiert
	M	37kDa	Zusammenbau u. Freisetzen neuer Viruspartikel verbindet Nukleokapsid mit Glykoproteinen
	N	60kDa	häufigstes MV-Protein bindet an genomische RNA Interaktion mit zellulären Proteinen
	P	72kDa	reguliert die Aktivität von L kleine Untereinheit der RNA-abhängigen RNA-Polymerase funktionelle Einheit mit L
	L	220kDa	Transkription große Untereinheit der RNA-abhängigen RNA-Polymerase funktionelle Einheit mit P
Nicht-Strukturproteine	C	28kDa	Strukturprotein? Transkriptionsregulation? Replikationsregulation? translatiert aus P mRNA Störung der Typ-I-Interferon Signalleitung
	V	45kDa	Transkriptionsregulation gebildet durch Editieren der P mRNA im Komplex mit N organisiert Störung der Typ-I-Interferon Signalleitung

### 1.1.3 Replikation und Transkription

Das nicht-segmentierte Genom der Masernviren hat eine Größe von ~16 Kilobasen (kb). Replikation und Transkription des Genoms finden im Zytoplasma der Wirtszelle statt. Die Transkription beginnt direkt nach der Freisetzung der Virionen in die Wirtszelle.

Das Genom ist am 3' („Leader“) und am 5' (Trailer“) Ende von nicht-codierenden Sequenzen flankiert, in der die Promotorregion für die Transkription und Replikation lokalisiert sind, außerdem enthalten diese Regionen Signale für die Enkapsidierung (Horikami and Moyer, 1995; Parks et al., 2001). Die Gene des MV sind durch nicht-codierende, so genannte intergenischen Sequenzen, voneinander getrennt. Diese enthalten Signalsequenzen für die Transkriptionstermination, Polyadenylierung sowie die Transkriptionsreinitiation (Bellini et al., 1994).

Die virale, RNA-abhängige RNA-Polymerase bindet zunächst an die Promotorregion in der 3' Leadersequenz (Crowley et al., 1988) und beginnt mit der Transkription des N-Gens. Beim Erreichen der intergenischen Sequenz zwischen dem N- und dem P-Gen kommt es zum Abbruch der Transkription. Das gebildete Transkript erhält eine Capstruktur und ein Poly-A-Ende. Die Transkription wird an der nächsten Initiationssequenz innerhalb der intergenischen Sequenz erneut gestartet, so dass die Sequenz des P-Gens abgelesen werden kann. Die Transkriptionsreinitiation findet ebenso vor dem M-, F-, H-, und L-Gen statt. Beim Überspringen der intergenischen Sequenzen kann es jedoch zum Abfallen des Polymerasekomplexes von der RNA kommen, infolgedessen entsteht im Verlauf der Transkription ein Gradient der gebildeten mRNAs (Cattaneo et al., 1987; Schneider-Schaulies et al., 1989) sowie der translatierten Proteine (Harder and Osterhaus, 1997); das am dichtesten an der Leadersequenz lokalisierte Gen (N) wird am häufigsten abgelesen. Das L-Gen, das am weitesten vom 3' Ende entfernt liegt, wird dementsprechend am seltensten abgelesen.

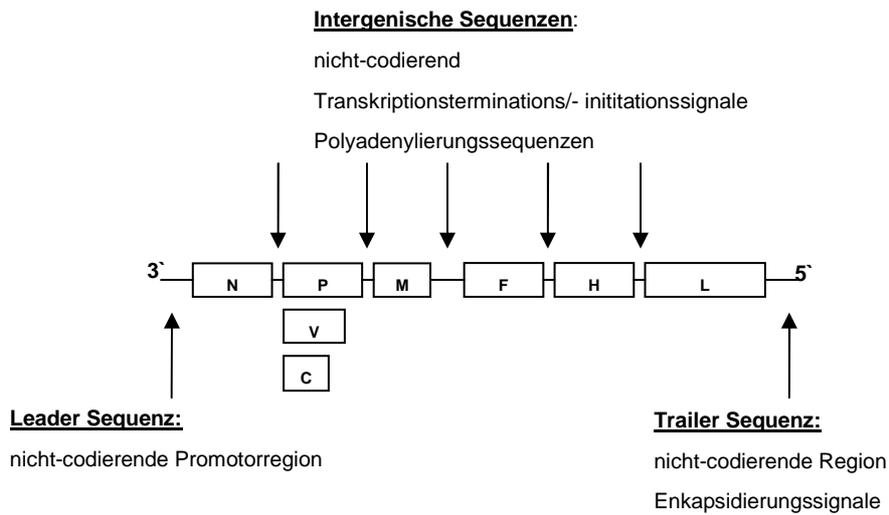
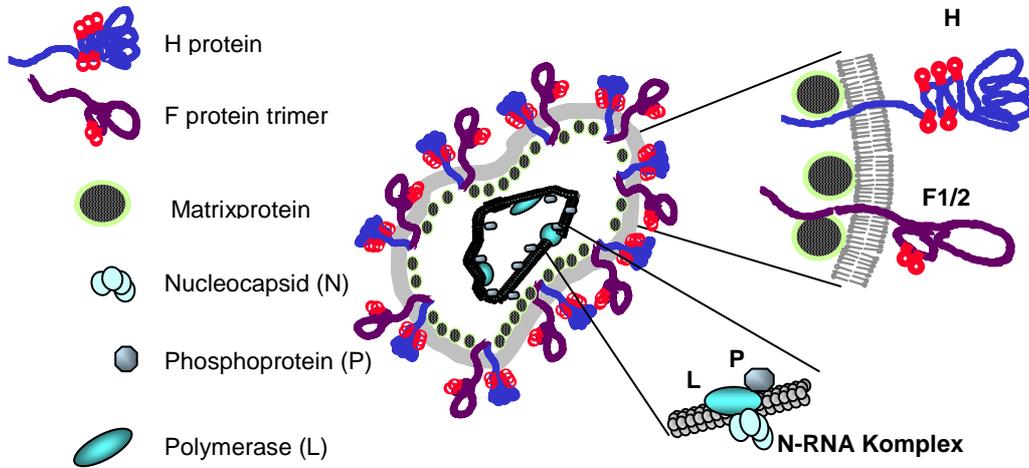


Abbildung 1—1: Schematische Darstellung die MV-Genomorganisation und des MV-Parikel.

Zum Wechsel von der Transkription zur Replikation bzw. zur Bildung von Antigenomen mit positiver Orientierung kommt es wahrscheinlich beim Vorliegen ausreichender Mengen an Nukleokapsidprotein. Die Polymerase ignoriert dann die Stopsequenzen in den intergenischen Sequenzen und

synthetisiert einen vollständigen Positivstrang (Banerjee, 1987; Blumberg and Kolakofsky, 1981; Lamb, 1996). Die gebildeten Positivstränge werden als Matrizen zur Bildung neuer negativsträngiger RNA-Genome benutzt. Die neu gebildeten Ribonukleotidkomplexe werden an die Zellmembran transportiert, wo sie mit dem M-Protein und den in die Wirtszellmembran eingelagerten F- und H-Proteinen interagieren und aus der Wirtszelle freigesetzt werden.

#### 1.1.4 Zelluläre Rezeptoren

MV gelangen in ihre Zielzellen durch Interaktion des H-Proteins mit bestimmten zellulären Rezeptoren. Derzeit sind zwei Rezeptoren bekannt, die von MV als Eintrittsrezeptoren benutzt werden.

Der Komplementbindungsrezeptor CD46 (*membrane cofactor protein*, MCP) wurde als erstes Oberflächenmolekül beschrieben, das mit dem MV-H-Protein interagiert und den Eintritt von MV in Zellen ermöglicht (Dorig et al., 1993; Nanche et al., 1993). Dies gilt jedoch nur für Impfstämme oder an das Wachstum auf Verozellen adaptierte Wildtypisolate. CD46 gehört zur Familie der Komplementbindungsrezeptoren und wird auf allen kernhaltigen humanen Zellen exprimiert, nicht jedoch auf Erythrozyten. Die eigentliche Funktion von CD46 besteht darin, die Bindung der Komplementkomponenten C3b und C4b an ihre Zielzellen (Liszewski et al., 1991) zu verhindern. Während die Komplementkomponenten mit den extrazellulären Domänen SCR3 (*short consensus repeats*) und SCR4 interagieren, binden MV an die extrazellulären Domänen SCR1 und SCR2 (Manchester et al., 1995). Es existieren verschiedene Splicevarianten von CD46, die alle von MV als Eintrittsrezeptoren benutzt werden können (Manchester et al., 1994).

Weiterhin wurde CD150 (SLAM, *signaling lymphocyte activation molecule*) als Eintrittsrezeptor von MV beschrieben (Erlenhoefer et al., 2001; Hsu et al., 2001; Tatsuo et al., 2000). CD150 wird auf aktivierten T- und B-Zellen (Cocks et al.,

1995; Punnonen et al., 1997), Gedächtniszellen und reifen Dendritischen Zellen exprimiert und kann sowohl von Impfstämmen als auch von Wildtypisolaten als Eintrittsrezeptor benutzt werden. Aufgrund der eingeschränkten Expression von CD150 auf Zellen des Immunsystems, nicht aber auf Endo- oder Epithelzellen, wird über das Vorhandensein eines weiteren Rezeptors spekuliert, der von Wildtypstämmen als Eintrittsrezeptor benutzt werden kann, bzw. ob CD46 als Rezeptor mit geringerer Affinität auch von Wildtypstämmen benutzt wird.

Die Expression der Rezeptoren auf der Zelloberfläche wird nach Kontakt oder durch Infektion mit MV verringert (Schneider-Schaulies et al., 1995).

### **1.1.5 Immunantwort während einer Masernvirus-Infektion**

Eine MV-Infektion ist durch zwei gegensätzliche Reaktionen des Immunsystems gekennzeichnet. Zum einen kommt es zu einer starken virusspezifischen Immunreaktion mit einer Aktivierung von CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup>T-Zellen sowie zur Produktion von Antikörpern, die zu lebenslanger Immunität führt. Zum anderen sind Patienten nach einer akuten Maserninfektion für mehrere Wochen immunsupprimiert; dadurch sind sie besonders gefährdet für Sekundärinfektionen.

Das Einsetzen der Immunantwort beginnt mit dem Auftreten des typischen Masernexanthems. Im Zuge der Immunantwort werden Antikörper der Klassen IgG1 und IgG4 (Ehrnst, 1978; Mathiesen et al., 1990) gegen die meisten viralen Proteine gebildet (Graves et al., 1984; Norrby et al., 1981; Stephenson and ter Meulen, 1979).

Während der exanthemischen Phase konnten im Plasma erhöhte Werte der löslichen Formen von CD4, CD8, des Interleukin-2-Rezeptors sowie an  $\beta$ 2-Mikroglobulin nachgewiesen werden (Griffin et al., 1989; Griffin et al., 1990; Griffin et al., 1992). Weiterhin wurden kurze Zeit vor dem Auftreten sowie während des Exanthems erhöhte Werte der Zytokine Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) und

Interleukin-2 (IL-2) gefunden und kurze Zeit nach dessen Abklingen und über einen längeren Zeitraum andauernd erhöhte IL-4 Werte (Griffin and Ward, 1993).

Das Ausbleiben der Tuberkulinreaktion nach oder während einer MV-Infektion brachte erste Hinweise für das Auftreten einer Immunsuppression. Dabei handelt es sich um eine Hypersensitivitätsreaktion vom Spättyp (DTH-Reaktion, *delayed-type hypersensitivity*), deren Ausbleiben für eine Störung der zellulären Immunität spricht. Weiterhin wurde die Reaktivierung von Tuberkulose nach einer MV-Infektion beobachtet (Tamashiro et al., 1987; von Pirquet, 1908). Die Immunsuppression ist gekennzeichnet durch eine reduzierte Anzahl an Monozyten, CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen und B-Zellen (Okada et al., 2000). Weiterhin konnte in *in vitro* Experimenten gezeigt werden, dass die Proliferation von Lymphozyten nach Stimulation mit Mitogenen supprimiert ist (Arneborn and Biberfeld, 1983; Hirsch et al., 1984). Bereits der Kontakt von PBL (*peripheral blood lymphocytes*) mit MV führt zu deren Arrest in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus (McChesney et al., 1988; Yanagi et al., 1992). Besondere Bedeutung haben die beiden MV-Glykoproteine F und H. Die Expression dieser beiden Proteine auf der Oberfläche infizierter oder transfizierter Zellen ist für die Inhibition der T-Zellproliferation verantwortlich. Der Kontakt zwischen nicht-infizierten Zellen und Zellen, die den MV-Glykoproteinkomplex exprimieren reicht aus, um die Inhibition der T-Zellproliferation zu induzieren und ist unabhängig von der Virusreplikation (Niewiesk et al., 1997; Schlender et al., 1996). Andere, zum Beispiel lösliche Faktoren, sind an der Inhibition dagegen nicht beteiligt (Weidmann et al., 2000). Später konnte gezeigt werden, dass es zu einer Deregulation am Zellzyklus beteiligter Proteine kommt (Engelking et al., 1999). In T-Zellen ist der Arrest im Zellzyklus auf die Inhibition der Proteinkinase B/Akt (Avota et al., 2001) zurückzuführen. Auch die Infektion von Dendritischen Zellen (*dendritic cells*, DC) hat Auswirkungen auf die Immunantwort. Beispielsweise verlieren DC *in vitro* durch eine MV-Infektion und die Expression der MV-Glykoproteine die Fähigkeit, allogene T-Zellen zu stimulieren (Fugier-Vivier et al., 1997; Grosjean et al., 1997; Klagge et al., 2000;

Schnorr et al., 1997; Servet-Delprat et al., 2000b; Steineur et al., 1998). Weitere funktionelle Veränderungen von DC bei einer MV-Infektion werden in Abschnitt 1.2.2 beschrieben.

## 1.2 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen sind Zellen des Immunsystems, die für die Prozessierung und Präsentation von Antigenen verantwortlich sind. Sie zählen daher zu den „professionellen antigenpräsentierenden-Zellen“ (*professional antigen-presenting-cells*, APC). DC existieren in verschiedenen Aktivierungsstadien, die auf die jeweilige Aufgabe, Antigenaufnahme und Prozessierung oder Antigenpräsentation, ausgerichtet sind. Der Aktivierungszustand der DC bestimmt dabei auch die Lokalisation der Zellen in der Peripherie oder in den lymphatischen Organen.

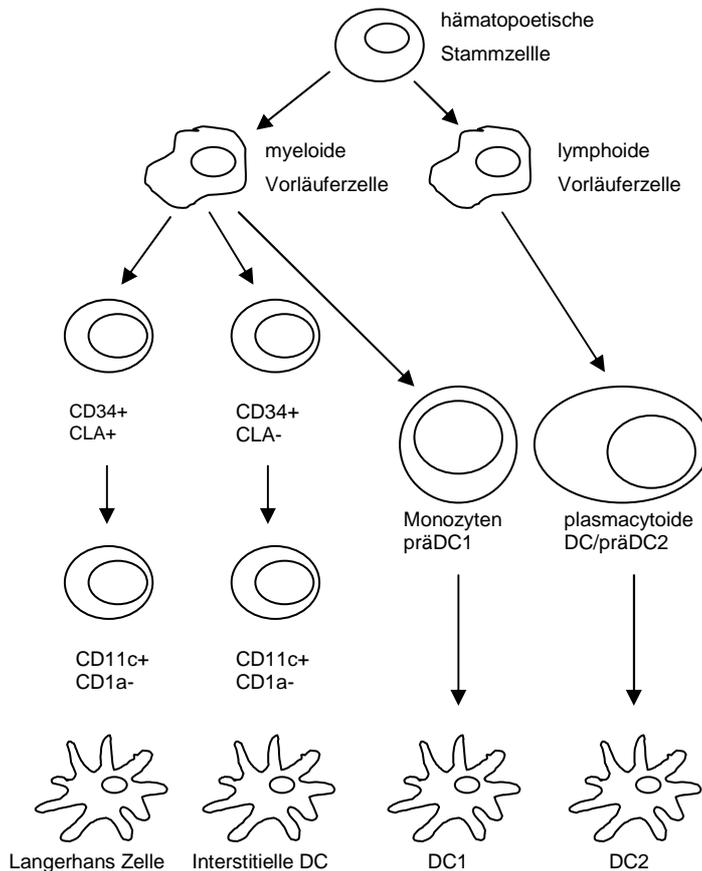
Unreife DC sind in den peripheren Geweben des Körpers lokalisiert. Durch ihr Rezeptorrepertoire sind sie für die Aufnahme von Antigenen und deren Prozessierung spezialisiert. Dazu gehören beispielsweise Fc $\gamma$ - und Fc $\epsilon$ -Rezeptoren (Sallusto and Lanzavecchia, 1994), oder auch PRR (*pattern recognition receptor*, PRR) (Janeway, 1992) wie die C-Typ-Lektin Rezeptoren DEC205 (Jiang et al., 1995), DC-SIGN (*dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule (ICAM-3) grabbing non-integrin*, DC-SIGN, CD209) (Geijtenbeek et al., 2000c) (1.4) und Toll-ähnliche Rezeptoren (*toll-like-receptors*, TLR) (Janeway and Medzhitov, 2002) (Beutler and Rietschel, 2003). Unreife DC exprimieren wenig MHC-Moleküle (*major-histocompatibility-complex*, MHC) und kostimulatorische Moleküle wie CD80, CD86 und CD40 auf der Oberfläche (Banchereau and Steinman, 1998). Von entscheidender Bedeutung für die Funktion und die Mobilität der DC ist die Expression der Chemokinrezeptoren auf der Oberfläche (siehe 1.3).

Kommt es zu einer Verletzung oder zu einer Infektion durch eindringende Pathogene, werden diese von den DC in der Peripherie des Körpers (Haut oder Schleimhäute) aufgenommen und prozessiert (Banchereau and Steinman, 1998). Infolge der Prozessierung machen die DC einen Reifungsprozess durch, der sowohl die Funktion als auch die Morphologie und die Ausstattung an Rezeptoren auf der Oberfläche der DC stark verändert. Es kommt zur Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IL-6, IL-8, IL-12, IL-18 und Chemokine (1.3), die eine Entzündungsreaktion hervorrufen und die Invasion weiterer Zellen bewirken. Dazu gehören auch Monozyten des peripheren Blutes, die daraufhin zu DC differenzieren. Reife DC verlieren die Fähigkeit, Antigene aufzunehmen, die Expression der Fc-Rezeptoren geht zurück. Die Expression anderer Oberflächenmoleküle, die für die Kostimulation und die Antigenpräsentation von Bedeutung sind, wird dagegen erhöht. Dazu gehören beispielsweise CD80 und CD86, MHC-I und MHC-II sowie Adhäsionsmoleküle (LFA-1,  $\beta$ 2-Integrine, L-Selectin) (Robert et al., 1999). Die Veränderung des Chemokinrezeptorrepertoires im Verlauf der Reifung der DC ist für die Wanderung der DC aus der Peripherie in die lymphatischen Organe und das Auslösen einer effizienten Immunantwort von besonderer Bedeutung (siehe Kap. 1.3). Aufgrund dieser Veränderungen können die DC periphere Gewebe verlassen und in die T-zellreichen Regionen der lymphatischen Gewebe migrieren, um das prozessierte Antigen T-Zellen zu präsentieren.

### 1.2.1 Entwicklung Dendritischer Zellen *in vivo* und *in vitro*

Innerhalb der DC werden verschiedene Subtypen unterschieden. Da es sich bei DC um eine Population handelt, die aufgrund ihrer geringen Anzahl im peripheren Blut nur schwer zu isolieren ist, werden für *in vitro* Experimente in der Regel Vorläuferzellen verwendet, die in Kultur genommen und durch

Zugabe bestimmter Wachstumsfaktoren und Zytokine in DC differenziert werden (s.u.).



**Abbildung 1—2: Entwicklung DC aus hämatopoetischen Stammzellen.** Unter dem Einfluss endogener Stimuli entstehen verschiedene DC-Subpopulationen. Langerhans DC und Interstitielle DC verbleiben in einem reifen aber ruhenden Zustand und benötigen zur Aktivierung exogene Stimuli (z.B. mikrobielle Produkte). Andere Linien verbleiben bis zur Aktivierung durch exogene Stimuli (z.B. virale Infektionen) in einer Art Vorläuferstadium (Monozyten, Plasmacytoide DC) und differenzieren dann zu reifen DC aus. CLA, cutaneous lymphocyte antigen; IPC, interferon producing cell; pDC precursor of DC (nach (Shortman and Liu, 2002)).

DC entstehen aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark. Dabei sind vor allem Flt-3 Ligand (*fms-like-tyrosine kinase-3*) und GM-CSF (*granulocyte-macrophage-colony stimulating factor*) entscheidende Wachstumsfaktoren (Pulendran et al., 2001). Bereits im Knochenmark differenzieren die Zellen in Vorläufer der myeloiden Linie und Vorläufer der lymphoiden Linie (Abbildung 1—2). Die Vorläufer der lymphoiden Linie differenzieren im weiteren Verlauf zu plasmacytoiden DC (auch präDC2 oder IFN produzierende DC). Die CD34<sup>+</sup>-Vorläufer der myeloiden Linie unterscheiden sich in der weiteren Entwicklung zunächst durch die Expression von CLA (*cutaneous lymphocyte*

*associated antigen*, CLA) und im weiteren Verlauf durch die Expression von CD1a (Strunk et al., 1997). Während die CLA<sup>-</sup>-Zellen sich in CD1a<sup>-</sup>-Zellen weiter entwickeln, aus denen im weiteren Verlauf interstitielle DC entstehen, differenzieren die CLA<sup>+</sup> weiter in CD1a<sup>+</sup> Zellen und schließlich in Langerhans-Zellen der Haut (Ito et al., 2001). Eine weitere Population der myeloiden Linie bilden die Monozyten (präDC1), die sich direkt aus den myeloiden Vorläufern des Knochenmarks entwickeln. Aus dieser Population entstehen unreife myeloide DC (präDC1).

Für *in vitro* Experimente bestehen verschiedene Möglichkeiten, DC aus unterschiedlichen Vorläuferzellen zu differenzieren (Shortman and Liu, 2002). Die in dieser Arbeit verwendeten DC wurden ausschließlich aus Monozyten des peripheren Bluts differenziert. In sechstägiger Kultur mit GM-CSF und IL-4 entstehen dabei DC, die sowohl die typische Morphologie als auch charakteristische Oberflächenmoleküle exprimieren (Sallusto and Lanzavecchia, 1994). Die so entstandenen DC können durch Zugabe proinflammatorischer Zytokine, wie TNF- $\alpha$  (*tumor necrosis factor*, TNF), oder bakterieller Produkte, wie LPS (Lipopolysaccharid), ausgereift werden. Sie weisen dann eine Oberflächenexpression von CD80<sup>+</sup>, CD86<sup>+</sup> und MHC<sup>high</sup> auf.

### 1.2.2 Die Rolle Dendritischer Zellen bei der Maserninfektion

Die Infektion DC im Verlauf einer MV-Infektion konnte bisher *in vivo* nicht gezeigt werden.

Reife DC exprimieren *in vitro* und *in vivo* die beiden zellulären Rezeptoren CD46 und CD150, unreife DC dagegen exprimieren *in vivo* dagegen zwar CD46, die Expression von CD150 wird jedoch erst im Zuge der Ausreifung, zum Beispiel durch LPS-Stimulation oder Ligand von CD40, induziert (Bleharski et

al., 2001). Bei *in vitro* generierten DC konnte CD150 jedoch in geringem Maße bereits auf unreifen DC nachgewiesen werden (Ohgimoto et al., 2001). Weiterhin kann die Expression von CD150 durch die MV-Infektion selbst induziert werden. Experimentell lässt sich die Infektion mit MV in DC, die aus dem peripheren Blut gewonnen oder aus Monozyten generiert wurden, gut untersuchen. Es konnte gezeigt werden, dass *in vitro* generierte DC sowohl mit verschiedenen Wildtypstämmen als auch mit Vakzinestämmen infizierbar sind (Fugier-Vivier et al., 1997; Grosjean et al., 1997; Klagge et al., 2000; Ohgimoto et al., 2001). Die Beteiligung weiterer Rezeptoren an der Bindung und Aufnahme der Viren in DC ist jedoch nicht ausgeschlossen.

Obwohl die DC *in vitro* infizierbar sind und es im Verlauf der Infektion zur Bildung von Syncytien kommt, wird nur wenig infektiöses Virus aus infizierten DC freigesetzt (Fugier-Vivier et al., 1997; Servet-Delprat et al., 2000b). Durch die Ligation von CD40 auf der Oberfläche kann die Produktion von infektiösem Virus jedoch erhöht werden (Fugier-Vivier et al., 1997; Servet-Delprat et al., 2000b). Die Infektion unreifer DC führt zu deren phänotypischer Ausreifung und damit zu einer erhöhten Expression von Aktivierungs- und Reifungsmarkern, wie MHC II, CD40, CD80, CD86 sowie CD83 und CD25 auf der Oberfläche (Klagge et al., 2000; Schnorr et al., 1997; Servet-Delprat et al., 2000b). Die Infektion mit dem Wildtypvirus WTF (Wildtyp Fleckenstein) verläuft effizienter und induziert eine schnellere Ausreifung als die Infektion mit dem Vakzinestamm Edmonston (ED) (Schnorr et al., 1997).

Für die Infektion mit dem Vakzinestamm ED wurde gezeigt, dass die Ausreifung der DC durch einen löslichen Faktor im Überstand infizierter Kulturen ausgelöst werden kann (Klagge et al., 2000). Die Induktion von Typ-I-Interferonen spielt dabei eine wichtige Rolle (Klagge et al., 2000). Für PBMC-Kulturen (*peripheral blood monocytes*, PBMC) wurde postuliert, dass sich die Induktion von Typ-I-Interferonen auf die Infektion mit Vakzinestämmen beschränkt (Naniche et al., 2000). Typ-I-Interferone sind bei der Abwehr viraler Infektionen von großer Bedeutung (Taniguchi and Takaoka, 2002) und ihre Produktion steht mit der Expression des TLR 3 in Zusammenhang. TLR 3 wird unter anderem auf aus Monozyten generierten DC exprimiert und interagiert mit doppelsträngiger RNA,

die während der Replikation verschiedener Viren entsteht und in der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren IRF 3 (*interferon regulatory factor*, IRF) und IRF 7 resultiert (Alexopoulou et al., 2001). Die Aktivierung von TLR 3 wurde für MV-Vakzinestämme, jedoch nicht für Wildtypviren, als Folge der IFN-Induktion (Tanabe et al., 2003) beschrieben.

Ein weiteres wichtiges proinflammatorisches Zytokin ist IL-12, dessen Rolle bei der MV-Infektion bisher kontrovers diskutiert wird. Einerseits konnte die Produktion von funktionellem IL-12p70 nach der Infektion von DC, die aus peripherem Blut isoliert wurden, nachgewiesen werden (Schnorr et al., 1997). In anderen Experimenten dagegen wurde die Bildung von IL-12p35- und IL-12p40-Transkripten in MV-infizierten DC-Kulturen im Vergleich zu LPS-behandelten oder mit CD40-Ligand behandelten DC untersucht (Servet-Delprat et al., 2000b). Dabei wurde gezeigt, dass die Menge an IL-12p35 und IL-12p40 mRNA in MV-infizierten DC-Kulturen, die zusätzlich mit CD40-Ligand behandelt wurde reduziert ist gegenüber der durch CD40-Ligation allein induzierten mRNA-Menge. In Monozyten wurde beobachtet, dass der Kontakt mit Masernviren die IL-12-Produktion durch Kreuzvernetzung des CD46-Rezeptors inhibiert (Karp et al., 1996).

### 1.3 Chemokine und Chemokinrezeptoren

Bei Chemokinen handelt es sich um kleine, sekretierte Proteine mit einer Größe von 67 bis 127 Aminosäuren. Bisher sind nur zwei membrangebundene Chemokine (CXCL-16, CX<sub>3</sub>CL-1) bekannt (Moser et al., 2004). Anhand ihrer Proteinstruktur werden die Chemokine in zwei Hauptgruppen unterteilt. Man unterscheidet die CXC-Chemokine ( $\alpha$ -Chemokine) von den CC-Chemokinen ( $\beta$ -Chemokinen). In der Gruppe der CXC-Chemokine sind die zwei aminoterminal vorkommenden Cysteinreste durch eine variable andere Aminosäure voneinander getrennt, während die Cysteinreste in der Gruppe der CC-

Chemokine direkt benachbart sind. Strukturell werden zwei weitere Gruppen unterschieden: Die C-Chemokine ( $\gamma$ -Chemokine) mit nur einem Cysteinrest und die CX<sub>3</sub>C-Chemokine ( $\delta$ -Chemokine), in der zwei Cysteinreste durch drei variable Aminosäuren voneinander getrennt sind.

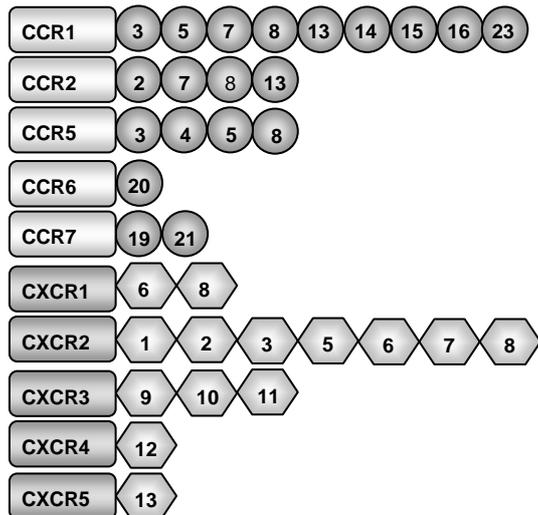
Innerhalb der Aminosäuresequenz der Chemokine gibt es konservierte Regionen, die in der aminoterminalen Domäne vorliegen (Clark-Lewis et al., 1995; Loetscher and Clark-Lewis, 2001). Besonders das ELR-Motiv (Glu-Leu-Arg), das vor dem ersten Cysteinrest der CXCL-Chemokine lokalisiert ist, ist für die Aktivierung von CXCR1 und CXCR2 von Bedeutung. In verschiedenen Untersuchungen wurde gezeigt, dass für die Aktivierung anderer Rezeptoren weitere Erkennungsstellen erforderlich sind, die kurz hinter dem zweiten bzw. direkt vor dem dritten Cysteinrest lokalisiert sind (Clark-Lewis et al., 1993). Trotz vieler Analogien in den Sequenzen verschiedener Chemokine, konnte das Verhältnis zwischen Struktur des Chemokins und Aktivierung des Rezeptors bisher nicht geklärt werden.

Chemokine sind nicht nur bei der Entwicklung verschiedener Zellen des Immunsystems von Bedeutung, sie gelten auch als besonders wichtig bei der Wanderung (Migration) von Leukozyten. Funktionell werden „inflammatorische“ und „homeostatische“ Chemokine unterschieden. Während die Gruppe der inflammatorischen Chemokine die Rekrutierung von Zellen in entzündliches Gewebe verursacht, sind die homeostatischen Chemokine für die Bewegung der Zellen während der Hämatopoese im Knochenmark und Thymus sowie die Initiation von Immunantworten in der Milz und den Lymphknoten verantwortlich.

Einige Chemokine haben sowohl inflammatorische als auch homeostatische Eigenschaften.

Chemokine interagieren mit Rezeptoren, die zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehören (Loetscher et al., 2000) (Baggiolini et al., 1994; Murphy et al., 2000). Dabei führen die Phosphorylierung an Tyrosinresten sowie die Internalisierung der Rezeptoren zu einem kurzfristigen Verlust der Sensitivität gegenüber den jeweiligen Chemokinen. Die Tyrosinphosphorylierung führt unter

anderem zur Aktivierung der *focal adhesion kinase* (FAK) und der *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) (Sato et al., 2001).



**Abbildung 1—3 Interaktion verschiedener Chemokine mit ihren Rezeptoren.** Kreise stehen für CC-Chemokine, Sechsecke stehen für CXC-Chemokine, Zahlen in den Symbolen entsprechen den jeweiligen Zahlen der Chemokinnomenklatur (verändert nach (Baggiolini, 2001)).

### 1.3.1 Chemokinrezeptoren auf Dendritischen Zellen

In ihren verschiedenen Entwicklungsstadien sind DC mit unterschiedlichen Chemokinrezeptoren ausgestattet. Während der Reifung der DC ändert sich das Rezeptorrepertoire auf der Oberfläche der DC stark (Sallusto et al., 1998c). Auf unreifen DC werden vorwiegend die Chemokinrezeptoren 1 (CCR1), CCR2, CCR5 und CCR6 sowie CXCR1, CXCR2 und CXCR3 exprimiert, deren Liganden inflammatorische Chemokine sind. Diese Ausstattung ermöglicht es den DC, auf inflammatorische Zytokine im Gewebe ihrerseits mit der Produktion

inflammatorischer Chemokine wie CCL-2, CCL-3, CCL-4, CCL-5, CCL-20 sowie CXCL-8, CXCL-9, CXCL-10, CXCL-11 zu reagieren und dadurch weitere Zellen an den Ort der Infektion zu locken. Gleichzeitig wird durch Pathogenkontakt bzw. –Aufnahme sowie durch Substanzen wie LPS, TNF- $\alpha$  oder IL1- $\beta$  die Reifung der DC induziert. Die mRNA-Synthese von beispielsweise CCR1 und CCR5 und damit auch die Expression von CCR1, CCR3, CCR5 und CCR6 geht zurück (Delgado et al., 1998; Lin et al., 1998; Sozzani et al., 1998). Dagegen wird die Synthese der CCR7 und CXCR4 mRNA verstärkt (Sallusto et al., 1998c). Weiterhin wird auf reifen DC CXCR5 exprimiert. Die veränderte Rezeptorexpression ermöglicht es den DC, die entzündlichen Gewebe zu verlassen und in die regionalen Lymphknoten zu gelangen, in denen homeostatische Chemokine gebildet werden.

Von besonderer Bedeutung sind dabei die konstitutiv gebildeten Chemokine CCL-19 und CCL-21 sowie CXCL-12. CCL-19 und CCL-21 vermitteln sowohl die Migration naiver T-Zellen, als auch reifer DC über CCR7 (Chan et al., 1999; Dieu et al., 1998; Kellermann et al., 1999; Saeki et al., 1999; Sallusto et al., 1998c; Sozzani et al., 1998) Unreife DC zeigen dagegen keinerlei chemotaktische Aktivität gegenüber diesen beiden Chemokinen (Caux et al., 2002). CCL-21 wird vorwiegend von postkapillären Venolen mit hohem Endothel (*high endothelial venules*, HEV) exprimiert (Dieu-Nosjean et al., 1999; Gunn et al., 1998) und ist für die Diapedese von Lymphozyten aus den Venolen in die Cortexregion der Lymphknoten verantwortlich. Weiterhin ist CCL-21 an der Integrin-vermittelten Adhesion naiver Lymphozyten an Endothelzellen beteiligt, CCR7 exprimierende T-Zellen gelangen dadurch in die Lymphknoten. CCL-19 dagegen wird vorwiegend von Stromazellen in den T-Zellregionen der sekundären lymphatischen Organe (Milz, Lymphknoten, Peyerschen Plaques) produziert. Reife DC, die sich in den T-Zellzonen der Lymphknoten befinden, produzieren ebenfalls CCL-19 (Ngo et al., 1998).

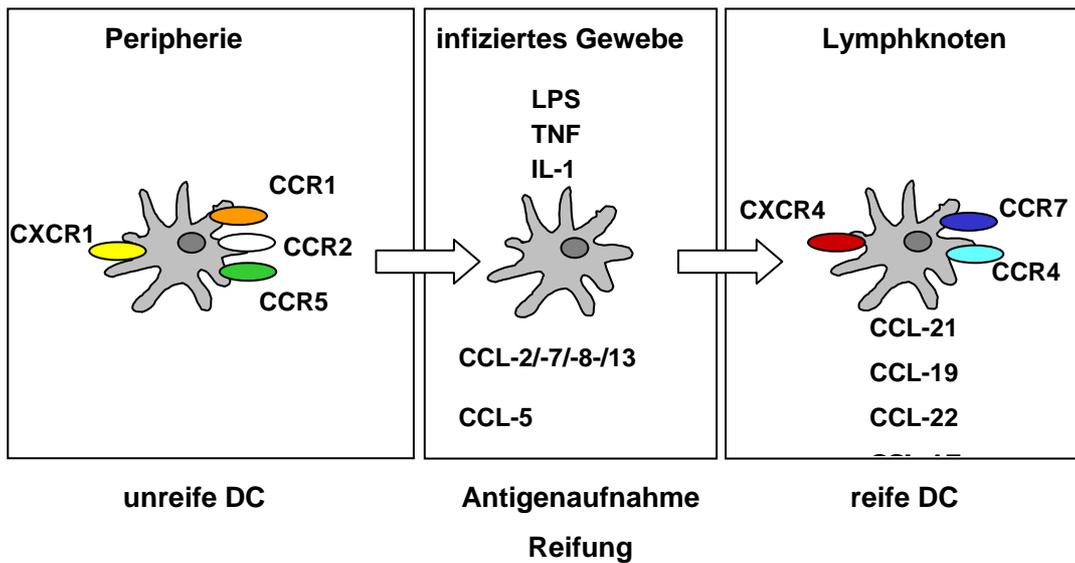


Abbildung 1—4: Wanderung Dendritischer Zellen in verschiedenen Geweben im Verlauf der Reifung und Abhängigkeit zur Veränderung der Rezeptorexpression (verändert nach (Baggiolini, 2001)).

Chemokine rufen chemotaktische Bewegungen hervor z.B. indem sie die Polarisierung von T-Zellen induzieren. Durch den Einfluss der Chemokine auf Zytoskelett-assoziierte Strukturen kommt es zur Polarisierung der T-Zellen. Dabei werden bestimmte Moleküle auf der Oberfläche der Zellen so organisiert, dass sich eine Frontseite (*leading edge*) und ein Uropod ausbilden. Am *leading edge* entsteht so beispielsweise eine erhöhte Sensitivität gegenüber der Stimulation des T-Zellrezeptor (Negulescu et al., 1996; Wei et al., 1999).

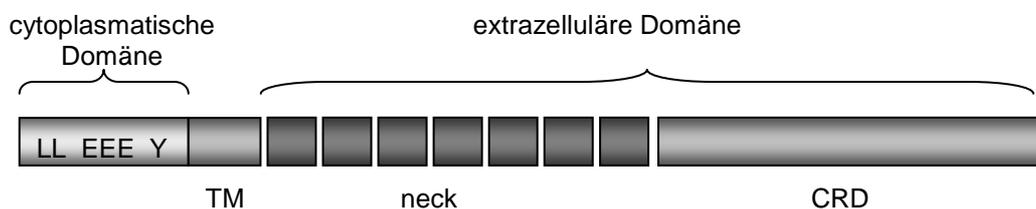
## 1.4 Struktur und Funktion des Oberflächenmoleküls DC-SIGN

DC exprimieren eine Reihe verschiedener Oberflächenmoleküle, die für die Erkennung von Pathogenen von Bedeutung sind (1.2). Zu den so genannten PRR gehört neben der Gruppe der TLR die Gruppe der C-Typ-Lektine. Auf der Oberfläche von DC werden je nach Aktivierungszustand und Herkunft der DC unterschiedliche C-Typ-Lektine und TLR exprimiert (Figdor et al., 2002). Dabei wird das C-Typ-Lektin DC-SIGN auf der Oberfläche sowohl myeloider DC im Blut als auch aus Monozyten entstandener DC im Gewebe exprimiert (Figdor et al., 2002). Weiterhin wurden andere C-Typ-Lektine beschrieben, die ebenfalls auf DC exprimiert werden. Dazu gehören unter anderem der Mannose Rezeptor (CD206) (Sallusto et al., 1995), DEC 205 (CD205) (Kato et al., 2000) und BDCA-2 (*Blood DC-Antigen-2*, BDCA-2) (Dzionek et al., 2001). Das Oberflächenmolekül L-SIGN (*DC-SIGN-related*, DC-SIGNR, CD209L) ist ein Homolog von DC-SIGN wird jedoch nicht auf DC, sondern auf sinusoidalen Leberendothelzellen exprimiert (*liver sinusoidal endothelial cells*, LSEC).

Sowohl TLR als auch C-Typ-Lektine erkennen bestimmte Strukturen von Pathogenen. Während TLR nach der Erkennung bestimmter Strukturen von Pathogenen, zum Beispiel LPS oder bakterieller DNA (Janeway and Medzhitov, 2002) über eine intrazelluläre Signalkaskade die Reifung der DC sowie die Produktion von Zytokinen induzieren, binden C-Typ-Lektine spezifische Carbohydratstrukturen von Pathogenen und internalisieren diese. Anschließend werden die Pathogene in den Lysosomen degradiert und prozessiert. Dadurch wird der Vorgang der Antigenprozessierung und -präsentation der DC verstärkt (Figdor et al., 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle des C-Typ-Lektins DC-SIGN bei der Infektion von DC mit MV untersucht. Aus diesem Grund wird im Folgenden nur auf die Struktur und Funktion von DC-SIGN eingegangen.

DC-SIGN ist ein Typ-II-Transmembranprotein. Es besteht aus einer extrazellulären Carbohydrat-Erkennungsdomäne (*carbohydrate recognition domain*, CRD) (Weis et al., 1998). Die CRD-Domäne bildet eine globuläre Struktur, auf der zwei Calciumbindungsstellen lokalisiert sind. Eine dieser Calciumbindungsstellen ist für die Faltung der CRD-Domäne, die andere für die Bindung der Carbohydratstruktur verantwortlich ist (Geijtenbeek et al., 2002). An die CRD-Domäne schließt sich eine so genannte *neck*-Region an; diese besteht aus sieben sich wiederholenden Strukturen, die für die Oligomerisierung des Proteins von Bedeutung sind und dadurch die Spezifität für verschiedene Carbohydrate beeinflussen (Mitchell et al., 2001). Die folgende Transmembrandomäne ist mit einer cytoplasmatischen Domäne verbunden, die zwei Internalisierungssignale sowie Signalsequenzen für den Transport in die Lysosomen bzw. späte Endosomen beinhaltet (Engering et al., 2002a).



**Abbildung 1—5 DC-SIGN-Struktur:** Die globuläre CRD-Struktur besteht aus 12- $\beta$ -Faltblättern, 2  $\alpha$ -Helices und 3 Disulfidbrücken. Die CRD-Domäne von DC-SIGN ist für die Bindung von Carbohydratresten verantwortlich und besitzt 2 Calciumbindungsstellen. Die Transmembrandomäne besitzt 7 komplette Tandemwiederholungen. Die „neck“-Struktur ist an der Oligomerisierung beteiligt. Die Transmembrandomäne enthält Internalisierungs- sowie weitere Signalmotive. TM, Transmembrandomäne; CRD, carbohydrate recognition domain; LL, Di-Leucin Motiv; EEE, dreifach Cluster saurer Aminosäuren, Y: nicht vollständiges ITAM-Motiv (*immunoreceptor tyrosin based motif*, ITAM) (Quelle: (van Kooyk and Geijtenbeek, 2003)).

Neben der Antigenaufnahme (s. o.) hat DC-SIGN auch Funktionen bei der Regulation der Immunantwort durch DC. Ursprünglich wurde DC-SIGN als Ligand von ICAM-3 (*intercellular adhesion molecule-3*, ICAM-3) beschrieben

(Geijtenbeek et al., 2000c) und spielt damit bei der Adhäsion eine entscheidende Rolle. Bei weiteren Untersuchungen wurde festgestellt, dass DC-SIGN ebenfalls an ICAM-2 (CD102) bindet, nicht jedoch an ICAM-1 (CD54) (Geijtenbeek et al., 2000a). Diese Adhäsionsmoleküle werden auf der Oberfläche von Endothelien exprimiert und ermöglichen Zellen den Wechsel aus dem Blutsystem in periphere Gewebe durch die Interaktion mit LFA-1 (*lymphocyte function associated antigen-1*, LFA-1). DC und ihre Vorläufer wechselwirken zunächst mit ICAM-2, das auf der Gefäßwand exprimiert wird. Dadurch wird das so genannte „Rollen“ der Zellen an der Gefäßwand ermöglicht, bevor die Zellen an dieser verankert werden und durch die Endothelzellschicht ins Gewebe eindringen können. Nicht nur DC, die im Blut nur in geringer Anzahl vorkommen, können so ins Gewebe gelangen, sondern auch periphere Blutmonozyten, die ebenfalls DC-SIGN positiv sind, können auf diese Weise ins Gewebe an den Ort einer Infektion gelangen (Engering et al., 2002b; Figdor et al., 2002).

Weiterhin ist DC-SIGN an der Bildung der Immunologischen Synapse (IS) (1.5) zwischen DC und T-Zellen beteiligt. Die Wechselwirkung zwischen ICAM-3 auf der Oberfläche der T-Zelle und DC-SIGN stabilisiert dabei die Bindung zwischen T-Zelle und DC und ermöglicht somit auch eine bessere Bindung zwischen MHC-Molekül und T-Zellrezeptor (siehe 1.5).

Des Weiteren können Bakterien wie *Mycobacterium tuberculosis* (Geijtenbeek et al., 2003), *Helicobacter pylori* (Appelmek et al., 2003), Hefen, Pilze wie *Candida albicans* (Cambi et al., 2003), Parasiten wie zum Beispiel *Leishmania amastigotes* (Colmenares et al., 2002) und Viren wie das Ebolavirus (Alvarez et al., 2002), das humane Cytomegalovirus (HCMV) (Halary et al., 2002), Hepatitis C (Gardner et al., 2003; Lozach et al., 2003; Pohlmann et al., 2003) und Denguevirus (Navarro-Sanchez et al., 2003; Tassaneetrithep et al., 2003) DC-SIGN als Bindungs- oder Eintrittsrezeptor benutzen. Besonders gut untersucht ist Wechselwirkung zwischen dem humanen Immundefizienzvirus (HIV) und DC-SIGN. Das von den DC internalisierte Virus entgeht dabei dem lysosomalen

Abbau (Geijtenbeek et al., 2000b) und wird mit den DC in die Lymphknoten transportiert, wo es auf seine eigentlichen Zielzellen (CD4<sup>+</sup>-T-Zellen) trifft und diese *in trans* infizieren kann (Geijtenbeek et al., 2000b; Kwon et al., 2002). Bei der Übertragung von HIV gehören DC zu den ersten Zellen, die mit dem Virus in Kontakt kommen. Die hochaffine Bindung des gp120-Glykoproteins an DC-SIGN ermöglicht einen effizienten Transport kleinster Virusmengen in die lymphoiden Organe. Der Mechanismus, der dazu führt, dass beispielsweise an DC-SIGN gebundene Antikörper internalisiert und in lysosomalen Kompartimenten abgebaut werden, gebundene Viruspartikel der Prozessierung aber entgehen, ist bisher unbekannt (Engering et al., 2002a). Die gebundenen Viruspartikel sind stabil und behalten ihre Infektiosität über mehrere Tage. Die Bindung an DC-SIGN ermöglicht nicht nur die Übertragung des Virus auf T-Zellen, sondern verstärkt zusätzlich deren Infektion. Bei geringen Viruskonzentrationen können T-Zellen ohne die Hilfe von DC-SIGN nicht infiziert werden. Neuere Studien zeigen jedoch, dass die Übertragung der HI-Viren auf T-Zellen nicht von DC-SIGN abhängig ist, sondern ausschließlich durch die Infektion DC mit der Neubildung von Viruspartikeln und durch deren Fusion mit den Wirtszellen stattfindet (Burleigh et al., 2006).

## 1.5 Immunologische Synapse

In den T-zellreichen Regionen der Lymphknoten werden prozessierte Antigene über den MHC-Peptid-Komplex T-Zellen präsentiert. Um eine effiziente Immunantwort auszulösen, werden Kontakte zwischen DC und T-Zelle hergestellt, die in der Aktivierung der T-Zelle resultieren (Banchereau and Steinman, 1998; Inaba et al., 1984). Dabei kontaktieren die T-Zellen die eindringenden DC und suchen deren Oberfläche nach MHC-Antigenkomplexen ab (*scanning*). Analog zu den Kontaktzonen zwischen Nervenzellen bezeichnet

man die Kontaktzone zwischen DC und T-Zellen als „Immunologische Synapse“ (IS) (Grakoui et al., 1999) (Paul and Seder, 1994).

Im Verlauf eines DC-T-Zellkontakts kommt es zu einer Umverteilung der zellulären Rezeptoren sowie zur Rekrutierung von Signalmolekülen und zur Veränderung des Zytoskeletts (Dustin and Shaw, 1999; Grakoui et al., 1999). Die dabei entstehenden hoch organisierten Strukturen werden als SMAC (*supramolecular activation cluster*) bezeichnet. Sie bestehen aus einem peripheren Ring (*peripheral SMAC*, pSMAC), in dem sich, auf der T-Zellseite, Integrine wie LFA-1 und, auf der Seite der DC, dessen Interaktionspartner ICAM-1 befinden. Weiterhin orientieren sich Komponenten des Cytoskeletts zur Kontaktzone. Das Zentrum dieses Clusters (*central SMAC*, cSMAC) bilden T-Zellrezeptoren (*T-cell receptor*, TCR), Signalmoleküle wie die Proteinkinase C $\theta$ , Lck, Fyn, ZAP-70 (*zeta-associated protein-70*, ZAP-70) und das akzessorische Molekül CD28 sowie die MHC-Peptidkomplexe auf der Oberfläche der DC (Grakoui et al., 1999; Monks et al., 1998; Wulfing and Davis, 1998). Die strukturelle Unterscheidung zwischen cSMAC und pSMAC ergibt sich durch die verschiedenen Größen und den sich daraus ergebenden Abständen der interagierenden Moleküle. So beträgt der Abstand zwischen T-Zellrezeptor und MHC-Molekül beispielsweise etwa 15 nm (Garboczi et al., 1996), während der Abstand zwischen LFA-1 und ICAM-1 etwa 40 nm beträgt (Dustin and Chan, 2000). Der hier beschriebene stabile Kontakt zwischen T-Zelle und DC mit einer strikten Trennung von Signalmolekülen und Adhäsionsmolekülen wird auch als „monozentrische Synapse“ bezeichnet. Über die Dauer eines funktionellen Kontaktes zwischen DC und T-Zelle gibt es kontroverse Ansichten. Zum einen wurden langanhaltende stabile Kontakte beschrieben. Dabei konnten adhäsive Kontakte von mehreren Stunden zwischen naiven T-Zellen und APC bis zur vollständigen Aktivierung beobachtet werden, aber auch Kontakte von etwa einer Stunde zwischen Effektor-T-Zellen und APC, die ebenfalls zur Aktivierung der T-Zellen führten (Iezzi et al., 1998). In anderen Studien wurden dagegen viele kurzlebige, dynamische Kontakte beschrieben, die ebenfalls zur Aktivierung der T-Zellen führten. Diese dynamischen Kontakte zwischen DC und T-Zellen können anhand eines *in vitro* Modells untersucht werden. Dabei

werden DC und T-Zellen in einer dreidimensionalen Kollagenmatrix gemischt und die entstehenden Kontakte videomikroskopisch analysiert. Bisherige Untersuchungen haben gezeigt, dass naive T-Zellen eine Vielzahl kurzer Kontakte mit mehreren DC ausbilden, die in einer erhöhten Expression von Aktivierungsmarkern sowie der Bildung von T-Zellblasten und Proliferation der T-Zellen resultieren (Gunzer et al., 2000). Die Dauer eines einzelnen Kontakts liegt durchschnittlich zwischen drei und 20 Minuten. Zu einer T-Zellaktivierung kommt es nur nach einem spezifischen Kontakt. (Friedl and Gunzer, 2001; Gunzer et al., 2000).

Die Interaktion zwischen DC und T-Zellen wird durch die Wirkung von Chemokinen verstärkt (Tybulewicz, 2002). Chemokine können beispielsweise die Affinität von Adhäsionsmolekülen wie LFA-1 beeinflussen und damit die Bindung an ICAM-1 verstärken. Dadurch kommt es zu einer generellen Stabilisierung der DC/T-Zell-Konjugate (Bromley and Dustin, 2002; Constantin et al., 2000).

Im Gegensatz zur stabilen Synapse unterscheidet man die dynamische Synapse. Dabei handelt es sich um eine migratorische Verbindung zwischen T-Zellen und DC, zu deren Bildung es kommt, wenn der initiale Kontakt nicht zur Entstehung einer festen, „reifen“ Synapse führt. Die amöboide Bewegung der T-Zelle auf der Oberfläche der DC führt zur Ausbildung einer mobilen Kontaktzone zwischen den beteiligten Zellen, die eine peptidspezifische Antigenerkennung ermöglicht und ebenfalls T-Zellrezeptorstimulation und Signalleitung induziert. Diese dynamische Form des DC-T-Zellkontaktes wurde bereits in *in vitro* und *in vivo* Modellen beschrieben (Gunzer et al., 2000; Mempel et al., 2004; Miller et al., 2004). Die genaue molekulare Zusammensetzung dieser mobilen Kontaktzone ist bisher weitestgehend ungeklärt.

Anhand verschiedener mikroskopischer Analysemethoden wurden weitere Varianten der IS identifiziert.

Dazu gehört die „sekretorische Synapse“, die bei cytotoxischen T-Lymphozyten (*cytotoxic T-lymphocytes*, CTL) oder Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) vorkommt sowie die *non-segregated* (nicht-geteilte) Synapse, in der es zu einer Ansammlung von T-Zellrezeptor und Signalmolekülen in der Kontaktzone kommt. In dieser Form der Synapse bleibt die Verteilung der beteiligten Moleküle aber diffus. Zur Ausbildung dieser unspezifischen Form der IS kommt es beispielsweise, wenn die beteiligte DC nicht das passende Peptid präsentiert, sie führt weiterhin nur zu eingeschränkter Signalleitung (z. B. Tyrosinphosphorylierung) (Revy et al., 2001; Wulfiging et al., 2002). In der multizentrischen Synapse kann keine exakte Trennung von cSMAC und pSMAC festgestellt werden. Es entstehen kleinere Strukturen von etwa 1 Mikrometer Durchmesser aus T-Zell-Rezeptor und CD3-Molekülen (Bromley et al., 2001). Die Stimulation des T-Zellrezeptors resultiert ebenfalls in der Aktivierung von Signalleitungsmolekülen wie ZAP-70 (Blanchard et al., 2002), Tyrosinphosphorylierung und Calciuminflux (Zaru et al., 2002).

## 1.6 Ziele der Arbeit

DC sind in der Peripherie des Körpers lokalisiert, um eindringende Pathogene aufzunehmen und in die lymphatischen Organe zu transportieren. Sie sind dadurch maßgeblich an der Entstehung einer effizienten Immunantwort beteiligt. Die Dynamik dieser Prozesse wird besonders durch das Expressionsmuster verschiedener Chemokinrezeptoren auf der Oberfläche der DC sowie die Expression ihrer Liganden in verschiedenen Geweben des Körpers beeinflusst.

Das auf der Oberfläche von DC exprimierte Molekül DC-SIGN hat zu verschiedenen Zeitpunkten und an verschiedenen Orten wichtige Funktionen bei der Aufnahme und Prozessierung von Antigenen sowie der Migration der DC und ist an der Stabilisierung der Immunologischen Synapse zwischen DC

und T-Zellen beteiligt. Bei der Interaktion von DC-SIGN mit verschiedenen viralen, bakteriellen und parasitären Krankheitserregern wurden bisher verschiedene Formen der Modulation der DC-Funktionen beschrieben.

Am Ende der Migration der DC aus der Peripherie des Körpers in die lymphatischen Organe steht die Bildung der Immunologischen Synapse zwischen DC und T-Zelle. Dabei kommt es zur Aktivierung und Proliferation der T-Zellen und zur Entstehung einer effektiveren Immunantwort.

In der vorliegenden Arbeit sollten verschiedene Aspekte der MV induzierten Immunmodulation in DC untersucht werden. Wie aus früheren Untersuchungen bekannt, führt die Infektion von DC mit MV zur phänotypischen Ausreifung der DC (Klagge et al., 2000; Schnorr et al., 1997; Servet-Delprat et al., 2000b). Diese Untersuchungen beschäftigten sich mit der Expression kostimulatorischer Moleküle und deren Regulation auf der DC-Oberfläche. Weiterhin ist bekannt, dass der MV-Glykoproteinkomplex auf der Oberfläche der DC einen Proliferationsarrest in T-Zellen auslöst (Engelking et al., 1999). Konsequenzen bei der Kontaktdauer zwischen infizierten DC und T-Zellen wurden bisher noch nicht untersucht.

Die Regulation der Chemokinrezeptoren sowie funktionelle Konsequenzen auf das migratorische Verhalten, die Interaktion mit dem Oberflächenmolekül DC-SIGN sowie die Kontaktdauer MV-infizierter DC mit T-Zellen in dreidimensionalen Kollagenmatrices waren zentrale Fragestellungen dieser Arbeit.

## 2 Material

### 2.1 Zellen

#### 2.1.1 Zelllinien

Die verwendeten Zellen waren am Institut verfügbar oder wurden vom Medizinischen Zentrum, Abteilung für Molekulare Zellbiologie und Immunologie der Vrije Universität, Amsterdam zur Verfügung gestellt.

Die Hybridomzelllinien zur Herstellung monoklonaler Antikörper gegen Proteine des MV (anti-H, anti-F, anti-N) sowie gegen die Eintrittsrezeptoren des Virus (anti-CD46 und anti-CD150) (s.a. Tabelle 2.6—1) wurden in RPMI 1640, 10 % FKS (fötales Kälberserum) kultiviert. Die Hybridomzelllinien wurden am Institut für Virologie, Universität Würzburg, hergestellt.

#### 2.1—1: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Zelltyp	Medium	Herkunft
CHO	Epithelzelle (Ovar), Chinesischer Hamster ( <i>Cricetulus griseus</i> )	MEM, 5 % FKS	(Puck et al., 1958)
CHO-5.3	Epithelzelle (Ovar), Chinesischer Hamster ( <i>Cricetulus griseus</i> ) stabil transfiziert mit CD46	MEM, 5 % FKS	(Loveland et al., 1993)
CHO- CD150	Epithelzelle (Ovar), Chinesischer Hamster ( <i>Cricetulus griseus</i> ) stabil transfiziert mit CD150	MEM, 5 % FKS	(Erlenhoefer et al., 2001)
CHO- DC-SIGN	Epithelzelle (Ovar), Chinesischer Hamster ( <i>Cricetulus griseus</i> ) stabil transfiziert mit DC-SIGN	RPMI 1640, 10 % FKS 1mg/ml G418	(Geijtenbeek et al., 2000b)

Zelllinie	Zelltyp	Medium	Herkunft
CHO 3E10hTLR2	Epithelzelle (Ovar), Chinesischer Hamster ( <i>Cricetulus griseus</i> )	HAM'S F12, 10 % FKS, 400U/ml Hygromycin, 0,5 mg/ml G418	(Medvedev et al., 2001)
BJAB	B-Zelllinie, lymphoblastoid (human)	RPMI 1640, 10 % FKS	(Menezes et al., 1975)
Vero	Fibroblastenzelllinie (Niere), (afrikanische grüne Meerkatze, ( <i>Cercopithecus aethiop</i> )	MEM, 5 % FKS	(Yasumura and Y, 1963)
B95a	B-Zelllinie , EBV transformiert, Krallenaaffe ( <i>Callithrix jacchus</i> )	RPMI 1640, 5 % FKS	(Kobune et al., 1990)
Raji/Raji-DC-SIGN	humane B-Zelllinie, stabil transfiziert mit DC-SIGN	RPMI, 10 % FKS	(Wu et al., 2004)
Meljuso-F/-H	humane Melanomzelle , stabil transfiziert mit ED F oder H Genen	RPMI, 10 % FKS	(de Swart et al., 1998)

### 2.1.2 Primäre Zellen

Die verwendeten primären Zellen wurden aus Leukozytenkonzentrat isoliert. Das Leukozytenkonzentrat wurde aus dem Blut gesunder Spender am Institut für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie, Universitätsklinik Würzburg, gewonnen. Die Kultur der primären Zellen erfolgte in RPMI 1640, 10 % FKS.

## 2.2 Viren

Alle in dieser Arbeit verwendeten Viren waren im Institut vorhanden. Das rekombinante ED-eGFP (*enhanced green fluorescent protein*, eGFP) exprimiert das Reporterogen von einer zusätzlichen Transkriptionseinheit, die vor der

codierenden Sequenz des viralen Nukleokapsids lokalisiert ist (Duprex et al., 1999).

**Tabelle 2.2—1 verwendete Viren**

Virus	Verwendeter Rezeptor	Anzucht auf
Wildtyp Fleckenstein (WTF)	CD46 CD150	BJAB
Vakzinestamm Edmonston (ED)	CD46	Vero
Edmonston-eGFP (ED-eGFP)	CD46	Vero

### 2.3 Zellkulturmedien und Zusätze

Ciprofloxacin

FKS

Genitacin-G418

HAM's F12

MEM

Migrationsmedium

RPMI 1640

1 % FKS

Il-4 (500 U/ml)

GM-CSF (250 U/ml)

Chemokine

Penicillin/Streptomycin

100 I.E./ml

RPMI 1640

Die Zellkulturmedien wurden in der Medienküche des Instituts für Virologie hergestellt (RPMI, MEM) oder von den Firmen PAA (HAM's F12) oder Biochrom (FKS) gekauft.

## 2.4 Oligonukleotide

Oligo dT Primer	Promega
Random Primer	Promega

Tabelle 2.4—1 Oligonukleotide

Chemokin-Rezeptoren:

Chemokin-Rezeptor	Vorwärts-Primer 5'	Rückwärts-Primer 5'	Produkt
CCR 7	CTCAAGACCATGA CCGATACC	TGAAGAGCTTGAAG AGATCGTTGC	759bp

Quelle: (Prechtel et al., 2005)

## Chemokine:

Chemokine	Vorwärts-Primer 5'	Rückwärts-Primer 5'	Produkt
CCL1 : I-309	GTGGTGAGCTCTTA GCTTCACC	ACCAAGCAGATCCT CTGTGACC	460 bp
CCL2 : MCP-1	CGAGAGGCTGAGAC TAACCC	GGGTTGTGGAGTGA GTGTTC	384 bp
CCL3 : MIP-1 $\alpha$	CGAGCCCACATTCC GTCACC	CGCATGTTCCCAAG GCTCAGG	390 bp
CCL4 : MIP-1 $\beta$	ATTCCGCTCCCTCA CCTCTG	CACATCGCACTCCC TTCATA	451 bp
CCL5 : Rantes	CCCCGTGCCACAT CAAGGAGT	TCAAGGAGCGGGTG GGGTAGGA	257 bp
CCL17 : TARC	CCTCCTCCTGGGGG CTTCTCTG	GACTTTAATCTGGG CCCTTTGTGC	445 bp
CCL18 : PARC	TGCCCTCCTTGTC TCGTCTG	GAAGGGAAAGGGGA AAGGATG	490 bp
CCL19 : ELC	ATGGCCCTGCTACT GGCCCTC	GCTCCCTCTGCACG GTCATAG	285 bp
CCL20 : LARC	TTGCTCCTGGCTGC TTTGATG	TCTTTCTGTTCTTGG GCTATG	300 bp
CCL21 : SLC	AGCCTCCTTATCCT GGTTCTG	TTACAAGGAAGAGG TGGGGTG	680 bp
CCL22 : MDC	GCATGGATCGCCTA CAGACT	GCAGGGAGGGAGG CAGAGGA	497 bp
CCL25 : TECK	AACCTGTGGCTCCT GGCCTGC	GGCTCACAGTCCTG AATTAGC	400 bp
CXCL8 : IL-8	ATGACTTCCAAGCT GGCCGTGG	TCTGGCAACCCTAC AACAGACC	370 bp

Chemokin	Vorwärts-Primer 5'	Rückwärts-Primer 5'	Produkt
CXCL9 : MIG	TTGCTGGTTCTGATT GGAGTG	GTTGTGAGTGGGAT GTGGTTG	610 bp
CXCL10 : IP-10	AACTGCGATTCTGAT TTGCTG	TTGGAAGATGGGAA AGGTGAG	560 bp
CXCL11 : I-TAC	CAGCATTCTACTCC TTCCA	ACCCACCTTTCATCC TTCAC	531 bp
CXCL12 : SDF-1 $\beta$	ATGAACGCCAAGGT CGTGGTCG	TGACCCTCTCACAT CTTGAACC	240 bp
CXCL13 : BLC	ATGAAGTTCATCTCG ACATCTC	TAGTGGAATATCA GCATCAGG	310 bp
XCL1 : lymphotactin	TCAAGACCTACACC ATCACG	ATTGTTGCCATTGTC ACAGC	614 bp
CX3CL1 : fractalkine	CCGAAGGAGCAATG GGTCAA	CAGGTTGGTGGGGA GCAG	350 bp
CX3CL16	ATCGGGGAAGTGAA AGTGCC	CAGGAGCAGAAGCA GGAGCA	534 bp

Quelle: (Real et al., 2004)

Andere Primer:

	Primer Vorwärts 5'	Primer Rückwärts 5'	Produkt
Morbillivirus- Universal	ATGTTTATGATCA CAGCGGT	ATTGGGTTGCACCAC TTGTC	429bp
Actin	TGACCCAGATCAT GTTTGAGA	ACTCCATGCCAGGA AGGA	456bp
GapDH	ATGGGGAAGGTG AAGGTCGGAGTC	CAGCGTCAAAGGTGG AGGAGTGG	869bp

## 2.5 Puffer und Lösungen

6 x Ladepuffer für Agarosegele

7-Aminoaktinomycin-D (7-AAD)

Stocklösung 1 mg/ml DMSO

Arbeitslösung 1:60 in FACS-Puffer

AET-Lösung

2 g AET (2-Aminoethylisothiuroniumbromid)

ad 100 ml ddH<sub>2</sub>O, pH 9

Alsevers

Ammoniumsulfatlösung (gesättigt)

761 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

in 1 l PBS (Ca<sup>2+</sup> Mg<sup>2+</sup>-frei)

ATV (Adjusted Trypsin Versene)

0,8 % (w/v) NaCl

0,04 % (w/v) KCl

0,1 % (w/v) D-Glucose

0,058 % (w/v) NaHCO<sub>3</sub>

0,05 % (w/v) Trypsin

0,02 % (w/v) EDTA

DMSO

Erythrozytenlyse-Puffer

10 ml 10x KHCO<sub>3</sub>

(1 g KHCO<sub>3</sub>, ad 100 ml ddH<sub>2</sub>O)

10 ml 10x NH<sub>4</sub>Cl

(8,3g NH<sub>4</sub>Cl, ad 100 ml ddH<sub>2</sub>O)

20 µl 0,5M EDTA, pH 8

ad 100 ml ddH<sub>2</sub>O

Ethidiumbromid 1 %-Lösung

Einfriermedium

FKS

10 % DMSO

FACS-Puffer

PBS ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ frei)

0,5 % BSA (bovines Serumalbumin)

0,02 %  $\text{NaN}_3$

Ficoll-Paque

Lysepuffer

1 % Triton-X-100

10 mM Tris EDTA, pH 8,2

150 mM NaCl

1 mM  $\text{MgCl}_2$

1 mM  $\text{CaCl}_2$

Hammelerythrozyten

1%-ige Lösung

$\text{NaHCO}_3$ -Lösung

$\text{NaIO}_4$

4,28 g/l  $\text{NaIO}_4$

ad ddH<sub>2</sub>O

Paraformaldehyd

PBS

80 g NaCl

2 g KCl

11,5 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

ad 1 l H<sub>2</sub>O

## Percoll-Lösungen

Lösung 1 (1,076 g/ml):

4 ml 1,5 M NaCl  
21,688 ml Percoll (1,129 g/ml)  
14,232 ml H<sub>2</sub>O

Lösung 2 (1,059 g/ml):

4 ml 1,5 M NaCl  
16,469 ml Percoll (1,129 g/ml)  
19,504 ml ddH<sub>2</sub>O

Lösung 3 (1,045 g/ml):

4 ml NaCl  
12,156 ml Percoll (1,129 g/ml)  
23,844 ml ddH<sub>2</sub>O

## RNase Inhibitor

## Saponinpuffer

FACS-Puffer  
0,33 % Saponin

## Substratlösung für ELISA:

Lösung A: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
Lösung B: Tetramethylbenzidin

## TAE-Puffer (50x)

242 g Tris-Base  
57,1 ml Essigsäure  
100 ml EDTA (0,5 M; pH8)  
ad 1 l H<sub>2</sub>O

## TSM

20 mM Tris  
150 mM NaCl  
1 mM CaCl<sub>2</sub>  
2 mM MgCl<sub>2</sub>

ad 1l dH<sub>2</sub>O, pH8

TSA

TSM

0,5 % BSA

Trypanblau

0,25 % (w/v) in PBS

Versene

Die Chemikalien für alle verwendeten Puffer und Lösungen wurden bei den Firmen Applichem, Amersham, Bayer, Calbiochem, MBI fermentas, PAA, Pharmacia, Promega, Sigma, Virion gekauft oder fertige Lösungen standen am Institut zur Verfügung.

## 2.6 Antikörper

Sekundärantikörper:

Fluoreszenzfarbstoffmarkierte Sekundärantikörper (Ziege-anti-Maus, F(ab)-Fragment) waren PE - (BeckmannCoulter) oder FITC konjugiert (Dianova).

## Primärantikörper

Tabelle 2.6—1 Antikörper

Spezifität	Klon	Isotyp	Konjugat	Hersteller
CD3	UCHT1	Maus-IgG1 $\kappa$	FITC/PE	BectonDickenson
CD14	RM052	Maus IgG2a	FITC	BeckmannCoulter
CD16	3G8	Maus-IgG1 $\kappa$	PE	BectonDickenson
CD19	HIB19	Maus-IgG1 $\kappa$	FITC	BectonDickenson
CD25	M-A251	Maus-IgG1 $\kappa$	PE	BectonDickenson
CD56	B159	Maus-IgG1 $\kappa$	PE	BectonDickenson
CD86	2331	Maus-IgG1 $\kappa$	FITC	BectonDickenson
HLA-DR	5681	Maus-IgG1	PerCP	BectonDickenson
CCR5 (CD195)	2D7	Maus-IgG2a	-	BectonDickenson
CCR7	150503	Maus-IgG2a	PE	RnD Systems
MV-H	L77 K83	Maus IgG2a Maus IgG2a	-	Institut für Virologie Würzburg
MV-F	A5047	Maus IgG1	-	Institut für Virologie Würzburg
MV-N	F227	Maus IgG2a	-	Institut für Virologie Würzburg
DC-SIGN	AZN-D1 AZN-D2	Maus IgG1 Maus IgG1	-	Abteilung für Molekulare Zellbiologie und Immunologie, VU Amsterdam

## 2.7 Enzyme

Kollagenase VII

Sigma Aldrich

Reverse Transkriptase

Qiagen

## 2.8 Chemikalien

Agarose	Applichem
BSA	Applichem
EDTA	Sigma Aldrich
EGTA	Sigma Aldrich
Ficoll	Amersham
Fusionsinhibitorisches Peptid (FIP) (Z-D-Phe-L-Phe-Gly-OH)	Bachem
Glucitol	Sigma
GM-CSF	Berlex
IFN- $\alpha$	Strathmann
IL-4	Promocell
LPS	Sigma Aldrich
Mannan	Sigma Aldrich
Na-Bicarbonat	Life Technologies
Pam <sub>3</sub> CSK <sub>4</sub>	EMC Microcollections GmbH
Percoll	Amersham
rCCL-3	R&DSystems
rCCL-19	R&DSystems
rCCL-20	R&DSystems
Vitrogen 100®	Nutacon

## 2.9 Kits

CCL-20 ELISA	R&DSystems
CXCL-8 ELISA	R&DSystems
OmniScript® RT Kit	Qiagen
RNeasy Mini Kit®	Qiagen

## 2.10 Plastikwaren und Verbrauchsmaterial

0,5-;1,5-; 2-ml Reaktionsgefäße	Eppendorf
15-/50-ml Rörchen	Greiner
50 ml, 250 ml, 550 ml Gewebekulturflaschen	Greiner
5- und 10 ml Pipetten	Costar
6-, 24- 96-Napf Platten	Greiner
Dialyseschlauch	Roth
Einmalhandschuhe	Kimberley Clark
Einmalküvetten	Eppendorf
FACS-Rörchen	Falcon
FlowCount™Fluorospheres	BeckmannCoulter
Gewebekulturflaschen (50 ml, 250 ml,550 ml)	Greiner
Kryorörchen	Greiner
Pipettenspitzen	Eppendorf, Roth
Polycarbonatfilter	Corning
Polypropylenrörchen	Hartenstein

---

PureTaq-Ready-To-Go PCR Beads	Amersham
Sterilfilter	Millipore
Zellschaber	Hartenstein

## 2.11 Geräte

Brutschrank	Nuaire
CCD Kamera	Sony
FACS-Calibur	BectonDickinson
Gelelektrophoresekammern	Institutswerkstatt
Lichtmikroskop	Leitz
Neubauerzählkammer	Marienfeld
pH-Meter	Hannah Instruments
Sterilwerkbank	Nuaire
Vortexer	GLW
Wasserbäder	GFL
Zentrifugen	Eppendorf, Hettich, Sorvall

## **3 Methoden**

### **3.1 Zellkultur**

Alle verwendeten Zellen wurden in Brutschränken bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub> enthaltender, wasserdampfgesättigter Luft kultiviert. Die verwendeten Medien wurden mit Natriumhydrogencarbonat gepuffert und mit Antibiotika (Penicillin/Streptomycin oder Ciprofloxacin) versetzt.

#### **3.1.1 Zellkultur adhärenter Zelllinien**

Die semiadhärente Zelllinie B95a wurde in RPMI 1640 mit 5 % FKS kultiviert. Adhärenente Vero-Zellen wurden in MEM mit 5 % FKS kultiviert. Nach der Ausbildung konfluenter Zellrasen wurden die Zellen mit ATV einmal gewaschen und anschließend abgelöst. Zur weiteren Kultivierung wurden sie in frische Zellkulturflaschen 1:5 bis 1:10 in frischem Medium verdünnt wieder ausgesät.

#### **3.1.2 Zellkultur von Suspensionszelllinien**

Die humane B-Zelllinie BJAB sowie die Hybridomzellen zur Gewinnung von Antikörpern wurden in RPMI 1640 mit 10 % FKS kultiviert. Die Zellen wurden 1- bis 2-mal wöchentlich für 5 Minuten bei 300 x g abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 10 Milliliter frischem Medium resuspendiert und die Zellen wurden 1:5 bis 1:10 in frischem Medium verdünnt in Zellkulturflaschen neu ausgesät.

### 3.1.3 Bestimmung der Lebendzellzahl

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurde eine Vitalfärbung mit Trypanblau durchgeführt. Dazu wurden aus einer Zellsuspension 10 bzw. 20 Mikroliter abgenommen und mit 10 bzw. 80 Mikroliter Trypanblaulösung gemischt. 10 Mikroliter der Lösung wurden anschließend in eine Neubauerzählkammer gegeben. Lebende Zellen bleiben ungefärbt, während tote Zellen den Farbstoff aufnehmen können. Mit Hilfe des Lichtmikroskops wurde die Zahl der ungefärbten (lebende) Zellen ermittelt. Die Gesamtzellzahl in der vorhandenen Zellsuspension konnte mit Hilfe des Kammerfaktors errechnet werden. Die Zellsuspension wurde anschließend entsprechend der gewünschten Zellzahl verdünnt und eingesetzt.

### 3.1.4 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Zur Kryokonservierung der verwendeten Zellen wurden die Zellen zunächst abzentrifugiert (5 min, 1200 rpm). Das gewonnene Zellpellet wurde in kaltem FKS resuspendiert und mit dem gleichen Volumen Einfriermedium versetzt. Die Zellen wurden zunächst für eine Stunde bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren und anschließend auf  $-80^{\circ}\text{C}$  überführt. Adhärente Zellen wurden in einer Konzentration von  $7,5 \times 10^6$  bis  $1 \times 10^7$  Zellen pro Milliliter eingefroren, Suspensionszellen wurden dagegen in einer Konzentration von  $1 \times 10^7$  bis  $2 \times 10^7$  Zellen pro Milliliter eingefroren. Zum langfristigen Lagern wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt.

Zur Rekultivierung wurden die Zellen schnell bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Wasserbad aufgetaut, mit einem Überschuss an Kulturmedium gewaschen und in frischem Medium ausgesät.

### 3.1.5 Mykoplasmentest

Um Kontaminationen mit Mykoplasmen zu vermeiden, wurden alle verwendeten Zelllinien regelmäßig mit Ciprofloxacin behandelt und auf Mykoplasmen getestet. Für den Test auf Mykoplasmenkontamination standen 3E10hTLR2 Zellen zur Verfügung. Diese Zellen wurden stabil mit einem CD25-Reporter gen (ELAM-tac) transfiziert, welches unter einem NF $\kappa$ B (*nuclear factor kappa B*, NF $\kappa$ B) abhängigen Promoter steht. Die Zellen exprimieren weiterhin einen humanen TLR (Medvedev et al., 2001) sowie CD14 als Korezeptor für eine NF $\kappa$ B-Aktivierung. Bei einer Kontamination mit Mykoplasmen, die als Agonisten für TLR bekannt sind (Takeuchi et al., 2000), wird der TLR2-Rezeptor aktiviert, daraufhin wird NF $\kappa$ B in den Kern transloziert und der CD25-Promotor aktiviert. Außerdem enthalten die Zellen endogenes TLR4. Die Expression von CD25 ist somit nur dann möglich, wenn TLR-Agonisten wie Endotoxine oder Mykoplasmen in der Kultur enthalten sind.

Für den Mykoplasmentest wurden  $5 \times 10^4$  3E10hTLR2 Zellen pro Napf in eine 24-Napf-Zellkulturplatte ausgesät und ü.N. kultiviert. Zur Stimulation der Zellen wurde 10 Mikrogramm Gesamtprotein des zu testenden Virusstocks bzw. 10 Mikroliter Zellkulturüberstand der zu testenden Zelllinien zu den 3E10hTLR2 Zellen gegeben. Die zu testenden Zellen wurden vorher für mindestens zwei Passagen ohne Ciprofloxacin kultiviert. Als Positivkontrolle diente LPS (100 ng/ml) oder Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> (2,5  $\mu$ g/ml), als Negativkontrolle Medium. Die Zellen wurden für weitere 12 bis 16 Stunden kultiviert, mit Trypsin abgelöst und durchflusszytometrisch (3.7.1) auf die Expression von CD25 untersucht.

### 3.1.6 Isolierung humaner primärer mononukleärer Zellen aus Leukozytenkonzentrat

Bei primären mononukleären Zellen aus dem Blut (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) handelt es sich um eine Mischpopulation aus im Blut enthaltenen Zellen (T-, B-, NK-Zellen und Monozyten).

Das für die Isolierung der PBMC verwendete Leukozytenkonzentrat wurde aus dem Blut gesunder Spender in der Abteilung für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie, Universitätsklinik Würzburg, gewonnen.

Das Leukozytenkonzentrat wurde zunächst 1:2 mit Versene verdünnt und nachfolgend auf Ficoll-Paque geschichtet (30 ml verdünnte Leukozytenlösung pro 9 ml Ficoll-Paque). Bei der anschließenden Dichtegradientenzentrifugation (30 min, 2 min Anlauf, 2 min Auslauf, 400 x g, 4° C) wurden die enthaltenden zellulären Bestandteile entsprechend ihrer unterschiedlichen Dichte aufgetrennt. Die entstandene Interphase wurde abgenommen, in 50-ml-Röhrchen überführt und zwei- bis dreimal mit  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freiem PBS gewaschen (10 min, 300 x g, RT). Zur Bestimmung der Zellzahl (3.1.3) und zur Charakterisierung der PBMC-Population mittels Durchflusszytometrie wurden vor dem letzten Waschschrift 200 Mikroliter Zellsuspension abgenommen.

Die Charakterisierung der erhaltenen PBMC erfolgte durch Färbung der Zellen mit einem Gemisch der nachfolgend aufgeführten monoklonalen Antikörper: CD3-FITC, CD14-FITC, CD19-FITC, CD16-PE, CD56-PE und HLA-DR-PerCP.

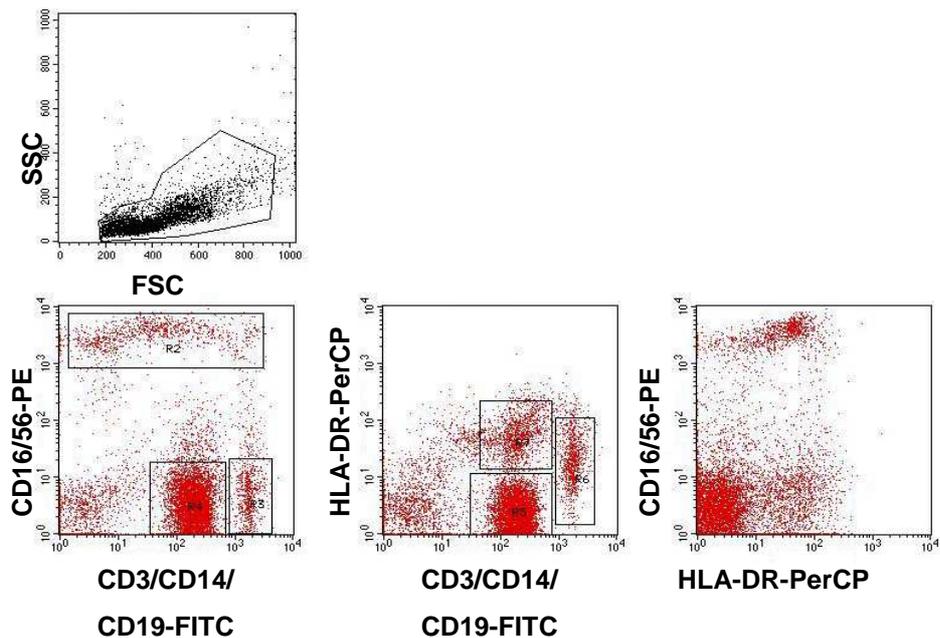


Abbildung 3—1 Durchflusszytometrische Charakterisierung der PBMC Population

Ein Drittel der so erhaltenen PBMC-Population wurde abzentrifugiert (300 x g, 10 min, RT) und eingefroren (3.1.4). Die übrigen zwei Drittel wurden für die Isolierung der T-Lymphozyten über Rosettierung mit Hammelerythrozyten (3.1.7) sowie die Isolierung der Monozyten verwendet (3.1.8).

### 3.1.7 Isolierung humaner primärer T-Lymphozyten über Rosettierung von Hammelerythrozyten aus PBMC

Zur Anreicherung der T-Zellen aus den PBMC wurden diese mit Hilfe von Hammelerythrozyten (Pellegrino et al., 1976) rosettiert und anschließend durch eine weitere Dichtegradientenzentrifugation von den übrigen Zellen getrennt.

Für die Rosettierung der T-Zellen wurde zunächst die 1%ige Lösung der Hammelerythrozyten abzentrifugiert (400 x g, 10 min, RT) und mit Alsevers gewaschen. Anschließend wurden die Pellets in 4 % AET-Lösung resuspendiert und für 20 Minuten bei 37°C im Wasserbad aktiviert, wodurch sich die Bindung CD2-positiver T-Zellen an die Oberfläche der Hammelerythrozyten verbessert. Nach mehrmaligem Waschen mit  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freiem PBS und anschließender Zentrifugation (10 min, 400 x g, 20° C) wurden die Pellets in RPMI 1640 mit 10 % FKS vorsichtig resuspendiert und mit RPMI 1640 auf 50 Milliliter aufgefüllt. Jeweils  $3 \times 10^8$  PBMC wurden dann mit 13 Milliliter Hammelerythrozytenlösung und 7 Milliliter FKS gemischt und für 5 Minuten (200 x g bei 4° C) zentrifugiert. Die Pellets wurden für eine Stunde auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die pelletierten Zellen durch vorsichtiges Rollen resuspendiert und die Suspension wieder auf Ficoll-Paque-Gradienten geschichtet (30 ml Erythrozytensuspension pro 9 ml Ficoll-Paque). Bei der nun folgenden 30-minütigen Zentrifugation (400 x g, ohne Bremse, 2 min Anlauf, 2 min Auslauf) pelletieren die T-Zellen zusammen mit den Hammelerythrozyten. Die entstehende Interphase (vorwiegend Monozyten und B-Zellen) wurde abgenommen und für die Isolierung der Monozyten verwendet (3.1.8). Die zusammen mit den T-Zellen pelletierten Hammelerythrozyten konnten dann mit Hilfe eines hypertonischen Erythrozytenlyse-Puffer für 2 bis 7 Minuten lysiert werden. Zur Wiederherstellung des osmotischen Gleichgewichts wurden die Zellen einmal mit RPMI 1640 mit 10 % FKS gewaschen und anschließend zwei weitere Male mit  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freiem PBS gewaschen (300 x g, 10 min, RT). Zur Bestimmung der Zellzahl (3.1.3) und zur Charakterisierung der gewonnenen Zellen wurden 200 Mikroliter abgenommen und mit einem Gemisch aus CD3-FITC, CD14-FITC, CD19-FITC, CD16-PE, CD56-PE und HLA-DR-PerCP monoklonaler Antikörper gefärbt (3.7.1) und im Durchflusszytometer analysiert. Diese Population der  $\text{CD3}^+ \text{CD14}^- \text{CD19}^-$  T-Zellen wurde mit Einfriermedium versetzt, in Kryoröhrchen aliquotiert und eingefroren (3.1.4).

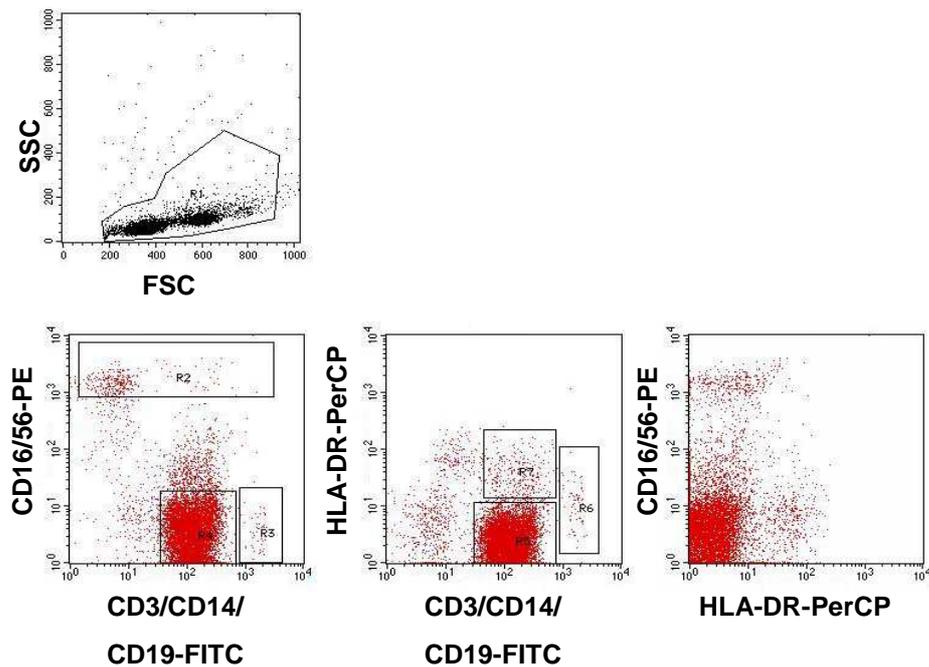


Abbildung 3—2 Durchflusszytometrische Charakterisierung der T-Zellpopulation nach der Rosettierung mit Hammelerythrozyten (T-Zellen: R4)

### 3.1.8 Isolierung primärer humaner Monozyten

Die bei der Dichtegradientenzentrifugation nach der Rosettierung der T-Zellen erhaltene Interphase setzt sich vorwiegend aus B-Zellen, Monozyten und NK-Zellen zusammen. Um die Monozyten von den übrigen Zellen zu trennen, wurde ein diskontinuierlicher Percollgradient (Hilkens et al., 1997) angeschlossen. Dazu wurden drei Percoll-Lösungen unterschiedlicher Dichte hergestellt (vgl. 2.5). Die Lösung mit der geringsten Dichte wurde in ein Polypropylenröhrchen pipettiert und anschließend mit den Lösungen größerer Dichte unterschichtet (2 ml/Lösung). Die zuvor dreimal mit Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>-freiem PBS gewaschenen Zellen wurden nach dem letzten Waschschrift in Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>-freiem PBS aufgenommen und auf die Gradienten verteilt (2 ml/Gradient). Die

Gradienten wurden für 30 Minuten bei 400 x g, Raumtemperatur (RT) mit zweiminütigem An- und Ablauf zentrifugiert. Die entstandenen Interphasen wurden geerntet und in 50-ml-Röhrchen überführt; die Röhrchen wurden mit  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freiem PBS aufgefüllt und für 10 Minuten bei 300 x g (RT) zentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden weitere zwei- bis drei Mal gewaschen. Zur Zellzahlbestimmung (3.1.3) und durchflusszytometrischen Charakterisierung wurden vor dem letzten Waschen 200 Mikroliter der Zellsuspension abgenommen. Die verschiedenen Interphasen wurden mit einem Gemisch verschiedener monoklonaler Antikörper (CD3-FITC, CD14-FITC, CD19-FITC, CD16-PE, CD56-PE und HLA-DR-PerCP) gefärbt (3.7.1) und im Durchflusszytometer untersucht. Abschließend wurde die Fraktion der Monozyten ( $\text{CD14}^+$ ) mit Einfriermedium gemischt, in Kryoröhrchen alitquotiert und eingefroren (3.1.4).

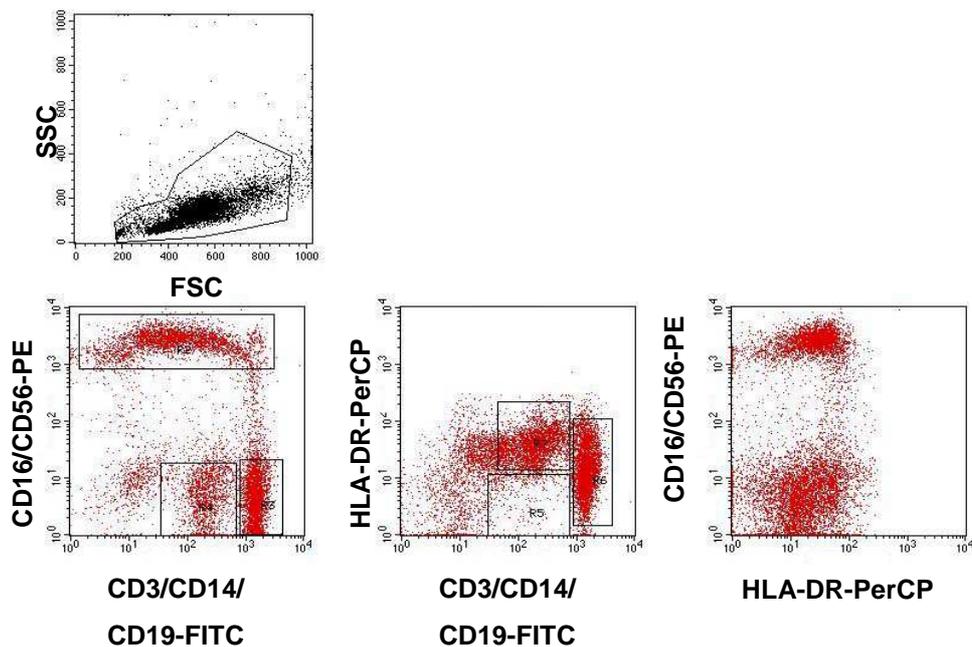


Abbildung 3—3 Durchflusszytometrische Charakterisierung der Monozytenpopulation (Monozyten: R5 bzw. R6)

### 3.1.9 Differenzierung humaner Dendritischer Zellen *in vitro* aus Monozyten

DC können *in vitro* aus Monozyten generiert werden (*monocyte-derived DC*, MoDC). Während der sechs- bis siebentägigen Kultur in IL-4- und GM-CSF-haltigem Medium (Sallusto and Lanzavecchia, 1994) verlieren die Monozyten ihren typischen Oberflächenmarker CD14 und exprimieren die typischen Oberflächenmarker unreifer DC (u.a. CD1a, MHC II niedrig, CD11c, LFA-1, I-CAM-1, DC-SIGN).

Die Monozyten wurden schnell im Wasserbad aufgetaut und in 50 Milliliter RPMI 1640 mit 10 % FKS überführt. Nach dem Pelletieren der Zellen (10 min, 350 x g, RT) wurden diese in 10 Milliliter frischem RPMI 1640, 10 % FKS resuspendiert, die Zellzahl bestimmt (3.1.3) und auf  $1,5 \times 10^6/3\text{ml}$  eingestellt, bevor sie in eine 6-Napf-Zellkulturplatte ausgesät wurden. Das Medium wurde mit 500 U/ml GM-CSF und 250 U/ml IL-4 bzw. 1000 U/ml IFN- $\alpha$  versetzt. Während der darauf folgenden sechstägigen Kultur wurde ein Teil des Mediums sowie die Zytokine alle zwei Tage ersetzt. Dazu wurde jeweils 1 Milliliter Medium/Napf entfernt. Das gesammelte Medium wurde für 5 Minuten, 350 x g zentrifugiert, das entstandene Zellpellet wurde in dem gleichen Volumen frischem RPMI 1640 mit 10 % FKS resuspendiert, mit neuen Zytokinen versetzt und zurück in die Zellkulturplatte gegeben.

Im Gegensatz zur Kultur mit IL-4 führt die Kultur mit IFN- $\alpha$  zur Entstehung von DC, die das charakteristische Oberflächenmolekül DC-SIGN nicht exprimieren (Gagliardi et al., 2005).

Um reife DC zu erhalten wurde dem Kulturmedium am Tag fünf oder sechs der Kultur 100 ng/ml LPS zugegeben. Nach weiteren 24 Stunden Kultur zeigten die DC den typischen Phänotyp reifer DC. Reifungsmarker wie CD80 (B7.1), CD83 oder CD86 (B7.2) sowie MHCII werden hoch exprimiert.

## 3.2 Viruskultur

### 3.2.1 Präparation von Virusstocks

Die in dieser Arbeit verwendeten Viren wurden zum einen auf adhärenenten Vero-Zellen gezüchtet, zum anderen auf der humanen B-Zelllinie BJAB (siehe Tabelle 2.1—1). Die unterschiedliche Verwendung der Zellen ist auf die Nutzung verschiedener Rezeptoren von Impf- und Wildtypstämmen zurückzuführen (1.1.4).

Für die Produktion des Impfstammes ED sowie des rekombinanten EDeGFP wurde ein konfluenten Verozellrasen ( $\sim 2 \times 10^7$  Zellen/550-ml-Zellkulturflasche) mit einer *moi* (*multiplicity of infection*, *moi*) von 0,01 infiziert. Dazu wurde das vorhandene Medium abgesaugt. Das entsprechende Volumen Virussuspension wurde in 10 Milliliter MEM, ohne FKS pro Flasche aufgenommen und auf die Zellen pipettiert. Die Zellkulturflaschen wurden dann für eine Stunde bei 20° C auf einer Wippe inkubiert, bevor das Virus-Inokulum wieder entfernt und durch frisches MEM mit 5 % FKS (20ml/Flasche) ersetzt wurde. Die weitere Kultur erfolgte bei 37° C. Sobald 80 bis 90 % der Zellen einen zytopathischen Effekt (*cytopathic effect*, CPE) zeigten, wurde das Medium von den Zellen entfernt und diese in 2 ml/Flasche PBS ( $\text{Ca}^{2+}$ / $\text{Mg}^{2+}$ -frei) über Nacht (ü.N.) bei -20° C eingefroren. Nach dem schnellen Wiederauftauen der Kulturen wurde der verbliebene Zellrasen mit einem Zellschaber gelöst und die Suspension in 50-ml-Röhrchen überführt. Um zellassoziertes Virus freizusetzen und Zelltrümmer zu entfernen, wurde für 15 Minuten bei 0° C, 1000 x g zentrifugiert. Der klare Überstand wurde in Kryoröhrchen aliquotiert und bei -80° C gelagert.

Der Wildtypstamm WTF wurde auf der Suspensionszelllinie BJAB kultiviert. Dazu wurden zunächst  $5 \times 10^7$  BJAB Zellen abzentrifugiert (300 x g, 5 min), in 5 ml RPMI 1640 ohne FKS aufgenommen und mit einer *moi* von 0,01 infiziert. Die Virus-Zell-Suspension wurde anschließend bei 37° C für 1 bis 2 Stunden im Brutschrank inkubiert. Um eine bessere Virusbindung zu erreichen, wurde die Suspension mehrmals invertiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (300 x g, 5 min, RT), in 50 Milliliter frischem RPMI 1640 mit 10 % FKS

aufgenommen und in eine Zellkulturflasche überführt. Nach 2 bis 3 Tagen Kultur und Ausbildung eines deutlichen CPE wurden die infizierten Zellen auf frische BJAB-Zellen verteilt und so lange weiter kultiviert, bis 80 bis 90 % der Zellen einen deutlichen CPE zeigten. Daraufhin wurden die Zellen abzentrifugiert (300 x g, 10 min, RT) und die erhaltenen Pellets in 2 bis 3 ml/Pellet  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freiem PBS aufgenommen, gut resuspendiert und ü.N. bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Nach dem zügigen Wiederauftauen der Zellen, wurde die Zellsuspension für 1 bis 2 Minuten gevortext und anschließend bei 1000 x g, für 15 Minuten,  $0^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Der klare Überstand wurde in Kryoröhrchen aliquotiert und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Parallel zur Anzucht der Viren wurden nicht-infizierte Zellen (Vero/BJAB) kultiviert und so präpariert wie für die Präparation der Virusstocks beschrieben aufgearbeitet. Diese Präparationen dienten als Mockkontrollen.

### 3.2.2 Bestimmung des Virustiters

Zur Bestimmung des Virustiters wurde die  $\text{TCID}_{50}$  (*tissue culture infectious dose*,  $\text{TCID}_{50}$ ) bestimmt. Diese gibt die Verdünnung einer virushaltigen Lösung an, die ausreicht, um 50 % der Zellen zu infizieren. Für eine Endpunkttitration wurden  $5 \times 10^4$  B95a Zellen pro Napf in eine 96-Napfplatte (*half area*) ausgesät und ü.N. kultiviert. Von den zu titrierenden Viruspräparationen wurde eine Verdünnungsreihe (1:10) in RPMI ohne FKS hergestellt. Pro Verdünnungsstufe wurden acht Näpfe der 96-Napf-Zellkulturplatte mit jeweils 100 Mikroliter Virusverdünnung versetzt, die Zellen wurden anschließend für eine Stunde bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Nach dem Absaugen des Mediums wurde in jeden Napf 100 Mikroliter RPMI 1640 mit 5 % FKS gegeben. Nach drei und fünf Tagen Kultur wurde lichtmikroskopisch die Anzahl der Näpfe bestimmt, in denen ein CPE auftrat. Anhand dieser Werte konnte die  $\text{TCID}_{50}$  mit Hilfe der Formeln nach

Spearman und Kärber (Formel 3-1, Formel 3-2) (Kärber, 1931; Spaerman, 1908) berechnet werden.

$$\log TCID50 = x_{p=1} + \frac{1}{2}d - d \sum p$$

**Formel 3-1: Formel zur Bestimmung der 50 % Endpunkttitration.**  $x_{p=1}$ : dekadischer Logarithmus der höchsten Verdünnungsstufe, bei der noch in allen Ansätzen ein CPE sichtbar ist,  $d$ : dekadischer Logarithmus des Verdünnungsfaktors,  $p$ : Anteil an CPE positiven Nöpfen pro Verdünnungsstufe,  $\sum p$ : Summe aller  $p$  ab der Verdünnungsstufe  $x_{p=1}$  und den  $p$ -Werten aller höheren Verdünnungen mit beobachtetem CPE. Berechnet wird der dekadische Logarithmus der Verdünnungsstufe, bei der 50 % der Ansätze einen CPE aufweisen.

$$SE \log TCID50 = \sqrt{d^2 \sum \frac{p(1-p)}{n-1}}$$

**Formel 3-2: Formel zur Berechnung des Standardfehlers der TCID50.**  $d$ : dekadischer Logarithmus der Verdünnungsstufe,  $p$ : Anteil an CPE positiven Nöpfen pro Verdünnungsstufe,  $n$ : für die Anzahl der Nöpfe pro Verdünnungsstufe

### 3.3 Infektionen und Virusbindungstest

#### 3.3.1 Infektion humaner Dendritischer Zellen

Für die Infektion von DC wurden diese an Tag fünf oder sechs der Kultur abzentrifugiert (350 x g, 5 min RT), in einem kleinem Volumen Kulturmedium ohne FKS mit Zytokinen (IL-4 und GM-CSF) resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Die gewünschte Zellzahl wurde in ein 15-ml-Röhrchen überführt und

mit der gewünschten Menge einer Viruspräparation oder dem entsprechenden Volumen einer Mockpräparation versetzt. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C wurden die Zellen mit einem Überschuss an FKS-freiem Medium gewaschen (350 x g, 5 min, RT), in frischem Kulturmedium (RPMI 1640, 10 % FKS, IL-4 und GM-CSF) aufgenommen und in Zellkulturplatten ausgesät. Für durchflusszytometrische Analysen und Chemotaxis-Assays wurde das Zellkulturmedium mit dem fusionsinhibitorischen Peptid (FIP) in einer Endkonzentration von 200 Mikromolar versetzt, um die Zell-Zellfusion zu verhindern (Richardson et al., 1980).

### 3.3.2 Infektion von CHO-Zellen

Verschiedene stabiltransfizierte CHO-Zellen (siehe Tabelle 2.1—1) standen zur Verfügung, um die Rezeptorbindungseigenschaften bzw. den Eintritt unterschiedlicher Masernviren über verschiedene Rezeptoren zu untersuchen.

Die Zellen wurden in einer Konzentration von  $3 \times 10^4$  Zellen pro Napf einer 24-Napf-Zellkulturplatte ausgesät und *u.N.* kultiviert. Das Zellkulturmedium wurde abgesaugt und die Zellen mit 200 µl/Napf einer Viruspräparation in entsprechendem Zellkulturmedium ohne FKS infiziert (1 h, 37° C). Anschließend wurde die Virussuspension von den Zellen entfernt, die Zellen einmal mit 1ml/Napf PBS ( $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -frei) gewaschen und frisches Zellkulturmedium (10 % FKS) auf die Zellen gegeben (1 ml/Napf). Für durchflusszytometrische Analysen wurde das Zellkulturmedium mit FIP versetzt (200 µM). Die Zellen wurden für 24 bis 72 Stunden kultiviert. Zum Nachweis der Infektion wurde eine Oberflächenfärbung des viralen H-Proteins durchgeführt, dazu wurden die Zellen mit ATV aus der Zellkulturplatte gelöst und in FACS-Röhrchen (*fluorescence activated cell sorting*, FACS) überführt (3.7.1).

Weiterhin wurde die Infektion anhand des auftretenden CPE mikroskopisch untersucht.

### 3.3.3 Virusbindungstest

Zur Untersuchung verschiedener Rezeptoren als Bindungsrezeptoren für Masernviren wurden ebenfalls stabiltransfizierte CHO-Zellen benutzt.

Für die durchgeführten Virusbindungstests wurden  $2 \times 10^5$  Zellen/Ansatz eingesetzt. Die Zellen wurden zunächst pelletiert (300 x g, 3 min, 4° C) und anschließend in 100 Mikroliter TSA-Puffer/Ansatz resuspendiert. Um die Bindung an den Oberflächenrezeptor DC-SIGN zu inhibieren, wurden die Zellen vor der Inkubation mit Viruspräparationen für 30 Minuten bei 37° C mit dem Polycarbohydrat Mannan (1 mg/ml) inkubiert. Die Viruspräparation wurde anschließend direkt zu den Zellen gegeben und die Ansätze für 1 Stunde bei 4° C unter Drehen inkubiert. Die Zellen wurden danach in FACS-Röhrchen überführt und mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen (300 x g, 5 min, 4° C), bevor eine Färbung des viralen H-Proteins, gemäß dem Protokoll der Oberflächenfärbung (3.7.1), durchgeführt wurde und die Menge des gebundenen Virus im Durchflusszytometer bestimmt wurde.

### 3.3.4 Adhäsionsassay mit fluoreszierenden Mikrokügelchen

Um die Adhäsion von Masernviren an verschiedene Rezeptoren zu untersuchen, wurde Streptavidin kovalent an fluoreszierende Mikrokügelchen (488/465nm) gebunden (Geijtenbeek et al., 1999). Die Mikrokügelchen wurden anschließend ü.N. mit einem biotinylierten F(ab)<sub>2</sub>-Fragment eines Ziege-anti-Maus-Antikörpers inkubiert (6 µg/ml). Nach einer weiteren Inkubation ü.N., wurden die Mikro-kügelchen mit einem monoklonalen Maus-anti-MV-Antikörper (L77 oder A5047, 10 µg/ml) behandelt und nach mehreren Waschschrinen mit UV-inaktivierten MV inkubiert (ü.N., 4° C).  $5 \times 10^4$  Zellen wurden dann mit virusbeladenen Mikrokügelchen im Verhältnis 20:1 gemischt und für 45 Minuten bei 37° C inkubiert. Antikörper gegen CD46 (13/42), CD150 (5C6) oder

DC-SIGN (AZN-D1) (alle 20 µg/ml) sowie EGTA (10 mM) und Mannan (1 mg/ml) wurden verwendet, um die Adhäsion an die verschiedenen untersuchten Rezeptoren zu inhibieren.

Die Zellen wurden in FACS-Röhrchen überführt und die Bindung der virusbeladenen Mikrokügelchen durchflusszytometrisch bestimmt.

Die Adhäsionsexperimente wurden im Medizinischen Zentrum, Abteilung für Molekulare Zellbiologie und Immunologie an der Vrije Universität, Amsterdam durchgeführt.

### 3.3.5 DC-SIGN-Fc-Bindungstest

Um die Bindung von Masernviren an DC-SIGN zu untersuchen, wurde ein Bindungstest durchgeführt, der auf dem Prinzip des ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) (3.8) basiert.

Dazu wurde rekombinantes DC-SIGN (extrazelluläre Domäne, Aminosäuren 64-404) verwendet, das an den c-terminalen Teil einer humanen IgG1-Fc-Domäne fusioniert war (Geijtenbeek et al., 2002). CHO Zellen wurden mit dem Konstrukt (DC-SIGN-Sig-plgG1-Fc) (Fawcett et al., 1992) transfiziert, um das rekombinante Protein zu produzieren. Für den ELISA wurden 96-Napf-Platten mit Ziege-anti-Maus IgG-Antikörper (4 µg/ml) beschichtet (1 h, 37° C). Nach dem Blockieren freier Bindungsstellen wurden Antikörper gegen Proteine des MV an den Primärantikörper gebunden (1 h, 37° C) und anschließend für weitere 18 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen gereinigten, UV-inaktivierten MV-Partikeln inkubiert. Nach der Zugabe von DC-SIGN-Fc (1 µg/ml, 2 h, RT) wurde die Bindung mit Hilfe eines Peroxidase konjugierten Ziege-anti-Human-Antikörpers nachgewiesen.

Weiterhin wurde die Interaktion von Masernviren mit DC-SIGN mit einer anderen Methode untersucht: Dabei wurde UV-inaktiviertes ( $1,5 \text{ J/cm}^2$ ) Masernvirus für 1 Stunde bei  $4^\circ \text{C}$  mit Lysepuffer ly siert. Parallel dazu wurde eine 96-Napf-Zellkulturplatte (Rundboden) mit einem Ziege-anti-Human-IgG-Antikörper ( $4 \text{ } \mu\text{g/ml}$ ) beschichtet ( $1 \text{ h}$ ,  $37^\circ \text{C}$ ). Nach dem Absättigen freier Bindungsstellen wurde DC-SIGN-Fc an den Primärantikörper gebunden ( $1 \text{ h}$ ,  $37^\circ \text{C}$ ), um anschließend mit den Viruslysaten für 18 Stunden inkubiert zu werden. Nicht-gebundenes Virus wurde durch Waschen entfernt, während gebundenes Virus durch Inkubation mit Antikörpern gegen das virale H- bzw. F-Protein ( $1 \mu\text{g/ml}$ ,  $2 \text{ h}$ , RT) und einen Peroxidase-gekoppelten Ziege-anti-Maus-Antikörper nachgewiesen wurde.

Die Experimente zur Bindung von MV an DC-SIGN wurden im Medizinischen Zentrum, Abteilung für Molekulare Zellbiologie und Immunologie an der Vrije Universität Amsterdam, durchgeführt.

### **3.4 T-Zell-Proliferationstest**

#### **3.4.1 Oxidative Mitogenese**

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Proliferationstests wurden autologe T-Zellen verwendet, die vor dem Einsatz in eine *mixed lymphocyte reaction* (MLR) (3.4.3) durch Natriumperodat ( $\text{NaIO}_4$ ) modifiziert wurden (King and Katz, 1989; Van Voorhis et al., 1983).

Die für 24 Stunden in Kultur genommenen T-Zellen wurden zunächst abzentrifugiert ( $5 \text{ min}$ ,  $350 \times g$ ,  $4^\circ \text{C}$ ) und anschließend in 1 Milliliter  $2 \text{ mM}$   $\text{NaIO}_4$ -Lösung aufgenommen. Nach 20 Minuten Inkubation auf Eis wurde  $500 \text{ Mikroliter}$  FKS zum Ansatz gegeben, um die Oxidation zu stoppen. Die Zellen

wurden erneut abzentrifugiert (5 min, 350 x g, 4° C ) und anschließend bis zum Einsatz in die MLR in Kulturmedium aufgenommen.

### 3.4.2 CFSE-Markierung

Um die Proliferation von T-Zellen in einer MLR (3.4.3) zu bestimmen, wurden diese zunächst mit dem farblosen Carboxyfluorescein-(5-,6-)diacetat (CFSE) behandelt. Der Stoff gelangt zunächst durch passive Diffusion in die Zellen, durch intrazelluläre Esterasen erfolgt die Abspaltung vorhandener Acetatgruppen. Dabei entsteht ein fluoreszierender Ester, der bei der Reaktion mit intrazellulären Aminen stabile Konjugate bildet.

Die zu färbenden T-Zellen ( $3 \times 10^6$ ) wurden zunächst dreimal mit einem Überschuss an PBS ( $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -frei) gewaschen (5 min, 350 x g, RT). Nach dem letzten Waschschrift wurden die abzentrifugierten Zellen in 1 Milliliter CFSE-Lösung (2,5  $\mu\text{M}$ ) aufgenommen und zügig resuspendiert, bevor sie für 3 Minuten bei 37° C inkubiert wurden. Sofort danach wurden 500 Mikroliter FKS zu den Zellen gegeben und die Zellen erneut abzentrifugiert (5 min, 350 x g, RT). Bevor die Zellen in eine MLR (3.4.3) eingesetzt wurden, hat man sie ein weiteres Mal mit RPMI 1640 mit 10 % FKS, gewaschen und nach Bestimmung der Zellzahl (3.1.3) in der entsprechenden Menge RPMI 1640 mit 10 % FKS aufgenommen und eingesetzt. Um die Infektion der T-Zellen sowie die Zell-Zell-Fusion bei der Kokultur mit den infizierten DC zu verhindern, wurde das Kulturmedium mit FIP in einer Endkonzentration von 200  $\mu\text{M}$  versetzt.

### 3.4.3 Mixed Lymphocyte Reaction

Bei einer MLR handelt es sich um die Kokultur verschiedener APC mit T-Zellen. Die APC präsentieren den kokultivierten T-Zellen Fremdantigene über den Peptid-MHC-Komplex. In Folge einer Fremderkennung kommt es zur Aktivierung und Proliferation der T-Zellen. Besonders geeignete APC sind reife DC, da sie nach der Ausreifung außer dem MHC-Komplex u.a. die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 verstärkt exprimieren. Eine MLR kann dabei im allogenen System, dabei handelt es sich um Zellen verschiedener Spender, oder im autologen System durchgeführt werden. Für die Verwendung autologer T-Zellen müssen diese zunächst durch eine Oxidative Mitogenese modifiziert werden (3.4.1).

Die zuvor mit CFSE markierten T-Zellen (3.4.2) werden durch die APC stimuliert und beginnen zu proliferieren. Bei jeder Zellteilung reduziert sich die Menge an CFSE in den T-Zellen um die Hälfte, da der Farbstoff gleichmäßig an die Tochterzellen weitergegeben wird. Die Proliferation kann nach mehreren Tagen Kokultur anhand der CFSE-Fluoreszenz im Durchflusszytometer bestimmt werden.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Proliferationsteste wurden vorwiegend in Kollagengelen durchgeführt. Dazu wurden die durch Oxidative Mitogenese modifizierten (3.4.1), CFSE-gefärbten autologen T-Zellen mit den DC im Verhältnis 1:6 gemischt und in den vorbereiteten Gelansatz (3.10) pipettiert. Dieser wurde dann in eine 96-Napf-Zellkulturplatte mit flachem Boden überführt und für fünf Tage kultiviert. Um die Proliferation im Durchflusszytometer zu untersuchen, wurde das Kollagen mit Hilfe von Kollagenase VII (1000 U/ml) für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach 15 Minuten wurden vorhandene Gelreste durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren zerstört. Anschließend wurden die T-Zellen mit einem monoklonalen Maus-anti-Human CD3-PE Antikörper gegengefärbt (3.7.1), um eine bessere Unterscheidung zu den mit ED-GFP infizierten DC zu ermöglichen.

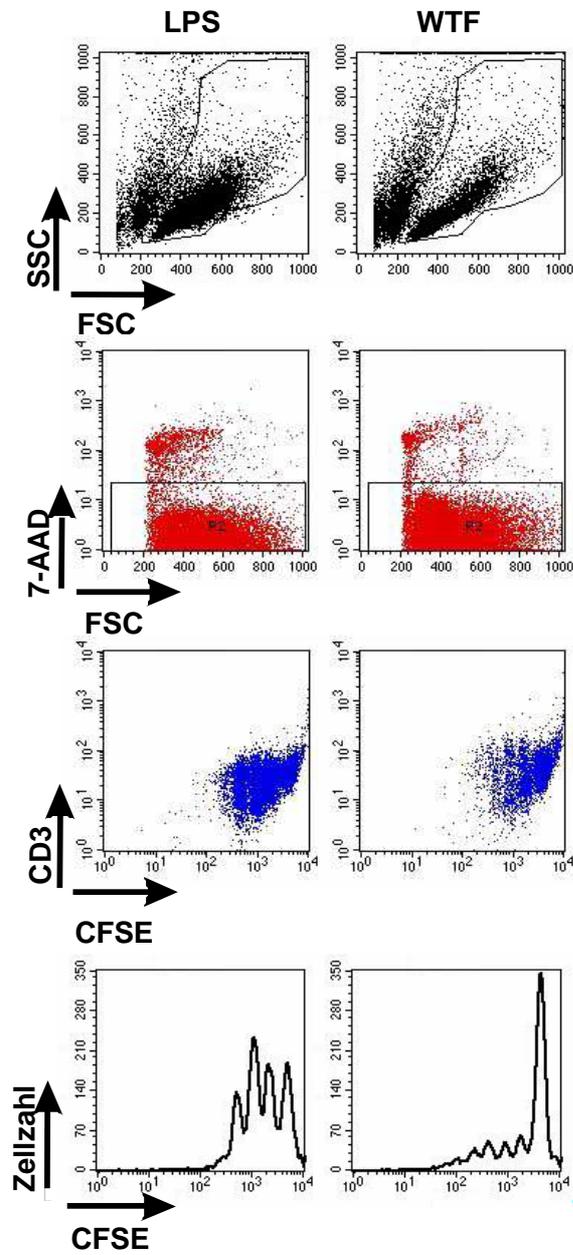


Abbildung 3—4: Beispiel einer typischen T-Zellproliferation in Flüssigkultur

### 3.5 Aufreinigung monoklonaler Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten Hybridomzelllinien, die Antikörper gegen verschiedene Strukturproteine des MV sowie gegen die zellulären Rezeptoren CD46 und CD150 des MV produzieren, wurden in RPMI 1640 mit 10 % FKS enthaltenden Medium kultiviert. Der Zellkulturüberstand wurde gesammelt und bis zur Aufreinigung bei 4°C gelagert. Die im Überstand enthaltenen Antikörper wurden durch mehrmaliges Präzipitieren mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) gewonnen. Bei dem Vorgang handelt es sich um eine Dehydratation, bei der dem sich in Lösung befindenden Protein die Wassermoleküle entzogen werden. Je mehr Ammoniumsulfat in der Lösung vorhanden ist, desto weniger Wasser steht für die Wechselwirkung mit dem Protein zur Verfügung. Ist nicht mehr genug Wasser vorhanden, um die Proteine in Lösung zu halten, fallen die Proteine aus.

Der Überstand wurde dazu im Eisbad langsam gerührt. Dasgleiche Volumen gesättigte Ammoniumsulfatlösung wurde mit Hilfe eines Scheidetrichters langsam in den Überstand getropft. Nach Zugabe des gesamten Volumens wurde für weitere 2 bis 3 Stunden gerührt. Die ausgefallenen Proteine wurden abzentrifugiert (4300 x g, 15 min, RT) und in der Hälfte des Ausgangsvolumens PBS (Ca<sup>2+</sup>- und Mg<sup>2+</sup>-frei) wieder aufgenommen. Die Präzipitation wurde zweimal wiederholt, um die Antikörper anzureichern. Nach der zweiten Wiederholung wurde eine zu 90 % gesättigte Ammoniumsulfatlösung verwendet. Das gewonnene Pellet wurde in einem kleinem Volumen PBS (Ca<sup>2+</sup>- und Mg<sup>2+</sup>-frei) aufgenommen, in einen Dialyseschlauch überführt und gegen PBS (Ca<sup>2+</sup>- und Mg<sup>2+</sup>-frei) bei zweimaligem Flüssigkeitswechsel für 48 Stunden (4°C) entsalzt. Der gewonnene Antikörper wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert.

## 3.6 Molekularbiologische Methoden

### 3.6.1 RNA-Präparation

Die Präparation von Gesamt-RNA aus DC wurde gemäß der Anleitung des RNeasy-Mini® Kits durchgeführt. Die Menge der gewonnenen RNA wurde photometrisch ( $OD_{260}$ ) bestimmt und bis zur Verwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 3.6.2 Reverse Transkription

Die Reverse Transkriptase ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase. Bei einer Reversen Transkription wird mit Hilfe dieses Enzyms einzelsträngige RNA in cDNA umgeschrieben. Weiterhin besitzt dieses Enzym eine RNase H Aktivität, die spezifisch RNA in RNA/DNA Hybriden degradiert.

Für eine Reverse Transkription wurde 1 Mikrogramm der isolierten RNA eingesetzt. Das Volumen wurde mit Hilfe von RNase freiem Wasser auf 12 bzw. 13 Mikroliter eingestellt. Nach der Zugabe von jeweils 1 Mikroliter Oligo dT- (und Random-Primern) ( $500\ \mu\text{g/ml}$ ) wurde die RNA für 10 Minuten bei  $70^{\circ}\text{C}$  denaturiert und anschließend kurz abzentrifugiert. Nach der Zugabe von jeweils 2 Mikroliter 10 x RT-Puffer und dNTP-Mix sowie RNase-Inhibitor ( $10\ \text{U}/\mu\text{l}$ ) wurde der Ansatz für 2 Minuten bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert und kurz abzentrifugiert. Vor der zweistündigen Inkubation bei  $37^{\circ}\text{C}$  wurde 1 Mikroliter Reverse Transkriptase ( $4\ \text{Units}/\mu\text{l}$ ) zum Ansatz pipettiert. Die gewonnene cDNA wurde entweder direkt in eine Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) eingesetzt oder bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 3.6.3 Polymerase Kettenreaktion

Bei der PCR wird vorhandene DNA oder aus RNA gewonnene cDNA mit Hilfe von Oligonukleotid-Primern amplifiziert. Eine PCR gliedert sich in drei Schritte:

- I. Denaturierung der doppelsträngigen DNA
- II. Anlagerung der Primer an die einzelsträngige DNA (*annealing*)
- III. Synthese der doppelsträngigen DNA zwischen den Primern (*elongation*)

Nach einem initialen Denaturierungsschritt von 5 Minuten bei 94° C folgt der erste Zyklus der dreistufigen Amplifikation. Im zweiten Schritt (Annealing) wird durch das Absenken der Temperatur die Hybridisierung der im Überschuss vorhandenen Primer an die einzelsträngige DNA ermöglicht. Anschließend wird die Temperatur erneut erhöht; dadurch beginnt die Polymerase mit dem Einbau der freien Nukleotide zwischen den Primern. Die entstehende doppelsträngige DNA ist ein vollständiges Duplikat der Ausgangs-DNA. Durch mehrfache Wiederholung des Zyklus wird die Menge der DNA exponentiell vermehrt. Abschließend wird die Polymerase inaktiviert, das entstandene Produkt kann bis zur weiteren Verwendung bei 4° C gelagert werden.

Für alle in dieser Arbeit durchgeführten PCRs wurden *pureTaq Ready-To-Go PCR-Beads* verwendet. Die Beads enthalten rekombinante pureTaq DNA-Polymerase (2,5 Units) sowie BSA, dATP, dCTP, dGTP, dTTP (je 200 µM in 10 mM Tris-HCl), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> und 10 x Reaktionspuffer. Nach der Rekonstitution der Beads mit jeweils 21 Mikroliter HPLC Wasser, wurden jeweils 1 Mikroliter Vorwärts- und Rückwärts-Primer (Sequenzen siehe

Tabelle 2.4—1) und 2 Mikroliter der zu amplifizierenden cDNA zugegeben.

Die cDNA wurde mit dem entsprechenden PCR-Programm (siehe unten) amplifiziert.

Reaktionsbedingungen:

a) Chemokin-PCR:

- 1) 94°C, 5 min
- 2) 94°C, 45 s
- 3) 60°C, 45 s
- 4) 72°C, 60 s

Die Schritte 2) bis 4) wurden 25-mal wiederholt. Das PCR-Produkt wurde auf ein 1%iges Agarose-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt (3.6.4). Die Amplifikatgrößen der verschiedenen analysierten Chemokine können Tabelle 2.4—1 entnommen werden.

b) CCR7-PCR:

- 1) 94°C, 5 min
- 2) 94°C, 1 min
- 3) 60°C, 1 min
- 4) 72°C, 1 min

Die Amplifikation der cDNA erfolgte in 25 Wiederholungen der Schritte 2) bis 4). Das erhaltene Produkt hatte eine Größe von 759 Basenpaaren und wurde in 2%igen Agarosegelen wie unter (3.6.4) beschrieben elektrophoretisch aufgetrennt.

c) Morbillivirus-PCR:

- 1) 94°C, 5 min
- 2) 95°C, 1 min
- 3) 51°C, 1 min
- 4) 72°C, 1 min
- 5) 72°C, 7 min

Die Schritte 2) bis 4) wurden 30-mal wiederholt und das erhaltene Produkt (469 Basenpaare) in 1%igen Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt (3.6.4).

### 3.6.4 Gelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese werden geladene Moleküle (wie z.B. DNA) in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Die Auftrennung erfolgt je nach Größe des erwarteten Produkts in Gelen mit verschiedenen Agarosekonzentrationen. Zusätzlich wird dem Gel der bei UV-Licht fluoreszierende Farbstoff Ethidiumbromid beigemischt, der in doppelsträngige DNA interkaliert. Im Anschluss an die Elektrophorese können die Fragmente unterschiedlicher Größe mit UV-Licht sichtbar gemacht werden.

Die bei den verschiedenen PCR-Reaktionen entstandenen Produkte wurden je nach Größe in 1 bis 2%igen Agarosegelen aufgetrennt. Dazu wurde die entsprechende Menge Agarose unter Kochen in einer Mikrowelle in 50 bis 100 Milliliter TAE-Puffer gelöst. Je nach Volumen wurde dem Gel 5 bis 10 Mikroliter 1%ige Ethidiumbromidlösung zugegeben. Nach der Polymerisation des Agarosegels wurden 5 µl des PCR-Produkts mit 1 µl 6x Probenpuffer gemischt und in die Taschen des Gels pipettiert. Zur Identifizierung der Fragmentgrößen wurde auf jedes Gel zusätzlich 5 Mikroliter eines Markers mit definierten Fragmentgrößen aufgetragen.

Die Auftrennung erfolgte bei 80 bis 100 Volt für 30 bis 60 Minuten. Anschließend konnten die Amplifikate durch UV-Licht sichtbar gemacht und bestimmt werden.

### 3.7 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode mit der verschiedene optische Eigenschaften von Zellen gleichzeitig quantifiziert werden können. Zum einen kann ihre relative Größe (Vorwärtsstreulicht, FSC), zum anderen ihre Granularität bestimmt werden (Seitwärtsstreulicht, SSC). Die Granularität der Zellen gibt dabei Aufschluss über deren interne Komplexität. Weiterhin können spezifische Fluoreszenzen und deren Intensitäten gemessen werden. Die zu messenden Zellen werden dabei in einer Trägerflüssigkeit aufgenommen und durch verschiedene Strömungen innerhalb des Durchflusszytometers voneinander getrennt; dadurch können sie einzeln an einem Laserstrahl vorbeigeführt werden.

Zelluläre Proteine können intra- oder extrazellulär mit spezifischen Antikörpern detektiert werden. Die Antikörper sind dazu mit Fluorochromen markiert, die durch Licht unterschiedlicher Wellenlänge angeregt werden können. Dabei wird die Energie zunächst vom verwendeten Fluorochrom absorbiert. Bei der späteren Abgabe dieser Energie wird Licht längerer Wellenlänge emittiert; dieses kann durch verschiedene Filter detektiert werden. Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten verhalten sich dabei proportional zur Anzahl der auf der Zelle gebundenen Fluorochrome. Zur Analyse der aufgenommenen Daten werden die gemessenen optischen Signale (Photonen) in elektronische Signale (Spannungspulse) umgewandelt und digitalisiert (Biosciences, 2004).

Alle Immunfluoreszenzfärbungen, CFSE-Markierungen (3.4.2) und quantitativen Zellzahlanalysen (3.7.3) wurden in einem Drei- bzw. Vierfarben-Durchflusszytometer gemessen (FACS-Calibur™; Becton Dickenson) und mit Hilfe der CellQuest oder CellQuestPro Software ausgewertet. Das Gerät verfügt über zwei Laser (488nm und 635nm Anregungswellenlänge), mit denen Fluorochrome verschiedener Wellenlängen detektiert werden können.

### 3.7.1 Oberflächenfärbungen

Für durchflusszytometrische Färbungen wurden pro Färbung  $\sim 5 \times 10^4$  bis  $1 \times 10^5$  Zellen eingesetzt, die zunächst in 1 Milliliter FACS-Puffer gewaschen (5 min, 350 x g, 4° C) wurden. Anschließend wurden die Zellen in 50 Mikroliter FACS-Puffer mit einer entsprechenden Antikörperverdünnung resuspendiert und für 30 Minuten bei 4° C im Dunkeln inkubiert. Die Konzentrationen der verwendeten Antikörper entsprachen dabei den Herstellerangaben oder wurden bei selbst präparierten Antikörpern durch entsprechende Kontrollfärbungen ermittelt. Im Anschluss daran wurde jede Probe erneut mit 1 Milliliter FACS-Puffer versetzt und gewaschen (5 min, 350 x g, 4° C), um überschüssigen, ungebundenen Antikörper zu entfernen. Wurden nichtmarkierte monoklonale Primärantikörper verwendet, folgte eine weitere 30-minütige Inkubation bei 4° C mit einem fluoreszenzfarbstoffmarkierten Sekundärantikörper: Das Färbervolumen betrug ebenfalls 50  $\mu$ l/Ansatz. Bei Mehrfachfärbungen wurde nach einem weiteren Waschschrift eine Färbung mit einem direkt markierten monoklonalen Antikörper angeschlossen (50  $\mu$ l/Färbung, 30 min, 4° C). Abschließend wurden die Zellen erneut in FACS-Puffer gewaschen. Bei einigen Färbungen wurde dem Ansatz zusätzlich 7-AAD (25  $\mu$ l/Färbung) zugegeben. Tote Zellen nehmen den Farbstoff auf; während lebende Zellen ungefärbt bleiben, dies ermöglicht die Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen. Soweit möglich wurden  $1 \times 10^4$  (7-AAD negative) Zellen gemessen. Zur Kontrolle des Hintergrunds sowie zur Überprüfung der Kompensation wurden entsprechende Isotyp-, Positiv- und Negativkontrollen durchgeführt.

### 3.7.2 Intrazelluläre Färbungen

Für durchflusszytometrische Bestimmungen intrazellulär vorliegender Proteine wurden, wenn möglich,  $5 \times 10^4$  bis  $1 \times 10^5$  Zellen eingesetzt. Für die Färbungen

wurden diese aus den Zellkulturplatten in FACS-Röhrchen überführt und zunächst mit 1 Milliliter FACS-Puffer gewaschen (5 min, 300 x g, 4° C) und anschließend mit Paraformaldehyd (100 µl, 4%ige Lösung/Probe) für 20 Minuten auf Eis fixiert. Nach einem weiteren Waschschrift (s. o.) wurden die Zellen mit Saponinpuffer permeabilisiert (10 min, RT). Nach dem Pelletieren der Zellen wurde der Saponinpuffer vorsichtig abgesaugt, die Zellen wurden anschließend in 50 Mikroliter Saponinpuffer/Probe mit dem Antikörper in entsprechender Verdünnung resuspendiert und für 30 Minuten bei RT im Dunkeln inkubiert und danach erneut mit Saponinpuffer (1 ml/Probe) gewaschen (s. o.). Nichtmarkierte Antikörper wurden mit einem fluoreszenzfarbstoff-markierten Sekundärantikörper (2.6) detektiert (30 min, RT, dunkel). Dieser wurde gemäß Herstellerangaben in Saponinpuffer verdünnt und in einem Volumen von 50 Mikroliter/Färbung eingesetzt. Vor der Analyse der Proben wurde überschüssiger Antikörper durch Waschen mit Saponinpuffer sowie überschüssiges Saponin durch Waschen mit FACS-Puffer entfernt (jeweils 1 ml/Probe) (300 x g, 5 min, 4°C).

### 3.7.3 Quantitative Durchflusszytometrie

Zur direkten Bestimmung der Zellzahl in einer Probe wurden fluoreszenzfarbstoff-markierte Mikrokügelchen in definierter Konzentration verwendet. Die zu zählenden Zellen wurden dazu aus den Zellkulturplatten in FACS-Röhrchen überführt, mit 100 Mikroliter der Mikrokügelchen vermischt und im Durchflusszytometer gezählt. Zur Bestimmung der Zellzahlen wurden verschiedene Regionen definiert (Abbildung 3—5): eine Region definierte Größe und Granularität der Zellen (Region 1), die zweite Region definierte die Morphologie und das Fluoreszenzmuster der Mikrokügelchen. Die Einstellungen des Durchflusszytometers wurden weiterhin so gewählt, dass die Messung nach 1000 gemessenen Ereignissen in der Region 2 abgebrochen wurde. Über die Anzahl der gemessenen Ereignisse in der Region 1 (Zellen)

und die Zahl der gemessenen Ereignisse in der Region 2 (Mikrokügelchen) sowie die definierte Konzentration der Mikrokügelchen in der Lösung, konnte die absolute Zahl der Zellen pro Mikroliter berechnet werden (Formel 3-3).

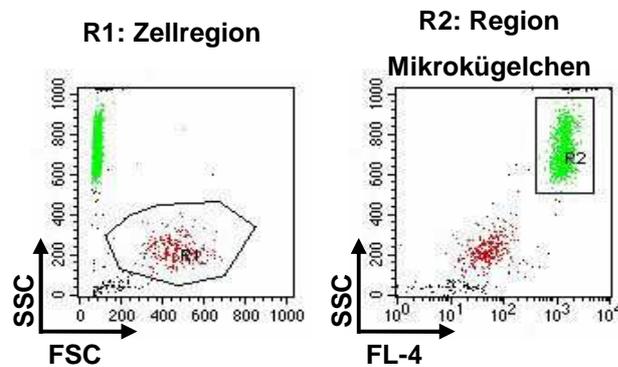


Abbildung 3—5: Dargestellt sind die zur Berechnung der absoluten Zellzahl definierten Regionen

*absolute Zellzahl (Zellen /  $\mu$ l) =*

$$\frac{\text{gezählte Ereignisse in der "Zellregion"}}{\text{gezählte Ereignisse in der "Region der Mikrokügelchen"}} \times \text{Konzentration der Mikrokügelchen}$$

Formel 3-3: Formel zur Berechnung der absoluten Zellzahl in einer Probe

### 3.8 ELISA

Bei der Methode des ELISA werden verschiedene monoklonale Antikörper zur Detektion von löslichen Proteinen, z. B. in Zellkulturüberstand, verwendet. Dazu

wird die Oberfläche einer 96-Napf-Zellkulturplatte mit einem gegen das zu detektierende Protein gerichteten Antikörper beschichtet. Anschließend wird die zu analysierende Probe in die Löcher der Zellkulturplatte gegeben. Die in der Probe enthaltenen Proteine binden an den Antikörper in der Zellkulturplatte, während ungebundene Proteine durch mehrmaliges Waschen entfernt werden. Zur Detektion der gebundenen Proteine wird ein weiterer monoklonaler Antikörper verwendet, der mit Biotin konjugiert ist. Zur Detektion des Biotin wird ein Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Komplex (*horseradishperoxidase-complex*, HRP-Komplex) benutzt. Durch die Zugabe einer Substratlösung und die darauf folgende enzymatische Umsetzung des Substrats durch die HRP entsteht ein farbiges Produkt, das bei einer Wellenlänge von 450 Nanometer photometrisch messbar ist. Durch den Vergleich mit einer gleichzeitig analysierten Referenzprobe mit definierter Konzentration des zu detektierenden Proteins, kann die Konzentration des untersuchten Proteins in der Probe quantifiziert werden.

Die in dieser Arbeit durchgeführten ELISA wurden gemäß dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

### **3.9 Chemotaxis-Assays**

Zur Untersuchung des Migrationsverhaltens DC bzw. T-Zellen wurde ein Zellkultursystem verwendet, bei dem ein Napf einer 24-Napf-Platte durch einen Polycarbonatfilter mit definierter Porengröße (5  $\mu\text{m}$ ) in ein oberes und ein unteres Kompartiment geteilt wurde.

### 3.9.1 Chemotaxis-Assays mit Dendritischen Zellen

Für Chemotaxis-Assays mit DC wurden die Polycarbonatfilter zunächst für 10 Minuten in Migrationsmedium (RPMI 1640, 1 % FKS, 250 U/ml IL-4, 500 U/ml GM-CSF) vorinkubiert. In die Löcher einer 24-Napf-Zellkulturplatte wurden pro Ansatz 600 Mikroliter Migrationsmedium mit entsprechenden Chemokinen vorgelegt (Endkonzentrationen: CCL-19 500ng/ml, CCL-3 250ng/ml). Die DC wurden für 6 oder 8 bzw. 24 Stunden infiziert. Pro Ansatz wurden  $2 \times 10^5$  Zellen abzentrifugiert (300 x g, 3 min, 4° C) und in 100 Mikroliter Migrationsmedium pro Ansatz resuspendiert, bevor sie in das obere Kompartiment des Filtersystems gegeben wurden. Der Filter wurde dann in den mit Migrationsmedium und Chemokinen gefüllten Napf einer 24-Napf-Zellkulturplatte gestellt. Nach einer Inkubationszeit von 150 Minuten bei 37° C wurde der Filter aus der Zellkulturplatte entfernt und dessen Boden fünfmal mit Medium aus dem unteren Kompartiment gespült, um Zellen von der Unterseite des Filters zu entfernen. Das Medium mit den verbleibenden Zellen des oberen Kompartiments wurde in ein FACS-Röhrchen überführt. Zellen und Medium aus dem unteren Kompartiment wurden ebenfalls in FACS-Röhrchen überführt, um zunächst die Zellzahl mittels quantitativer Durchflusszytometrie (3.7.3) zu bestimmen. Anschließend wurde zur Kontrolle der Infektion das MV-N-Protein in den Zellen des oberen und unteren Kompartiments mittels intrazellulärer Färbung (3.7.2) nachgewiesen.

### 3.9.2 Chemotaxis-Assays mit T-Zellen

Die eingefrorenen Überstände infizierten DC wurden auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 300 Mikroliter/Ansatz in den Napf einer 24-Napf-Zellkulturplatte vorgelegt. Die Überstände wurden in der Zellkulturplatte mit 300 Mikroliter RPMI 1640, 0 % FKS und 0,5 % BSA 1:2 verdünnt. Während der Bestimmung der Zellzahl wurden die Polycarbonatfilter ca. 10 Minuten mit RPMI 1640, 0 % FKS vorinkubiert. Allogene T-Zellen wurden ca. 24 Stunden vor dem

Experiment aufgetaut (3.1.4) und in Kultur genommen. Pro Ansatz wurden anschließend  $5 \times 10^5$  T-Zellen abzentrifugiert (300 x g, 3 min, 4° C) und in 100 Mikroliter/Ansatz RPMI 1640, 0 % FKS resuspendiert, bevor sie in das obere Kompartiment eines Polycarbonatfilters pipettiert wurden. Für die Substitutionsexperimente wurde zusätzlich 1 µg/ml CCL-20 zu den Zellkulturüberständen in die unteren Kompartimente gegeben. Nach dreistündiger Inkubation bei 37° C wurden die Filter aus der Zellkulturplatte entfernt und das Medium mit den Zellen aus dem unteren Kompartiment zur Zellzahlbestimmung mittels quantitativer Durchflusszytometrie (3.7.3) in FACS-Röhrchen überführt.

### **3.10 Kokultur Dendritischer Zellen und T-Zellen in dreidimensionalen Kollagenmatrices**

Für die videomikroskopische Analyse von DC-/T-Zellkontakten wurden DC und T-Zellen in dreidimensionalen Kollagenmatrices miteinander vermischt (Friedl et al., 1993).

Das Gemisch der Zellen wird dabei in eine Gelkammer (Friedl and Brocker, 2004) gegeben und kann über einen längeren Zeitraum videomikroskopisch beobachtet werden. Für eine Gelkammer wird ein Deckglas mit einem Vaseline/Paraffingemisch (1:1) auf einem Objektträger befestigt (Entschladen et al., 1997). Eine Seite der Kammer wird zum Beschicken offen gelassen, das Kammervolumen sollte etwa 200 Mikroliter betragen.

Die DC sowie die autologen T-Zellen wurden gezählt, abzentrifugiert (300 g, 3 min, 4° C) und anschließend in 33 Mikroliter RPMI 10 % FKS aufgenommen. Das Mischungsverhältnis der DC zu den T-Zellen betrug dabei 1:6. Für vier Gele mit einem Volumen von je 100 Mikroliter wurde ein Gelansatz aus Bicarbonat (17 µl), MEM (50 µl) und Vitrogen (375 µl) hergestellt. Pro Gel wurden 67 Mikroliter Gelansatz mit den Zellen gemischt und der Ansatz sofort in die vorbereiteten Gelkammern pipettiert. Zum Polymerisieren des Gels

wurden die Gelkammern senkrecht für 20 bis 30 Minuten im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Gelkammern mit RPMI 1640, 10 % FKS aufgefüllt und mit dem Vaseline/Paraffingemisch luftdicht verschlossen. Die folgende videomikroskopische Analyse erfolgte für 16 bis 20 Stunden.

### 3.10.1 Videomikroskopie

Die videomikroskopische Auswertung der DC-/T-Zellkokulturen (3.10) wurde in der Hautklinik der Universität Würzburg durchgeführt. Die mit den Kokulturen beschickten Gelkammern wurden auf dem Objektisch eines Durchlichtmikroskops mit einem Vaseline/Paraffingemisch befestigt. Die Temperatur der Kokulturen wurde durch Rotlichtlampen über den gesamten Zeitraum der Analyse bei 37°C gehalten. Alle 20 Sekunden wurden Einzelbilder mit einer an das Mikroskop angeschlossenen Schwarzweiß-Videokamera aufgenommen und mit einem Coaxialkabel an einen Computer übertragen, digitalisiert und im TIF-Format gespeichert. Gesteuert wurde der Vorgang von der ISCAP-Software. Die einzelnen Bilder wurden anschließend mit der Quicktime™ Software zu einem Film komprimiert. Die Wiedergabegeschwindigkeit der Bilder im Film betrug zehn Bilder pro Sekunde, d. h. eine Sekunde im Film entspricht drei Minuten in Echtzeit.

Bei der anschließenden Auswertung der Interaktion zwischen DC und T-Zellen wurde vom Zeitpunkt des Andockens der T-Zelle an eine DC bis zur Ablösung der T-Zelle eine Bild-zu-Bild-Analyse durchgeführt. Dabei wurden einzelne DC beobachtet, die von T-Zellen kontaktiert wurden. Die Länge der Kontaktdauer im Film wurde dann in Echtzeit umgerechnet und graphisch dargestellt.

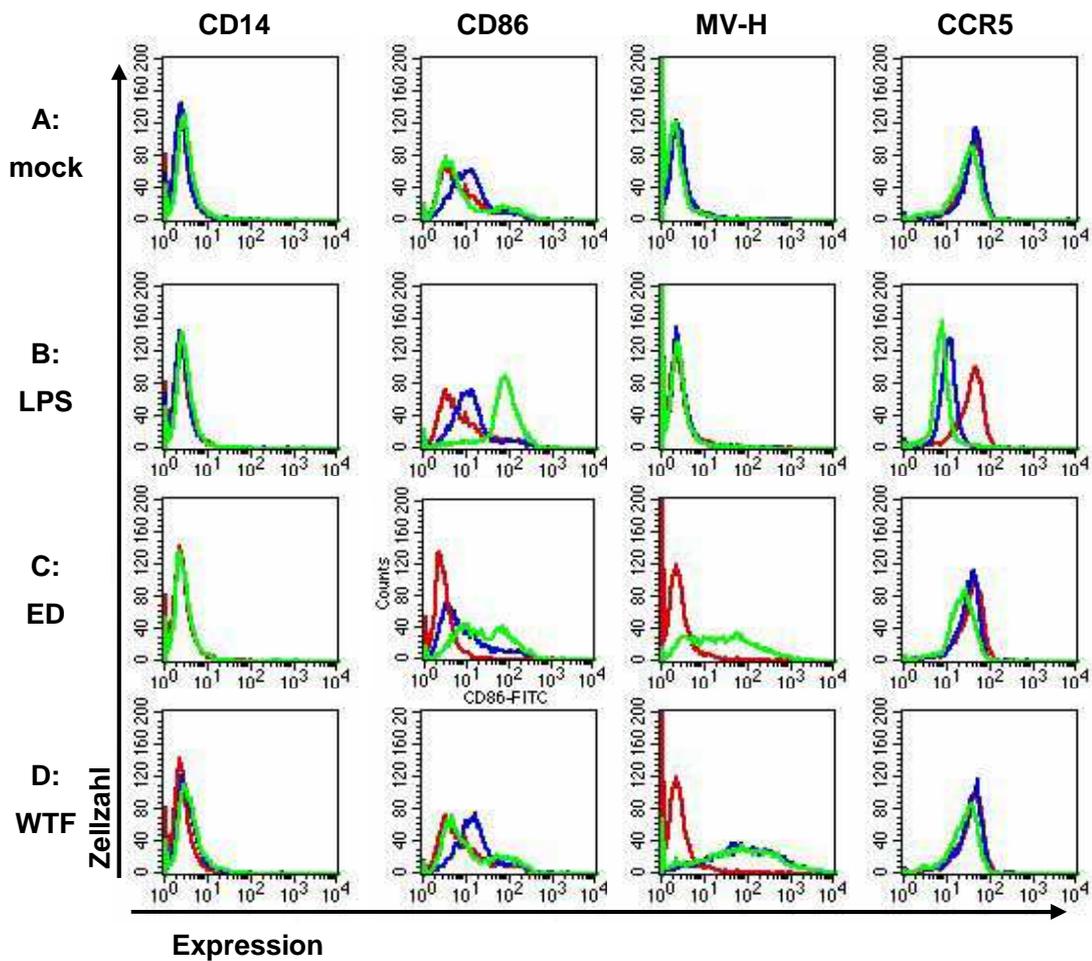
## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Regulation der Chemokinrezeptoren CCR5 und CCR7 und chemotaktisches Verhalten MV-infizierter Dendritischer Zellen**

#### **4.1.1 Einfluss von Masernviren auf die Expression von CCR5**

DC wurden an Tag sechs nach Kulturbeginn geerntet und zunächst für eine Stunde mit dem MV-Wildtypstamm WTF oder dem Vakzinestamm ED mit einer *moi* von 0,5 infiziert. Parallel wurden DC mit einer Mockpräparation oder mit LPS (100 ng/ml) behandelt. Anschließend wurden die Zellen für weitere 5 bzw. 23 Stunden kultiviert. In den folgenden Experimenten wurde zunächst die Veränderung verschiedener Oberflächenmoleküle auf DC untersucht. Weiterhin wurde die Expression des CCR5 in MV-infizierten DC-Kulturen beobachtet.

Die DC wurden mit monoklonalen Antikörpern gegen CD14 (Monozytenmarker, dessen Expression im Verlauf der DC-Entwicklung zurückgeht), CD86 (Reifungsmarker), das virale H-Protein und CCR5 gefärbt. In Abbildung 4—1 ist die Veränderung dieser Oberflächenmoleküle nach sechs Stunden (blaue Kurve) und 24 Stunden (grüne Kurve) im Vergleich zu unbehandelten Zellen (rote Kurve) dargestellt. Die in Tabelle 4.1—1 gezeigten Werte entsprechen den durchschnittlichen Fluoreszenzintensitäten (*mean fluorescence intensity*, MFI) der in Abbildung 4—1 gezeigten Histogramme.



**Abbildung 4—1: Durchflusszytometrische Analyse charakteristischer Oberflächenmoleküle auf Dendritischen Zellen.** Die Zellen wurden mit einer moi von 0,5 infiziert bzw. mit 100 ng/ml LPS ausgereift oder mit der entsprechenden Mockkontrolle behandelt. Die Färbung erfolgte gegen CD14, CD86, MV-H sowie CCR5. Gefärbt wurden unbehandelte Zellen (rot), 6 Stunden nach Infektion (blau) und 24 Stunden nach Infektion (grün). A: „mock-behandelte“ Zellen, B: LPS-behandelte Zellen, C: ED-infizierte Zellen, D: WTF-infizierte Zellen.

Im oberen Teil der Abbildung sind die Färbungen der mit einer Mockpräparation (A) und LPS (B) behandelten Zellen dargestellt. Die CD14-Färbung ist in allen untersuchten Proben negativ (durchschnittliche Fluoreszenzintensität <5). Zur Kontrolle der Infektion wurde in allen Ansätzen eine Färbung des viralen H-Proteins durchgeführt. In den MV-infizierten DC-Kulturen konnten 24 Stunden nach der Infektion 85 % WTF-infizierte Zellen und 64 % ED-infizierte DC

nachgewiesen werden. Die mit einer Mockpräparation behandelten und die LPS-ausgereiften Zellen zeigten erwartungsgemäß keine Expression des viralen H-Proteins.

Die Expression von CD86 veränderte sich in den verschiedenen untersuchten Kulturen im zeitlichen Verlauf: Nur geringe Veränderungen zeigten die unbehandelten Zellen und die mit einer Mockpräparation behandelten Zellen (Abbildung 4—1 A). Nach Behandlung der DC-Kulturen mit LPS (B) dagegen stieg die Expression von CD86 bereits nach 6 Stunden an und war nach 24 Stunden stark erhöht. In den mit MV-infizierten Kulturen (C und D) war die CD86-Expression im Verhältnis zu der von LPS-behandelten Zellen (B) geringer, stieg jedoch im Vergleich zu unbehandelten oder mit einer Mockpräparation (A) behandelten Zellen ebenfalls an.

Auf unbehandelten und mit einer Mockpräparation behandelten Zellen wurde eine MFI von 37 bzw. 41 für die Expression von CCR5 gemessen (vgl. Tabelle 4.1—1), die gemessenen Werte blieben über den Beobachtungszeitraum von 24 Stunden in etwa konstant. Im Vergleich dazu zeigten die mit LPS behandelten Zellen bereits sechs Stunden nach der Zugabe von LPS einen deutlichen Rückgang der CCR5-Expression. 24 Stunden nach der Zugabe von LPS wurde eine weitere Abnahme der CCR5-Expression beobachtet. Die CCR5-Färbungen der MV-infizierten DC-Kulturen (Abbildung 4—1 C und D) zeigten, dass sich die Expression von CCR5 sowohl in ED-infizierten als auch in WTF-infizierten DC-Kulturen im zeitlichen Verlauf nur geringfügig verändert.

Anhand dieser Ergebnisse wird deutlich, dass die Infektion einer DC-Kultur mit MV die Expression von CCR5 nicht beeinflusst, obwohl die Expression anderer Reifungsmarker wie CD86 und CD80 (nicht gezeigt) ansteigt, was auf eine Ausreifung der DC hindeutet. Die Ausreifung der DC mit LPS dagegen führt erwartungsgemäß zu einer starken Zunahme der CD86-Expression und zu einer Abnahme der CCR5-Expression.

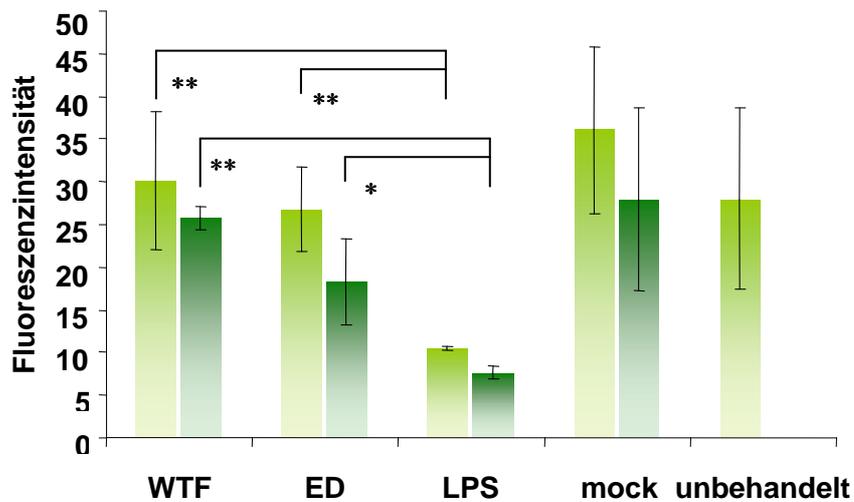
In Tabelle 4.1—1 ist die gemessene MFI der in Abbildung 4—1 gezeigten Histogramme aufgeführt.

**Tabelle 4.1—1: Durchschnittliche Fluoreszenzintensität der in Abbildung 4—1 dargestellten Histogramme**

unbehandelt			
CD14	MV-H	CCR5	CD86
3	3	36	17

	6 h p.i.				24 h p.i.			
	CD14	MV-H	CCR5	CD86	CD14	MV-H	CCR5	CD86
mock	3	4	41	19	4	2	31	22
LPS	3	3	11	20	3	3	8	84
ED	3	64	32	24	4	108	23	44
WTF	4	207	36	25	4	222	27	28

In Abbildung 4—2 ist die statistische Auswertung mehrerer durchflusszytometrischer Analysen LPS- und „mock“-behandelter Zellen sowie WTF- und ED-infizierter DC-Kulturen dargestellt. Die bereits in Abbildung 4—1 beschriebene Beobachtung, dass eine MV-Infektion keinen Einfluss auf die Expression von CCR5 hat, konnte hier bestätigt werden.

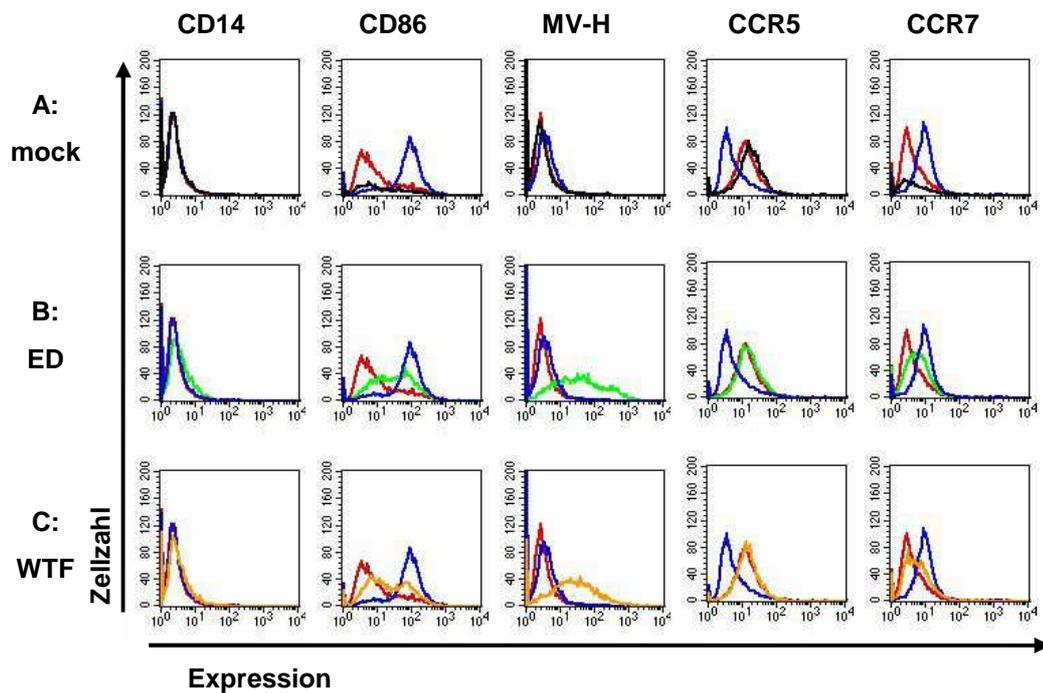


**Abbildung 4—2: Statistische Auswertung mehrerer durchflusszytometrischer Analysen der Oberflächenexpression von CCR5 nach Infektion von DC-Kulturen mit MV.** Die Zellen wurden mit einer moi von 0,5 infiziert bzw. mit 100 ng/ml LPS ausgereift oder mit einer entsprechenden Mockpräparation behandelt. \*, P < 0,05; \*\*, P < 0,01

#### 4.1.2 Mit MV infizierte DC-Kulturen exprimieren kein CCR7 auf der Oberfläche

In weiteren durchflusszytometrischen Analysen wurde untersucht, ob die Infektion von DC-Kulturen mit MV zu einer Oberflächenexpression von CCR7 führt.

Dazu wurden DC, wie in 4.1.1 beschrieben, entweder mit ED oder WTF infiziert oder mit einer Mockpräparation behandelt oder mit LPS (100 ng/ml) ausgereift. Die Analyse der Oberflächenmoleküle erfolgte 24 Stunden nach der Infektion. Als Kontrollen wurden Färbungen gegen CD14, CD86, CCR5 sowie zur Kontrolle der Infektion gegen das MV-H-Protein durchgeführt.



**Abbildung 4—3: Durchflusszytometrische Analyse der CCR7-Expression auf DC nach Infektion mit MV.** DC wurden mit WTF oder ED (moi 0,5) für 24 Stunden infiziert und anschließend mit Antikörpern gegen CD14, CD86, MV-H, CCR5 und CCR7 gefärbt. In einem Histogramm ist jeweils die Färbung der unbehandelten Zellen (rot), die Färbung LPS-behandelter Zellen (blau) sowie die von „mock“-behandelten Zellen (A, schwarz), ED-infizierten Zellen (B, grün), WTF-infizierten Zellen (C, orange) dargestellt.

Die abgebildeten Histogramme (Abbildung 4—3) zeigen jeweils die Färbung unbehandelter Zellen (rot), LPS ausgereifter Zellen (blau) und entweder WTF- (orange) oder ED-infizierter (grün) bzw. mit einer Mockpräparation (schwarz) behandelte DC-Kulturen. Dabei blieb die MFI von CD14 in allen Fällen < 4. Die MFI der CD86-Färbungen stieg 24 Stunden nach LPS-Behandlung stark an. Die Expression von CD86 lag in MV-infizierten Kulturen (Abbildung 4—3 B und C) zwischen der mit einer Mockpräparation und der mit LPS behandelten Zellen. Erneut bestätigt wurde die konstante Expression von CCR5 in infizierten DC-Kulturen, während die MFI bei LPS-behandelten Zellen deutlich zurückging. Die Expression von CCR7 änderte sich in allen Fällen nur geringfügig, jedoch konnte ein leichter Anstieg der MFI in LPS-behandelten Zellen festgestellt werden. Die CCR7-Expression in MV-infizierten DC-Kulturen war geringer als die Expression LPS-behandelter Zellen, stieg aber im Vergleich zu den

unbehandelten Zellen leicht an. 24 Stunden nach der Infektion mit WTF waren 62 % der Zellen und 66 % der mit ED-infizierten Zellen MV-H positiv. Die LPS-ausgereiften sowie die mit einer Mockpräparation behandelten DC zeigten erwartungsgemäß keine Expression des viralen H-Proteins.

In Tabelle 4.1—2 ist die gemessene MFI der in Abbildung 4—3 gezeigten Histogramme aufgeführt.

**Tabelle 4.1—2: Durchschnittliche Fluoreszenzintensität der in Abbildung 4—3 dargestellten Histogramme**

	CD14	CD86	MV-H	CCR5	CCR7
unbehandelt	3	20	3,5	16	5
mock, 24 h p.i.	3	22	3	20	6
LPS, 24 h p.i.	3	91	4	8	11
ED, 24 h p.i.	4	49	79	18	7
WTF, 24 h p.i.	3,5	40	16	16	8

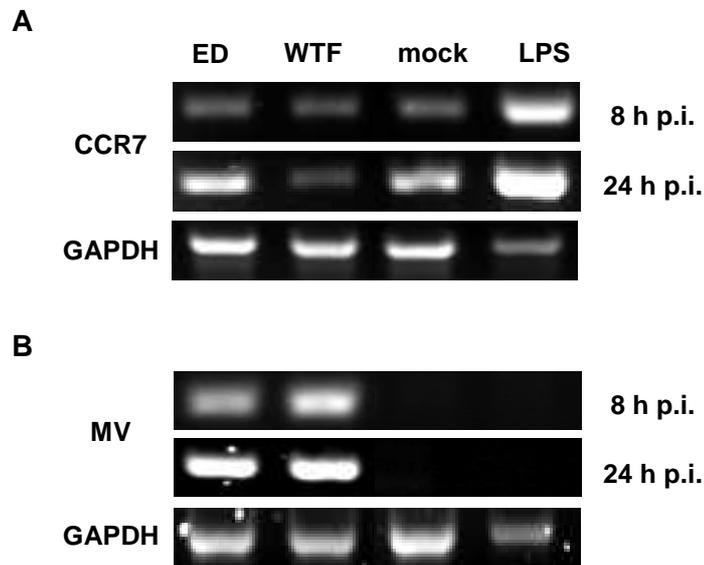
DC aus den mit MV-infizierten Kulturen zeigten nach der Analyse der CCR5- und CCR7-Expression, einen Phänotyp, der zwar auf eine Reifung der DC hindeutet (Anstieg der CD86-Expression, erhöhte Expression von CD80, CD83 [nicht gezeigt]), aber keiner vollständigen Ausreifung entspricht.

### 4.1.3 Einfluss von Masernvirusinfektionen auf die Induktion von CCR7 mRNA

Die Färbung des CCR7-Oberflächenmoleküls erwies sich im Verlauf der Arbeit als schwierig und stark spenderabhängig. Um die Expression von CCR7 besser nachzuweisen, können Agenzien wie beispielsweise PGE<sub>2</sub> (Scandella et al., 2002) eingesetzt werden. In dieser Arbeit wurde jedoch auf den Einsatz von PGE<sub>2</sub> verzichtet, da dessen Wirkung auf die Zellen bzw. den Verlauf der Infektion unbekannt ist.

Um die ausbleibende Induktion von CCR7 zu bestätigen, wurde aus infizierten DC-Kulturen RNA isoliert und mit Hilfe einer RT-PCR die Menge CCR7 spezifischer mRNA bestimmt. Abbildung 4—4 A zeigt das Ergebnis einer CCR7-spezifischen RT-PCR. Die Amplifikate der isolierten und in cDNA transkribierten RNA wurden elektrophoretisch aufgetrennt. Dabei wurden von links nach rechts Proben ED-infizierter, WTF-infizierter, „mock“- oder LPS-behandelter DC-Kulturen aufgetragen.

Bereits nach achtstündiger LPS-Behandlung konnte eine deutliche Zunahme der CCR7 mRNA beobachtet werden (obere Reihe), die noch deutlicher nach 24 Stunden zu erkennen war (mittlere Reihe). Dagegen konnte keine Zunahme CCR7-spezifischer mRNA in den Proben aus MV-infizierten DC-Kulturen nachgewiesen werden. Abbildung 4—4 B zeigt den Nachweis MV-spezifischer mRNA (Infektionskontrolle). In WTF- und ED-infizierten DC-Kulturen konnte eine Zunahme virusspezifischer mRNA zwischen 8- und 24-stündiger Infektion gezeigt werden. In der mRNA der mit einer Mockpräparation bzw. mit LPS behandelten Zellen ließen sich keine MV-spezifischen Sequenzen amplifizieren.



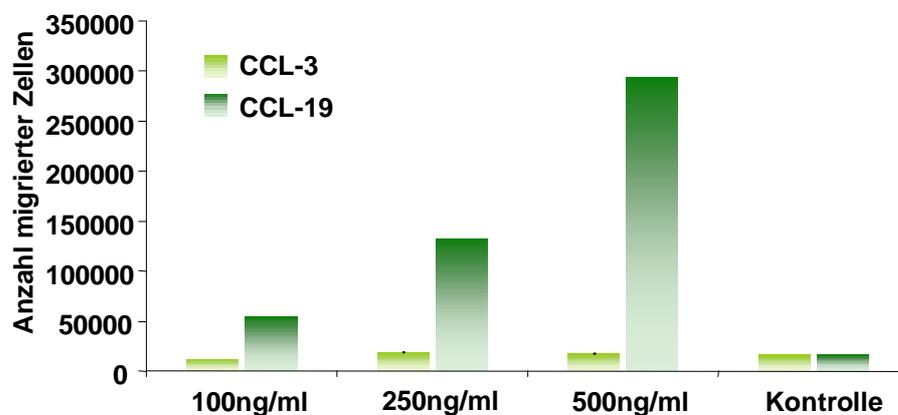
**Abbildung 4—4: CCR7-spezifische RT-PCR in DC nach Infektion mit MV oder LPS-Behandlung.** DC wurden an Tag sechs der Kultur für 8 und 24 Stunden mit MV (ED und WTF) infiziert (moi 1), mit einer Mockpräparation behandelt oder mit LPS (100 ng/ml) ausgereift. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurde die RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und in eine CCR7-spezifische PCR eingesetzt (A). Zur Kontrolle der Infektion wurde dieselbe cDNA in eine Morbillivirus-spezifische PCR eingesetzt. Als Ladekontrolle wurde eine GAPDH-spezifische PCR durchgeführt. Jeweils 5  $\mu$ l der erhaltenen PCR-Produkte wurden in einem 2%-igen Agarosegel aufgetrennt.

#### 4.1.4 Migrationsverhalten Dendritischer Zellen

Aufgrund der Expression verschiedener Chemokin-Rezeptorkombinationen auf unreifen und reifen DC zeigen diese ein unterschiedliches Migrationsverhalten auf bestimmte Chemokine. Wie aus den zuvor beschriebenen Experimenten hervorgeht, führen mit MV infizierte DC den Rezeptorwechsel von CCR5 nach CCR7 nicht oder in nur sehr eingeschränktem Maß durch. In den folgenden Experimenten sollte das Migrationsverhalten von DC in Richtung verschiedener Chemokine untersucht werden. Dazu wurden zwei Chemokine gewählt, die entweder als Ligand für CCR5 (CCL-3) oder für CCR7 (CCL-19) fungieren.

#### 4.1.4.1 Migrationsverhalten reifer DC in Richtung verschiedener Chemokine

Zunächst wurde untersucht, wie sich reife DC in ihrem Migrationsverhalten bezüglich der beiden untersuchten Chemokine unterscheiden. Dazu wurde ein Teil der DC an Tag sechs der Kultur für 24 Stunden mit LPS (100 ng/ml) ausgereift, während der andere Teil unbehandelt blieb. Mit Hilfe eines Polycarbonatfilters wurde ein Napf einer 24-Napf-Zellkulturplatte in ein oberes und ein unteres Kompartiment unterteilt. Im unteren Kompartiment wurde Migrationsmedium mit unterschiedlichen Konzentrationen an Chemokinen vorgelegt. Die Zellen wurden ins obere Kompartiment pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 150 Minuten bei 37°C wurde die Zahl der Zellen im unteren Kompartiment mittels quantitativer Durchflusszytometrie bestimmt.



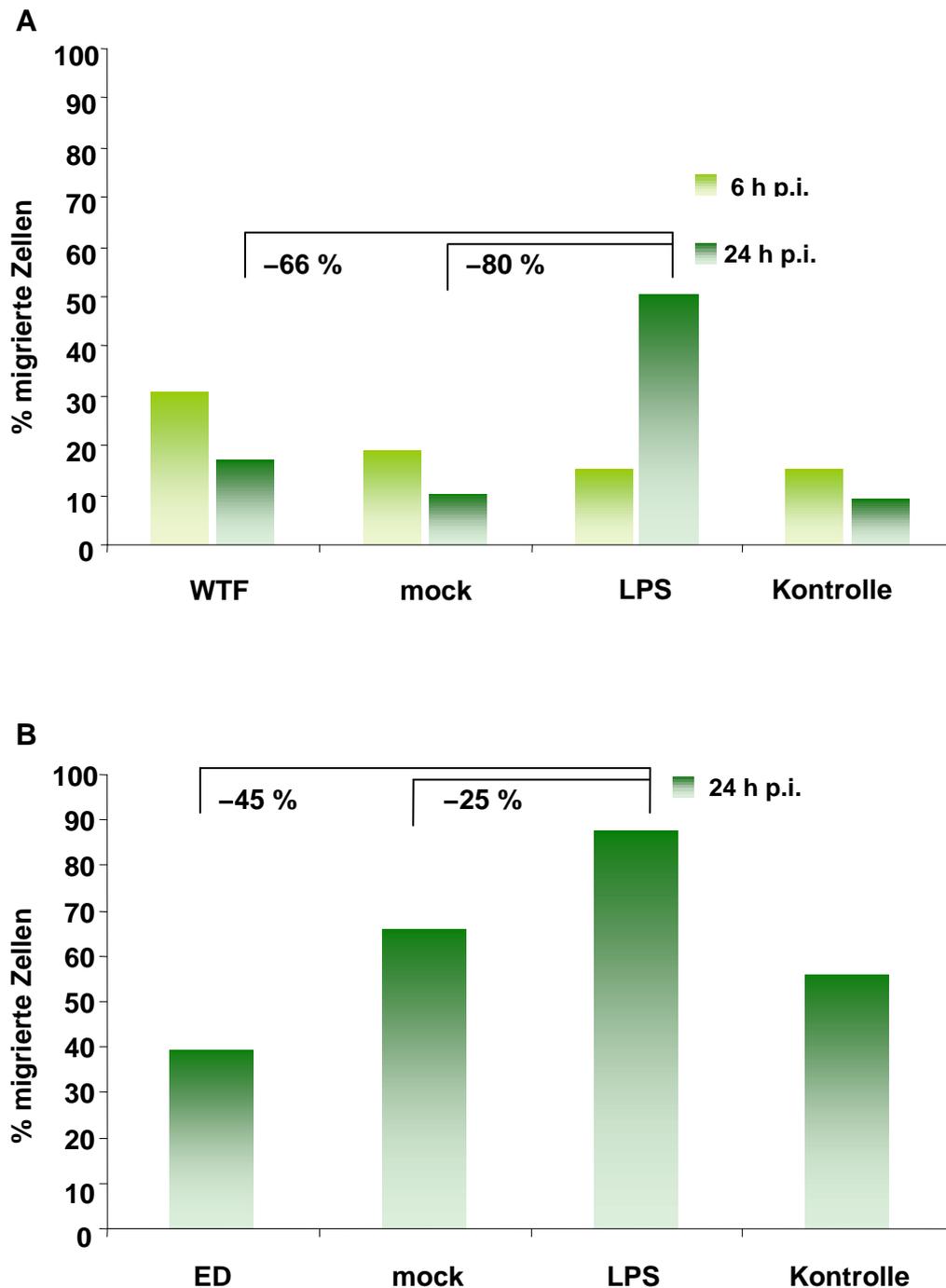
**Abbildung 4—5: Migrationsverhalten reifer DC in Richtung der Chemokine CCL-19 und CCL-3.** DC wurden für 24 Stunden mit LPS (100 ng/ml) ausgereift und in die oberen Kompartimente von Filtersystemen eingesetzt. In die unteren Kompartimente wurde Migrationsmedium mit CCL-3 bzw. CCL-19 (100 ng/ml, 250 ng/ml oder 500 ng/ml) vorgelegt. Nach einer Inkubationszeit von 150 Minuten wurde die Anzahl der migrierten Zellen im unteren Kompartiment mittels quantitativer Durchflusszytometrie bestimmt. Als Negativkontrolle wurden Zellen in ein Filtersystem eingesetzt, in dessen unterem Kompartiment keine zusätzlichen Chemokine enthalten waren.

Die Abbildung 4—5 zeigt, dass reife DC in Richtung CCL-19 wandern. Je höher die Konzentration des Chemokins im unteren Kompartiment ist, desto mehr DC können nach dem Ende der Inkubationszeit im unteren Kompartiment detektiert werden. Dagegen haben unterschiedliche Konzentrationen von CCL-3 (100 ng/ml bis 500 ng/ml) im unteren Kompartiment keinen Einfluss auf die Migration reifer DC. Bei allen drei untersuchten Konzentrationen befanden sich zwischen 12000 und 17000 Zellen im unteren Kompartiment, während in der Mediumkontrolle ca. 16000 Zellen gemessen werden konnten.

Das Ergebnis dieses Versuchs zeigt, dass die hier verwendeten, mit LPS ausgereiften DC den Rezeptorwechsel von CCR5 nach CCR7 vollzogen haben. Sie haben die Fähigkeit unreifer DC verloren, in Richtung eines CCR5-Liganden zu migrieren. Dagegen können sie in Richtung des CCR7-Liganden CCL-19 migrieren.

#### **4.1.4.2 Vergleich des Migrationsverhaltens DC aus MV-infizierten Kulturen mit LPS-ausgereiften DC**

In den nachfolgend beschriebenen Experimenten wurde das Migrationsverhalten MV-infizierter DC-Kulturen gegenüber CCL-19 untersucht. Dazu wurden die DC entweder infiziert (siehe 4.1.1) oder mit LPS ausgereift. Als Kontrolle wurden DC eingesetzt, die mit einer Mockpräparation behandelt wurden. Sechs und 24 Stunden nach der Infektion oder Behandlung mit LPS wurden die DC in die oberen Kompartimente eines Filtersystems eingesetzt. In die unteren Kompartimente wurde Migrationsmedium mit 500 ng/ml CCL-19 vorgelegt. Nach einer Inkubationszeit von 150 Minuten bei 37° C wurde die Anzahl der Zellen im unteren Kompartiment, wie zuvor beschrieben (4.1.4.1), quantifiziert. Abbildung 4—6 zeigt die Ergebnisse dieser Experimente.



**Abbildung 4—6: Migrationsverhalten MV-infizierter DC in Richtung CCL-19.** DC wurden mit einer *moi* von 0,5 mit MV-WTF für 6 und 24 Stunden (A) oder mit MV-ED für 24 Stunden (B) infiziert oder für die gleiche Dauer mit LPS ausgereift bzw. mit einer Mockpräparation behandelt. Anschließend wurden die DC in die oberen Kompartimente von Filtersystemen eingesetzt. In die unteren Kompartimente wurde Migrationsmedium mit CCL-19 (500 ng/ml) vorgelegt. Nach einer Inkubationszeit von 150 Minuten wurden die Zellzahlen im unteren Kompartiment mit Hilfe quantitativer Durchflusszytometrie bestimmt. Als Kontrolle dienten LPS-behandelte Zellen, die in ein Filtersystem ohne Chemokine eingesetzt wurden. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der migrierten Zellen, angegeben ist die prozentuale Veränderung der Zellzahl der MV-infizierten DC-Kulturen gegenüber mit LPS-ausgereiften DC-Kulturen. Siehe auch Abbildung 4—8.

In Abbildung 4—6 A ist der prozentuale Anteil migrierter Zellen dargestellt, die zuvor für 6 bzw. 24 Stunden mit MV infiziert wurden. Dabei wird deutlich, dass zu einem frühen Zeitpunkt nach der Infektion (6 h p.i.) in der Kultur der WTF-infizierten DC (ca. 38 % MV-N-positiv, vgl. Abbildung 4—8) mehr Zellen ins untere Kompartiment migrieren als in den Kulturen der mit LPS oder der mit einer Mockpräparation behandelten Zellen. In diesen Ansätzen entspricht der Prozentsatz der migrierten Zellen in etwa der des Kontrollansatzes (Migrationsmedium ohne CCL-19). Wurden die DC-Kulturen dagegen für 24 Stunden mit WTF infiziert, befanden sich nach dem Ende der Inkubationszeit ca. 17 % der eingesetzten DC im unteren Kompartiment (ca. 28 % MV-N-positiv DC, vgl. Abbildung 4—8). Die für 24 Stunden mit LPS behandelten Zellen zeigten dagegen eine bessere Migration in Richtung CCL-19. Im unteren Kompartiment befanden sich nach Ende der Inkubationszeit ca. 50 % der eingesetzten Zellen. In den Ansätzen der mit einer Mockpräparation behandelten Zellen sowie der Mediumkontrolle waren nur etwa 10 % der eingesetzten Zellen ins untere Kompartiment migriert. Im Vergleich zu den für sechs Stunden mit LPS behandelten Zellen konnten in den für 24 Stunden mit LPS behandelten Zellen deutlich mehr migrierte DC im unteren Kompartiment gemessen werden. In der für 24 Stunden mit WTF infizierten Kultur dagegen hatte sich die Anzahl der migrierten Zellen im Vergleich zu den für sechs Stunden infizierten DC deutlich verringert.

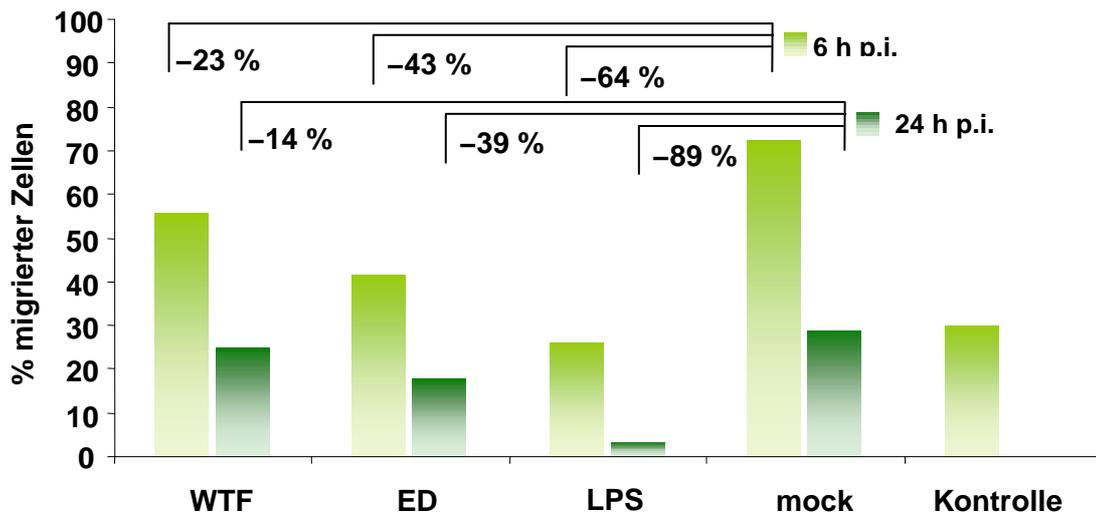
Die Abbildung 4—6 B zeigt die Ergebnisse eines Experiments in den DC-Kulturen für 24 Stunden mit dem Vakzinestamm ED infiziert und anschließend in ein Filtersystem eingesetzt wurden (ca. 17 % MV-N-positive DC, vgl. Abbildung 4—8). Auch die Zellen aus einer mit ED-infizierten Kultur zeigten eine deutlich schlechtere Migration in Richtung CCL-19 als LPS-ausgereifte DC. Der prozentuale Anteil migrierter Zellen in der Kultur der ED-infizierten DC war im Vergleich zu dem LPS behandelten Zellen in etwa um die Hälfte reduziert. Auch in der Mediumkontrolle und den mit einer Mockpräparation behandelten Kulturen wurden in den unteren Kompartimenten mehr Zellen gezählt als in der Kultur der mit ED infizierten DC.

Die Ergebnisse dieser Experimente zeigen, dass DC-Kulturen, die mit dem Wildtypstamm WTF oder mit dem Vakzinestamm ED infiziert wurden, 24 Stunden nach der Infektion deutlich schlechter in Richtung des CCR7-Liganden CCL-19 migrieren als DC aus Kulturen, die für 24 Stunden mit LPS behandelt wurden.

#### **4.1.4.3 Migrationsverhalten DC aus MV-infizierten Kulturen in Richtung CCL-3 im Vergleich zum Migrationsverhalten LPS-ausgereifter DC**

In den vorausgegangenen Experimenten (4.1.1) wurde beobachtet, dass sich die Expression von CCR5 in DC-Kulturen, die mit MV infiziert wurden (ED und WTF), nicht verändert. Aus diesem Grund sollte in weiteren Experimenten die Migration dieser Zellen in Richtung eines CCR5-Liganden untersucht werden. Als Ligand für CCR5 wurde CCL-3 gewählt.

Für das in Abbildung 4—7 dargestellte Experiment wurden DC-Kulturen eingesetzt, die für 6 bzw. 24 Stunden mit ED und WTF infiziert wurden (WTF: 7 % MV-N-positive Zellen, ED: 17 % MV-N-positive Zellen 24 Stunden nach Infektion, vgl. Abbildung 4—9), in Filtersysteme eingesetzt. Als Kontrollen wurden LPS oder mit einer Mockpräparation behandelte DC eingesetzt. In die unteren Kompartimente der Filtersysteme wurde Migrationsmedium mit 250 ng/ml CCL-3 eingesetzt.



**Abbildung 4—7: Migrationsverhalten MV-infizierter DC in Richtung CCL-3:** DC-Kulturen wurden mit einer moi von 0,25 mit MV-WTF oder MV-ED infiziert oder mit einer Mockpräparation behandelt und 6 bzw. 24 Stunden nach der Infektion in Filtersysteme eingesetzt, deren untere Kompartimente Migrationsmedium mit CCL-3 (250 ng/ml) enthielten. Als Kontrolle wurden DC eingesetzt, die für 6 bzw. 24 Stunden mit LPS ausgereift wurden. Nach einer Inkubationszeit von 150 Minuten bei 37° C wurde die Zellzahl der migrierten Zellen im unteren Kompartiment durchflusszytometrisch quantifiziert. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen in ein Filtersystem eingesetzt, das Migrationsmedium ohne CCL-3 enthielt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der migrierten Zellen, angegeben ist die prozentuale Reduktion der Zellzahl der MV-infizierten DC-Kulturen gegenüber mit Mockpräparation behandelten DC-Kulturen. Siehe auch Abbildung 4—9.

Für MV-infizierte Kulturen war der prozentuale Anteil migrierter Zellen im unteren Kompartiment (6 Stunden nach Infektion) im Vergleich zum Anteil der Zellen aus den mit einer entsprechenden Mockkontrolle behandelten Kulturen etwas reduziert. Der prozentuale Anteil der Zellen aus LPS-ausgereiften Kulturen war im Vergleich dazu bereits sechs Stunden nach der Zugabe von LPS deutlich reduziert.

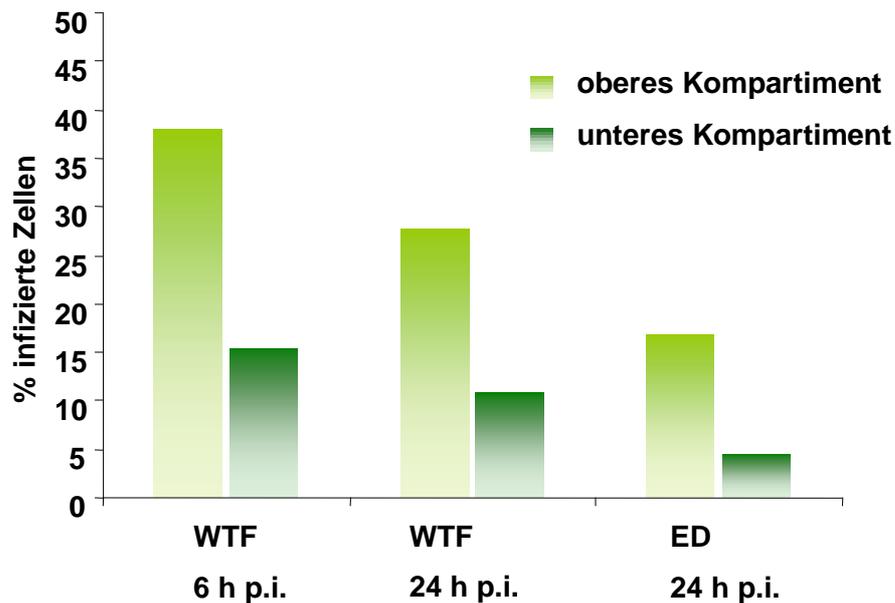
In allen Ansätzen migrierten die eingesetzten Zellen deutlich schlechter, wenn die Kulturen zuvor für 24 Stunden infiziert wurden bzw. mit LPS ausgereift waren. Der Anteil der migrierten Zellen reduzierte sich für WTF-infizierte Zellen auf 25 % der eingesetzten Zellen im unteren Kompartiment, gegenüber 56 % gezählter Zellen im unteren Kompartiment nach sechs Stunden Infektion mit LPS. Im Fall der Kulturen, die für 24 Stunden mit ED infiziert wurden, konnte

derselbe Effekt beobachtet werden. Hier reduzierte sich die Zahl gezählter Zellen im unteren Kompartiment von 42 % im Fall der für sechs Stunden infizierten Zellen auf 18 % der eingesetzten Zellen, die für 24 Stunden mit ED infiziert wurden. Auch die mit einer Mockpräparation behandelten Kulturen zeigten 24 Stunden nach der Behandlung eine verringerte Migration in Richtung des CCR5-Liganden CCL-3. Am deutlichsten war der Effekt bei Zellen aus LPS-ausgereiften Kulturen zu beobachten. Hier fand man nach sechsstündiger Ausreifung mit LPS 26 % der eingesetzten Zellen und nach 24-stündiger Ausreifung nur noch 3 % der eingesetzten Zellen im unteren Kompartiment.

Die Ergebnisse des hier gezeigten Experiments zeigen, dass DC-Kulturen, die mit ED oder WTF infiziert wurden, ein ähnliches Migrationsverhalten in Richtung CCL-3 zeigen, wie DC aus Kulturen, die mit einer Mockpräparation behandelt wurden. Zellen aus Kulturen, die mit LPS ausgereift wurden, verlieren dagegen mit zunehmender Ausreifung die Fähigkeit, in Richtung des CCR5-Liganden CCL-3 zu migrieren.

#### **4.1.4.4 Infizierte Zellen verbleiben im oberen Kompartiment**

Um die Infektion der im Abschnitt 4.1.4.2 und 4.1.4.3 eingesetzten Zellen zu überprüfen und gleichzeitig Informationen über den Verbleib der infizierten Zellen zu erhalten, wurde nach der quantitativen Analyse der Zellzahl eine intrazelluläre Färbung gegen das MV-N-Protein durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Färbungen sind in Abbildung 4—8 und Abbildung 4—9 dargestellt. Dabei entsprechen die jeweiligen Färbungen den in den Abschnitten 4.1.4.2 und 4.1.4.3 dargestellten Experimenten.

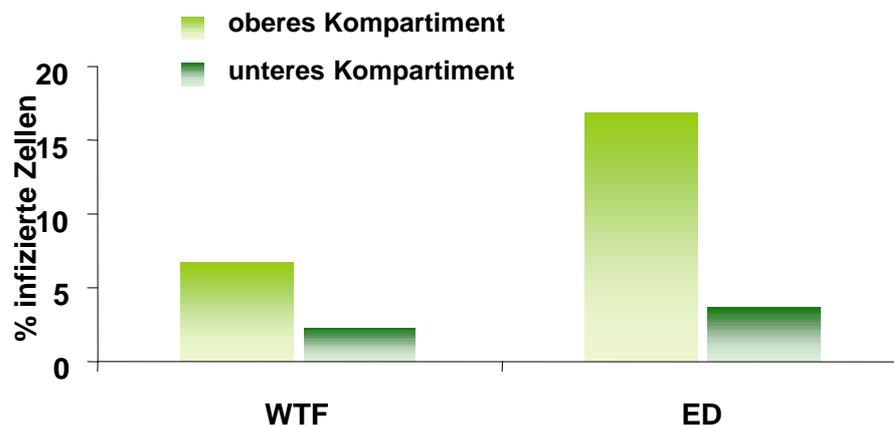


**Abbildung 4—8: Analyse der MV-infizierten Zellen im oberen und unteren Kompartiment.** Nach der quantitativen Analyse der Zellzahl (vgl. Abbildung 4—6) wurden die DC aus den oberen und unteren Kompartimenten mit einem anti-MV-N-Antikörper (F227) intrazellulär gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Dargestellt ist der prozentuale Anteil MV-N-positiver Zellen an der Gesamtpopulation im oberen und unteren Kompartiment. Die hier gezeigte Analyse bezieht sich auf das in Abbildung 4—6 dargestellte Experiment.

Die Abbildung 4—8 zeigt den prozentualen Anteil MV-N-positiver Zellen im oberen und unteren Kompartiment der in Abbildung 4—6 dargestellten CCL-19-abhängigen Migrationsexperimente. Dabei wird deutlich, dass in allen untersuchten Ansätzen die infizierten DC vorwiegend im oberen Kompartiment verbleiben. Im Ansatz der für sechs Stunden mit WTF infizierten DC-Kulturen konnten im oberen Kompartiment 38 % MV-N-positive Zellen detektiert werden, während sich im unteren Kompartiment nur etwa 15 % MV-N-positive Zellen befanden. Der linke Teil der Abbildung 4—8 entspricht dabei dem in Abbildung 4—6 A dargestellten Experiment. Wurden DC-Kulturen eingesetzt, die für 24 Stunden mit WTF infiziert wurden, konnten nach der Migrationszeit von 150 Minuten ebenfalls die infizierten Zellen vorwiegend im oberen Kompartiment der Filtersysteme detektiert werden. In dem dargestellten Experiment wurden im

oberen Kompartiment 28 % infizierte Zellen gemessen, während sich im unteren Kompartiment nur 11 % MV-N-positive Zellen befanden.

Auch Zellen aus Kulturen, die mit dem Vakzinestamm ED infiziert wurden, konnten nach einer Migrationszeit von 150 Minuten vorwiegend im oberen Kompartiment nachgewiesen werden (Abbildung 4—8, rechte Seite). Hier wurden im oberen Kompartiment 17 % MV-N-positive Zellen gemessen, während sich im unteren Teil des Filtersystems nur 4 % MV-N-positive Zellen befanden (s. a. Abbildung 4—6 B).



**Abbildung 4—9: Analyse der MV-infizierten Zellen im oberen und unteren Kompartiment.** Nach der quantitativen Analyse der Zellzahl (vgl. Abbildung 4—7) wurden die DC aus den oberen und unteren Kompartimenten mit einem anti-MV-N-Antikörper (F227) intrazellulär gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Dargestellt ist der prozentuale Anteil MV-N-positiver Zellen an der Gesamtpopulation der eingesetzten Zellen. Die hier gezeigte Analyse bezieht sich auf das in Abbildung 4—7 dargestellte Experiment zum chemotaktischen Verhalten MV-infizierter Zellen in Richtung CCL-3.

Die Abbildung 4—9 zeigt die Ergebnisse der intrazellulären MV-N-Färbung aus den in Abbildung 4—7 dargestellten Experimenten zum CCL-3-abhängigen chemotaktischen Verhalten DC. Auch hier konnten nach der Migration prozentual mehr infizierte Zellen in den oberen Kompartimenten der Filtersysteme nachgewiesen werden. Insgesamt waren nur wenige Zellen

infiziert, im oberen Kompartiment befanden sich 7 % gegenüber 2 % infizierter Zellen im unteren Kompartiment. Im Fall der Infektion mit dem Vakzinestamm ED konnten im oberen Kompartiment 17 % gegenüber 4 % im unteren Kompartiment nachgewiesen werden.

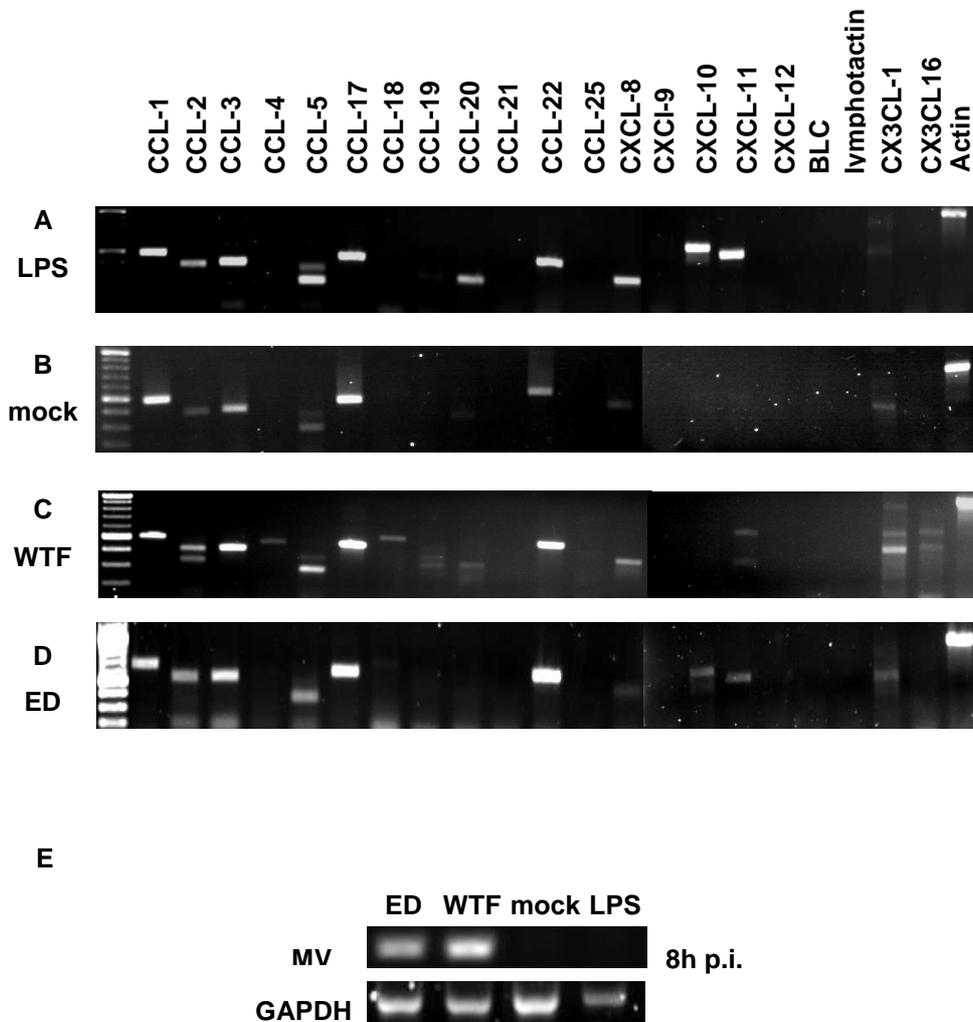
Mit Hilfe einer intrazellulären Färbung des MV-N-Proteins konnte gezeigt werden, dass sich nach der Inkubationszeit von 150 Minuten die MV-infizierten Zellen vorwiegend im oberen Teil des Filtersystems befinden. Dies geht aus den in den Abbildung 4—8 und Abbildung 4—9 dargestellten Ergebnissen hervor. Interessanterweise trifft diese Aussage auch für die Experimente zum chemotaktischen Verhalten MV-infizierter DC zu, bei denen CCL-3 als Ligand für CCR5 eingesetzt wurde. Wie in den zuvor gezeigten Ergebnissen (4.1.1) bleibt die CCR5-Expression auf DC aus MV-infizierten DC-Kulturen konstant, so dass erwartet wurde, dass MV-infizierte bzw. DC aus MV-infizierten DC-Kulturen in Richtung CCL-3 migrieren können und nicht im oberen Kompartiment zurückbleiben.

#### **4.1.5 MV-induzierte Chemokinproduktion in DC**

In weiteren Experimenten wurden DC-Kulturen mit WTF und ED wie oben beschrieben infiziert (4.1.1). Acht Stunden nach der Infektion wurden die Zellen abzentrifugiert und die RNA isoliert. Der erhaltene Zellkulturüberstand wurde zur späteren Bestimmung der Konzentration selektierter Chemokine (4.1.6) bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Durch eine RT-PCR wurde mit Hilfe sequenzspezifischer Primer die erhaltene RNA auf das Vorhandensein Chemokin-spezifischer mRNA untersucht. Ziel war es, das durch MV induzierte Chemokinmuster mit dem durch LPS- bzw. „mock“-

Behandlung induziertem zu vergleichen. Dazu wurden verschiedene  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -Chemokine gewählt, deren Induktion durch Reifungsstimuli bekannt ist.



**Abbildung 4—10: RT-PCR mit spezifischen Primern verschiedener Chemokine.** DC-Kulturen wurden mit MV-ED oder MV-WTF infiziert (moi 1) oder mit einer Mockpräparation behandelt oder LPS (100 ng/ml) ausgereift. Sechs Stunden nach der Infektion wurde die RNA isoliert und in cDNA transkribiert. Die anschließende PCR erfolgte mit sequenzspezifischen Primern gegen die angegebenen Chemokine. Als Kontrolle wurde ein spezifischer Primer gegen Actin verwendet. Jeweils 5  $\mu$ l des erhaltenen PCR-Produkts wurden in einem 1%-igen Agarosegel aufgetrennt (A-D). Die Kontrolle der Infektion erfolgte mit spezifischen Primern gegen Morbilliviren. Als Ladekontrolle wurden hier spezifische Primer gegen GAPDH verwendet (E).

Abbildung 4—10 zeigt das Chemokinmuster LPS-behandelter (A), mit einer Mockpräparation behandelter (B), mit WTF- (C) oder ED-infizierter (D) DC sowie die Infektionskontrolle (E).

Für die ersten acht (CCL-1 bis CCL-19) der untersuchten Chemokine konnten keine großen Unterschiede in der Induktion der jeweils untersuchten RNA festgestellt werden. Hingegen ist die Induktion von CCL-20 nur in LPS-behandelten DC detektierbar. Bei den nächsten drei untersuchten Chemokinen (CCL-21, CCL-22 und CCL-25) konnten erneut keine Unterschiede in den vier Ansätzen festgestellt werden. Vergleicht man dagegen die Induktion von CXCL-8 in den verschiedenen Ansätzen, wird deutlich, dass in LPS-behandelten DC mehr CXCL-8 mRNA gebildet wird als in WTF- oder ED-infizierten DC-Kulturen. Ähnlich geringe Mengen CXCL-8 mRNA konnte in DC detektiert werden, die mit einer Mockpräparation behandelt wurden.

Weitere Unterschiede konnten bei den Chemokinen CXCL-10 und CXCL-11 festgestellt werden. Während mRNA beider Chemokine bei LPS-behandelten und ED-infizierten Zellen nachgewiesen werden konnte, zeigte sich bei den WTF-infizierten Zellen und den mit einer Mockpräparation behandelten Zellen keine Induktion der CXCL-10 und CXCL-11 mRNA.

Für die weiteren untersuchten mRNA konnten keine Unterschiede festgestellt werden.

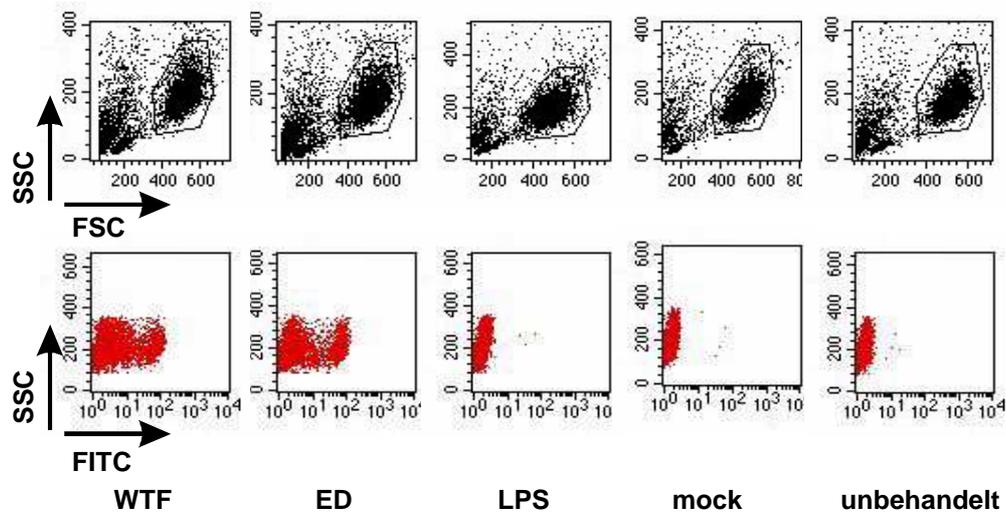
Durch die Analyse von mRNA in MV-infizierten, LPS- sowie mit einer Mockpräparation behandelten DC-Kulturen konnte gezeigt werden, dass es Unterschiede in der mRNA-Expression sowohl zwischen den beiden benutzten Virusstämmen ED und WTF (CXCL-10 und CXCL-11) als auch zwischen virusinfizierten und LPS-ausgereiften DC-Kulturen gibt (CCL-20 und CXCL-8). Die beobachteten Unterschiede könnten Konsequenzen für das Anlocken anderer Immunzellen, insbesondere von T-Zellen (vgl. 4.1.7), oder auch Auswirkungen auf das Migrationsverhalten der DC selbst haben. Aus diesen Gründen sollten in den folgenden Experimenten zunächst die Unterschiede in der Expression von CCL-20 und CXCL-8 auf Proteinebene genauer charakterisiert werden (4.1.6) und später das Migrationsverhalten von T-Zellen

auf Zellkulturüberstände infizierter (WTF und ED), LPS- oder mit einer Mockpräparation behandelte DC-Kulturen untersucht werden (4.1.7).

#### **4.1.6 Bestimmung der Chemokin-Konzentration an CXCL-8 und CCL-20 in Überstand aus MV-infizierten DC-Kulturen**

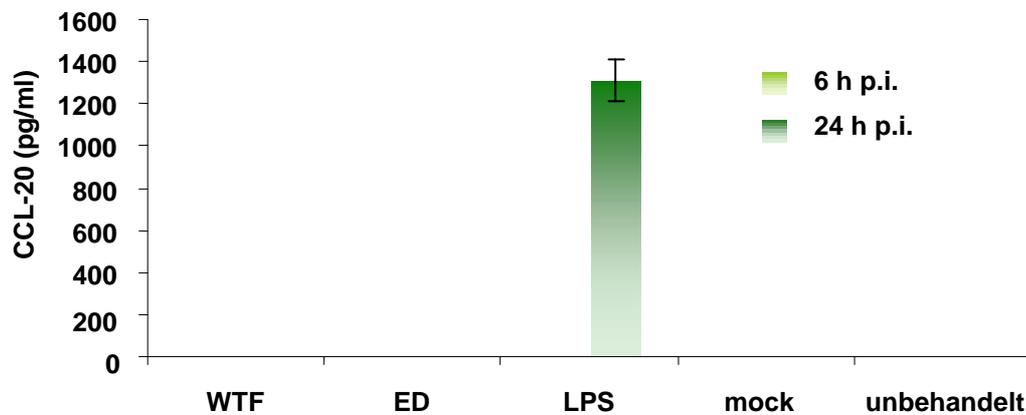
Mit Hilfe chemokinspezifischer ELISA wurden die Chemokin-Konzentrationen von CXCL-8 und CCL-20 im Zellkulturüberstand virusinfizierter im Vergleich zu LPS- oder mit einer Mockpräparation behandelte DC-Kulturen sowie unbehandelte DC-Kulturen bestimmt. Dazu wurde der gesammelte und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagerte Zellkulturüberstand verwendet. Durch die eingesetzten spezifischen Antikörper können Mengen  $>15\text{ pg/ml}$  (CCL-20) bzw.  $>31\text{ pg/ml}$  (CXCL-8) detektiert werden.

Mit Hilfe einer intrazellulären Färbung gegen das MV-N-Protein, wurde zunächst die Infektion der DC-Kulturen untersucht, deren Überstände für die Bestimmung der Chemokin-Konzentrationen eingesetzt wurden. Abbildung 4—11 zeigt das Ergebnis dieser durchflusszytometrischen Analyse. Sowohl in den WTF- als auch in den ED-infizierten Zellen konnte virales N-Protein nachgewiesen werden (29 % WTF, 19 % ED). In allen anderen Ansätzen konnte erwartungsgemäß kein MV-N-Protein nachgewiesen werden.



**Abbildung 4—11: Durchflusszytometrische Kontrolle der Infektion von DC.** DC wurden mit MV-ED und MV-WTF (moi 0,5) infiziert. Überstände dieser DC-Kulturen wurden nach 6 und 24 Stunden geerntet und in CCL-20 (Abbildung 4—12) und CXCL-8 (Abbildung 4—13) ELISA eingesetzt. Zur Kontrolle der Infektion wurde die Expression des MV-N-Proteins mit einem MV-N-spezifischen Antikörper (F227) überprüft. Dargestellt ist jeweils die Morphologie der Zellen sowie die Färbung mit dem Antikörper gegen das MV-N-Protein.

Die Ergebnisse eines ELISA zum Nachweis von CCL-20 sind in Abbildung 4—12 dargestellt. Für das hier gezeigte Experiment wurden Zellkulturüberstände verwendet, die 6 und 24 Stunden nach der Infektion der DC-Kulturen geerntet wurden. Nur im Überstand der LPS-behandelten DC-Kultur konnte CCL-20 nachgewiesen werden (1300 pg/ml $\pm$ 100). In allen anderen untersuchten Ansätzen konnte kein CCL-20 nachgewiesen werden.

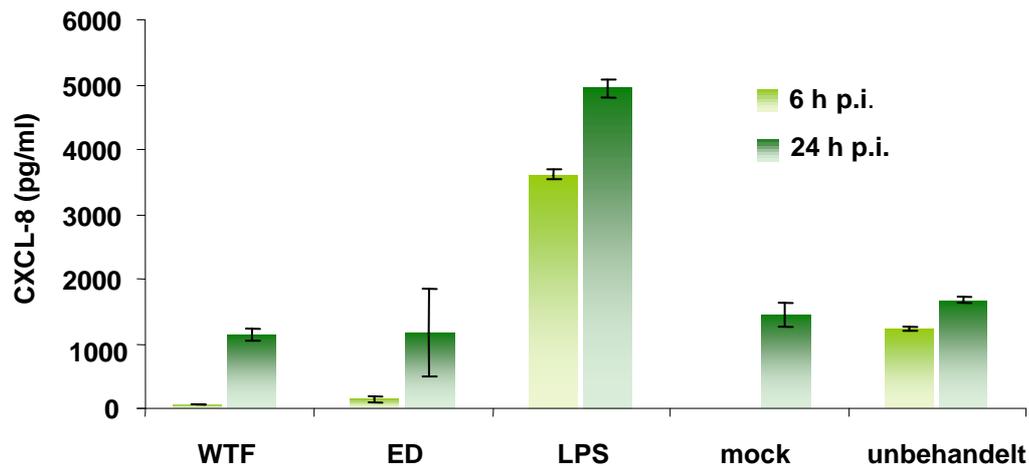


**Abbildung 4—12: Bestimmung der CCL-20 Konzentration im Zellkulturüberstand MV-infizierter DC-Kulturen.** DC-Kulturen wurden mit MV infiziert (WTF und ED, moi 0,5). 6 Stunden bzw. 24 Stunden nach der Infektion wurde der Überstand gesammelt und in einen CCL-20-spezifischen ELISA eingesetzt. Die Menge an enthaltenem Protein wurde über eine mitgeführte Standardreihe und die Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt. Zur Kontrolle der Infektion wurden die Zellen mit einem Antikörper gegen das MV-N-Protein (F227) intrazellulär gefärbt (siehe Abbildung 4—11).

In Abbildung 4—13 sind die Ergebnisse eines CXCL-8-spezifischen ELISA dargestellt. In dem gezeigten Experiment wurden dieselben Zellkulturüberstände wie in dem Experiment aus Abbildung 4—12 verwendet.

Wie aus der Abbildung 4—13 hervorgeht, nimmt die Menge des detektierten Proteins mit der Zeit zu. In allen Ansätzen konnte 24 Stunden nach der Infektion mehr CXCL-8 nachgewiesen werden als 6 Stunden nach Infektion der Kulturen. In den Überständen der mit LPS ausgereiften DC-Kulturen konnte die höchste Konzentration CXCL-8 nachgewiesen werden. Im Fall der Überstände aus den WTF-infizierten DC-Kulturen wurden zu beiden Zeitpunkten deutlich niedrigere Werte gemessen. Ähnlich niedrige Werte wurden in den Überständen aus den mit ED infizierten DC-Kulturen ermittelt. In den Überständen, der mit einer Mockpräparation behandelten DC-Kultur wurden 24 Stunden nach der Behandlung ähnliche Mengen CXCL-8 gemessen wie in den Überständen der virusinfizierten DC-Kulturen. 6 Stunden nach der Behandlung mit einer

Mockpräparation lag die Menge an CXCL-8 unterhalb der Detektionsgrenze. In Überständen un behandelter DC-Kulturen konnte zu beiden Zeitpunkten geringfügig mehr CXCL-8 detektiert werden als im Zellkulturüberstand infizierter DC-Kulturen.



**Abbildung 4—13: Bestimmung der CXCL-8-Konzentration im Zellkulturüberstand MV-infizierter DC-Kulturen.** DC-Kulturen wurden mit MV infiziert (WTF und ED, moi 0,5). 6 bzw. 24 Stunden nach der Infektion wurde der Überstand gesammelt und in einen CXCL-8-spezifischen ELISA eingesetzt. Als Kontrollen wurden die Überstände von LPS-ausgereiften (100 ng/ml) oder mit einer Mockpräparation behandelten sowie un behandelten DC-Kulturen eingesetzt. Die Menge an gebildetem Protein wurde über eine mitgeführte Standardreihe und die Veränderung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt. Zur Kontrolle der Infektion wurden die Zellen mit einem Antikörper gegen das MV-N-Protein (F227) intrazellulär gefärbt (siehe Abbildung 4—11).

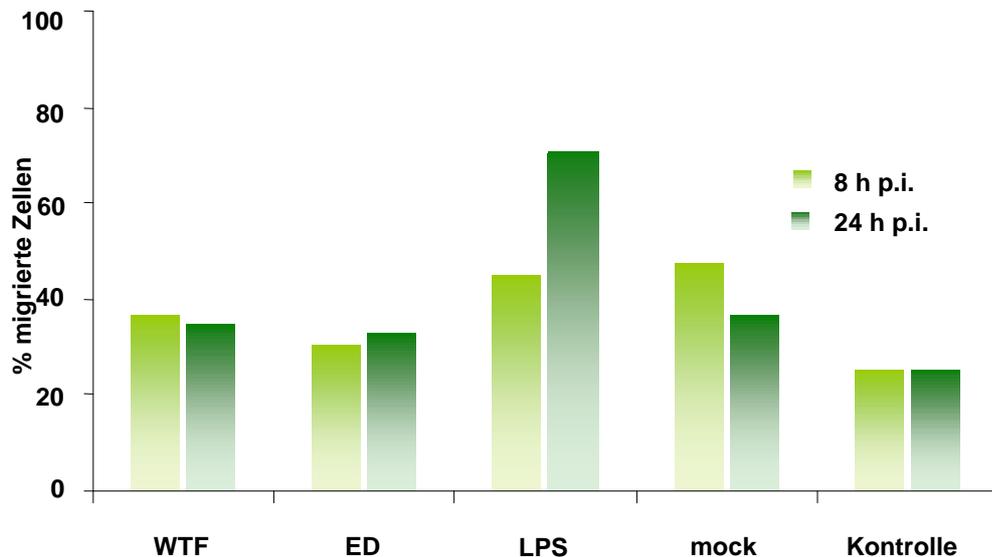
Die Ergebnisse der RT-PCR (Abbildung 4—10) bezüglich der induzierten CCL-20 und CXCL-8 mRNA konnten durch die quantitative Bestimmung der Proteinmenge im Zellkulturüberstand infizierter (WTF und ED), mit LPS ausgereifter oder mit einer Mockpräparation behandelte DC-Kulturen bestätigt werden.

#### 4.1.7 Experimente zur T-Zellchemotaxis

Nachdem in den vorangegangenen Experimenten Unterschiede in der Chemokininduktion zwischen MV-infizierten DC-Kulturen und LPS-behandelten DC-Kulturen festgestellt wurden, sollte nachfolgend untersucht werden, ob Zellkulturüberstände unterschiedlich behandelte bzw. infizierter DC-Kulturen unterschiedliche Wirkungen auf das chemotaktische Verhalten von T-Zellen haben. Dazu wurden Zellkulturüberstände infizierter DC-Kulturen (WTF und ED) sowie LPS-ausgereifter oder mit einer Mockpräparation behandelte DC-Kulturen eingesetzt. Die Überstände wurden mit Zellkulturmedium verdünnt in einen Napf einer 24-Napf-Zellkulturplatte vorgelegt. Die verwendeten, allogenen T-Zellen wurden in Polycarbonatfilter gegeben und diese in die Näpfe der Zellkulturplatten mit den verschiedenen Zellkulturüberständen gestellt. Nach einer Inkubationszeit von drei Stunden wurde anschließend die Zahl der T-Zellen im unteren Teil des Filtersystems mittels quantitativer Durchflusszytometrie bestimmt. Abbildung 4—14 zeigt das Ergebnis eines solchen Experiments.

Die Anzahl der migrierten T-Zellen lag in den Ansätzen, in denen Zellkulturüberstände aus infizierten DC-Kulturen (WTF und ED) in den unteren Teil des Filtersystems eingesetzt wurden, bei ca. 30 % (WTF 8 h p.i. 36 %, 24 h p.i. 34 %; ED 8 h p.i. 30 %, 24 h p.i. 33 %). Dagegen wurden deutlich mehr T-Zellen in den unteren Kompartimenten detektiert, in denen Zellkulturüberstände aus LPS ausgereiften DC-Kulturen eingesetzt wurden. Im Ansatz der für acht Stunden mit LPS behandelte DC-Kulturen wurden nach der dreistündigen Inkubationszeit ungefähr 45 % der eingesetzten T-Zellen gezählt, diese Zahl erhöhte sich auf etwa 70 % in dem Ansatz der Überstand aus DC-Kulturen enthielt, die zuvor für 24 Stunden mit LPS ausgereift wurden. Die gemessenen Zellzahlen in den Ansätzen der Mockkontrolle lagen bei 47 % (8h-Behandlung mit einer Mockpräparation) und 37 % (24h-Behandlung mit einer Mockpräparation). In der Mediumkontrolle wurden 25 Prozent der eingesetzten T-Zellen detektiert. Zur Kontrolle der Infektion der eingesetzten DC wurde eine

morbillivirus-spezifische RT-PCR durchgeführt. Die Ergebnisse der RT-PCR sind in Abbildung 4—10 B dargestellt.

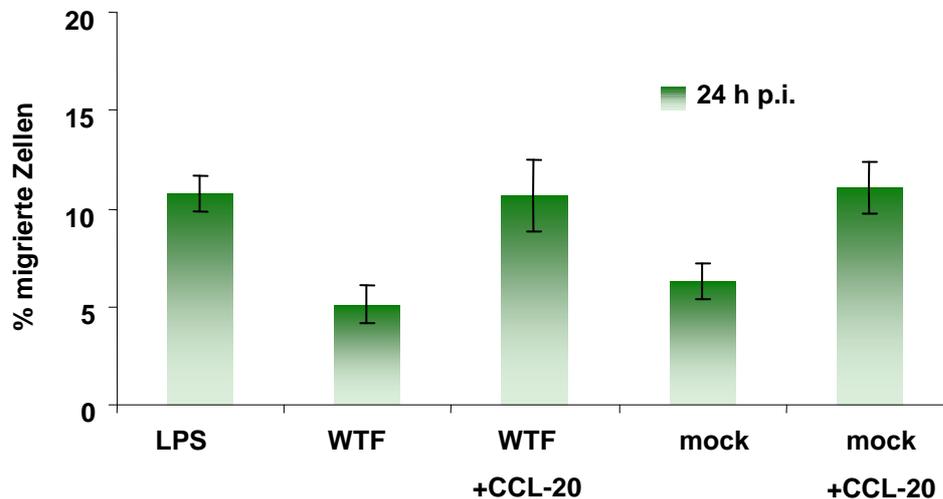


**Abbildung 4—14: Untersuchung zur T-Zellchemotaxis.** Zellkulturüberstand MV-infizierter DC-Kulturen (ED und WTF, moi 1) bzw. mit einer Mockpräparation behandelte oder mit LPS (100 ng/ml) ausgereifter DC-Kulturen wurden mit RPMI verdünnt und in die unteren Kompartimente von Filtersystemen eingesetzt. Nach einer Inkubationszeit von drei Stunden wurde die Anzahl der migrierten Zellen im unteren Kompartiment durchflusszytometrisch quantifiziert. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der migrierten Zellen.

#### 4.1.8 Experimente zur T-Zellchemotaxis mit Substitution von CCL-20

In den vorausgegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass T-Zellen ein verändertes Migrationsverhalten gegenüber Zellkulturüberständen aus MV-infizierten DC-Kulturen zeigen verglichen mit Zellkulturüberständen aus LPS-behandelten DC-Kulturen. Weiterhin wurde gezeigt, dass MV-infizierte DC kein

CCL-20 produzieren. In weiteren Experimenten wurden Zellkulturüberstände mit CCL-20 substituiert und in T-Zellchemotaxis-Assays eingesetzt.



**Abbildung 4—15: T-Zellchemotaxis nach Substitution von CCL-20.** Zellkulturüberstände WTF-infizierter DC-Kulturen (moi 1) bzw. mit einer Mockpräparation behandelte oder mit LPS-ausgereifte (100 ng/ml) DC-Kulturen wurden mit RPMI verdünnt, z. T. mit CCL-20 substituiert (1 µg/ml) und in die unteren Kompartimente von Filtersystemen eingesetzt. Nach einer Inkubationszeit von drei Stunden wurde die Anzahl der migrierten Zellen im unteren Kompartiment durchflusszytometrisch quantifiziert. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der migrierten Zellen. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung die sich nach dreimaliger Messung der einzelnen Proben ergab.

Der zuvor beschriebene Effekt der verschlechterten Migration von T-Zellen gegenüber Zellkulturüberständen aus MV-infizierten DC-Kulturen konnte in dem in Abbildung 4—15 gezeigten Experiment bestätigt werden. Weiterhin geht aus diesem Experiment hervor, dass die Migration der T-Zellen gegenüber Überständen aus WTF-infizierten Kulturen durch Zugabe von CCL-20 deutlich verbessert werden kann. Nach Substitution von CCL-20 konnten im unteren Kompartiment des Filtersystems ähnlich viele T-Zellen gezählt werden wie im Ansatz mit Überstand aus LPS-behandelten DC-Kulturen.

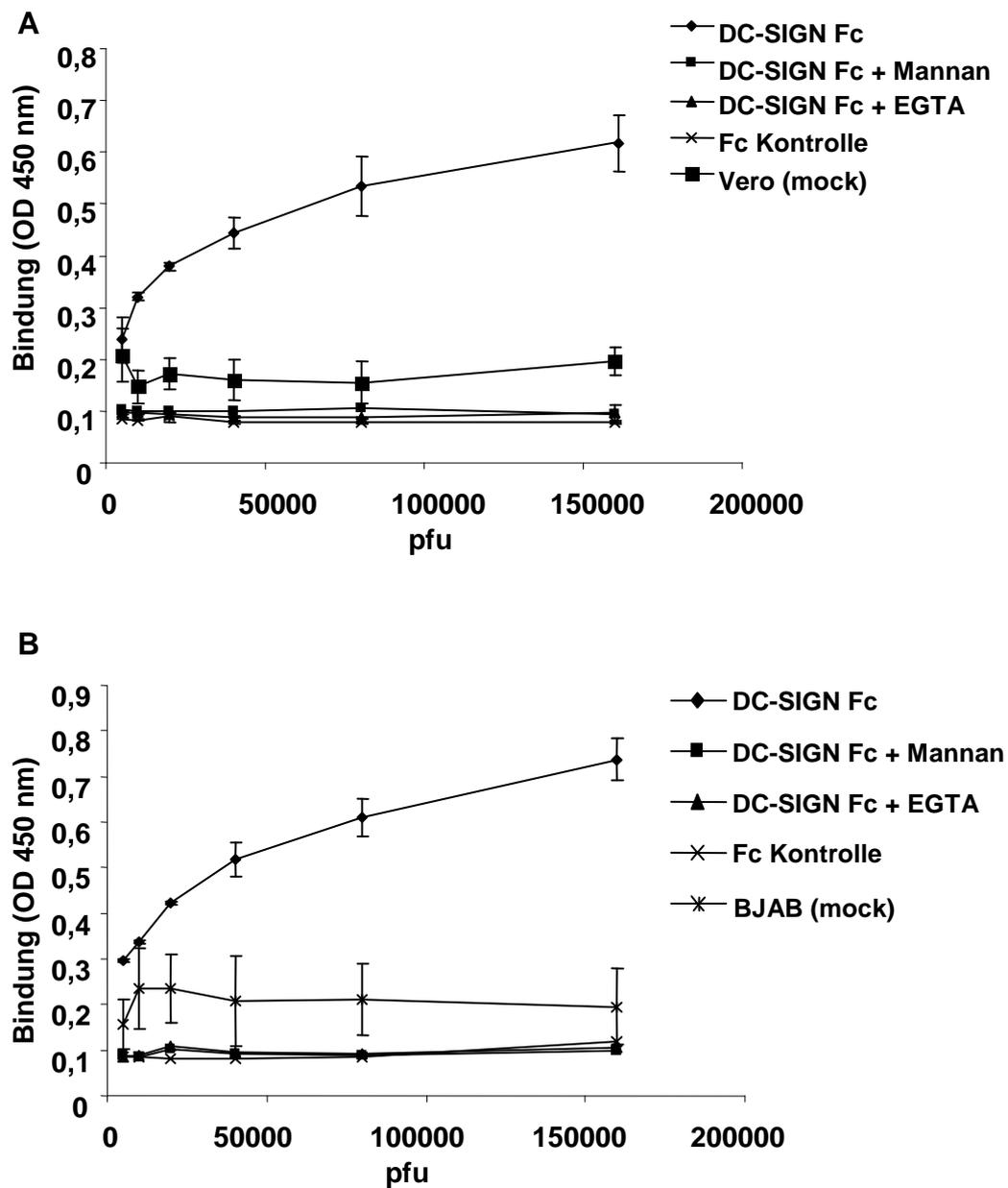
## 4.2 Untersuchungen zur Rolle von DC-SIGN als Rezeptor für Masernviren

### 4.2.1 Rekombinantes DC-SIGN interagiert mit WTF und ED

Die Untersuchungen zur Rolle von DC-SIGN als Rezeptor für MV wurden zunächst mit rekombinantem DC-SIGN durchgeführt. Das dazu verwendete Konstrukt besteht aus dem extrazellulären Teil von DC-SIGN, das mit dem Fc-Teil eines humanen IgG-Konstrukts fusioniert und rekombinant in CHO-Zellen produziert wurde (Fawcett et al., 1992).

Für den durchgeführten Fc-Bindungstest wurden ELISA-Platten mit MV-spezifischen Antikörpern gekoppelt und zunächst mit UV-inaktivierten Viren (WTF und ED) und darauffolgend mit rekombinantem DC-SIGN-Fc inkubiert. Die Bindung von DC-SIGN wurde mit Hilfe einer Peroxidase-gekoppelten Reaktion anhand der Zunahme der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt. Die Ergebnisse der Virusbindung an rekombinantes DC-SIGN sind in Abbildung 4—16 dargestellt.

Wie aus der Abbildung 4—16 hervorgeht, bindet sowohl der Vakzinestamm ED (A) als auch das Wildtypvirus WTF (B) an rekombinantes DC-SIGN. Je höher die Menge an eingesetztem Virus, desto stärker ist die Zunahme der optischen Dichte. Die Veränderung der optischen Dichte, und damit die Bindung an DC-SIGN, ist bei den verwendeten Viren in etwa gleich. Die Bindung an DC-SIGN konnte durch den Einsatz des DC-SIGN Liganden Mannan und des Calciumchelators EGTA deutlich reduziert werden. Dies zeigt die Spezifität der Bindung. Als Kontrolle wurde eine Fc-Chimäre mit identischer Fc-Domäne verwendet (ICAM-3-Fc).



**Abbildung 4—16: DC-SIGN-Fc-Bindungstest.** MV-ED (A) und MV-WTF (B) (5000 pfu bis 160000 pfu) oder die entsprechenden Mengen der Mockpräparationen wurden mit einem anti-MV-F-Antikörper (A504/7) inkubiert und über Interaktion mit einem Ziege-anti-Maus-Antikörper an eine ELISA-Platte gebunden und anschließend mit rekombinanten DC-SIGN inkubiert. Die Wechselwirkung der Viruspräparationen bzw. Mockpräparationen mit dem rekombinanten DC-SIGN wurde durch die Bestimmung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 450 nm ermittelt. Zur Kontrolle der Spezifität wurde der DC-SIGN Ligand Mannan (1 mg/ml) oder EGTA (10 mM) eingesetzt. Als Fc-Kontrolle diente ein Konstrukt mit identischem Fc-Teil (ICAM-3-Fc).

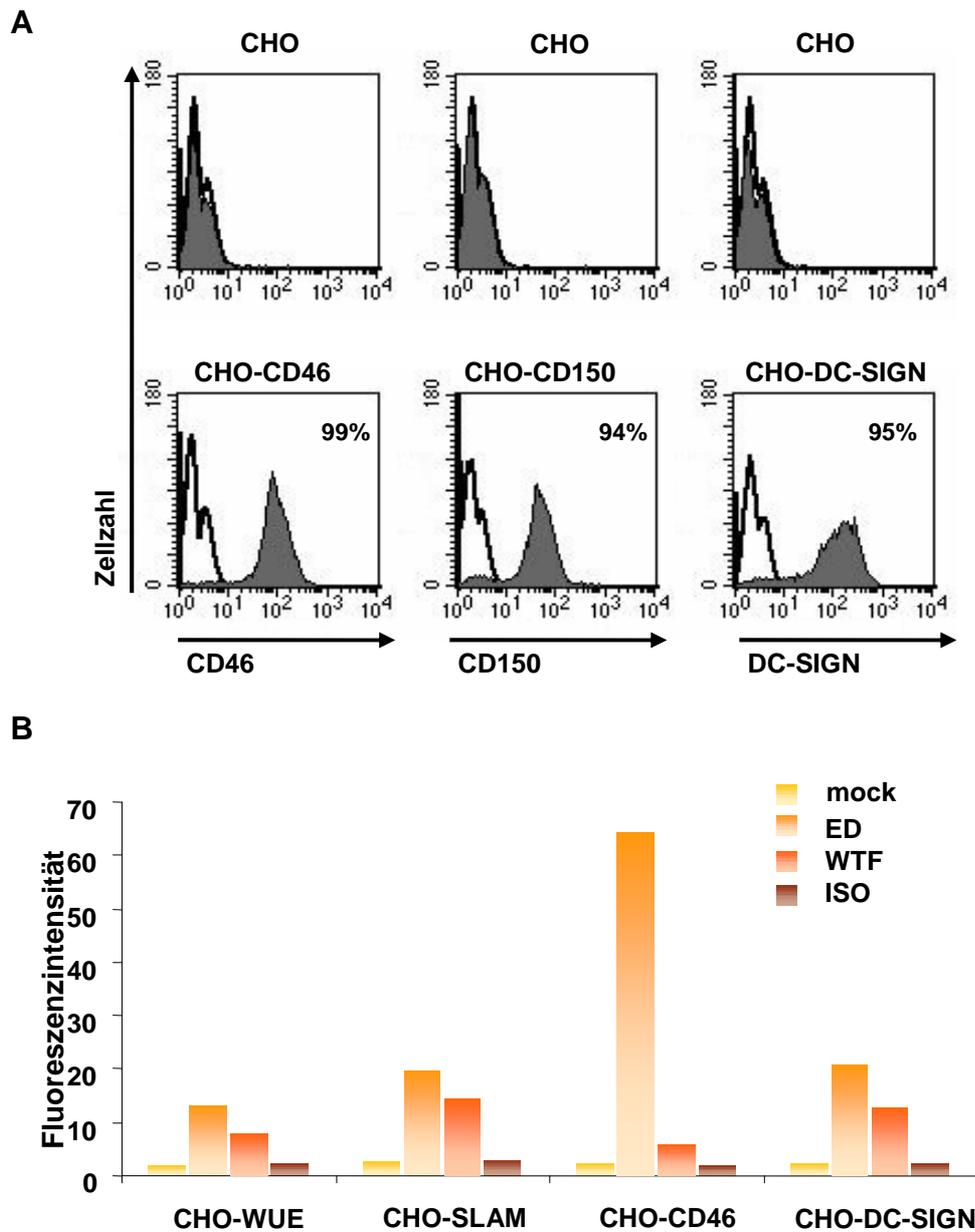
## 4.2.2 Zelluläres DC-SIGN als Rezeptor für MV

Nachdem gezeigt werden konnte, dass MV an rekombinantes DC-SIGN bindet, wurden für die folgenden Experimente Zelllinien verwendet, die DC-SIGN stabil exprimieren, um die Rolle von zellulärem DC-SIGN als Rezeptor für MV zu untersuchen.

### 4.2.2.1 Untersuchungen zur Bindung von MV an DC-SIGN

Um die Bindung von MV an DC-SIGN zu untersuchen, wurden verschiedene Zelllinien eingesetzt, die die MV-Rezeptoren CD46, CD150 oder DC-SIGN natürlicherweise nicht exprimieren. Verschiedene Zelllinien, die jeweils einen der genannten Rezeptoren stabil exprimieren, standen zur Verfügung und wurden für diese Experimente eingesetzt. Zunächst wurden für diese Experimente CHO-Zellen (*Chinese Hamster Ovary*, CHO) benutzt.

Die verschiedenen Zelllinien wurden für eine Stunde bei 4°C mit ED oder WTF inkubiert. Anschließend wurde die Menge an gebundenem Virus auf der Oberfläche der Zellen durch eine Färbung des MV-H-Proteins bestimmt. Die Ergebnisse des Virusbindungstests sind in Abbildung 4—17 dargestellt.



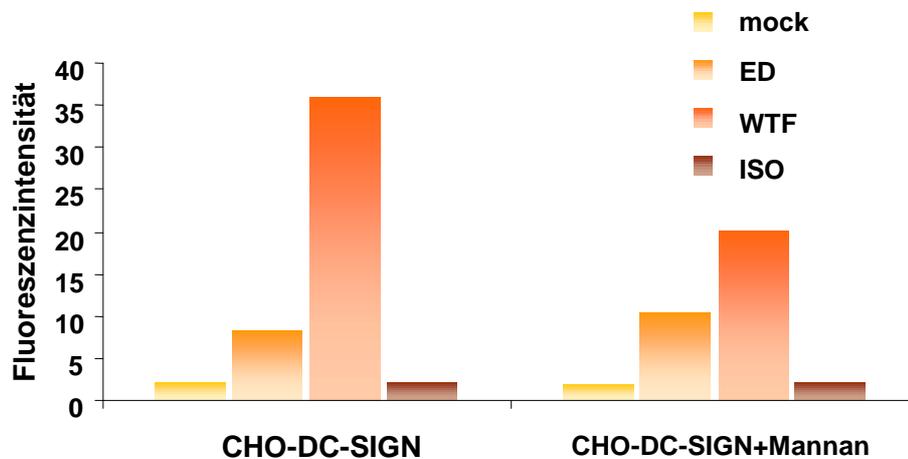
**Abbildung 4—17: Untersuchung zur Bindung von MV an DC-SIGN.** CHO-Zellen, die verschiedene Oberflächenmoleküle stabil exprimieren (CD46, CD150, DC-SIGN), wurden in einen Virusbindungstest eingesetzt. A: Expressionskontrolle der eingesetzten Zellen. Die Expression der verwendeten Konstrukte wurde mit Hilfe spezifischer Antikörper gegen das jeweilige Oberflächenprotein nachgewiesen (CD46: 13/42, CD150: 5C6, DC-SIGN: AZN-D1). Als Kontrolle wurde jeweils ein Antikörper des entsprechenden Isotyps verwendet. B: Die Zellen wurden mit MV (ED und WTF, moi 1) inkubiert und die Menge an gebundenem Virus anschließend mit einem Antikörper gegen das MV-H-Protein (L-77) durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt ist die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (MFI).

Im oberen Teil der Abbildung (A) ist die Kontrolle der Expression der verschiedenen Rezeptoren in den stabil transfizierten Zellen dargestellt. Alle verwendeten Zelllinien weisen eine hohe Expression des jeweiligen Rezeptors auf (CHO-CD46: 99 %, CHO-CD150: 94 %, CHO-DC-SIGN: 95 % positive Zellen). Die Bindung der beiden verwendeten Virusstämme an die verschiedenen Zelllinien ist in Abbildung 4—17 (B) in Form der gemessenen Fluoreszenzintensitäten nach der Färbung des viralen H-Proteins auf der Oberfläche der Zellen dargestellt. Als Kontrollen wurden jeweils die Bindung einer Mockpräparation bestimmt sowie die Färbung mit einer Isotyp-Kontrolle durchgeführt.

Wie aus Abbildung 4—17 (B) hervorgeht, findet eine Bindung der Viren an alle vier verwendeten Zelllinien statt. Die als Kontrollzellen verwendeten nicht-transfizierten CHO-Zellen binden zu einem geringen Anteil sowohl den ED-Stamm (MFI 13) als auch den Wildtypstamm WTF (MFI 8). Bei CHO-CD150-Zellen steigt die gemessene MFI auf 20 (ED) bzw. 15 (WTF). Besonders auffällig ist die starke Bindung des Vakzinestamms ED an die CHO-CD46-Zellen (MFI 65). Der verwendete Wildtypstamm WTF zeigt erwartungsgemäß nur eine sehr geringe Bindung an CHO-CD46 (MFI 6). Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten bei CHO-DC-SIGN-Zellen entsprechen in etwa denen der CHO-CD150-Zellen: Bei der verwendeten ED-Präparation wurde eine MFI von 21 (CHO-CD150: 20) gemessen, die MFI der WTF-Präparation betrug 13 (CHO-CD150: 15).

In weiteren Experimenten wurde untersucht, ob sich die Bindung an DC-SIGN mit Hilfe des Polycarbohydrats Mannan inhibieren lässt. Dazu wurden die Zellen vor der Inkubation mit den jeweiligen Viruspräparationen für 30 Minuten mit 1 mg/ml Mannan bei 37° C inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze wie oben beschrieben mit den Viruspräparationen inkubiert und mit Antikörpern gegen das MV-H-Protein gefärbt.

Die Abbildung 4—18 zeigt die Virusbindung an CHO-DC-SIGN-Zellen im Vergleich mit und ohne vorherige Mannanbehandlung.



**Abbildung 4—18: Inhibition der Virusbindung nach Vorinkubation mit Mannan.** Stabiltransfizierte CHO-DC-SIGN-Zellen wurden in einen Virusbindungstest eingesetzt. Die Zellen wurden vor der Virusbindung mit Mannan (1 mg/ml) inkubiert und anschließend mit MV-WTF oder MV-ED (moi 1) inkubiert. Die Menge an gebundenem Virus wurde mit einem Antikörper gegen das MV-H-Protein (L77) bestimmt und ist als durchschnittliche Fluoreszenzintensität (MFI) angegeben.

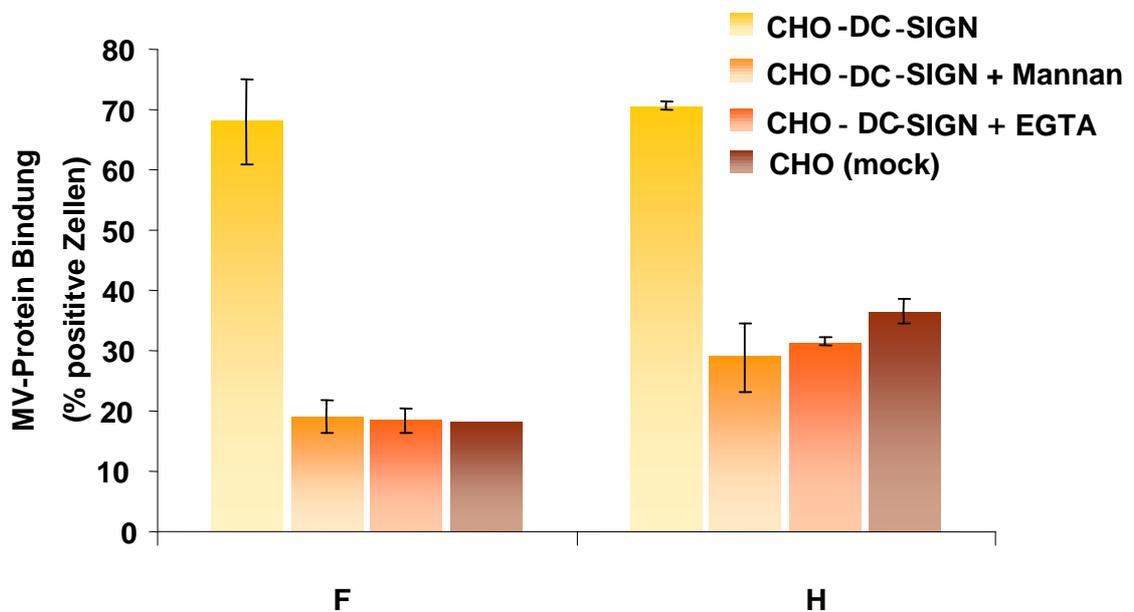
Die Abbildung zeigt die Bindung der beiden verwendeten Virusstämme ED und WTF an CHO-DC-SIGN-Zellen. Dabei konnten besonders bei der Bindung des Wildtypvirus Unterschiede festgestellt werden. Während nach einer Inkubation mit WTF eine MFI von 36 gemessen wurde, zeigte der Ansatz, der zuvor mit Mannan inkubiert wurde, nur ein MFI von 20. Im Fall des verwendeten Vakzinestamms ED konnten keine großen Unterschiede festgestellt werden (MFI 8 bzw 11 mit vorheriger Mannanbehandlung).

Um die Rolle von zellulärem DC-SIGN genauer zu untersuchen und die Wechselwirkung mit den bereits bekannten Rezeptoren für MV zu charakterisieren, wurden eine Reihe weiterer Experimente mit anderen stabiltransfizierten Zellen durchgeführt (de Witte et al., 2006). Experimente mit DC, auf denen DC-SIGN *in vivo* exprimiert wird, sind in Abschnitt 4.2.3.1 dargestellt.

#### 4.2.2.2 Die Masernvirusglykoproteine F und H interagieren mit DC-SIGN

In diesen Experimenten sollte untersucht werden, welches der beiden MV-Glykoproteine an DC-SIGN bindet. Dazu wurden transfizierte Meljuso-Zellen benutzt, die entweder das MV-H- oder das MV-F-Protein exprimieren.

Die aus den Zellen isolierten F- und H-Proteine wurden an fluoreszierende Mikrokügelchen gebunden und mit CHO-Zellen, die das Oberflächenmolekül DC-SIGN stabil exprimierten, inkubiert. Die Bindung der Mikrokügelchen an die Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt.



**Abbildung 4—19: Bindung der MV-Glykoproteine an DC-SIGN.** Transfizierte Meljuso-Zellen exprimieren die MV-Glykoproteine F oder H. Die Zellen wurden lysiert, die Proteine F und H aus dem Lysat immunpräzipitiert und an fluoreszierende Mikrokügelchen gebunden. Zur Untersuchung der Wechselwirkung der MV-Proteine F und H mit DC-SIGN wurden die beladenen Mikrokügelchen mit DC-SIGN exprimierenden CHO-Zellen inkubiert. Um die Spezifität der Bindung an DC-SIGN zu bestimmen, wurden der DC-SIGN Ligand Mannan (1 mg/ml) und der Calciumchelator EGTA (10 mM) eingesetzt. Die Menge an gebundenem Virus wurde durchflusszytometrisch bestimmt und ist in Prozent MV-positiver Zellen dargestellt.

Wie aus der Abbildung 4—19 hervorgeht, bindet sowohl das MV-H- als auch das MV-F-Protein an DC-SIGN. In beiden Fällen wurden in etwa 70 % positive

Zellen gemessen. Um die Spezifität der Bindung zu untersuchen, wurde sowohl der DC-SIGN Ligand Mannan als auch EGTA eingesetzt. Die Bindung der Glykoproteine MV-H und MV-F konnte durch beide Substanzen stark reduziert werden. Für das MV-F-Protein konnten nur noch ca. 20 % positive Zellen gemessen werden, für das MV-H-Protein noch etwa 30 %.

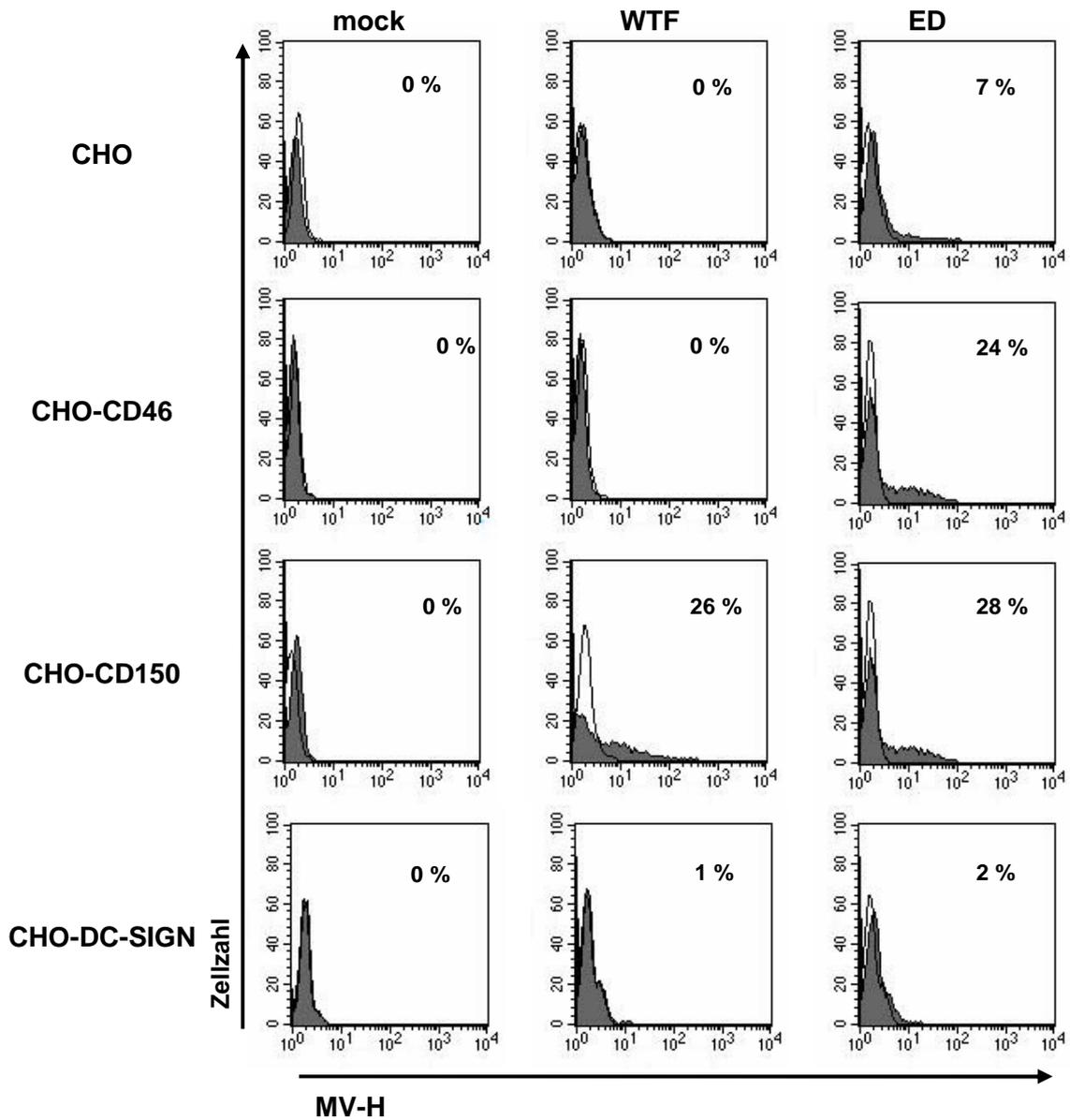
Die Ergebnisse zeigen, dass beide Glykoproteine an DC-SIGN binden können.

#### **4.2.2.3 Masernviren benutzen DC-SIGN nicht als Eintrittsrezeptor**

Nachdem gezeigt werden konnte, dass MV an DC-SIGN auf der Oberfläche verschiedener Zellen bindet, sollte untersucht werden, ob DC-SIGN einen Eintrittsrezeptor für MV darstellt.

Dazu wurden CHO-Zellen benutzt, die die Oberflächenmoleküle CD46, CD150 oder DC-SIGN stabil exprimierten. Die eingesetzten Zellen zeigten für das jeweilige Oberflächenmolekül eine Expression von > 80 % (nicht gezeigt). Die in Zellkulturplatten ausgesäten Zellen wurden dann für eine Stunde bei 37° C mit den verschiedenen Virussuspensionen oder einer Mockpräparation inkubiert. Die Virussuspension wurde anschließend durch frisches Zellkulturmedium ersetzt.

Dabei wurde in die Hälfte der Ansätze FIP gegeben, um eine Zell-Zell-Fusion zu verhindern. Diese Ansätze wurden zum Nachweis der Infektion 48 Stunden nach der Infektion mit einem Antikörper gegen das virale H-Protein gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht (Abbildung 4—20). Die andere Hälfte der Ansätze wurde ohne FIP ebenfalls für 48 Stunden inkubiert, um dann im Lichtmikroskop auf die Entstehung eines CPE untersucht zu werden (Abbildung 4—20).



**Abbildung 4—20: Durchflusszytometrische Analyse MV-infizierter CHO-Zellen.** CHO-Zellen wurden mit MV-ED und MV-WTF (moi 0,5) oder einer Mockpräparation infiziert. 48 Stunden nach der Infektion wurde der prozentuale Anteil an MV-H-positiven Zellen durch Färbung mit einem spezifischen Antikörper gegen MV-H (L77) bestimmt. Angegeben sind die MV-H-positiven Zellen in Prozent.

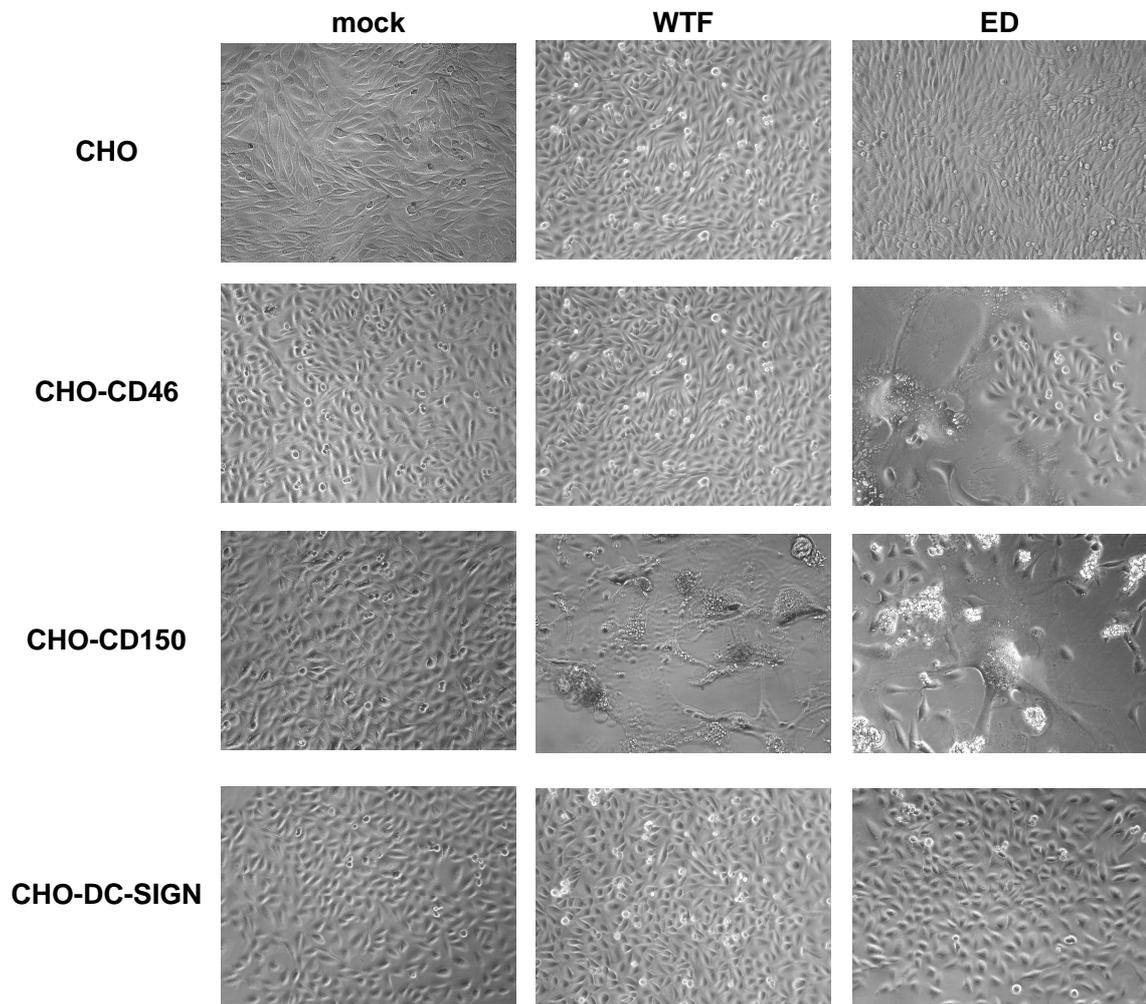
In Abbildung 4—20 sind die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchung 48 Stunden nach der Infektion dargestellt. Die Zellen wurden dazu mit einem Antikörper gegen das MV-H-Protein gefärbt.

Erwartungsgemäß konnte virales H-Protein auf der Oberfläche der CHO-CD46-Zellen nach der Infektion mit dem Vakzinestamm ED nachgewiesen werden. 24 % der untersuchten CHO-CD46-Zellen waren MV-H-positiv. Ebenfalls erwartungsgemäß war das Ergebnis der durchflusszytometrischen Analyse der CHO-CD150-Zellen, die sowohl für das Wildtypvirus (26 % positive Zellen) als auch für den Impfstamm ED (28 % positive Zellen) permissiv sind. Dagegen konnte auf der Oberfläche der CHO-DC-SIGN-Zellen kein MV-H-Protein nachgewiesen werden (ED 2 %, WTF 1 % positive Zellen). Dies traf auch für die nicht-transfizierten CHO-Zellen zu (< 7 % positive Zellen).

Abbildung 4—21 zeigt die Ergebnisse der mikroskopischen Analyse der verschiedenen Ansätze. Für das dargestellte Experiment wurden dieselben Zellen wie in Abbildung 4—20 verwendet. Aus diesem Grund wurde auf die erneute Darstellung der Expression der einzelnen Rezeptoren verzichtet.

In nicht-transfizierten CHO-Zellen führt weder die Infektion mit ED noch mit WTF zur Ausbildung eines CPE (Abbildung 4—21). In CHO-CD46-Zellen induzierte die Infektion mit dem ED-Virus, jedoch nicht mit WTF die Ausbildung eines CPE. Die CHO-CD150-Zellen zeigten, wie erwartet, sowohl im Fall der WTF als auch im Fall der ED-Infektion einen deutlichen CPE. Die mit DC-SIGN transfizierten CHO-Zellen wiesen dagegen weder nach der Inkubation mit dem Wildtypvirus noch mit dem Vakzinestamm ED die Ausbildung eines CPE auf.

Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse konnten durch die lichtmikroskopische Untersuchung hinsichtlich der Bildung eines CPE bestätigt werden. MV benutzen DC-SIGN nicht als Eintrittsrezeptor.



**Abbildung 4—21: Phasenkontrastmikroskopie MV-infizierter CHO-Zellen.** Stabil transfizierte CHO-Zellen wurden mit MV-ED oder MV-WTF (moi 1) infiziert und nach 48 Stunden im Phasenkontrastmikroskop auf das Auftreten eines cytopathischen Effekts untersucht.

### 4.2.3 Die Rolle von DC-SIGN bei der Infektion von DC

Da DC-SIGN *in vivo* auf der Oberfläche von DC exprimiert wird, sollte die Funktion von DC-SIGN bei der Bindung und Infektion von DC durch MV untersucht werden. Im Folgenden sind die Ergebnisse der Experimente zu dieser Thematik gezeigt.

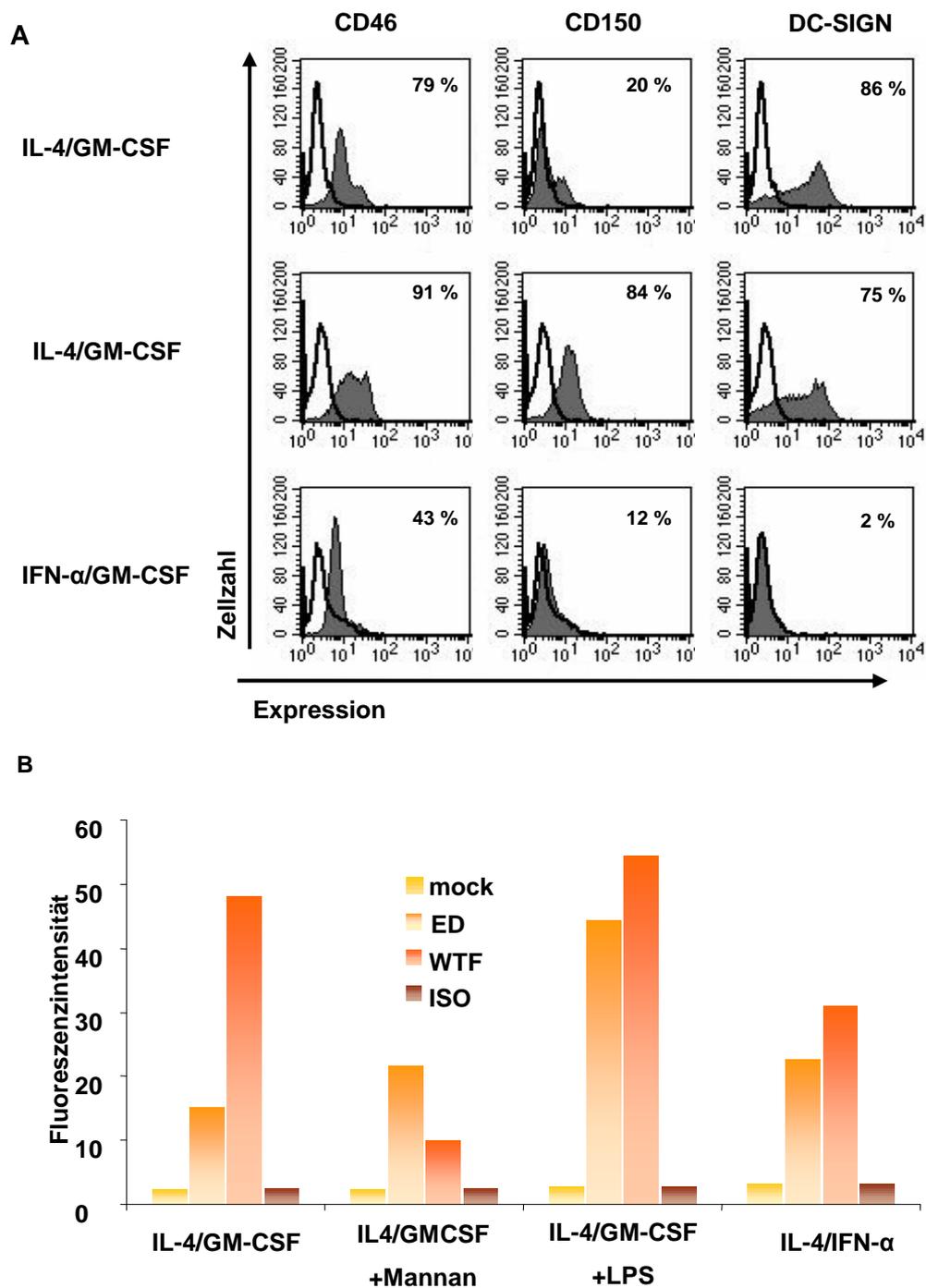
#### 4.2.3.1 Die Rolle von DC-SIGN bei der Bindung von MV an DC

Zunächst wurde die Bindung der beiden benutzten Virusstämme WTF und ED an unreife und reife DC untersucht. Unreife und reife DC unterscheiden sich in der Menge der exprimierten Oberflächenrezeptoren, die von MV als Eintrittsrezeptoren benutzt werden. Auch die Expression von DC-SIGN unterscheidet sich auf unreifen und reifen DC (s. u.).

Für die Experimente wurden DC auf unterschiedliche Weise generiert. Ein Teil der Monozyten wurde statt mit IL-4 und GM-CSF mit IFN- $\alpha$  und GM-CSF kultiviert. Die so generierten DC exprimieren kein DC-SIGN auf der Oberfläche (Gagliardi et al., 2005). Teile der IL-4/GM-CSF-Kultur wurden an Tag fünf mit LPS (100 ng/ml) ausgereift.

Zunächst wurden die DC auf die Expression der Rezeptoren CD46, CD150 und DC-SIGN durchflusszytometrisch untersucht. Anschließend wurden die unterschiedlichen Zellen einem Virusbindungstest unterzogen und nach einstündiger Inkubation mit den WTF- und ED-Viruspräparationen mit einem Antikörper gegen das MV-H-Protein gefärbt. Als Kontrollen wurde jeweils die Bindung einer Mockpräparation untersucht sowie eine Kontrollfärbung mit einer Isotypkontrolle durchgeführt. In

Abbildung 4—22 ist das Ergebnis eines solchen Experiments dargestellt.



**Abbildung 4—22: Virusbindungstest zur Bindung von MV an DC mit und ohne DC-SIGN.** DC wurden in Anwesenheit von GM-CSF und IL-4 oder GM-CSF und IFN- $\alpha$  generiert und z. T. mit LPS (100 ng/ml) ausgereift. A: Die Expression der Rezeptoren CD46, CD150 und DC-SIGN wurde mit spezifischen Antikörpern gegen die entsprechenden Rezeptoren (CD46:13/42, CD150: 5C6, DC-SIGN: AZN-D1) nachgewiesen. B: Die verschiedenen DC-Populationen wurden in einen Virusbindungstest eingesetzt und mit MV-Präparationen (WTF und ED, moi 1) inkubiert. Die Bindung an DC-SIGN wurde in einigen Ansätzen durch Vorinkubation mit dem DC-SIGN Ligand Mannan (1 mg/ml) blockiert. Die Menge an gebundenem Virus wurde anschließend mit einem spezifischen Antikörper gegen das MV-H-Protein (L77) bestimmt und ist als durchschnittliche Fluoreszenzintensität angegeben.

In Abbildung 4—22 (A) ist die Rezeptorexpression der DC dargestellt. Alle generierten DC exprimieren CD46 auf der Oberfläche, jedoch in unterschiedlicher Stärke. Im Fall der mit IL-4 und GM-CSF generierten DC sind 79 % der Zellen CD46-positiv, durch Ausreifung mit LPS steigt die Expression von CD46 an (91 %). Auch die Expression von CD150 lässt sich durch die 24-stündige Behandlung mit LPS induzieren. Der Wert steigt von 20 % auf 84 % CD150-positiver Zellen. Die Expression von DC-SIGN dagegen geht von 86 % auf unreifen DC auf 75 % auf reifen DC zurück. Auf den mit IFN- $\alpha$  generierten DC konnte nur auf 2 % der Zellen DC-SIGN nachgewiesen werden. Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass alle drei untersuchten Oberflächenmoleküle auf den mit IFN- $\alpha$  generierten DC schlechter exprimiert werden als auf den mit IL-4 und GM-CSF generierten DC.

Abbildung 4—22 (B) zeigt die Ergebnisse des Virusbindungstest. Die mit IL-4 und GM-CSF generierten Zellen binden sowohl ED (MFI 15) als auch WTF, dies jedoch deutlich stärker (MFI 48). Wurden diese Zellen vor der Inkubation mit den Viruspräparationen mit dem DC-SIGN Ligand Mannan behandelt, kann man einen starken Rückgang der Virusbindung bei der Inkubation mit dem Wildtypvirus beobachten (MFI 10). Die Bindung des Impfstammes ED (MFI 22) dagegen ist verglichen mit der Bindung an IL-4/GM-CSF-generierte Zellen stärker (MFI 15). Eine deutlich stärkere Virusbindung wurde für beide benutzten Virusstämme an LPS-ausgereifte Zellen beobachtet. Die MFI betrug hier für ED 44 und 54 für WTF. Die mit IFN- $\alpha$  generierten DC zeigten im Vergleich zu den IL-4-generierten DC eine bessere Bindung von ED (MFI 23 gegenüber 15), aber ebenfalls im Vergleich mit den IL-4-behandelten Zellen (MFI 18) eine deutlich reduzierte Bindung des Wildtypvirus (MFI 31). In allen mitgeführten Kontrollen lag die gemessene MFI nicht über drei.

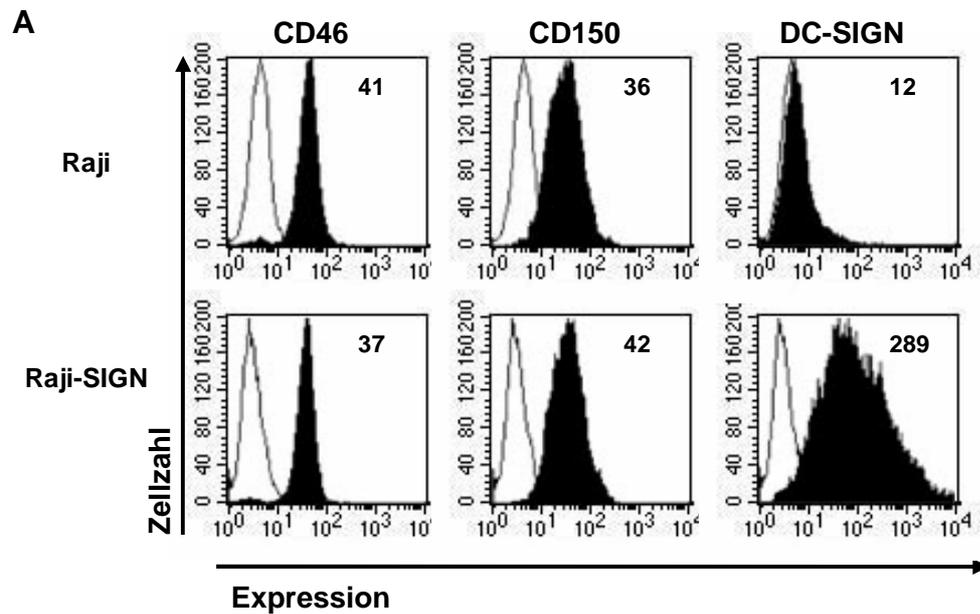
#### 4.2.3.2 Die Rolle von DC-SIGN bei der Infektion von DC

In den nachfolgend beschriebenen Experimenten sollte die Rolle von DC-SIGN bei der CD150-vermittelten Infektion von DC, dem Rezeptor für Wildtyp- und Vakzinestämme, untersucht werden.

Dazu wurden Raji-Zellen verwendet, die natürlicherweise CD46 und CD150, aber kein DC-SIGN exprimieren sowie Raji-Zellen, die zusätzlich mit DC-SIGN transfiziert waren. Abbildung 4—23 A zeigt die Expression der Rezeptoren der eingesetzten Zellen. Mit DC-SIGN transfizierte Raji-Zellen weisen eine hohe Expression von DC-SIGN auf (MFI 289).

Die beiden verwendeten Zelllinien wurden mit verschiedenen Mengen des Wildtypvirus WTF infiziert und 48 Stunden nach der Infektion mit einem Antikörper gegen das MV-H-Protein gefärbt, um den prozentualen Anteil an infizierten Zellen zu bestimmen (Abbildung 4—23). Sowohl bei einer geringen  $moi$  (0,03) als auch bei einer höheren Infektionsdosis ( $moi$  0,3) waren die mit DC-SIGN transfizierten Zellen deutlich besser infizierbar als die nicht-transfizierten Zellen. Bei einer vorherigen Behandlung der transfizierten Zellen mit dem DC-SIGN Ligand Mannan wurden deutlich weniger Zellen infiziert.

Durch diese Experimente konnte gezeigt werden, dass die Infektion von Zellen durch das Vorhandensein von DC-SIGN verbessert wird, auch wenn DC-SIGN selbst nicht als Eintrittsrezeptor für MV fungiert (vgl. 4.2.2.2).



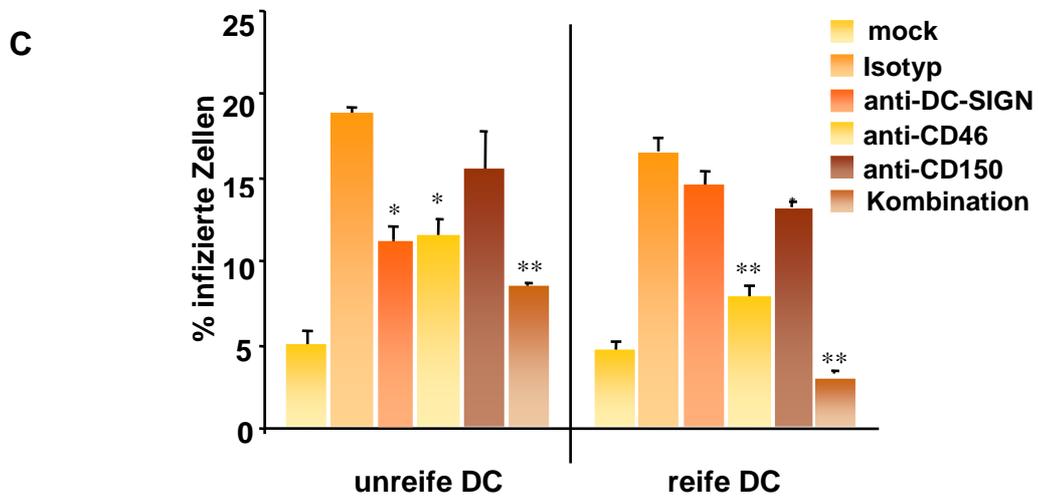
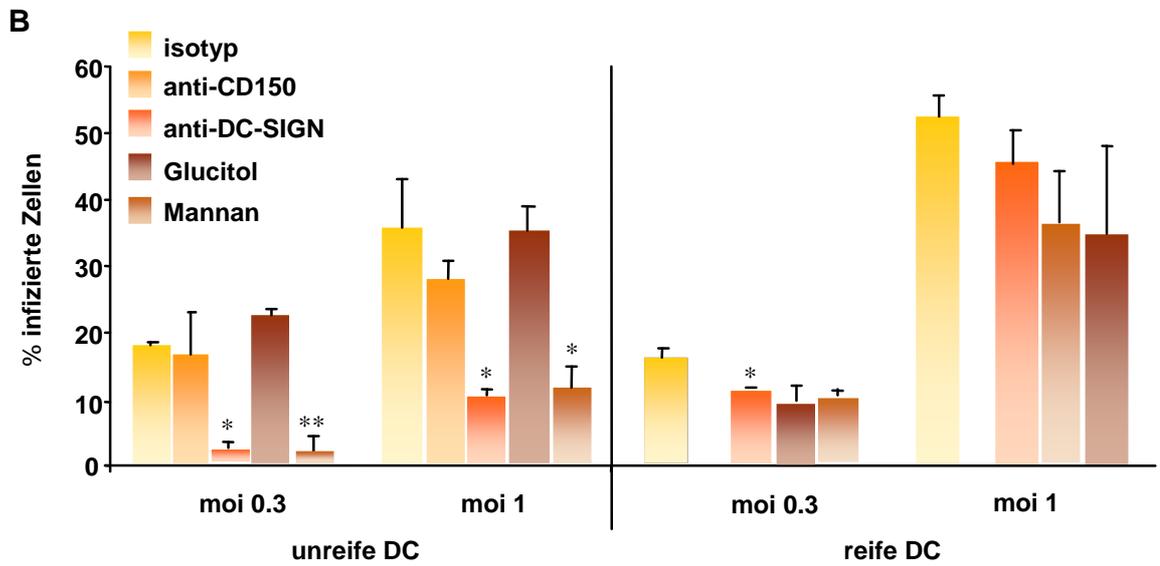
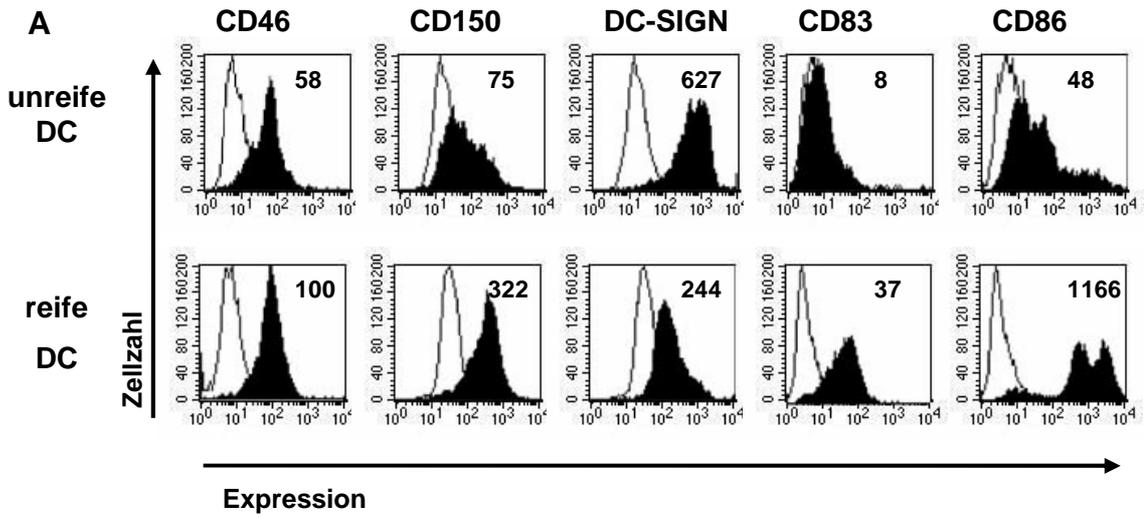
**Abbildung 4—23: Infektion DC-SIGN positiver Zellen mit MV.** A: Raji-Zellen und stabil mit DC-SIGN transfizierte Raji-Zellen wurden auf die Expression der Rezeptoren CD46, CD150 und DC-SIGN mit Hilfe spezifischer Antikörper überprüft (CD46:13/42, CD150: 5C6, DC-SIGN: AZN-D1). B: Die Zellen wurden mit MV-WTF infiziert (moi 0,03 und 0,3) und nach 48 Stunden auf die Expression des MV-H-Proteins (anti-MV-H Antikörper: L77) durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (MFI).

### 4.2.3.3 DC-SIGN verstärkt die Infektion unreifer DC

Nachdem gezeigt werden konnte, dass DC-SIGN die Infektion von Raji-Zellen verstärkt (4.2.3.2), sollte die Rolle von DC-SIGN bei der Infektion von DC untersucht werden. Zunächst wurde die Expression von CD46, CD150 und DC-SIGN sowie die Expression der Reifungsmarker CD83 und CD86 auf unreifen und reifen DC durchflusszytometrisch bestimmt.

Im oberen Teil der Abbildung 4—24 (A) sind die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse der Rezeptorexpression dargestellt. Die Expression von CD46 und CD150 sowie CD83 und CD86 steigt im Verlauf der Reifung an, während die Expression von DC-SIGN zurückgeht.

Im mittleren Teil der Abbildung 4—24 (B) ist der prozentuale Anteil der WTF-infizierten reifen und unreifen DC dargestellt. Die Zellen wurden mit zwei verschiedenen Virusmengen infiziert und nach 48 Stunden mit einem monoklonalen Antikörper gegen das MV-H-Protein gefärbt. Vor der Infektion wurden die Zellen mit verschiedenen Antikörpern (anti-CD150 bzw. anti-CD46) oder mit Mannan (1 mg/ml) inkubiert, um die Rezeptoren zu blockieren und so deren Einfluss auf die Infektion zu untersuchen. Dabei wird deutlich, dass die Infektion der unreifen DC (linke Seite) besonders durch Antikörper gegen DC-SIGN oder durch Vorinkubation mit dem Carbohydrat Mannan gehemmt wird. Dagegen hatte die Vorinkubation mit Glucitol (Carbohydratkontrolle) keinen Einfluss auf die Infektion. Bei der Infektion mit einer höheren Viruskonzentration konnte der prozentuale Anteil MV-H-positiver Zellen auch durch vorherige Inkubation mit einem Antikörper gegen CD150 verringert werden.



**Abbildung 4—24: Einfluss von DC-SIGN auf die Infektion unreifer und reifer DC.** A: Die Expressionskontrolle der MV-Eintrittsrezeptoren CD46 und CD150 sowie von DC-SIGN und den Reifungsmarkern CD83 und CD86 wurde mit den entsprechenden spezifischen Antikörpern durchgeführt (CD46:13/42, CD150: 5C6, DC-SIGN: AZN-D1). B: Unreife und reife DC wurden mit MV-WTF (moi 0,3 und moi 1) und der entsprechenden Mockkontrolle infiziert. Um die Rolle von DC-SIGN bei der Infektion der DC zu untersuchen, wurden die Zellen mit Mannan (1 mg/ml) oder einem Antikörper gegen DC-SIGN (AZN-D2; 20 µg/ml) blockiert. Zur Kontrolle der Carbohydratbindung wurde Glucitol (50 µg/ml) eingesetzt. CD150 wurde durch Antikörper gegen CD150 (5C6) blockiert. Nach 48 Stunden wurden die DC auf die Expression des MV-H-Proteins mit Hilfe des MV-H-spezifischen Antikörpers L77 durchflusszytometrisch untersucht. Angegeben ist der prozentuale Anteil MV-H-positiver Zellen. C: Unreife und reife DC wurden mit MV-EDeGFP für 48 Stunden infiziert. Die Bindung an die zu untersuchenden Rezeptoren CD46, CD150 und DC-SIGN wurde durch Vorinkubation mit spezifischen Antikörpern (CD46:13/42, CD150: 5C6, DC-SIGN: AZN-D1) einzeln oder in Kombination blockiert. Der prozentuale Anteil MV-infizierter Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der GFP-positiven Zellen. \*, P <0,05; \*\*P<0,01 (gegenüber den Kontrollen).

Die Infektion der reifen DC wurde dagegen weder durch die Vorinkubation mit einem DC-SIGN-Antikörper noch durch Mannan stark beeinflusst. Auch bei unterschiedlich hohen Konzentrationen an eingesetztem Virus konnten die Antikörper bzw. Mannan den prozentualen Anteil infizierter Zellen nur wenig reduzieren.

Im Fall der reifen DC ergab sich in Folge der erhöhten Expression von CD150 eine Kreuzreaktivität zwischen den verwendeten Antikörpern zum Blockieren der Bindung und für die durchflusszytometrische Analyse der MV-H-Expression, die zu einer starken Hintergrundfärbung der DC führte (nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurden unreife und reife DC mit einem rekombinanten ED-Virus infiziert, das für das grünfluoreszierende Protein (Duprex et al., 1999) codiert. Die Expression des GFP ist replikationsabhängig.

Die Ergebnisse dieses Experiments sind in Abbildung 4—24 (C) dargestellt. Auch hier hatte das Blockieren von DC-SIGN sowie CD150 einen größeren Effekt auf die Infektion unreifer DC als auf die Infektion reifer DC. Die Vorinkubation mit Antikörpern gegen CD46 zeigte dagegen sowohl einen deutlichen Effekt bei unreifen als auch bei reifen DC. Ebenso wie bei der Infektion mit dem Wildtypvirus (siehe Abbildung 4—24 (B)) hatten Antikörper gegen DC-SIGN einen größeren Einfluss auf die Infektion unreifer DC. Die Kombination der verschiedenen Antikörper hatte jedoch den größten Effekt auf die Infektion. Der prozentuale Anteil der infizierten DC verringerte sich am

deutlichsten bei der Verwendung einer Antikörperkombination gegen CD46, CD150 und DC-SIGN im Vergleich zur Isotypkontrolle.

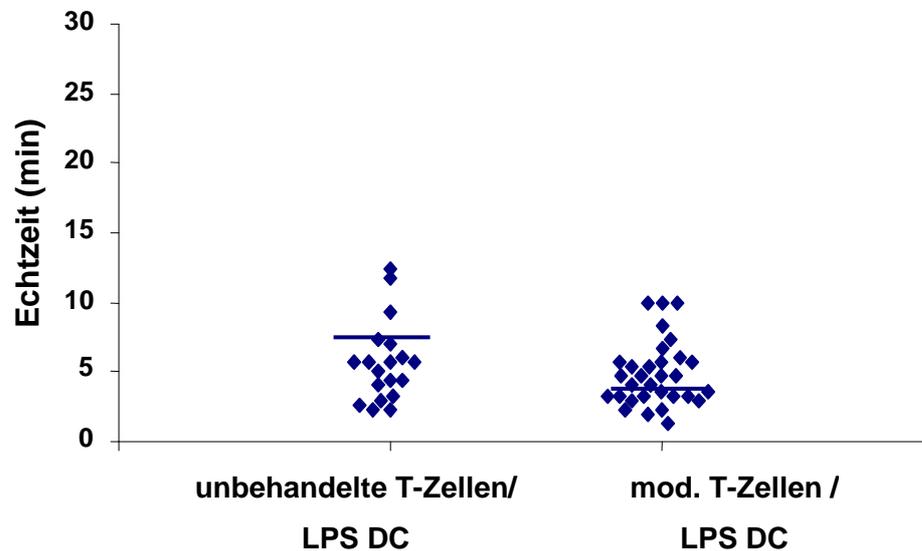
Anhand dieser Ergebnisse wird deutlich, dass DC-SIGN für die Bindung von MV an unreife DC von Bedeutung ist, die Infektion der DC verstärkt, aber nicht als Eintrittsrezeptor benutzt wird.

### **4.3 Interaktion zwischen MV-infizierten DC und T-Zellen in dreidimensionalen Kollagenmatrices**

#### **4.3.1 Analyse der Kontaktzeiten zwischen LPS-behandelten DC und T-Zellen**

Im dritten Teil dieser Arbeit wurden die Kontakte zwischen DC und T-Zellen in dreidimensionalen Kollagenmatrices untersucht. Dazu wurden DC an Tag sechs der Kultur mit LPS (100 ng/ml) ausgereift. Autologe T-Zellen wurden entweder durch Oxidative Mitogenese modifiziert oder unbehandelt eingesetzt. Durch die Oxidative Mitogenese kommt es zu einer Veränderung der T-Zelloberfläche, die dann von der APC als fremd erkannt wird. DC und T-Zellen wurden in einem Gelansatz gemischt und in eine vorbereitete Gelkammer pipettiert. Nach der Polymerisation des Gels wurden die Gelkammern auf dem Objektisch eines Durchlichtmikroskops für die videomikroskopische Analyse fixiert und für die Dauer der Aufnahme bei einer konstanten Temperatur von 37°C gehalten. In den folgenden 16 Stunden wurden pro Minute drei Bilder aufgenommen, die anschließend in einen Film umgeschrieben wurden. Die Analyse der Dauer der Zell-Zell-Kontakte erfolgte über eine Bild-zu-Bild-Analyse, bei der der Zeitraum vom Zeitpunkt der Bindung der T-Zelle bis zur Ablösung der T-Zelle von der DC gemessen und in Echtzeit umgerechnet wurde. Abbildung 4—25 zeigt die Auswertungsergebnisse der Kontaktzeiten

zwischen LPS-behandelten DC und unbehandelten bzw. durch Oxidative Mitogenese modifizierten T-Zellen.

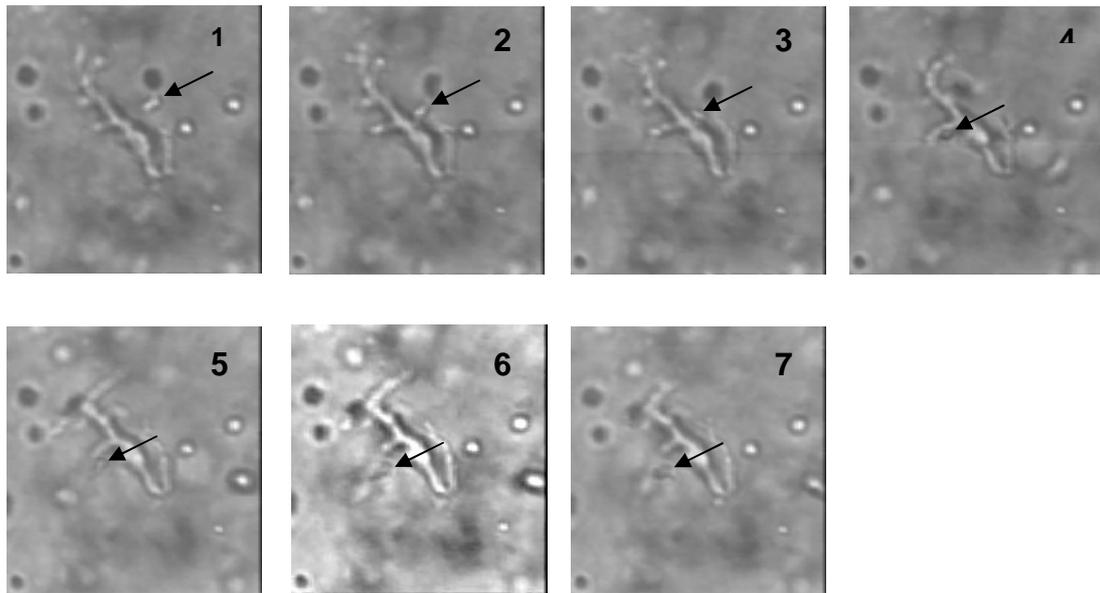


**Abbildung 4—25: Analyse der Kontaktzeiten von LPS-behandelten DC und T-Zellen.** Dargestellt sind die Kontaktzeiten zwischen unbehandelten T-Zellen oder durch Oxidative Mitogenese modifizierten T-Zellen mit LPS-ausgereiften (100 ng/ml) DC. Die Zellen wurden in Kollagengelansätzen gemischt und in Gelkammern eingesetzt. Die videomikroskopische Analyse erfolgte für 16 Stunden. Dabei wurden drei Bilder pro Minute aufgenommen und zu einem Film konvertiert (10 Bilder pro Sekunde). Die Auswertung der Kontaktzeiten erfolgte durch Bild-zu-Bild-Analyse. Die ermittelten Kontaktzeiten wurden in Echtzeit umgerechnet. Die einzelnen Kontakte sowie der Median aller ausgewerteten Kontakte sind dargestellt.

Wie aus der Abbildung 4—25 hervorgeht, konnte kein wesentlicher Unterschied in der Kontaktdauer der beiden untersuchten Ansätze festgestellt werden. Der Median der Kontaktdauer im Ansatz der unbehandelten T-Zellen mit LPS-behandelten DC lag bei etwa sechs Minuten. Für die Kontaktdauer der durch Oxidative Mitogenese modifizierten T-Zellen mit LPS ausgereiften DC wurde ein Median von etwa vier Minuten ermittelt.

In Abbildung 4—26 und Film 1 ist ein ausgewählter Kontakt zwischen einer LPS-behandelten DC und einer durch Oxidative Mitogenese modifizierten T-Zelle dargestellt. Die Dauer dieses Kontaktes in Echtzeit beträgt in etwa 3,5 Minuten. Die Folge der Bilder in Abbildung 4—26 zeigt eine T-Zelle unmittelbar vor dem Kontakt mit der DC (Bild 1), die Kontaktaufnahme (Bilder 2 und 3), die

Dauer des Kontaktes (Bilder 4 und 5). Dabei konnte beobachtet werden, wie die T-Zelle über die Oberfläche der DC wandert. Auf Bild 6 erkennt man die Ablösung der T-Zelle von der DC. Bild 7 zeigt die von der Oberfläche der DC abgelöste T-Zelle.

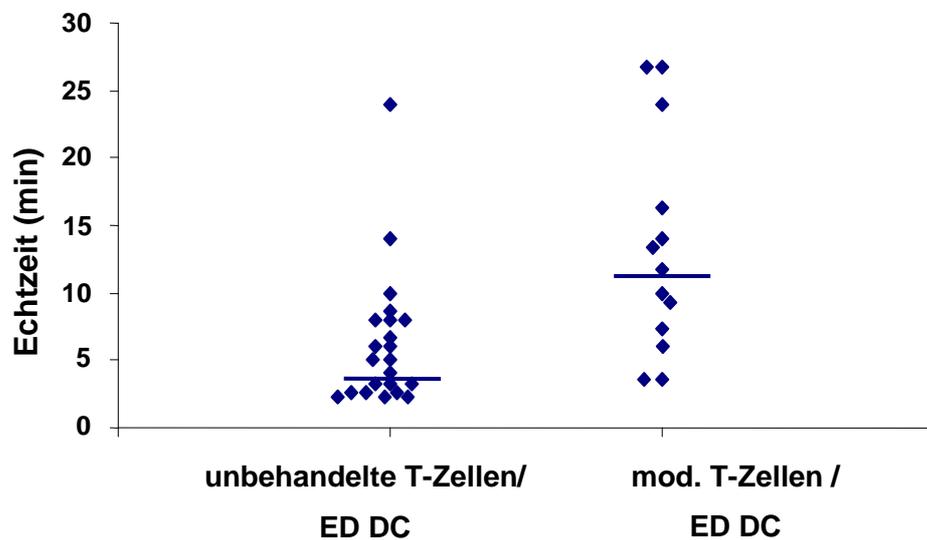


**Abbildung 4—26 und Film 1: Ausgewählter Kontakt zwischen einer reifen DC und einer T-Zelle.** DC wurden mit LPS (100 ng/ml) ausgereift und mit T-Zellen kokultiviert, die durch Oxidative Mitogenese modifiziert wurden. Dargestellt ist ein ausgewählter Kontakt zwischen einer DC und einer T-Zelle. Bild 1: vor dem Kontakt, Bild 2+3: Kontaktaufnahme, Bild 4+5: Kontakt, Bild 6: Ablösen, Bild 7: T-Zelle und DC sind getrennt

#### 4.3.2 Analyse der Kontaktzeiten zwischen MV-infizierten DC und T-Zellen

Wie bereits in Abschnitt 4.3.1 beschrieben, wurden DC und T-Zellen in dreidimensionalen Kollagenmatrices kokultiviert und für 16 Stunden videomikroskopisch beobachtet. In Abbildung 4—27 sind die Kontaktzeiten von

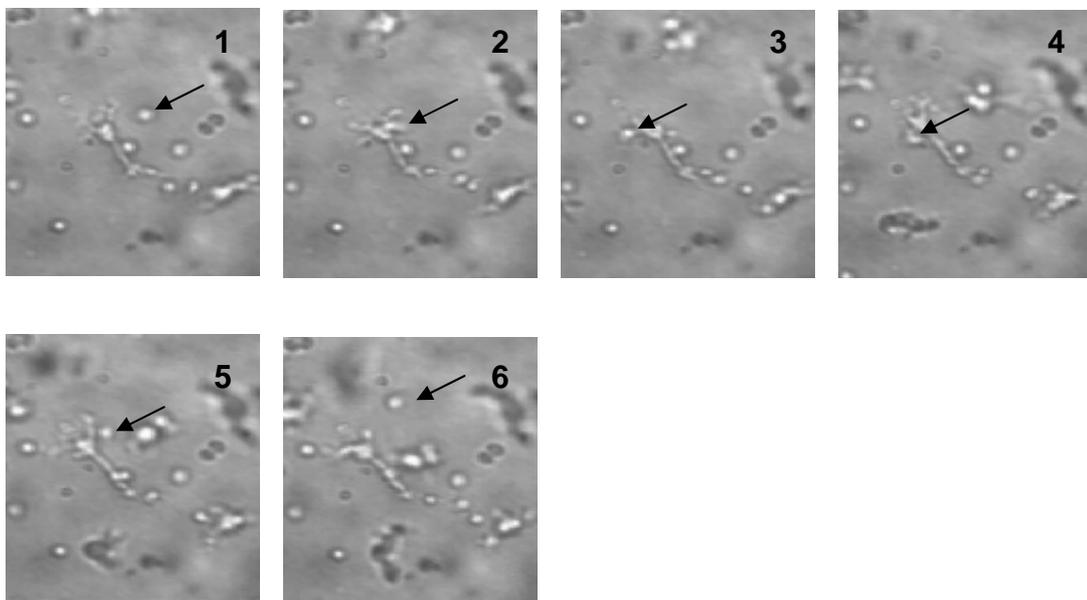
ED-infizierten DC mit unbehandelten oder durch Oxidative Mitogenese veränderten T-Zellen dargestellt. Für die Experimente wurde ein rekombinantes ED-Virus verwendet, das zusätzlich ein für GFP codiert. Bevor die DC mit den T-Zellen gemischt und in die Kollagenmatrix eingesetzt wurden, wurden die GFP-positiven (d.h. infizierten Zellen) sortiert, so dass in der Kokultur nahezu ausschließlich infizierte DC enthalten waren. Abbildung 4—27 zeigt die Analyse der Kontaktzeiten zwischen ED-infizierten DC und unbehandelten bzw. durch Oxidative Mitogenese veränderten T-Zellen.



**Abbildung 4—27: Analyse der Kontaktzeiten MV-infizierter DC mit T-Zellen.** DC wurden mit MV-EDeGFP für 48 Stunden infiziert (moi 0,25) und anschließend sortiert. eGFP-positive Zellen wurden mit unbehandelten oder durch Oxidative Mitogenese modifizierten T-Zellen gemischt und in Kollagenmatrices eingesetzt. Die videomikroskopische Analyse erfolgte für 16 Stunden. Dabei wurden drei Bilder pro Minute aufgenommen und zu einem Film konvertiert (10 Bilder pro Sekunde). Die Auswertung der Kontaktzeiten erfolgte durch Bild-zu-Bild-Analyse. Die ermittelten Kontaktzeiten wurden in Echtzeit umgerechnet und die einzelnen Kontakte sowie der Median aller ausgewerteten Kontakte dargestellt.

Bei der Analyse der Kontaktzeiten wurde für die Kokultur der unbehandelten T-Zellen mit den ED-infizierten DC Kontaktzeiten zwischen 3 und 24 Minuten ermittelt. Der Median aller untersuchten Kontakte betrug ca. 4 Minuten und war damit ähnlich wie der ermittelte Median der Kontaktdauer zwischen nicht-infizierten DC und T-Zellen. In der Kokultur der infizierten DC und der durch Oxidative Mitogenese veränderten T-Zellen wurden Kontaktzeiten zwischen 3 und 26 Minuten ermittelt. Die überwiegende Zahl der Kontakte hatte eine Dauer von ca. 10 Minuten. Der sich aus allen gezählten Kontakten ergebende Median der Kontaktzeiten lag bei ca. 11 Minuten.

Abbildung 4—28 und Film 2 zeigen einen ausgewählten Kontakt zwischen einer ED-infizierten DC und einer durch Oxidative Mitogenese behandelten T-Zelle. Bild 1 zeigt die T-Zelle vor dem Kontakt, Bild 2 zeigt die Kontaktaufnahme. Die T-Zelle wandert auf der Oberfläche der DC (Bilder 3 und 4). Bild 5 zeigt die Ablösung der T-Zelle und in Bild 6 ist die T-Zelle vollständig von der DC-Oberfläche abgelöst.



**Abbildung 4—28 und Film 2:** Ausgewählter Kontakt einer ED-GFP-infizierten DC mit einer T-Zelle. DC wurden mit ED-GFP für 48 Stunden infiziert (moi 0,25) und mit T-Zellen kokultiviert, die durch Oxidative Mitogenese modifiziert wurden. Dargestellt ist ein ausgewählter Kontakt zwischen einer DC und einer T-Zelle. Bild 1: vor dem Kontakt, Bild 2: Kontaktaufnahme, Bild 3, 4+5: Kontakt, Bild 6: T-Zelle und DC sind getrennt.

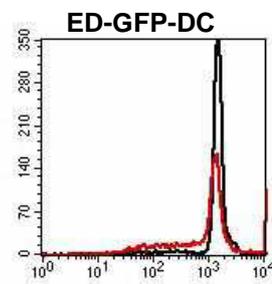
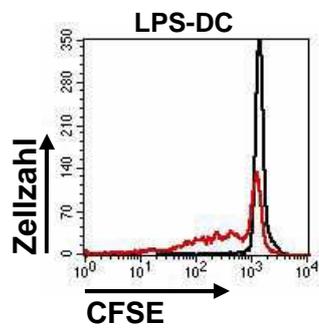
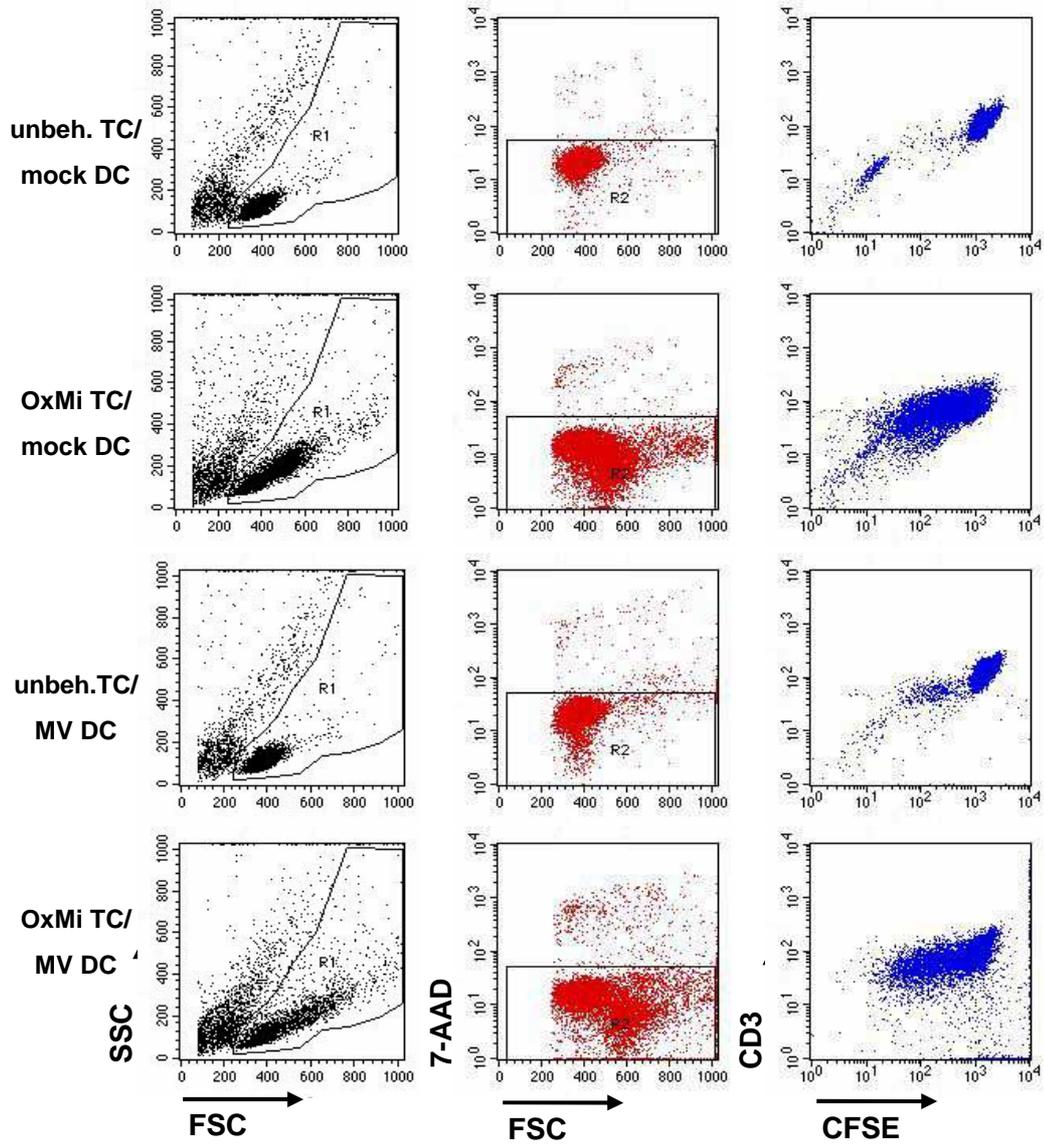
### 4.3.3 Proliferation der T-Zellen in Kollagenmatrices

Parallel zu den videomikroskopischen Analysen wurden die DC und T-Zellen in Proliferationstests eingesetzt. Um die Proliferation der T-Zellen zu ermitteln, wurden diese (unbehandelte und modifizierte) zunächst mit CFSE gefärbt und anschließend mit den LPS-behandelten bzw. den ED-GFP-infizierten DC in einem Gelansatz gemischt und für fünf Tage kultiviert. Nach dem Herauslösen der Zellen aus dem Gel wurde die Proliferation im Durchflusszytometer untersucht.

Die Ergebnisse des Proliferationstests sind in Abbildung 4—29 dargestellt.

Die linke Seite der Abbildung zeigt die Morphologie der Zellen. Bereits in dieser Darstellung wird die Proliferation der T-Zellen in den Ansätzen mit den modifizierten T-Zellen deutlich, da sich diese in der Größe von den nicht-proliferierenden T-Zellen unterscheiden. Die mittlere Spalte zeigt die 7-AAD-Färbung der Zellen. In die weitere Analyse wurden nur die 7-AAD-negativen Zellen einbezogen. Die rechte Seite der Abbildung zeigt die Abnahme der CFSE-Färbung.

Im unteren Teil der Abbildung wurden Histogramme der Färbungen erstellt, um den prozentualen Anteil der proliferierenden Zellen zu bestimmen. Dabei wurde im Fall der unbehandelten T-Zellen in Kokultur mit LPS-ausgereiften DC eine Proliferation von 3 % gegenüber 51 % proliferierender Zellen im Ansatz der LPS-ausgereiften Zellen mit durch Oxidativer Mitogenese veränderten T-Zellen. Dagegen war die Proliferation bei Verwendung der ED-GFP-infizierten Zellen und den modifizierten T-Zellen deutlich reduziert. In diesem Ansatz wurden 29 % proliferierende Zellen ermittelt. Eine Proliferationsrate von 4 % wurde für die Kokultur der ED-GFP-infizierten DC mit unbehandelten T-Zellen ermittelt.



**Abbildung 4—29: Proliferationstest MV-infizierter und nicht-infizierter DC in Kollagenmatrices:** DC wurden mit LPS ausgereift (100 ng/ml) oder für 48 Stunden mit MV-EDeGFP (moi 0,25) infiziert, eGFP-positive Zellen wurden sortiert und für den Proliferationstest eingesetzt. Unbehandelte oder durch Oxidative Mitogenese modifizierte T-Zellen wurden mit CFSE gefärbt. T-Zellen und DC wurden in einer Kollagenmatrix gemischt. Nach fünftägiger Kokultur wurden die Zellen aus dem Kollagengel gelöst, die T-Zellen mit einem Antikörper gegen CD3 gefärbt und die Proliferation der T-Zellen durchflusszytometrisch untersucht. Die morphologisch intakten, 7-AAD-negativen, CD3-positiven Zellen wurden in die Berechnung des prozentualen Anteils der proliferierenden Zellen einbezogen.

Wie erwartet trat bei der Verwendung unbehandelter T-Zellen keine Proliferation der T-Zellen ein. Wurden dagegen modifizierte T-Zellen verwendet, konnte eine Proliferation der eingesetzten T-Zellen ermittelt werden. Die erwartete Proliferationshemmung durch die ED-GFP-Infektion konnte ebenfalls festgestellt werden.

## 5 Diskussion

Die Funktion DC ist durch Antigenaufnahme und deren anschließende Prozessierung gekennzeichnet. Die Erkennung der präsentierten Peptide durch den T-Zell-Rezeptor führt zur Induktion einer spezifischen Immunantwort. DC bilden dadurch eine Schnittstelle zwischen angeborener und erworbener Immunität. Die Vorgänge der Antigenaufnahme und -präsentation finden an verschiedenen Orten des Körpers statt. Während die Aufnahme in den peripheren Geweben erfolgt, findet die Präsentation des prozessierten Antigens in sekundären lymphatischen Organen statt. Um eine effiziente Immunantwort auslösen zu können, müssen DC vom Ort der Antigenaufnahme in die lymphatischen Organe gelangen und mit den dort vorhandenen sowie den in Folge der einsetzenden Immunantwort dorthin rekrutierten Zellen des adaptiven Immunsystems in Kontakt treten.

DC sind durch lange vom Zellkörper ausgehende Fortsätze gekennzeichnet; durch Extension und Retraktion dieser Fortsätze sind sie für die Fortbewegung im Gewebe besonders geeignet (Banchereau and Steinman, 1998). Während der Wanderung (Migration) in die lymphatischen Organe machen sie eine funktionelle Reifung durch. Dabei verlieren sie die Fähigkeit, Antigene zu sammeln und stellen ihre Funktion auf das Präsentieren von Antigen um. Für die optimale Nutzung dieser Funktionen sind DC in den verschiedenen Stadien ihres Lebenszyklus mit verschiedenen Rezeptoren ausgestattet, die es ihnen ermöglichen, auf bestimmte Stoffe in ihrer Umgebung zu reagieren. Eine besondere Rolle für die Migration der DC nach der Antigenaufnahme spielen Chemokine und deren Rezeptoren. Besonders gut beschrieben ist der Wechsel von CCR5 auf unreifen DC zu CCR7 auf reifen DC.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollte die Expression von CCR5 und CCR7 auf der Oberfläche MV-infizierter DC-Kulturen untersucht werden. Dass die Infektion DC mit MV (Wildtyp und Vakzinestämmen) *in vitro* möglich ist,

wurde bereits mehrfach gezeigt (Fugier-Vivier et al., 1997; Grosjean et al., 1997; Klagge et al., 2000; Ohgimoto et al., 2001). In der vorliegenden Arbeit wurden DC-Kulturen mit MV-infiziert und die Expression verschiedener Oberflächenmoleküle durch-flusszytometrisch untersucht. Obwohl die Infektion mit MV zu einer erhöhten Expression kostimulatorischer Moleküle (z.B. CD86) führt, bleibt die Expression von CCR5 auf der Oberfläche nahezu konstant (Abbildung 4—1, Abbildung 4—2, Abbildung 4—3). In der durchflusszytometrischen Analyse der CCR5-Expression konnte eine einheitliche Population CCR5-exprimierender Zellen detektiert werden. Dies deutet daraufhin, dass sich die konstante CCR5-Expression nicht auf die tatsächlich infizierten Zellen beschränkt. Diese Frage wurde im Verlauf der Arbeit jedoch nicht näher untersucht. Die Ausreifung der DC-Kulturen mit LPS führte wie erwartet zu einer starken Abnahme der CCR5-Expression.

Die Expression von CCR7 wird im Verlauf der Ausreifung DC induziert und ist für die Emigration reifender DC aus entzündlichem Gewebe von essentieller Bedeutung (Caux et al., 2002). Sowohl die Infektion mit ED als auch mit WTF konnte in den DC-Kulturen keine erhöhte mRNA-Expression und folglich auch keine CCR7-Expression auf der Oberfläche der DC induzieren. Erwartungsgemäß erhöhte sich sowohl die Menge der mRNA als auch die Oberflächenexpression von CCR7 in LPS-behandelten DC-Kulturen (Abbildung 4—3, Abbildung 4—4). Anhand dieser Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass die Infektion einer DC-Kultur mit MV die Expression kostimulatorischer Moleküle erhöht, der für die Migration der DC essentielle Rezeptorwechsel von CCR5 zu CCR7 jedoch ausbleibt.

Im Gegensatz zu den in dieser Arbeit gezeigten Daten wurde in einer Studie von Zilliox und Kollegen (Zilliox et al., 2006) die Induktion von CCR7 mRNA in MoDC (*monocyte-derived DC*, MoDC) nach der Infektion mit MV gezeigt. In der Arbeit von Zilliox et al werden die Daten von Micro-Array-Analysen MV- und mit anderen Pathogenen infizierter DC verglichen. Die erhobenen Daten werden in dieser Arbeit allerdings nicht durch andere Methoden bestätigt. Ein möglicher Grund für die deutlichen Unterschiede zwischen den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit bezüglich der CCR7-Expression auf DC und der Studie von

Zilliox und Kollegen könnte die zehnfach höhere Virusmenge sein, die verwendet wurde.

Funktionell ist die Veränderung der Rezeptorexpression auf DC von besonderer Bedeutung. Besonders die Migration reifender DC aus den peripheren Geweben in die lymphatischen Organe ist von der CCR7-Expression abhängig. Während es für CCR5 mehrere Liganden gibt (CCL-3, CCL-4, CCL-5), die ihrerseits mit jeweils noch mindestens einem weiteren Chemokinrezeptor interagieren können, gibt es für CCR7 nur zwei Liganden (CCL-19, CCL-21).

Nicht nur die Expression von CCR5 und CCR7 verändert sich mit der Reifung der DC. Sallusto und Lanzavecchia beschrieben 1998 die Veränderung der Chemokinrezeptoren auf DC in Folge der Ausreifung mit LPS, TNF- $\alpha$  oder nach CD40-Ligation (Sallusto et al., 1998c). Auf der Oberfläche unreifer MoDC konnten sie die Expression von CCR1, CCR2, CCR5 und CXCR1 nachweisen. Durch die Ausreifung ging die Expression dieser Chemokinrezeptoren zurück. Dagegen konnte auf reifen DC die Expression von CCR4, CXCR4 und CCR7 gezeigt werden. Die Untersuchung der Expression anderer Chemokinrezeptoren auf der Oberfläche DC nach Infektion mit MV und der Einsatz entsprechender Liganden sowie deren Kombination könnte weiteren Aufschluss über die migratorischen Fähigkeiten DC nach einer MV-Infektion bringen.

Zur Untersuchung der funktionellen Konsequenzen der ausbleibenden CCR7-Expression sowie der konstanten CCR5-Expression wurden Chemotaxis-Assays durchgeführt. Erwartungsgemäß zeigten Zellen aus MV-infizierten DC-Kulturen eine verringerte Migration in Richtung CCL-19 (Abbildung 4—6) und eine bessere Migration gegenüber CCL-3 (Abbildung 4—7). In beiden Ansätzen konnte der überwiegende Teil der infizierten DC im oberen Teil des eingesetzten Filtersystems nachgewiesen werden, d.h. die infizierten Zellen konnten nicht Richtung der eingesetzten Liganden migrieren (Abbildung 4—8, Abbildung 4—9). Trotz einer nahezu konstanten CCR5-Expression 6 und 24 Stunden nach MV-Infektion (Abbildung 4—1, Abbildung 4—2) reduzierte sich

die Gesamtzahl der migrierten Zellen in den DC-Kulturen, die für 24 Stunden mit MV infiziert waren, gegenüber der Gesamtzahl der migrierten Zellen, die für 6 Stunden mit MV infiziert wurden, deutlich (Abbildung 4—7). Dieser Effekt ist möglicherweise durch die zunehmende Zahl apoptotischer Zellen in der Kultur verursacht. Dieser Fragestellung wurde aber im Verlauf der Arbeit nicht weiter nachgegangen, jedoch ist eine erhöhte Expression von TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*, TRAIL) ebenso wie eine erhöhte Expression von Fas (CD95) nach einer MV-Infektion von DC beschrieben (Servet-Delprat et al., 2000a; Vidalain et al., 2000). Dadurch erklärt sich jedoch nicht die ebenfalls nach 24 Stunden auftretende Reduktion der Zellzahl in dem Ansatz der mit einer Mockpräparation behandelten DC-Kultur.

In den bisherigen Studien, in denen der Wechsel von CCR5 nach CCR7 auf DC bei viralen Infektionen untersucht wurde, konnte eine Veränderung auf Ebene der CCR7-Induktion festgestellt werden, während die Abnahme von CCR5 wie erwartet stattfand (Moutaftsi et al., 2004; Varani et al., 2005). Auch die Migrationsinhibition gegenüber CCL-19 (und CCL-21) wurde bereits für DC beschrieben, die mit HCMV (Moutaftsi et al., 2004) oder dem humanen Herpes-simplex-Virus (HSV) infiziert waren (Prechtel et al., 2005), beschrieben. In der Studie von Moutaftsi et al wurde weiterhin gezeigt, dass nur auf infizierten DC kein CCR7 exprimiert wird. Auch durch zusätzliche Gabe von LPS nach der Infektion konnte die CCR7-Expression nicht induziert werden. In der Studie von Prechtel und Kollegen wurden DC eingesetzt, die vor der Infektion durch HSV mit LPS ausgereift wurden. Die Infektion mit HSV führte dazu, dass die bereits induzierte Expression von CCR7 wieder zurückging. Die zusätzliche Behandlung der DC mit LPS vor oder nach der Infektion mit MV könnte Informationen darüber bringen, ob die inhibierende Wirkung der MV auf die Induktion der CCR7-Synthese aufgehoben werden kann.

Der Frage nach dem molekularen Mechanismus, der CCR7-Expressionsinhibition, wurde nur in einer Studie experimentell nachgegangen. Moutaftsi et al (Moutaftsi et al., 2004) konnten zeigen, dass die Bindung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B an die DNA in HCMV-infizierten DC inhibiert ist. In einer bisher unveröffentlichten Arbeit wurden DC zunächst mit dem MV WTF

infiziert oder mit einer Mockpräparation behandelt. Anschließend wurden sie mit CD40L stimuliert und die Aktivierung von NF $\kappa$ B gemessen. Durch die Stimulation mit CD40L kommt es sowohl in infizierten als auch in nicht-infizierten DC zu einer Erhöhung der NF $\kappa$ B-Aktivität. Die Infektion DC mit WTF hat somit keinen Einfluss auf die Aktivierung von NF $\kappa$ B durch CD40L.

Der in der vorliegenden Arbeit beobachtete ineffiziente Wechsel von CCR5 nach CCR7 bei der MV-Infektion von DC-Kulturen scheint aber prinzipiell andere Ursachen zu haben. Bereits die Funktion von CCR5 scheint gestört zu sein. In einer Untersuchung von D'Amico (D'Amico et al., 2000) wurde die Beteiligung von IL-10 an der Chemokinrezeptorregulation beschrieben. Das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 hemmt die Differenzierung von DC (Allavena et al., 1998; Buelens et al., 1997). In der Studie von D'Amico konnte gezeigt werden, dass die Inkubation unreifer DC mit LPS und IL-10 die Abnahme der CCR5-Expression inhibiert. Auch in Chemotaxis-Assays konnte diese Beobachtung weiter bestätigt werden: Nach Inkubation mit IL-10 und LPS zeigten die DC keine Migration gegenüber CCL-19 und trotz vorhandenem CCR5 nur eine geringe Migration gegenüber CCL-3. Jedoch konnte keine generelle Dysfunktion der DC-Bewegung festgestellt werden. Dies wurde durch die Verwendung von Formyl-Peptiden (fMLP) gezeigt, die als unspezifische chemotaktische Lockstoffe eingesetzt werden (Bokoch, 1995). D'Amico und Kollegen folgern, dass die Chemokinrezeptoren auf der Oberfläche der DC erhalten bleiben, aber von der Signalleitung getrennt werden und unfähig sind, die Migration der DC zu induzieren, jedoch in der Umgebung vorkommende Chemokine binden. Solche Rezeptoren werden auch als „Decoy“-Rezeptoren bezeichnet, deren Vorkommen zunächst für den IL-1-Rezeptor beschrieben wurde (Colotta et al., 1993; Re et al., 1994). D'Amico und Kollegen beobachteten weiterhin eine inhibierte Phosphorylierung der Proteinkinase B sowie von ERK1 (*extracellular signaling regulated kinase*, ERK), ERK2 und p38 durch CCL-3 nach Vorinkubation mit IL-10, jedoch nicht durch Behandlung mit fMLP. Die von D'Amico et al. beschriebene ineffiziente Signalleitung der

vorhandenen Chemokinrezeptoren wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht untersucht, könnte jedoch Ziel weiterer Untersuchungen sein.

Über die Produktion von IL-10 bei einer MV-Infektion von DC gibt es kontroverse Befunde. In den Arbeiten von Servet-Delprat und Kollegen (Servet-Delprat et al., 2000b; Servet-Delprat et al., 2003) wurde bei der Infektion von MoDC mit einem MV-Impfstamm die Induktion von IL-10 mRNA festgestellt, während nach Infektion von MoDC mit Wildtypviren oder Vakzineviren auf Proteinebene kein IL-10 nachgewiesen werden konnte (Klagge et al., 2004). In DC, die aus CD34<sup>+</sup>- Vorläufern generiert wurden, konnte dagegen IL-10 sowohl auf mRNA-Ebene wie auch auf Proteinebene nach Infektion mit MV-ED nachgewiesen werden (Dubois et al., 2001). In der vorliegenden Arbeit wurde die Bildung von IL-10 weder auf Proteinebene noch auf mRNA-Ebene untersucht. Die eingehendere Untersuchung der IL-10-Produktion durch DC in Zusammenhang mit dem ineffizienten Chemokin-rezeptorwechsel könnte Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen sein.

Betrachtet man weiterhin die Daten aus Patientenstudien (Moss et al., 2002; Okada et al., 2001) in denen eine erhöhte IL-10 Konzentration im Plasma nach MV-Infektionen bzw. nach Impfungen nachgewiesen werden konnte, ist die Beteiligung von IL-10 an den auftretenden Veränderungen durchaus in Betracht zu ziehen. Die Produktion von IL-10 kann außer in DC auch in T-Zellen erfolgen, insbesondere regulatorischen T-Zellen (Mason D, 1998, Curr Opin Immunol, 10).

In einer Studie von Dubois et al (Dubois et al., 2001) wurde die Ausreifung MV-infizierter DC in Zusammenhang mit der IL-12-Produktion und Chemotaxis gegenüber CCL-19 untersucht. Dabei wurde allerdings nur die Migration mock-infizierter DC mit der MV-infizierter DC verglichen. Dabei wird zwar ein signifikanter Unterschied festgestellt, jedoch fehlt hier der Vergleich zu LPS-ausgereiften DC. Der dargestellte Unterschied ist verhältnismäßig gering und konnte in ähnlicher Form in der vorliegenden Arbeit beobachtet werden. Im Vergleich zur Migration LPS-ausgereifter DC ist die Migration MV-infizierter DC-Kulturen in Richtung CCL-19 allerdings sehr gering (Abbildung 4–6). Weiterhin

wurden in der Arbeit von Dubois et al zwar die Regulation an der Reifung DC beteiligter Moleküle wie MHC-I und MHC-II sowie CD40, CD32 und CD54 untersucht, die Expression der für die Migration der DC wichtigen Oberflächenmoleküle CCR5 und CCR7 jedoch nicht.

In allen in der vorgelegten Arbeit durchgeführten Experimenten zur Expression von CCR5 und CCR7 sowie zum Migrationsverhalten MV-infizierter DC-Kulturen konnten keine Unterschiede zwischen dem verwendeten Wildtypstamm und dem verwendeten Vakzinestamm festgestellt werden. Die Expression verschiedener anderer Parameter, z. B. die verstärkte Oberflächenexpression von z. B. CD80, CD83, CD86 sowie von MHC I und MHC II Molekülen nach der MV-Infektion DC kann ebenfalls für Wildtypviren und Vakzineviren beobachtet werden.

Die Produktion inflammatorischer Chemokine als Reaktion auf Reifungsstimuli und die Produktion konstitutiv exprimierter Chemokine im Verlauf der Reifung ist ein charakteristisches Merkmal DC (Sallusto et al., 1999b). Das durch MV induzierte Chemokinmuster war Gegenstand weiterer Untersuchungen der vorliegenden Arbeit. Sechs Stunden nach der Infektion von DC-Kulturen konnten Unterschiede im Chemokinmuster sowohl in MV-infizierten DC-Kulturen im Vergleich zu mock- und LPS-behandelten DC-Kulturen als auch zwischen den beiden benutzten Virusstämmen ED und WTF festgestellt werden (Abbildung 4—10). Viele der untersuchten inflammatorischen Chemokine, wie beispielsweise CCL-1 oder CCL-5, konnten in allen untersuchten Proben nachgewiesen werden. In einer kürzlich veröffentlichten Studie von Piqueras et al (Piqueras et al., 2006) wurde die Chemokinproduktion myeloider und plasmacytoider DC, die direkt aus dem Blut isoliert wurden, nach Exposition mit Influenzaviren untersucht. In dieser Studie wird beschrieben, dass die Chemokinsekretion in drei aufeinander folgenden Wellen erfolgt. Die erste tritt nach zwei bis vier Stunden nach der Infektion auf, die zweite nach acht bis zwölf Stunden und die dritte nach vierundzwanzig bis achtundvierzig Stunden.

In jeder dieser Phasen werden Chemokine sekretiert, die bestimmte Populationen von Immunzellen anlocken.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Analyse des durch MV induzierten Chemokinmusters sechs Stunden nach der Infektion durchgeführt. Für die Infektion mit Influenzaviren (Piqueras et al., 2006) wurde in dieser Phase die Produktion von vorwiegend inflammatorischen Chemokinen wie CCL-3, CCL-4, CCL-5 sowie CXCL-9, CXCL-10 und CXCL-11 beschrieben. Die Produktion dieser Chemokine konnte auch nach Infektion mit MV beobachtet werden. Diese Chemokine sind vorwiegend für das Anlocken von Monozyten und DC verantwortlich (Cook et al., 1995). Während CCL-3, CCL-4 und CCL-5 in allen untersuchten Ansätzen nachgewiesen werden konnten, wurden CXCL-10 und CXCL-11 nur in LPS-behandelten und ED-behandelten DC-Kulturen nachgewiesen. Diese Chemokine gehören zu der Gruppe IFN- $\gamma$  induzierbarer Chemokine (Cole et al., 1998; Farber, 1997; Luster and Ravetch, 1987). Der gemeinsame Rezeptor, der auf aktivierten- und T<sub>H</sub>1-Zellen exprimiert wird, ist CXCR3 (Loetscher et al., 1996; Sallusto et al., 1998b). Die antivirale Wirkung von IFN- $\gamma$  kann in humanen Zellen durch Typ-I-Interferone verstärkt werden (O'Shea and Visconti, 2000). Für verschiedene Zelltypen wurde bereits gezeigt, dass die MV-Infektion mit Vakzinestämmen zur Bildung von Typ-I-Interferon führt, die Infektion mit Wildtypviren jedoch nicht (Naniche et al., 2000; Tanabe et al., 2003). In der Studie von Tanabe et al wird die Produktion von Typ-I-Interferon nach Infektion von MoDC mit attenuierten MV-Stämmen in Zusammenhang mit einer erhöhten TLR3-Expression beschrieben.

IFN- $\gamma$  ist weiterhin ein Zytokin, das typischerweise von TH1-Zellen produziert wird. In einem *in vitro* Zellkultursystem konnte gezeigt werden, dass Zellkulturüberstand aus ED-infizierten DC in kokultivierten T-Zellen eine T<sub>H</sub>1-Polarisierung hervorruft (Klagge et al., 2004). Das in Abbildung 4—10 dargestellte Ergebnis zeigt, dass in ED-infizierten DC Chemokine produziert werden, die eine T<sub>H</sub>1-Antwort begünstigen würden. Dagegen wurde für die *in vivo* Situation die erhöhte Produktion von IL-4 und nur geringe Mengen IFN- $\gamma$  in Zellkulturüberständen aus PBMC kurz nach einer MV-Impfung beschrieben,

dies deutet auf die Unterstützung einer T<sub>H</sub>2-Antwort hin (Ward and Griffin, 1993). Unklar bleibt jedoch, warum in keinem der untersuchten Ansätze CXCL-9, das ebenfalls zur Gruppe der durch IFN- $\gamma$  induzierbaren Chemokine gehört, nachweisbar war.

Nur sehr geringe Mengen mRNA der Chemokine CCL-19 und CCL-21 konnten sechs Stunden nach Stimulation bzw. Infektion mit MV-ED oder MV-WTF in DC gemessen werden. Sallusto et al detektieren die Expression von CCL-19 in DC erst 30 Stunden nach der Stimulation mit LPS (Sallusto et al., 1999b). Um eine Aussage über eine mögliche Veränderung der Expression dieser Chemokine durch eine MV-Infektion zu treffen, ist die Analyse der mRNA zu einem späteren Zeitpunkt der Infektion erforderlich.

Weiterhin konnten Unterschiede in der Menge vorhandener CCL-20 und CXCL-8 mRNA in beiden infizierten MV-Kulturen gegenüber den mit LPS behandelten Zellen festgestellt werden. In LPS-behandelten DC konnte nach sechs Stunden sowohl die Induktion von CCL-20 als auch die Induktion von CXCL-8 mRNA detektiert werden. Im Vergleich dazu war die Menge an gebildeter CXCL-8 und CCL-20 mRNA in MV-infizierten DC-Kulturen deutlich reduziert (Abbildung 4—10). Diese Beobachtung konnte durch die Analyse von Zellkulturüberständen aus MV-infizierten DC-Kulturen bzw. LPS-ausgereiften oder mit einer Mockpräparation behandelten DC-Kulturen in chemokin-spezifischen ELISA bestätigt werden (Abbildung 4—12, Abbildung 4—13). In der Arbeit von Zilliox und Kollegen (Zilliox et al., 2006) wurde im Gegensatz zu den in der vorliegenden Arbeit gezeigten Ergebnissen sowohl die Induktion von CXCL-8 als auch von CCL-20 mRNA in DC nach MV-Infektion beschrieben. Die Infektion mit MV zeigte dabei die beste Induktion von CCL-20 mRNA. Dies steht im deutlichen Gegensatz zu den in der vorliegenden Arbeit gezeigten Ergebnissen.

In den durchgeführten Experimenten zur T-Zellchemotaxis konnte eine verringerte Migration der eingesetzten T-Zellpopulation gegenüber Zellkulturüberständen aus MV-infizierten DC-Kulturen im Vergleich zu Zellkulturüberständen aus LPS-behandelten DC-Kulturen beobachtet werden

(Abbildung 4—14). In verschiedenen Untersuchungen wurde die Chemokinproduktion in DC im Verlauf der Reifung analysiert: Darin wurde gezeigt, dass kurz nach der Stimulation vorwiegend inflammatorische Chemokine produziert werden (CXCL-8, CXCL-10, CCL-3, CCL-4, CCL-5) (Foti et al., 1999; Padovan et al., 2002; Sallusto et al., 1999b; Yoneyama et al., 2002), die vorwiegend für die Rekrutierung von Neutrophilen und Monozyten an die Orte der Infektion sorgen, während zu späteren Zeitpunkten nach der Stimulation Chemokine gebildet werden, die speziell für die Anlockung von T- und B-Lymphozyten sorgen (CCL-17, CCL-18, CCL-19 und CCL-22) (Bromley et al., 2000; Sallusto et al., 1999b; Vulcano et al., 2001). Die beobachtete verschlechterte T-Zellmigration in Richtung der DC-Zellkulturüberstände aus MV-infizierten DC-Kulturen ist aus diesem Grund wahrscheinlich nur teilweise mit der reduzierten Produktion von CXCL-8 und CCL-20, wie sie in den PCR-Analysen und ELISA beobachtet wurde, zu erklären. Jedoch wurde in weiteren Experimenten zur T-Zellchemotaxis beobachtet, dass die Migration der eingesetzten T-Zellen durch Zugabe von rekombinantem CCL-20 deutlich verbessert werden konnte (Abbildung 4—15). Diese Ergebnisse zeigen, dass die verminderte Produktion von CCL-20 in MV-infizierten DC-Kulturen für die verschlechterte Migration der eingesetzten T-Zelle verantwortlich sein könnte. Die verschlechterte Migration der T-Zellen war gegenüber Zellkulturüberständen aus DC-Kulturen, die für 24 Stunden infiziert wurden, ausgeprägter als gegenüber Zellkulturüberständen, die acht Stunden nach der Infektion mit MV geerntet wurden (vgl. Abbildung 4—14). Um diesen Effekt genauer zu untersuchen, wäre eine Analyse der produzierten Chemokine (insbesondere CCL-20) zu einem späteren Zeitpunkt nach der Infektion mit MV erforderlich. Weiterhin wurden in die für diese Arbeit durchgeführten Chemotaxis-Assays gemischte T-Zellpopulationen verwendet. Der Einsatz bestimmter T-Zellpopulationen (z. B. CD4<sup>+</sup>, T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2 oder naiver T-Zellen) könnte Aufschluss darüber geben, ob die verschlechterte T-Zellmigration für eine bestimmte T-Zellpopulation besonders ausgeprägt ist. Gut beschrieben ist die unterschiedliche Expression von Chemokinrezeptoren auf T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Zellen (Sallusto et al., 1998a) (Sallusto and Lanzavecchia, 2000). Dadurch ergibt sich für die einzelnen Subpopulationen die Möglichkeit, auf

bestimmte Chemokine zu reagieren. Beispielsweise exprimieren naive T-Zellen sowie eine bestimmte Population von Gedächtniszellen (*central memory T-cells*,  $T_{CM}$ ) CCR7 (Sallusto and Lanzavecchia, 2000; Sallusto et al., 1999a). Diese Zellen sind dadurch in der Lage, auf CCL-19 zu reagieren, das in den Lymphknoten von reifen DC produziert wird (Ngo et al., 1998). Dagegen exprimiert die Population der  $T_{EM}$  (*effector memory T-cells*,  $T_{EM}$ ) kein CCR7 und hat Effektorfunktionen wie z. B. die Produktion von Zytokinen, z.B. IFN- $\gamma$ , nach Stimulation mit Antigen. Diese Population ist vorwiegend in peripheren Geweben lokalisiert, während sich die Population der  $T_{CM}$  vorwiegend in den lymphatischen Organen befindet (Lanzavecchia and Sallusto, 2005).

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Rolle des DC-spezifischen Oberflächenmoleküls DC-SIGN bei der MV-Infektion untersucht.

Um festzustellen, ob MV an DC-SIGN binden können, wurde zunächst rekombinantes DC-SIGN verwendet. Die Bindung an DC-SIGN konnte für Viruspartikel beider verwendeter Virusstämme (ED und WTF) gezeigt werden (Abbildung 4–16). Für verschiedene andere Pathogene viraler, bakterieller oder parasitärer Art wurde die Bindung an DC-SIGN bereits beschrieben. Für Viren sind dies beispielsweise HIV (Geijtenbeek et al., 2000b), das Hepatitis-C-Virus (Gardner et al., 2003; Lozach et al., 2003; Pohlmann et al., 2003), HCMV (Halary et al., 2002) oder auch das Denguevirus (Navarro-Sanchez et al., 2003; Tassaneeritthep et al., 2003). Insbesondere Viren scheinen z.B. die Migration DC für eine effektive Ausbreitung im Organismus zu nutzen, um zu ihren Zielzellen zu gelangen (Geijtenbeek et al., 2000b).

Für die durchgeführten Experimente standen verschiedene DC-SIGN exprimierende Zelllinien zur Verfügung, die benutzt wurden, um die Bindung von MV an DC-SIGN im Vergleich zur Bindung an die bereits bekannten MV-Rezeptoren zu untersuchen (Abbildung 4–17 und (de Witte et al., 2006)). In

den durchgeführten Virusbindungstests konnte eine etwa gleich effiziente Bindung der MV an DC-SIGN und an CD150 festgestellt werden. Die besonders starke Affinität des Vakzinestamms ED für das Oberflächenmolekül CD46, die bereits beschrieben wurde (Casasnovas et al., 1999), konnte in diesen Experimenten bestätigt werden (Abbildung 4—17). Für weitere Experimente wurden K562-Zellen eingesetzt, die natürlicherweise CD46, aber nicht CD150 exprimieren. Erwartungsgemäß konnte eine Virusbindung des Vakzinestamms ED, jedoch keine Bindung des Wildtypvirus WTF festgestellt werden. Wurden K562-Zellen eingesetzt, die zusätzlich DC-SIGN auf der Oberfläche exprimierten, konnte auch eine Bindung des Wildtypvirus nachgewiesen werden (nicht gezeigt, (de Witte et al., 2006)). Durch diese Ergebnisse konnte die Interaktion von MV mit DC-SIGN bestätigt werden. In weiteren Experimenten konnte durch Vorinkubation der Zellen mit DC-SIGN-spezifischen Antikörpern oder mit dem DC-SIGN Liganden Mannan oder mit Hilfe des Calciumchelators EGTA die Bindung der MV an DC-SIGN blockiert werden, wodurch die Spezifität der Interaktion zwischen MV und DC-SIGN weiter bestätigt wurde (Abbildung 4—18).

Die Frage, ob die Bindung von MV an DC-SIGN auf eines der beiden Glykoproteine zurückzuführen ist, wurde mit Hilfe von Zelllinien durchgeführt, die entweder das MV-H- oder das MV-F-Protein des ED-Virus stabil exprimieren. Auf den Einsatz infizierter Zellen zur Bearbeitung dieser Fragestellung konnte hier nicht zurückgegriffen werden, da auf MV-infizierten Zellen die Glykoproteine als Komplex vorliegen. Vermutlich ist eine cysteinreiche Domäne innerhalb des F-Proteins für die Komplexbildung mit dem H-Protein verantwortlich (Fournier et al., 1997; Wild and Buckland, 1995). Eine Trennung der beiden Glykoproteine ist experimentell schwierig und bei der Untersuchung der Frage welches der beiden MV-Glykoproteine an DC-SIGN bindet, konnte keine zufrieden stellende Aussage getroffen werden. Aus diesem Grund wurden für die durchgeführten Experimente Lysate der F- und H-exprimierenden Zellen in einen DC-SIGN-Fc-ELISA eingesetzt. Dabei wurde eine Bindung beider Glykoproteine an DC-SIGN festgestellt (Abbildung 4—19). Die Bindung anderer Viren an DC-SIGN wurde ebenfalls auf die Interaktion der

viralen Glykoproteine zurückgeführt. Im Fall des HIV wurde beispielsweise die Bindung an das gp120-Protein beschrieben (Hong et al., 2002; Lue et al., 2002), für das Ebolavirus die Bindung an das Glykoprotein (G) (Simmons et al., 2003) und für Hepatitis C die Bindung an die Glykoproteine E<sub>1</sub>/E<sub>2</sub> (Lozach et al., 2003; Pohlmann et al., 2003). Die Bindung an DC-SIGN kann entweder durch Protein-Protein-Interaktionen erfolgen oder durch die Interaktion der C-Typ-Lektin Domäne mit hoch-organisierten Mannose-strukturen, die z. B. in O- und N-verknüpften Glykosylierungen vorkommen. Sowohl das F- als auch das H-Protein des MV enthalten N-verknüpfte Glykosylierungen (Bolt et al., 1999) (Lamb, 1993). Die fünf Glykosylierungsstellen im H-Protein liegen innerhalb einer 70 Aminosäuren langen Region des Proteins und sind u. a. an der Faltung des Proteins und dem Export aus dem Golgi-Apparat beteiligt. Die Glykosylierung des F<sub>0</sub>-Vorläufers ist für die Spaltung und den Transport des Proteins essentiell, die drei vorhandenen Glykosylierungsstellen befinden sich in der F<sub>2</sub>-Untereinheit. Die Bindung von MV an DC-SIGN erfolgt vermutlich über die glykosylierten Oberflächenproteine F und H.

Für das Ebolavirus und das Denguevirus wurde nicht nur die Bindung der Viren, sondern auch die Aufnahme der Viren in die Zellen über DC-SIGN oder im Fall von Hepatitis C durch L-SIGN beschrieben (Alvarez et al., 2002; Navarro-Sanchez et al., 2003) (Cormier et al., 2004). Die Nutzung von DC-SIGN als Eintrittsrezeptor für MV ohne die Beteiligung von CD46 und CD150 kann anhand der in den Abbildung 4—20 und Abbildung 4—21 dargestellten Ergebnisse ausgeschlossen werden. Allerdings konnte in einigen Experimenten gezeigt werden, dass das Vorhandensein von DC-SIGN die Infektion der untersuchten Zellen begünstigt. Abbildung 4—23 zeigt, dass die zusätzliche Expression von DC-SIGN auf Raji-Zellen (CD46<sup>+</sup>, CD150<sup>+</sup>, DC-SIGN<sup>-</sup>) die Infektion der Zellen, insbesondere bei niedrigen Viruskonzentrationen, verstärkt.

In weiteren Experimenten zur Beteiligung von DC-SIGN an der Infektion wurde vergleichend die Infektion unreifer und reifer DC untersucht. Dabei wurde deutlich, dass das Vorhandensein von DC-SIGN besonders die Infektion unreifer DC unterstützt (Abbildung 4—24). Dabei ist der Vergleich zwischen reifen und unreifen DC von Bedeutung, da je nach Aktivierungszustand die

Expression der Rezeptoren variiert. Beispielsweise exprimieren DC im unreifen Zustand in der Peripherie intermediäre oder geringe Mengen an CD150 (Kruse et al., 2001; Ohgimoto et al., 2001). In Folge der Ausreifung erhöht sich das Expressionsniveau sowohl von CD150 als auch von CD46 (Abbildung 4—22 (A), Abbildung 4—24 (A)) dagegen nimmt die Expression von DC-SIGN in Folge der Ausreifung ab. Anhand der gezeigten Daten kann DC-SIGN als ein Bindungsfaktor betrachtet werden, der die Infektion unreifer DC in cis verstärkt.

Außerdem könnte die Interaktion von MV mit DC-SIGN auf DC die *trans*-Infektion von T-Zellen ermöglichen. Die *trans*-Infektion von T-Zellen wurde bereits für HIV beschrieben (Geijtenbeek et al., 2000b); dabei wird die Infektion von T-Zellen durch die Interaktion des Virus mit DC-SIGN verstärkt. Man geht davon aus, dass die Viren zunächst an DC-SIGN auf der Oberfläche der DC binden und internalisiert werden. Anschließend werden die intakten Virionen in den DC in die sekundären lymphatischen Organe transportiert. Dort treffen sie auf CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, welche die eigentlichen Zielzellen des Virus sind. Wie die aufgenommenen Viren dem lysosomalen Abbau in den DC entgehen und der genaue Mechanismus der *trans*-Infektion ist bisher jedoch nicht vollständig geklärt. Ein ähnlicher Mechanismus ist allerdings auch für eine MV-Infektion denkbar.

Um die Rolle von DC-SIGN bei der Bindung von MV weiter zu untersuchen, wurden aus Monozyten DC differenziert, die kein DC-SIGN exprimierten. Nach einer Studie von Relloso und Kollegen ist die Expression von DC-SIGN auf DC, die aus Monozyten generiert wurden, von dem Vorhandensein von IL-4 in der Kultur abhängig (Relloso et al., 2002). Andere Reifungsmarker werden nach dieser Studie jedoch nicht durch das Vorhandensein von IL-4 beeinflusst. Weiterhin wurde in der Untersuchung von Relloso festgestellt, dass IFN- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  sowie TGF- $\beta$  (*tumor growth factor*, TGF) die Expression von DC-SIGN auf der Oberfläche der DC negativ beeinflussen.

Für die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden DC aus Monozyten mit IL-4/GM-CSF und IFN- $\alpha$ /GM-CSF differenziert. Erwartungsgemäß exprimierten die IFN- $\alpha$ /GM-CSF-DC nach sechstägiger Kultur kein DC-SIGN auf der Oberfläche,

die Expression der beiden anderen untersuchten Oberflächenmoleküle (CD46 und CD150) war im Vergleich zu IL-4/GM-CSF ebenfalls deutlich reduziert. Die Behandlung mit LPS führte bei den IL-4/GM-CSF-DC zu erhöhter Expression von CD46 und insbesondere CD150, die Expression von DC-SIGN dagegen verringerte sich durch die Behandlung mit LPS (Abbildung 4—22). Die mit diesen DC durchgeführten Virusbindungstests ergaben, dass die Bindung von WTF durch das Vorhandensein von DC-SIGN stark beeinflusst wird. Durch Vorinkubation der DC-SIGN<sup>+</sup>-DC mit dem DC-SIGN Liganden Mannan konnte die Bindung von WTF deutlich reduziert werden. Die Bindung von WTF an DC-SIGN<sup>-</sup>-Zellen war im Vergleich zu den DC-SIGN<sup>+</sup>-Zellen ebenfalls deutlich reduziert. Die Bindung des Vakzinestamms ED war dagegen auf den DC-SIGN<sup>-</sup> Zellen im Vergleich zu den DC-SIGN<sup>+</sup> sogar etwas erhöht, die Bindung des ED-Virus an DC-SIGN<sup>-</sup>-Zellen entsprach in etwa der Bindung an DC-SIGN<sup>+</sup> Zellen nach Vorbehandlung mit Mannan. Durch die Behandlung mit LPS wurde eine bessere Bindung beider verwendeter Virusstämme an DC-SIGN<sup>+</sup>-DC beobachtet. Entgegen den Erwartungen war die Bindung der Viren an die DC-SIGN<sup>-</sup>-DC nur im Fall der Wildtypviren deutlich reduziert. Diese bessere Bindung des Wildtypvirus WTF an DC-SIGN exprimierende Zellen wurde bereits in vorangegangenen Experimenten beobachtet (Abbildung 4—18) und ist möglicherweise auf eine erhöhte Glykoproteinmenge der Wildtypviren zurückzuführen. Trotz ebenfalls reduzierter Expression von CD46 und CD150 (Abbildung 4—22) konnte eine Virusbindung festgestellt werden.

Mehrere Studien zeigen, dass Mykobakterien DC-SIGN als Eintrittsrezeptor für die Infektion von DC benutzen (Geijtenbeek et al., 2003; Tailleux et al., 2003). In der Studie von Geijtenbeek wird weiterhin beschrieben, dass durch die Infektion von DC mit Mykobakterien die Ausreifung der DC sowie die Produktion von IL-12p70 inhibiert ist, die Produktion von IL-10 dagegen induziert wird. Diese Studie zeigt, dass die Interaktion mit DC-SIGN auch die Signalleitung der Zellen beeinflusst. In einer anderen Studie von Gagliardi et al (Gagliardi et al., 2005) werden DC aus Monozyten in Abwesenheit von IL-4 generiert, so dass sie kein DC-SIGN exprimieren. Diese Arbeit zeigt, dass die Aufnahme der Bakterien durch DC-SIGN und die in der Arbeit von Geijtenbeek et al

beschriebene IL-10-Produktion durch DC nicht ausschließlich auf DC-SIGN zurückzuführen ist.

Die in der vorgelegten Arbeit gezeigten Daten zeigen ebenfalls eine Beteiligung von DC-SIGN an der MV-Infektion von DC. Inwieweit durch diese Interaktion die intrazelluläre Signalleitung und möglicherweise die IL-10-Produktion beeinflusst wird, geht aus den hier gezeigten Daten jedoch nicht hervor.

Im dritten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die Interaktion von DC und T-Zellen in dreidimensionalen Kollagenmatrices videomikroskopisch untersucht. Ziel dieser Untersuchungen war es, die Kontaktdauer infizierter und nicht-infizierter DC mit autologen oder durch Oxidative Mitogenese modifizierte T-Zellen zu untersuchen. Dabei wurde eine in etwa doppelt so lange Kontaktzeit zwischen MV-infizierten DC und durch Oxidative Mitogenese veränderten (modifizierten) T-Zellen festgestellt, als in den anderen untersuchten Ansätzen (Abbildung 4—25, Abbildung 4—27).

Die in diesem Experiment gemachten Beobachtungen zur Kontaktdauer zwischen MV-infizierten DC und T-Zellen können insgesamt nur als vorläufige Beobachtungen festgehalten werden. Um die Bedeutung dieser Ergebnisse einordnen zu können, sind weitergehende Untersuchungen erforderlich. Besonders der Einfluss auf die Kontaktdauer einer DC-Infektion mit Wildtypvirus sollte in weiterführenden Experimenten untersucht werden. Nachfolgend werden Möglichkeiten diskutiert, die an dem beobachteten Effekt der verlängerten Kontaktzeiten zwischen MV-infizierten DC und modifizierten T-Zellen beteiligt sein könnten.

Die Kontaktdauer zwischen DC und T-Zellen kann von verschiedenen Faktoren beeinflusst werden. Einerseits ist die Dauer der Kontakte von der Funktion der eingesetzten Zellen abhängig. Die Kontakte zwischen Effektorzellen und DC sind nur wenige Minuten lang, dagegen benötigen naive T-Zellen Kontakte von

mehreren Stunden, um die Produktion von Zytokinen und die Proliferation zu induzieren (Iezzi et al., 1998; van Stipdonk et al., 2003). In den in dieser Arbeit durchgeführten videomikroskopischen Analysen wurden gemischte T-Zellpopulationen eingesetzt. Um bessere Informationen über die Kontaktdauer zwischen MV-infizierten DC und T-Zellen zu erhalten, könnten in weiteren Experimenten einzelne T-Zellpopulationen, z.B. ausschließlich naive T-Zellen, eingesetzt werden. Weiterhin wurden die in dieser Arbeit gezeigten Daten in einem Modellsystem durchgeführt, in dem eine Kollagenmatrix als Umgebung für die analysierten Zellkontakte verwendet wurde. Die in solchen Systemen gemachten Beobachtungen zur Kontaktdauer zwischen APC und T-Zellen führten bereits zu kontroversen Diskussion (Dustin et al., 2001; Friedl and Gunzer, 2001) und unterscheiden sich teilweise von Beobachtungen, die in anderen Systemen gemacht wurden. Andererseits könnte der Phosphorylierungsstatus der T-Zellen ausschlaggebend für die Kontaktdauer zwischen verschiedenen Zellen sein. Dies wird in einer Studie von Mempel et al (Mempel et al., 2004) beschrieben, die dort durchgeführten Analysen erfolgten in einem *in vivo* System. Der Vergleich der in dieser Arbeit gezeigten Daten mit anderen Daten ist daher schwierig, da die zur Verfügung stehenden Analysemethoden untereinander wenig vergleichbar sind.

In einer Arbeit von Gunzer et al (Gunzer et al., 2004) wurde die Kontaktdauer zwischen verschiedenen APC und T-Zellen im dreidimensionalen Kollagenmodell untersucht. Der Vergleich der Kontaktzeiten zwischen T-Zellen und DC, die mit spezifischem Antigen beladen waren, und DC, die kein spezifisches Antigen präsentierten, zeigte, dass die Beladung mit Antigen nur geringen Einfluss auf die Kontaktdauer hat. Ein kurzfristiger leichter Anstieg der Kontaktdauer konnte im Fall der antigen-beladenen DC in Kokultur mit T-Zellen beobachtet werden. Ob sich die beobachtete längere Kontaktzeit zwischen MV-infizierten DC und modifizierten T-Zellen ebenfalls nur in einem bestimmten Zeitrahmen abspielt, kann anhand der bisherigen Untersuchungen jedoch nicht bestimmt werden.

Weiterhin wurde in der Arbeit von Gunzer und Kollegen gezeigt, dass die Kontaktdauer keinen Einfluss auf die Stimulation der kokultivierten T-Zellen hat.

Die sequentiellen, kurzen Kontakte zwischen DC und T-Zellen lösten eine effektive Proliferation der T-Zellen aus. In der vorgelegten Arbeit wurde neben der Analyse der Kontaktzeiten ebenfalls die Proliferation der T-Zellen gemessen. Dabei zeigte sich, dass die LPS-behandelten DC in der Lage waren die zuvor durch Oxidative Mitogenese aktivierten T-Zellen zu stimulieren. Trotz längerer Kontaktzeiten zwischen MV-infizierten DC und modifizierten T-Zellen, war die Proliferation der T-Zellen in diesem Ansatz deutlich geringer (Abbildung 4—29). Dieses Ergebnis zeigt, dass die beobachteten Kontakte nicht stimulatorisch sind. Die Proliferationsinhibition der T-Zellen ist auf den auf der Oberfläche MV-infizierter Zellen exprimierten Glykoproteinkomplex des MV zurückzuführen (Dubois et al., 2001; Klagge et al., 2000).

In der Arbeit von Gunzer et al (Gunzer et al., 2004) wurde weiterhin die Beteiligung von LFA-1 an der Ausbildung von Kontakten zwischen verschiedenen APC und T-Zellen untersucht. LFA-1 liegt sowohl auf der Oberfläche von T-Zellen als auch auf der Oberfläche von DC zunächst in inaktivem Zustand vor (Geijtenbeek et al., 2000c). Auf Seiten der T-Zelle kann LFA-1 über den Kontakt mit DC durch die Stimulation des TCR aktiviert werden. Die Aktivierung führt zu einer Konformations-änderung des Proteins und damit zu einer verbesserten Avidität und einer stärkeren Bindung an die interagierenden Proteine (Chan et al., 2003; Constantin et al., 2000), dies kann zur Bildung eines adhäsiven Kontaktes führen. Die Untersuchungen von Gunzer und Kollegen zeigten, dass statische, langandauernde Kontakte, wie sie zwischen B- und T-Zellen beobachtet wurden, durch die Inhibition von LFA-1 aufgehoben werden können. Es konnte jedoch nicht eindeutig geklärt werden, ob LFA-1 an der Ausbildung der kurzen, sequentiellen Kontakte zwischen DC und T-Zellen beteiligt ist.

In den in dieser Arbeit gezeigten Daten konnte eine längere Kontaktzeit ausschließlich im Ansatz der modifizierten T-Zellen in Kokultur mit MV-infizierten DC beobachtet werden. Dieses Ergebnis zeigt, dass sowohl die Infektion als auch die Oxidative Mitogenese Einfluss auf die Kontaktdauer

haben. Wäre die Infektion bzw. die Expression der MV-Glykoproteine auf der Oberfläche der infizierten DC oder die Oxidative Mitogenese alleine für die Veränderung verantwortlich, müsste eine ähnlich verlängerte Kontaktzeit in einem weiteren Ansatz auftreten. Die Oxidative Mitogenese wird zur polyklonalen T-Zellaktivierung eingesetzt, welche Veränderungen sich dadurch für die Expression bzw. Aktivierung von Adhäsionsmolekülen, wie beispielsweise LFA-1, ergeben ist bisher nicht bekannt. Da LFA-1 sowohl auf T-Zellen als auch auf DC exprimiert wird, ist eine veränderte LFA-1 Expression oder Aktivierung auch durch eine Infektion mit MV möglich. Eine veränderte LFA-1 Expression nach einer Infektion mit MV wurde bisher für verschiedene Zellen bzw. Zelllinien beschrieben (Attibele et al., 1993; Nanan et al., 1999). Eine Untersuchung der LFA-1-Expression sowie des Aktivierungszustands auf MV-infizierten DC und den eingesetzten durch Oxidative Mitogenese behandelten T-Zellen, wäre eine weitere Möglichkeit, die verlängerten Kontaktzeiten zwischen MV-infizierten DC und den modifizierten T-Zellen weiter zu untersuchen.

Möglicherweise haben von DC produzierte Chemokine ebenfalls Einfluss auf die Dauer von DC/T-Zellkontakten (Wong and Fish, 2003). Bereits bekannt ist, dass die durch Chemokine induzierte Signalleitung die Affinität des Adhäsionsmoleküls LFA-1 verändert und dadurch die Bindung an ICAM-1 verstärkt wird (Tybulewicz, 2002).

Inwieweit die Interaktion von MV mit DC-SIGN die Kontaktzeit zwischen DC und T-Zellen beeinflusst, kann anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht beurteilt werden. Es gibt jedoch Hinweise, dass auch die Bindung von DC-SIGN Liganden (z.B. das HIV-Protein gp120) die Akkumulation von LFA-1 auf der DC an der DC-T-Zellkontaktstelle bewirkt (van Gisbergen et al., 2005). Ob eine Oxidative Mitogenese der T-Zellen Einfluss auf Expression und Aktivierung von Adhäsionsmolekülen wie LFA-1 oder ICAM-1 hat und dadurch die Kontaktdauer beeinflusst wird, ist bisher nicht bekannt.

Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass Proteine die an der Auflösung von Zell-Zell-Kontakten beteiligt sind durch die Infektion mit MV beeinflusst werden.

Kürzlich wurde ein Protein identifiziert, das an der Auflösung von DC/T-Zellkontakten beteiligt ist (Hofer et al., 2006). Die Transkription dieses Proteins (*cytohesin interacting protein*, CYTIP) wird während der Reifung von DC verschiedenen Ursprungs induziert. Die Studie von Hofer et al (Hofer et al., 2006) zeigt in verschiedenen experimentellen Ansätzen, dass CYTIP an der Termination von DC/T-Zellkontakten beteiligt ist. Die Beteiligung von CYTIP an der Adhäsion verschiedener Zellen wird dabei durch das an der Innenseite der Zellmembran vorliegende Protein Cytohesin-1 vermittelt (*intracellular adhesion enhancing, integrin-binding molecule*, Cytohesin-1). Die Interaktion von CYTIP mit Cytohesin-1 resultiert in der Translokation der Proteine von der Zellmembran ins Zytoplasma. Dies führt zu reduzierter Adhäsion der Zellen.

Die Beteiligung von Cytohesin-1 sowie die Induktion von CYTIP bei der Infektion von DC mit MV ist Gegenstand derzeitiger Untersuchungen.

## 6 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von MV auf die Expression und Nutzung verschiedener Rezeptoren auf Dendritischen Zellen (DC) untersucht. Dazu wurden DC *in vitro* aus Monozyten gewonnen und mit IL-4 und GM-CSF ausdifferenziert. In der Arbeit wurden das Wildtypvirus WTF und der Vakzinestamm ED eingesetzt.

Im ersten Teil der Arbeit wurde die Expression der Chemokinrezeptoren 5 (CCR5) und 7 (CCR7) auf MV-infizierten DC-Kulturen sowie das Migrationsverhalten der DC untersucht. Die Expression von CCR5 ist abhängig vom Reifungszustand der DC. Während unreife DC CCR5 exprimieren, verringert sich die Expression im Zuge der Ausreifung, während die Expression von CCR7 induziert wird. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die MV-Infektion einer DC-Kultur die Expression von CCR5 nicht beeinflusst, obwohl die Expression anderer charakteristischer Reifungsmarker erhöht wird. Weiterhin konnte die Expression von CCR7 durch eine Infektion der DC-Kulturen mit MV nicht induziert werden. Die Ergebnisse der durchgeführten durchflusszytometrischen Analysen zur Rezeptorexpression wurden in Chemotaxis-Assays eingehender untersucht. DC aus MV-infizierten Kulturen zeigten trotz anhaltender CCR5-Expression nur eine geringe Migration in Richtung des CCR5-Liganden CCL-3. Aufgrund der fehlenden CCR7-Expression konnte erwartungsgemäß keine Migration der eingesetzten DC gegenüber dem CCR7-Liganden CCL-19 beobachtet werden. Weiterhin konnten Unterschiede im induzierten Chemokinmuster in MV-infizierten DC-Kulturen im Vergleich zu LPS-ausgereiften oder mit einer Mockpräparation behandelten DC nachgewiesen werden. Kurz nach der Infektion konnte in MV-infizierten DC-Kulturen eine reduzierte Menge CXCL-8 und CCL-20 sowohl auf mRNA Ebene als auch auf Proteinebene detektiert werden. In weiteren Experimenten konnte eine verminderte Migration von T-Zellen auf

Zellkulturüberstände aus infizierten DC-Kulturen im Vergleich zu Überständen aus LPS-behandelten DC-Kulturen festgestellt werden.

Im zweiten Teil der vorgelegten Arbeit konnte MV als Ligand für das DC-spezifische Oberflächenmolekül DC-SIGN (*dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule (ICAM)-3 grabbing non-integrin*) identifiziert werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass beide verwendeten Virusstämme an DC-SIGN binden können, DC-SIGN jedoch keinen Eintrittsrezeptor für MV darstellt. Weitere Analysen zeigten, dass DC-SIGN die Infektion, besonders bei geringen Viruskonzentrationen, verstärkt. In erster Linie zeigt die MV-Infektion unreifer DC die Bedeutung von DC-SIGN als Bindungsrezeptor für MV. Die hohe Expression von DC-SIGN auf unreifen DC ermöglicht eine effiziente effektive Infektion dieser Zellen. Auf reifen DC ist der Einfluss von DC-SIGN auf die Effektivität der Infektion der DC deutlich verringert.

Im dritten Teil dieser Arbeit wurden die Kontaktzeiten zwischen DC und T-Zellen in dreidimensionalen Kollagenmatrices untersucht. Dabei wurde eine in etwa doppelt so lange Kontaktzeit zwischen MV-infizierten DC und durch Oxidative Mitogenese veränderten T-Zellen gegenüber LPS-behandelten DC bzw. MV-infizierten und nicht-modifizierten T-Zellen festgestellt. In den parallel durchgeführten Proliferationstests wurde eine reduzierte Proliferation der T-Zellen beobachtet, die mit MV-infizierten DC kokultiviert wurden. Im Gegensatz zu den kürzeren Kontakten zwischen LPS-behandelten DC und modifizierten T-Zellen waren die Kontakte zwischen MV-infizierten DC und modifizierten T-Zellen nicht-stimulatorisch.

## 7 Summary

This study investigates the influence of measles virus (MV) on the expression and usage of different receptors on dendritic cells (DC) was investigated. For this dendritic cells were generated *in vitro* by culturing monocytes in the presence of IL-4 and GM-CSF. The wildtype virus WTF and the vaccine virus ED were used for the experiments.

The first part of the study analyses the expression of Chemokine receptor 5 (CCR5) and CCR7 as well as functional consequences for the migration of MV-infected DC-cultures. The expression of CCR5 depends on the maturation state of DC; expression of CCR5 on immature DC is downregulated during maturation, while expression of CCR7 is upregulated. This study shows that the expression of CCR5 on DC is not influenced by MV-infection, although other characteristic maturation markers are upregulated. In addition, the expression of CCR7 could not be detected on DC after infection with MV. Chemotaxis assays were used to investigate the results of the flowcytometric analysis in more detail. Despite constant CCR5 expression DC of MV-infected cultures showed impaired migration towards the CCR5 ligand CCL-3. Migration towards the CCR7 ligand CCL-19 could not be detected due to the lack of CCR7 expression. Additionally, differences in the chemokine expression pattern between MV-infected and LPS- or mock-treated DC were observed. Short term infection of DC-cultures resulted in reduced mRNA and protein production of CXCL-8 and CCL-20 in DC infected with MV compared to LPS- or mock-treated cells. The migration of T-cells towards supernatants of MV-infected DC was, as well, impaired in comparison to migration towards supernatants of LPS-treated DC.

In the second part of this study identified MV as a ligand for the DC-specific surface molecule DC-SIGN (*dendritic cell-specific intercellular adhesion*

*molecule (ICAM)-3 grabbing non-integrin*). The work shows that both viruses (ED and WTF) bind to DC-SIGN, whereas uptake and replication of the virus was not supported by DC-SIGN alone. This study could show that the expression of DC-SIGN efficiently enhances the infection of different cells, especially at low virus titers. In particular, the infection of immature DC is supported by DC-SIGN. The high expression level of DC-SIGN on immature DC enhances the efficient infection of these cells. For the infection of immature DC DC-SIGN functions as an enhancement factor, whereas the infection of mature DC is less influenced by DC-SIGN.

The third part of this study shows preliminary data of DC/T-cell interactions. Contact duration between both cell types were analysed in three-dimensional collagen matrices by time-lapsed videomicroscopy. The results show that interactions between MV-infected DC and modified T-cells are twice as long as those of not-infected dendritic cells. In parallel the proliferation of contacted T-cells was analysed. The T-cells contacted with MV-infected DC showed impaired proliferation in comparison with T-cells contacted with LPS-treated DC. These results show that the observed short-lived contacts between LPS-treated DC and modified T-cells are more efficient as the longer contacts between MV-infected DC and modified T-cells.

## 8 Literaturverzeichnis

Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R., and Flavell, R. A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 413, 732-738.

Allavena, P., Piemonti, L., Longoni, D., Bernasconi, S., Stoppacciaro, A., Ruco, L., and Mantovani, A. (1998). IL-10 prevents the differentiation of monocytes to dendritic cells but promotes their maturation to macrophages. *Eur J Immunol* 28, 359-369.

Alvarez, C. P., Lasala, F., Carrillo, J., Muniz, O., Corbi, A. L., and Delgado, R. (2002). C-type lectins DC-SIGN and L-SIGN mediate cellular entry by Ebola virus in cis and in trans. *J Virol* 76, 6841-6844.

Appelmek, B. J., van Die, I., van Vliet, S. J., Vandenbroucke-Grauls, C. M., Geijtenbeek, T. B., and van Kooyk, Y. (2003). Cutting edge: carbohydrate profiling identifies new pathogens that interact with dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin on dendritic cells. *J Immunol* 170, 1635-1639.

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

Attibele, N., Wyde, P. R., Trial, J., Smole, S. C., Smith, C. W., and Rossen, R. D. (1993). Measles virus-induced changes in leukocyte function antigen 1 expression and leukocyte aggregation: possible role in measles virus pathogenesis. *J Virol* 67, 1075-1079.

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

Baggiolini, M. (2001). Chemokines in pathology and medicine. *J Intern Med* 250, 91-104.

Baggiolini, M., Dewald, B., and Moser, B. (1994). Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines. *Adv Immunol* 55, 97-179.

Banchereau, J., and Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-252.

- Banerjee, A. K. (1987). The transcription complex of vesicular stomatitis virus. *Cell* 48, 363-364.
- Bartz, R., Brinckmann, U., Dunster, L. M., Rima, B., Ter Meulen, V., and Schneider-Schaulies, J. (1996). Mapping amino acids of the measles virus hemagglutinin responsible for receptor (CD46) downregulation. *Virology* 224, 334-337.
- Bartz, R., Firsching, R., Rima, B., ter Meulen, V., and Schneider-Schaulies, J. (1998). Differential receptor usage by measles virus strains. *J Gen Virol* 79 ( Pt 5), 1015-1025.
- Bellini, W. J., Englund, G., Rozenblatt, S., Arnheiter, H., and Richardson, C. D. (1985). Measles virus P gene codes for two proteins. *J Virol* 53, 908-919.
- Bellini, W. J., Rota, J. S., and Rota, P. A. (1994). Virology of measles virus. *J Infect Dis* 170 Suppl 1, S15-23.
- Beutler, B., and Rietschel, E. T. (2003). Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nat Rev Immunol* 3, 169-176.
- Biosciences, B. (2004). Einführung in die Durchflusszytometrie.
- Blanchard, N., Di Bartolo, V., and Hivroz, C. (2002). In the immune synapse, ZAP-70 controls T cell polarization and recruitment of signaling proteins but not formation of the synaptic pattern. *Immunity* 17, 389-399.
- Bleharski, J. R., Niazi, K. R., Sieling, P. A., Cheng, G., and Modlin, R. L. (2001). Signaling lymphocytic activation molecule is expressed on CD40 ligand-activated dendritic cells and directly augments production of inflammatory cytokines. *J Immunol* 167, 3174-3181.
- Blumberg, B. M., and Kolakofsky, D. (1981). Intracellular vesicular stomatitis virus leader RNAs are found in nucleocapsid structures. *J Virol* 40, 568-576.
- Bokoch, G. M. (1995). Chemoattractant signaling and leukocyte activation. *Blood* 86, 1649-1660.
- Bolt, G., Pedersen, I. R., and Blixenkrone-Møller, M. (1999). Processing of N-linked oligosaccharides on the measles virus glycoproteins: importance for antigenicity and for production of infectious virus particles. *Virus Res* 61, 43-51.
- Bromley, S. K., Burack, W. R., Johnson, K. G., Somersalo, K., Sims, T. N., Sumen, C., Davis, M. M., Shaw, A. S., Allen, P. M., and Dustin, M. L. (2001). The immunological synapse. *Annu Rev Immunol* 19, 375-396.

- Bromley, S. K., and Dustin, M. L. (2002). Stimulation of naive T-cell adhesion and immunological synapse formation by chemokine-dependent and -independent mechanisms. *Immunology* 106, 289-298.
- Bromley, S. K., Peterson, D. A., Gunn, M. D., and Dustin, M. L. (2000). Cutting edge: hierarchy of chemokine receptor and TCR signals regulating T cell migration and proliferation. *J Immunol* 165, 15-19.
- Buelens, C., Verhasselt, V., De Groote, D., Thielemans, K., Goldman, M., and Willems, F. (1997). Interleukin-10 prevents the generation of dendritic cells from human peripheral blood mononuclear cells cultured with interleukin-4 and granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor. *Eur J Immunol* 27, 756-762.
- Burleigh, L., Lozach, P. Y., Schiffer, C., Staropoli, I., Pezo, V., Porrot, F., Canque, B., Virelizier, J. L., Arenzana-Seisdedos, F., and Amara, A. (2006). Infection of dendritic cells (DCs), not DC-SIGN-mediated internalization of human immunodeficiency virus, is required for long-term transfer of virus to T cells. *J Virol* 80, 2949-2957.
- Cambi, A., Gijzen, K., de Vries, J. M., Torensma, R., Joosten, B., Adema, G. J., Netea, M. G., Kullberg, B. J., Romani, L., and Figdor, C. G. (2003). The C-type lectin DC-SIGN (CD209) is an antigen-uptake receptor for *Candida albicans* on dendritic cells. *Eur J Immunol* 33, 532-538.
- Casasnovas, J. M., Larvie, M., and Stehle, T. (1999). Crystal structure of two CD46 domains reveals an extended measles virus-binding surface. *Embo J* 18, 2911-2922.
- Cathomen, T., Mrkic, B., Spehner, D., Drillien, R., Naef, R., Pavlovic, J., Aguzzi, A., Billeter, M. A., and Cattaneo, R. (1998). A matrix-less measles virus is infectious and elicits extensive cell fusion: consequences for propagation in the brain. *Embo J* 17, 3899-3908.
- Cattaneo, R., Kaelin, K., Baczko, K., and Billeter, M. A. (1989). Measles virus editing provides an additional cysteine-rich protein. *Cell* 56, 759-764.
- Cattaneo, R., Rebmann, G., Schmid, A., Baczko, K., ter Meulen, V., and Billeter, M. A. (1987). Altered transcription of a defective measles virus genome derived from a diseased human brain. *Embo J* 6, 681-688.
- Caux, C., Vanbervliet, B., Massacrier, C., Ait-Yahia, S., Vaure, C., Chemin, K., Dieu, N., Mc, and Vicari, A. (2002). Regulation of dendritic cell recruitment by chemokines. *Transplantation* 73, S7-11.

- Chan, J. R., Hyduk, S. J., and Cybulsky, M. I. (2003). Detecting rapid and transient upregulation of leukocyte integrin affinity induced by chemokines and chemoattractants. *J Immunol Methods* 273, 43-52.
- Chan, V. W., Kothakota, S., Rohan, M. C., Panganiban-Lustan, L., Gardner, J. P., Wachowicz, M. S., Winter, J. A., and Williams, L. T. (1999). Secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) is chemotactic for mature dendritic cells. *Blood* 93, 3610-3616.
- Clark-Lewis, I., Dewald, B., Geiser, T., Moser, B., and Baggiolini, M. (1993). Platelet factor 4 binds to interleukin 8 receptors and activates neutrophils when its N terminus is modified with Glu-Leu-Arg. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 3574-3577.
- Clark-Lewis, I., Kim, K. S., Rajarathnam, K., Gong, J. H., Dewald, B., Moser, B., Baggiolini, M., and Sykes, B. D. (1995). Structure-activity relationships of chemokines. *J Leukoc Biol* 57, 703-711.
- Clements, C. J., and Cutts, F. T. (1995). The epidemiology of measles: thirty years of vaccination. *Curr Top Microbiol Immunol* 191, 13-33.
- Cocks, B. G., Chang, C. C., Carballido, J. M., Yssel, H., de Vries, J. E., and Aversa, G. (1995). A novel receptor involved in T-cell activation. *Nature* 376, 260-263.
- Cole, K. E., Strick, C. A., Paradis, T. J., Ogborne, K. T., Loetscher, M., Gladue, R. P., Lin, W., Boyd, J. G., Moser, B., Wood, D. E., *et al.* (1998). Interferon-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC): a novel non-ELR CXC chemokine with potent activity on activated T cells through selective high affinity binding to CXCR3. *J Exp Med* 187, 2009-2021.
- Colmenares, M., Puig-Kroger, A., Pello, O. M., Corbi, A. L., and Rivas, L. (2002). Dendritic cell (DC)-specific intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3)-grabbing nonintegrin (DC-SIGN, CD209), a C-type surface lectin in human DCs, is a receptor for *Leishmania amastigotes*. *J Biol Chem* 277, 36766-36769.
- Colotta, F., Re, F., Muzio, M., Bertini, R., Polentarutti, N., Sironi, M., Giri, J. G., Dower, S. K., Sims, J. E., and Mantovani, A. (1993). Interleukin-1 type II receptor: a decoy target for IL-1 that is regulated by IL-4. *Science* 261, 472-475.
- Constantin, G., Majeed, M., Giagulli, C., Piccio, L., Kim, J. Y., Butcher, E. C., and Laudanna, C. (2000). Chemokines trigger immediate beta2 integrin affinity and mobility changes: differential regulation and roles in lymphocyte arrest under flow. *Immunity* 13, 759-769.

- Cook, D. N., Beck, M. A., Coffman, T. M., Kirby, S. L., Sheridan, J. F., Pragnell, I. B., and Smithies, O. (1995). Requirement of MIP-1 alpha for an inflammatory response to viral infection. *Science* *269*, 1583-1585.
- Cormier, E. G., Durso, R. J., Tsamis, F., Boussemart, L., Manix, C., Olson, W. C., Gardner, J. P., and Dragic, T. (2004). L-SIGN (CD209L) and DC-SIGN (CD209) mediate transinfection of liver cells by hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 14067-14072.
- Crowley, J. C., Dowling, P. C., Menonna, J., Silverman, J. I., Schuback, D., Cook, S. D., and Blumberg, B. M. (1988). Sequence variability and function of measles virus 3' and 5' ends and intergenic regions. *Virology* *164*, 498-506.
- D'Amico, G., Frascaroli, G., Bianchi, G., Transidico, P., Doni, A., Vecchi, A., Sozzani, S., Allavena, P., and Mantovani, A. (2000). Uncoupling of inflammatory chemokine receptors by IL-10: generation of functional decoys. *Nat Immunol* *1*, 387-391.
- de Swart, R. L., Vos, H. W., UytdeHaag, F. G., Osterhaus, A. D., and van Binnendijk, R. S. (1998). Measles virus fusion protein- and hemagglutinin-transfected cell lines are a sensitive tool for the detection of specific antibodies by a FACS-measured immunofluorescence assay. *J Virol Methods* *71*, 35-44.
- de Witte, L., Abt, M., Schneider-Schaulies, S., van Kooyk, Y., and Geijtenbeek, T. B. (2006). Measles virus targets DC-SIGN to enhance dendritic cell infection. *J Virol* *80*, 3477-3486.
- Delgado, E., Finkel, V., Baggiolini, M., Mackay, C. R., Steinman, R. M., and Granelli-Piperno, A. (1998). Mature dendritic cells respond to SDF-1, but not to several beta-chemokines. *Immunobiology* *198*, 490-500.
- Devaux, P., and Cattaneo, R. (2004). Measles virus phosphoprotein gene products: conformational flexibility of the P/V protein amino-terminal domain and C protein infectivity factor function. *J Virol* *78*, 11632-11640.
- Dieu-Nosjean, M. C., Vicari, A., Lebecque, S., and Caux, C. (1999). Regulation of dendritic cell trafficking: a process that involves the participation of selective chemokines. *J Leukoc Biol* *66*, 252-262.
- Dieu, M. C., Vanbervliet, B., Vicari, A., Bridon, J. M., Oldham, E., Ait-Yahia, S., Briere, F., Zlotnik, A., Lebecque, S., and Caux, C. (1998). Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J Exp Med* *188*, 373-386.

- Dorig, R. E., Marcil, A., Chopra, A., and Richardson, C. D. (1993). The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain). *Cell* 75, 295-305.
- Dubois, B., Lamy, P. J., Chemin, K., Lachaux, A., and Kaiserlian, D. (2001). Measles virus exploits dendritic cells to suppress CD4+ T-cell proliferation via expression of surface viral glycoproteins independently of T-cell trans-infection. *Cell Immunol* 214, 173-183.
- Duprex, W. P., Duffy, I., McQuaid, S., Hamill, L., Cosby, S. L., Billeter, M. A., Schneider-Schaulies, J., ter Meulen, V., and Rima, B. K. (1999). The H gene of rodent brain-adapted measles virus confers neurovirulence to the Edmonston vaccine strain. *J Virol* 73, 6916-6922.
- Dustin, M. L., Allen, P. M., and Shaw, A. S. (2001). Environmental control of immunological synapse formation and duration. *Trends Immunol* 22, 192-194.
- Dustin, M. L., and Chan, A. C. (2000). Signaling takes shape in the immune system. *Cell* 103, 283-294.
- Dustin, M. L., and Shaw, A. S. (1999). Costimulation: building an immunological synapse. *Science* 283, 649-650.
- Dzionic, A., Sohma, Y., Nagafune, J., Cella, M., Colonna, M., Facchetti, F., Gunther, G., Johnston, I., Lanzavecchia, A., Nagasaka, T., *et al.* (2001). BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction. *J Exp Med* 194, 1823-1834.
- Ehrnst, A. (1978). Separate pathways of C activation by measles virus cytotoxic antibodies: subclass analysis and capacity of F(ab) molecules to activate C via the alternative pathway. *J Immunol* 121, 1206-1212.
- Engelking, O., Fedorov, L. M., Lilischkis, R., ter Meulen, V., and Schneider-Schaulies, S. (1999). Measles virus-induced immunosuppression in vitro is associated with deregulation of G1 cell cycle control proteins. *J Gen Virol* 80 (Pt 7), 1599-1608.
- Engering, A., Geijtenbeek, T. B., van Vliet, S. J., Wijers, M., van Liempt, E., Demarex, N., Lanzavecchia, A., Franssen, J., Figdor, C. G., Piguët, V., and van Kooyk, Y. (2002a). The dendritic cell-specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T cells. *J Immunol* 168, 2118-2126.

- Engering, A., Van Vliet, S. J., Geijtenbeek, T. B., and Van Kooyk, Y. (2002b). Subset of DC-SIGN(+) dendritic cells in human blood transmits HIV-1 to T lymphocytes. *Blood* 100, 1780-1786.
- Entschladen, F., Niggemann, B., Zanker, K. S., and Friedl, P. (1997). Differential requirement of protein tyrosine kinases and protein kinase C in the regulation of T cell locomotion in three-dimensional collagen matrices. *J Immunol* 159, 3203-3210.
- Erlenhoef, C., Wurzer, W. J., Loffler, S., Schneider-Schaulies, S., ter Meulen, V., and Schneider-Schaulies, J. (2001). CD150 (SLAM) is a receptor for measles virus but is not involved in viral contact-mediated proliferation inhibition. *J Virol* 75, 4499-4505.
- Escoffier, C., Manie, S., Vincent, S., Muller, C. P., Billeter, M., and Gerlier, D. (1999). Nonstructural C protein is required for efficient measles virus replication in human peripheral blood cells. *J Virol* 73, 1695-1698.
- Esolen, L. M., Ward, B. J., Moench, T. R., and Griffin, D. E. (1993). Infection of monocytes during measles. *J Infect Dis* 168, 47-52.
- Farber, J. M. (1997). Mig and IP-10: CXC chemokines that target lymphocytes. *J Leukoc Biol* 61, 246-257.
- Fawcett, J., Holness, C. L., Needham, L. A., Turley, H., Gatter, K. C., Mason, D. Y., and Simmons, D. L. (1992). Molecular cloning of ICAM-3, a third ligand for LFA-1, constitutively expressed on resting leukocytes. *Nature* 360, 481-484.
- Figdor, C. G., van Kooyk, Y., and Adema, G. J. (2002). C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. *Nat Rev Immunol* 2, 77-84.
- Foti, M., Granucci, F., Aggujaro, D., Liboi, E., Luini, W., Minardi, S., Mantovani, A., Sozzani, S., and Ricciardi-Castagnoli, P. (1999). Upon dendritic cell (DC) activation chemokines and chemokine receptor expression are rapidly regulated for recruitment and maintenance of DC at the inflammatory site. *Int Immunol* 11, 979-986.
- Fournier, P., Brons, N. H., Berbers, G. A., Wiesmuller, K. H., Fleckenstein, B. T., Schneider, F., Jung, G., and Muller, C. P. (1997). Antibodies to a new linear site at the topographical or functional interface between the haemagglutinin and fusion proteins protect against measles encephalitis. *J Gen Virol* 78 ( Pt 6), 1295-1302.

- Friedl, P., and Brocker, E. B. (2004). Reconstructing leukocyte migration in 3D extracellular matrix by time-lapse videomicroscopy and computer-assisted tracking. *Methods Mol Biol* 239, 77-90.
- Friedl, P., and Gunzer, M. (2001). Interaction of T cells with APCs: the serial encounter model. *Trends Immunol* 22, 187-191.
- Friedl, P., Noble, P. B., and Zanker, K. S. (1993). Lymphocyte locomotion in three-dimensional collagen gels. Comparison of three quantitative methods for analysing cell trajectories. *J Immunol Methods* 165, 157-165.
- Fugier-Vivier, I., Servet-Delprat, C., Rivallier, P., Rissoan, M. C., Liu, Y. J., and Roubrouin-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.
- Gagliardi, M. C., Teloni, R., Giannoni, F., Pardini, M., Sargentini, V., Brunori, L., Fattorini, L., and Nisini, R. (2005). Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guerin infects DC-SIGN- dendritic cell and causes the inhibition of IL-12 and the enhancement of IL-10 production. *J Leukoc Biol* 78, 106-113.
- Garboczi, D. N., Ghosh, P., Utz, U., Fan, Q. R., Biddison, W. E., and Wiley, D. C. (1996). Structure of the complex between human T-cell receptor, viral peptide and HLA-A2. *Nature* 384, 134-141.
- Gardner, J. P., Durso, R. J., Arrigale, R. R., Donovan, G. P., Maddon, P. J., Dragic, T., and Olson, W. C. (2003). L-SIGN (CD 209L) is a liver-specific capture receptor for hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 4498-4503.
- Geijtenbeek, T. B., Krooshoop, D. J., Bleijs, D. A., van Vliet, S. J., van Duijnhoven, G. C., Grabovsky, V., Alon, R., Figdor, C. G., and van Kooyk, Y. (2000a). DC-SIGN-ICAM-2 interaction mediates dendritic cell trafficking. *Nat Immunol* 1, 353-357.
- Geijtenbeek, T. B., Kwon, D. S., Torensma, R., van Vliet, S. J., van Duijnhoven, G. C., Middel, J., Cornelissen, I. L., Nottet, H. S., KewalRamani, V. N., Littman, D. R., *et al.* (2000b). DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* 100, 587-597.
- Geijtenbeek, T. B., Torensma, R., van Vliet, S. J., van Duijnhoven, G. C., Adema, G. J., van Kooyk, Y., and Figdor, C. G. (2000c). Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* 100, 575-585.

Geijtenbeek, T. B., van Duijnhoven, G. C., van Vliet, S. J., Krieger, E., Vriend, G., Figdor, C. G., and van Kooyk, Y. (2002). Identification of different binding sites in the dendritic cell-specific receptor DC-SIGN for intercellular adhesion molecule 3 and HIV-1. *J Biol Chem* 277, 11314-11320.

Geijtenbeek, T. B., van Kooyk, Y., van Vliet, S. J., Renes, M. H., Raymakers, R. A., and Figdor, C. G. (1999). High frequency of adhesion defects in B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 94, 754-764.

Geijtenbeek, T. B., Van Vliet, S. J., Koppel, E. A., Sanchez-Hernandez, M., Vandenbroucke-Grauls, C. M., Appelmelk, B., and Van Kooyk, Y. (2003). Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. *J Exp Med* 197, 7-17.

Grakoui, A., Bromley, S. K., Sumen, C., Davis, M. M., Shaw, A. S., Allen, P. M., and Dustin, M. L. (1999). The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* 285, 221-227.

Graves, M., Griffin, D. E., Johnson, R. T., Hirsch, R. L., de Soriano, I. L., Roedenbeck, S., and Vaisberg, A. (1984). Development of antibody to measles virus polypeptides during complicated and uncomplicated measles virus infections. *J Virol* 49, 409-412.

Griffin, D. E., and Ward, B. J. (1993). Differential CD4 T cell activation in measles. *J Infect Dis* 168, 275-281.

Griffin, D. E., Ward, B. J., Jauregui, E., Johnson, R. T., and Vaisberg, A. (1989). Immune activation in measles. *N Engl J Med* 320, 1667-1672.

Griffin, D. E., Ward, B. J., Jauregui, E., Johnson, R. T., and Vaisberg, A. (1990). 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, D. E., Ward, B. J., Juaregui, E., Johnson, R. T., and 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., and Kaiserlian, D. (1997). Measles virus infects human dendritic cells and blocks their allostimulatory properties for CD4+ T cells. *J Exp Med* 186, 801-812.

Gunn, M. D., Tangemann, K., Tam, C., Cyster, J. G., Rosen, S. D., and Williams, L. T. (1998). A chemokine expressed in lymphoid high endothelial

venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 258-263.

Gunzer, M., Schafer, A., Borgmann, S., Grabbe, S., Zanker, K. S., Brocker, E. B., Kampgen, E., and Friedl, P. (2000). Antigen presentation in extracellular matrix: interactions of T cells with dendritic cells are dynamic, short lived, and sequential. *Immunity* 13, 323-332.

Gunzer, M., Weishaupt, C., Hillmer, A., Basoglu, Y., Friedl, P., Dittmar, K. E., Kolanus, W., Varga, G., and Grabbe, S. (2004). A spectrum of biophysical interaction modes between T cells and different antigen-presenting cells during priming in 3-D collagen and in vivo. *Blood* 104, 2801-2809.

Halary, F., Amara, A., Lortat-Jacob, H., Messerle, M., Delaunay, T., Houles, C., Fieschi, F., Arenzana-Seisdedos, F., Moreau, J. F., and Dechanet-Merville, J. (2002). Human cytomegalovirus binding to DC-SIGN is required for dendritic cell infection and target cell trans-infection. *Immunity* 17, 653-664.

Harder, T. C., and Osterhaus, A. D. (1997). Canine distemper virus--a morbillivirus in search of new hosts? *Trends Microbiol* 5, 120-124.

Hilkens, C. M., Kalinski, P., de Boer, M., and Kapsenberg, M. L. (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, R. L., Griffin, D. E., Johnson, R. T., Cooper, S. J., Lindo de Soriano, I., Roedenbeck, S., and Vaisberg, A. (1984). Cellular immune responses during complicated and uncomplicated measles virus infections of man. *Clin Immunol Immunopathol* 31, 1-12.

Hofer, S., Pfeil, K., Niederegger, H., Ebner, S., Nguyen, V. A., Kremmer, E., Auffinger, M., Neyer, S., Furhapter, C., and Heufler, C. (2006). Dendritic cells regulate T-cell deattachment through the integrin-interacting protein CYTIP. *Blood* 107, 1003-1009.

Hong, P. W., Flummerfelt, K. B., de Parseval, A., Gurney, K., Elder, J. H., and Lee, B. (2002). Human immunodeficiency virus envelope (gp120) binding to DC-SIGN and primary dendritic cells is carbohydrate dependent but does not involve 2G12 or cyanovirin binding sites: implications for structural analyses of gp120-DC-SIGN binding. *J Virol* 76, 12855-12865.

Horikami, S. M., and Moyer, S. A. (1995). Structure, transcription, and replication of measles virus. *Curr Top Microbiol Immunol* 191, 35-50.

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

Hsu, E. C., Sarangi, F., Iorio, C., Sidhu, M. S., Udem, S. A., Dillehay, D. L., Xu, W., Rota, P. A., Bellini, W. J., and Richardson, C. D. (1998). A single amino acid change in the hemagglutinin protein of measles virus determines its ability to bind CD46 and reveals another receptor on marmoset B cells. *J Virol* 72, 2905-2916.

Hu, A., and Norrby, E. (1994). Role of individual cysteine residues in the processing and antigenicity of the measles virus haemagglutinin protein. *J Gen Virol* 75 ( Pt 9), 2173-2181.

Iezzi, G., Karjalainen, K., and Lanzavecchia, A. (1998). The duration of antigenic stimulation determines the fate of naive and effector T cells. *Immunity* 8, 89-95.

Inaba, K., Witmer, M. D., and Steinman, R. M. (1984). Clustering of dendritic cells, helper T lymphocytes, and histocompatible B cells during primary antibody responses in vitro. *J Exp Med* 160, 858-876.

Ito, T., Amakawa, R., Inaba, M., Ikehara, S., Inaba, K., and Fukuhara, S. (2001). Differential regulation of human blood dendritic cell subsets by IFNs. *J Immunol* 166, 2961-2969.

Janeway, C. A., Jr. (1992). The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol Today* 13, 11-16.

Janeway, C. A., Jr., and Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20, 197-216.

Jiang, W., Swiggard, W. J., Heufler, C., Peng, M., Mirza, A., Steinman, R. M., and Nussenzweig, M. C. (1995). The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature* 375, 151-155.

Joshi, S. B., Dutch, R. E., and Lamb, R. A. (1998). A core trimer of the paramyxovirus fusion protein: parallels to influenza virus hemagglutinin and HIV-1 gp41. *Virology* 248, 20-34.

Kärber, G. (1931). *Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie*.

- Karp, C. L., Wysocka, M., Wahl, L. M., Ahearn, J. M., Cuomo, P. J., Sherry, B., Trinchieri, G., and Griffin, D. E. (1996). Mechanism of suppression of cell-mediated immunity by measles virus. *Science* 273, 228-231.
- Kato, M., Neil, T. K., Fearnley, D. B., McLellan, A. D., Vuckovic, S., and Hart, D. N. (2000). Expression of multilectin receptors and comparative FITC-dextran uptake by human dendritic cells. *Int Immunol* 12, 1511-1519.
- Kellermann, S. A., Hudak, S., Oldham, E. R., Liu, Y. J., and McEvoy, L. M. (1999). The CC chemokine receptor-7 ligands 6CKine and macrophage inflammatory protein-3 beta are potent chemoattractants for in vitro- and in vivo-derived dendritic cells. *J Immunol* 162, 3859-3864.
- King, P. D., and Katz, D. R. (1989). Human tonsillar dendritic cell-induced T cell responses: analysis of molecular mechanisms using monoclonal antibodies. *Eur J Immunol* 19, 581-587.
- Klagge, I. M., Abt, M., Fries, B., and Schneider-Schaulies, S. (2004). Impact of measles virus dendritic-cell infection on Th-cell polarization in vitro. *J Gen Virol* 85, 3239-3247.
- Klagge, I. M., ter Meulen, V., and 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.
- Kobune, F., Sakata, H., and Sugiura, A. (1990). Marmoset lymphoblastoid cells as a sensitive host for isolation of measles virus. *J Virol* 64, 700-705.
- Koplik (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.
- Kruse, M., Meinel, E., Henning, G., Kuhnt, C., Berchtold, S., Berger, T., Schuler, G., and Steinkasserer, A. (2001). Signaling lymphocytic activation molecule is expressed on mature CD83+ dendritic cells and is up-regulated by IL-1 beta. *J Immunol* 167, 1989-1995.
- Kwon, D. S., Gregorio, G., Bitton, N., Hendrickson, W. A., and Littman, D. R. (2002). DC-SIGN-mediated internalization of HIV is required for trans-enhancement of T cell infection. *Immunity* 16, 135-144.
- Lamb, R. A. (1993). Paramyxovirus fusion: a hypothesis for changes. *Virology* 197, 1-11.

Lamb, R. A. u. K. (1996). Paramyxoviridae, the viruses and their replication. in: Fields Virology, 1177-1204.

Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2005). Understanding the generation and function of memory T cell subsets. *Curr Opin Immunol* 17, 326-332.

Lecouturier, V., Fayolle, J., Caballero, M., Carabana, J., Celma, M. L., Fernandez-Munoz, R., Wild, T. F., and Buckland, R. (1996). Identification of two amino acids in the hemagglutinin glycoprotein of measles virus (MV) that govern hemadsorption, HeLa cell fusion, and CD46 downregulation: phenotypic markers that differentiate vaccine and wild-type MV strains. *J Virol* 70, 4200-4204.

Lin, C. L., Suri, R. M., Rahdon, R. A., Austyn, J. M., and Roake, J. A. (1998). Dendritic cell chemotaxis and transendothelial migration are induced by distinct chemokines and are regulated on maturation. *Eur J Immunol* 28, 4114-4122.

Liszewski, M. K., Post, T. W., and Atkinson, J. P. (1991). Membrane cofactor protein (MCP or CD46): newest member of the regulators of complement activation gene cluster. *Annu Rev Immunol* 9, 431-455.

Loetscher, M., Gerber, B., Loetscher, P., Jones, S. A., Piali, L., Clark-Lewis, I., Baggiolini, M., and Moser, B. (1996). Chemokine receptor specific for IP10 and mig: structure, function, and expression in activated T-lymphocytes. *J Exp Med* 184, 963-969.

Loetscher, P., and Clark-Lewis, I. (2001). Agonistic and antagonistic activities of chemokines. *J Leukoc Biol* 69, 881-884.

Loetscher, P., Moser, B., and Baggiolini, M. (2000). Chemokines and their receptors in lymphocyte traffic and HIV infection. *Adv Immunol* 74, 127-180.

Loveland, B. E., Johnstone, R. W., Russell, S. M., Thorley, B. R., and McKenzie, I. F. (1993). Different membrane cofactor protein (CD46) isoforms protect transfected cells against antibody and complement mediated lysis. *Transpl Immunol* 1, 101-108.

Lozach, P. Y., Lortat-Jacob, H., de Lacroix de Lavalette, A., Staropoli, I., Fong, S., Amara, A., Houles, C., Fieschi, F., Schwartz, O., Virelizier, J. L., *et al.* (2003). DC-SIGN and L-SIGN are high affinity binding receptors for hepatitis C virus glycoprotein E2. *J Biol Chem* 278, 20358-20366.

Lue, J., Hsu, M., Yang, D., Marx, P., Chen, Z., and Cheng-Mayer, C. (2002). Addition of a single gp120 glycan confers increased binding to dendritic cell-

specific ICAM-3-grabbing nonintegrin and neutralization escape to human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 76, 10299-10306.

Luster, A. D., and Ravetch, J. V. (1987). Biochemical characterization of a gamma interferon-inducible cytokine (IP-10). *J Exp Med* 166, 1084-1097.

Manchester, M., Liszewski, M. K., Atkinson, J. P., and Oldstone, M. B. (1994). Multiple isoforms of CD46 (membrane cofactor protein) serve as receptors for measles virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 2161-2165.

Manchester, M., Valsamakis, A., Kaufman, R., Liszewski, M. K., Alvarez, J., Atkinson, J. P., Lublin, D. M., and Oldstone, M. B. (1995). Measles virus and C3 binding sites are distinct on membrane cofactor protein (CD46). *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 2303-2307.

Mathiesen, T., Hammarstrom, L., Fridell, E., Linde, A., Wirsén, G., Smith, C. I., Norrby, E., and 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, M. B., Altman, A., and Oldstone, M. B. (1988). Suppression of T lymphocyte function by measles virus is due to cell cycle arrest in G1. *J Immunol* 140, 1269-1273.

Medvedev, A. E., Henneke, P., Schromm, A., Lien, E., Ingalls, R., Fenton, M. J., Golenbock, D. T., and Vogel, S. N. (2001). Induction of tolerance to lipopolysaccharide and mycobacterial components in Chinese hamster ovary/CD14 cells is not affected by overexpression of Toll-like receptors 2 or 4. *J Immunol* 167, 2257-2267.

Mempel, T. R., Henrickson, S. E., and Von Andrian, U. H. (2004). T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. *Nature* 427, 154-159.

Menezes, J., Leibold, W., Klein, G., and 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, 276-284.

Miller, M. J., Safrina, O., Parker, I., and Cahalan, M. D. (2004). Imaging the single cell dynamics of CD4+ T cell activation by dendritic cells in lymph nodes. *J Exp Med* 200, 847-856.

Mitchell, D. A., Fadden, A. J., and Drickamer, K. (2001). A novel mechanism of carbohydrate recognition by the C-type lectins DC-SIGN and DC-SIGNR.

Subunit organization and binding to multivalent ligands. *J Biol Chem* 276, 28939-28945.

Moll, M., Klenk, H. D., Herrler, G., and Maisner, A. (2001). A single amino acid change in the cytoplasmic domains of measles virus glycoproteins H and F alters targeting, endocytosis, and cell fusion in polarized Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem* 276, 17887-17894.

Moll, M., Klenk, H. D., and Maisner, A. (2002). Importance of the cytoplasmic tails of the measles virus glycoproteins for fusogenic activity and the generation of recombinant measles viruses. *J Virol* 76, 7174-7186.

Monks, C. R., Freiberg, B. A., Kupfer, H., Sciaky, N., and Kupfer, A. (1998). Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* 395, 82-86.

Moser, B., Wolf, M., Walz, A., and Loetscher, P. (2004). Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends Immunol* 25, 75-84.

Moss, W. J., Ryon, J. J., Monze, M., and Griffin, D. E. (2002). Differential regulation of interleukin (IL)-4, IL-5, and IL-10 during measles in Zambian children. *J Infect Dis* 186, 879-887.

Moutaftsi, M., Brennan, P., Spector, S. A., and Tabi, Z. (2004). Impaired lymphoid chemokine-mediated migration due to a block on the chemokine receptor switch in human cytomegalovirus-infected dendritic cells. *J Virol* 78, 3046-3054.

Murphy, P. M., Baggiolini, M., Charo, I. F., Hebert, C. A., Horuk, R., Matsushima, K., Miller, L. H., Oppenheim, J. J., and Power, C. A. (2000). International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev* 52, 145-176.

Naim, H. Y., Ehler, E., and Billeter, M. A. (2000). Measles virus matrix protein specifies apical virus release and glycoprotein sorting in epithelial cells. *Embo J* 19, 3576-3585.

Nanan, R., Chittka, B., Hadam, M., and Kreth, H. W. (1999). Measles virus infection causes transient depletion of activated T cells from peripheral circulation. *J Clin Virol* 12, 201-210.

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

- Naniche, D., Yeh, A., Eto, D., Manchester, M., Friedman, R. M., and Oldstone, M. B. (2000). Evasion of host defenses by measles virus: wild-type measles virus infection interferes with induction of Alpha/Beta interferon production. *J Virol* *74*, 7478-7484.
- Navarro-Sanchez, E., Altmeyer, R., Amara, A., Schwartz, O., Fieschi, F., Virelizier, J. L., Arenzana-Seisdedos, F., and Despres, P. (2003). Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses. *EMBO Rep* *4*, 723-728.
- Negulescu, P. A., Krasieva, T. B., Khan, A., Kerschbaum, H. H., and Cahalan, M. D. (1996). Polarity of T cell shape, motility, and sensitivity to antigen. *Immunity* *4*, 421-430.
- Ngo, V. N., Tang, H. L., and Cyster, J. G. (1998). Epstein-Barr virus-induced molecule 1 ligand chemokine is expressed by dendritic cells in lymphoid tissues and strongly attracts naive T cells and activated B cells. *J Exp Med* *188*, 181-191.
- Niewiesk, S., Eisenhuth, I., Fooks, A., Clegg, J. C., Schnorr, J. J., Schneider-Schaulies, S., and ter Meulen, V. (1997). Measles virus-induced immune suppression in the cotton rat (*Sigmodon hispidus*) model depends on viral glycoproteins. *J Virol* *71*, 7214-7219.
- Norrby, E., Orvell, C., Vandvik, B., and Cherry, J. D. (1981). Antibodies against measles virus polypeptides in different disease conditions. *Infect Immun* *34*, 718-724.
- Nussbaum, O., Broder, C. C., Moss, B., Stern, L. B., Rozenblatt, S., and Berger, E. A. (1995). Functional and structural interactions between measles virus hemagglutinin and CD46. *J Virol* *69*, 3341-3349.
- O'Shea, J. J., and Visconti, R. (2000). Type 1 IFNs and regulation of TH1 responses: enigmas both resolved and emerge. *Nat Immunol* *1*, 17-19.
- Ohgimoto, S., Ohgimoto, K., Niewiesk, S., Klagge, I. M., Pfeuffer, J., Johnston, I. C., Schneider-Schaulies, J., Weidmann, A., ter Meulen, V., and Schneider-Schaulies, S. (2001). The haemagglutinin protein is an important determinant of measles virus tropism for dendritic cells in vitro. *J Gen Virol* *82*, 1835-1844.
- Okada, H., Kobune, F., Sato, T. A., Kohama, T., Takeuchi, Y., Abe, T., Takayama, N., Tsuchiya, T., and Tashiro, M. (2000). Extensive lymphopenia due to apoptosis of uninfected lymphocytes in acute measles patients. *Arch Virol* *145*, 905-920.

- Okada, H., Sato, T. A., Katayama, A., Higuchi, K., Shichijo, K., Tsuchiya, T., Takayama, N., Takeuchi, Y., Abe, T., Okabe, N., and Tashiro, M. (2001). Comparative analysis of host responses related to immunosuppression between measles patients and vaccine recipients with live attenuated measles vaccines. *Arch Virol* 146, 859-874.
- Padovan, E., Spagnoli, G. C., Ferrantini, M., and Heberer, M. (2002). IFN- $\alpha$ 2a induces IP-10/CXCL10 and MIG/CXCL9 production in monocyte-derived dendritic cells and enhances their capacity to attract and stimulate CD8<sup>+</sup> effector T cells. *J Leukoc Biol* 71, 669-676.
- Palosaari, H., Parisien, J. P., Rodriguez, J. J., Ulane, C. M., and Horvath, C. M. (2003). STAT protein interference and suppression of cytokine signal transduction by measles virus V protein. *J Virol* 77, 7635-7644.
- Parks, C. L., Lerch, R. A., Walpita, P., Wang, H. P., Sidhu, M. S., and Udem, S. A. (2001). Analysis of the noncoding regions of measles virus strains in the Edmonston vaccine lineage. *J Virol* 75, 921-933.
- Patterson, J. B., Scheifflinger, F., Manchester, M., Yilma, T., and Oldstone, M. B. (1999). Structural and functional studies of the measles virus hemagglutinin: identification of a novel site required for CD46 interaction. *Virology* 256, 142-151.
- Patterson, J. B., Thomas, D., Lewicki, H., Billeter, M. A., and Oldstone, M. B. (2000). V and C proteins of measles virus function as virulence factors in vivo. *Virology* 267, 80-89.
- Paul, W. E., and Seder, R. A. (1994). Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* 76, 241-251.
- Pellegrino, M. A., Ferrone, S., and Theofilopoulos, A. N. (1976). Isolation of human T and B lymphocytes by rosette formation with 2-aminoethylisothiquonium bromide (AET) -treated sheep red blood cells with monkey red blood cells. *J Immunol Methods* 11, 273-279.
- Piqueras, B., Connolly, J., Freitas, H., Palucka, A. K., and Banchereau, J. (2006). Upon viral exposure, myeloid and plasmacytoid dendritic cells produce 3 waves of distinct chemokines to recruit immune effectors. *Blood* 107, 2613-2618.
- Plempner, R. K., Hammond, A. L., and Cattaneo, R. (2001). Measles virus envelope glycoproteins hetero-oligomerize in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 276, 44239-44246.

Plempner, R. K., Hammond, A. L., Gerlier, D., Fielding, A. K., and Cattaneo, R. (2002). Strength of envelope protein interaction modulates cytopathicity of measles virus. *J Virol* 76, 5051-5061.

Pohlmann, S., Zhang, J., Baribaud, F., Chen, Z., Leslie, G. J., Lin, G., Granelli-Piperno, A., Doms, R. W., Rice, C. M., and McKeating, J. A. (2003). Hepatitis C virus glycoproteins interact with DC-SIGN and DC-SIGNR. *J Virol* 77, 4070-4080.

Prechtel, A. T., Turza, N. M., Kobelt, D. J., Eisemann, J. I., Coffin, R. S., McGrath, Y., Hacker, C., Ju, X., Zenke, M., and Steinkasserer, A. (2005). Infection of mature dendritic cells with herpes simplex virus type 1 dramatically reduces lymphoid chemokine-mediated migration. *J Gen Virol* 86, 1645-1657.

Puck, T. T., Cieciura, S. J., and Robinson, A. (1958). Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *J Exp Med* 108, 945-956.

Pulendran, B., Banchereau, J., Maraskovsky, E., and Maliszewski, C. (2001). Modulating the immune response with dendritic cells and their growth factors. *Trends Immunol* 22, 41-47.

Punnonen, J., Cocks, B. G., Carballido, J. M., Bennett, B., Peterson, D., Aversa, G., and de Vries, J. E. (1997). Soluble and membrane-bound forms of signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) induce proliferation and Ig synthesis by activated human B lymphocytes. *J Exp Med* 185, 993-1004.

Re, F., Muzio, M., De Rossi, M., Polentarutti, N., Giri, J. G., Mantovani, A., and Colotta, F. (1994). The type II "receptor" as a decoy target for interleukin 1 in polymorphonuclear leukocytes: characterization of induction by dexamethasone and ligand binding properties of the released decoy receptor. *J Exp Med* 179, 739-743.

Real, E., Kaiser, A., Raposo, G., Amara, A., Nardin, A., Trautmann, A., and Donnadieu, E. (2004). Immature dendritic cells (DCs) use chemokines and intercellular adhesion molecule (ICAM)-1, but not DC-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin, to stimulate CD4+ T cells in the absence of exogenous antigen. *J Immunol* 173, 50-60.

Relloso, M., Puig-Kroger, A., Pello, O. M., Rodriguez-Fernandez, J. L., de la Rosa, G., Longo, N., Navarro, J., Munoz-Fernandez, M. A., Sanchez-Mateos, P., and Corbi, A. L. (2002). DC-SIGN (CD209) expression is IL-4 dependent and is negatively regulated by IFN, TGF-beta, and anti-inflammatory agents. *J Immunol* 168, 2634-2643.

Revy, P., Sospedra, M., Barbour, B., and Trautmann, A. (2001). Functional antigen-independent synapses formed between T cells and dendritic cells. *Nat Immunol* 2, 925-931.

Richardson, C. D., Scheid, A., and Choppin, P. W. (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, E. C., Murphy, G., and Riley, R. L. (1978). Airborne spread of measles in a suburban elementary school. *Am J Epidemiol* 107, 421-432.

Robert, C., Fuhlbrigge, R. C., Kieffer, J. D., Ayehunie, S., Hynes, R. O., Cheng, G., Grabbe, S., von Andrian, U. H., and Kupper, T. S. (1999). Interaction of dendritic cells with skin endothelium: A new perspective on immunosurveillance. *J Exp Med* 189, 627-636.

Saeki, H., Moore, A. M., Brown, M. J., and Hwang, S. T. (1999). Cutting edge: secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) and CC chemokine receptor 7 (CCR7) participate in the emigration pathway of mature dendritic cells from the skin to regional lymph nodes. *J Immunol* 162, 2472-2475.

Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C., and Lanzavecchia, A. (1995). Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* 182, 389-400.

Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 179, 1109-1118.

Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (2000). Understanding dendritic cell and T-lymphocyte traffic through the analysis of chemokine receptor expression. *Immunol Rev* 177, 134-140.

Sallusto, F., Lanzavecchia, A., and Mackay, C. R. (1998a). Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses. *Immunol Today* 19, 568-574.

Sallusto, F., Lenig, D., Forster, R., Lipp, M., and Lanzavecchia, A. (1999a). Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401, 708-712.

Sallusto, F., Lenig, D., Mackay, C. R., and Lanzavecchia, A. (1998b). Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *J Exp Med* 187, 875-883.

Sallusto, F., Palermo, B., Lenig, D., Miettinen, M., Matikainen, S., Julkunen, I., Forster, R., Burgstahler, R., Lipp, M., and Lanzavecchia, A. (1999b). Distinct patterns and kinetics of chemokine production regulate dendritic cell function. *Eur J Immunol* 29, 1617-1625.

Sallusto, F., Schaerli, P., Loetscher, P., Schaniel, C., Lenig, D., Mackay, C. R., Qin, S., and Lanzavecchia, A. (1998c). Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur J Immunol* 28, 2760-2769.

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

Sato, K., Kawasaki, H., Nagayama, H., Enomoto, M., Morimoto, C., Tadokoro, K., Juji, T., and Takahashi, T. A. (2001). Signaling events following chemokine receptor ligation in human dendritic cells at different developmental stages. *Int Immunol* 13, 167-179.

Sato, T. A., Kohama, T., and Sugiura, A. (1988). Intracellular processing of measles virus fusion protein. *Arch Virol* 98, 39-50.

Scandella, E., Men, Y., Gillessen, S., Forster, R., and Groettrup, M. (2002). Prostaglandin E2 is a key factor for CCR7 surface expression and migration of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 100, 1354-1361.

Schlender, J., Schnorr, J. J., Spielhoffer, P., Cathomen, T., Cattaneo, R., Billeter, M. A., ter Meulen, V., and Schneider-Schaulies, S. (1996). Interaction of measles virus glycoproteins with the surface of uninfected peripheral blood lymphocytes induces immunosuppression in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13194-13199.

Schneider-Schaulies, J., Schnorr, J. J., Brinckmann, U., Dunster, L. M., Baczko, K., Liebert, U. G., Schneider-Schaulies, S., and ter Meulen, V. (1995). Receptor usage and differential downregulation of CD46 by measles virus wild-type and vaccine strains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 3943-3947.

Schneider-Schaulies, S., Kreth, H. W., Hofmann, G., Billeter, M., and 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., Liebert, U. G., Baczko, K., Cattaneo, R., Billeter, M., and 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., Xanthakos, S., Keikavoussi, P., Kampgen, E., ter Meulen, V., and Schneider-Schaulies, S. (1997). Induction of maturation of human blood dendritic cell precursors by measles virus is associated with immunosuppression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 5326-5331.

Servet-Delprat, C., Vidalain, P. O., Azocar, O., Le Deist, F., Fischer, A., and Roubardin-Combe, C. (2000a). 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., Manie, S., Le Deist, F., Azocar, O., Hanau, D., Fischer, A., and Roubardin-Combe, C. (2000b). Measles virus induces abnormal differentiation of CD40 ligand-activated human dendritic cells. *J Immunol* 164, 1753-1760.

Servet-Delprat, C., Vidalain, P. O., Valentin, H., and Roubardin-Combe, C. (2003). Measles virus and dendritic cell functions: how specific response cohabits with immunosuppression. *Curr Top Microbiol Immunol* 276, 103-123.

Shaffer, J. A., Bellini, W. J., and Rota, P. A. (2003). The C protein of measles virus inhibits the type I interferon response. *Virology* 315, 389-397.

Shortman, K., and Liu, Y. J. (2002). Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* 2, 151-161.

Siedler, A. (2005). Erkrankungen an Masern im Jahr 2004 und Ausbrüche in Hessen und Bayern in der ersten Hälfte des Jahres 2005. *Neues Epidemiologisches Bulletin* 29.

Simmons, G., Reeves, J. D., Grogan, C. C., Vandenberghe, L. H., Baribaud, F., Whitbeck, J. C., Burke, E., Buchmeier, M. J., Soilleux, E. J., Riley, J. L., *et al.* (2003). DC-SIGN and DC-SIGNR bind ebola glycoproteins and enhance infection of macrophages and endothelial cells. *Virology* 305, 115-123.

Sozzani, S., Allavena, P., D'Amico, G., Luini, W., Bianchi, G., Kataura, M., Imai, T., Yoshie, O., Bonecchi, R., and Mantovani, A. (1998). Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties. *J Immunol* 161, 1083-1086.

Spaerman, C. (1908). The method of right and wrong cases. *British Journal of Psychology*.

- Steffens, I. H. (2006). Erkrankungen an Masern im Jahr 2004 und Ausbrüche in Hessen und Bayern in der ersten Hälfte des Jahres 2005. *Neues Epidemiologisches Bulletin*.
- Steineur, M. P., Grosjean, I., Bella, C., and Kaiserlian, D. (1998). Langerhans cells are susceptible to measles virus infection and actively suppress T cell proliferation. *Eur J Dermatol* 8, 413-420.
- Stephenson, J. R., and ter Meulen, V. (1979). Antigenic relationships between measles and canine distemper viruses: comparison of immune response in animals and humans to individual virus-specific polypeptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 6601-6605.
- Stern, L. B., Greenberg, M., Gershoni, J. M., and Rozenblatt, S. (1995). The hemagglutinin envelope protein of canine distemper virus (CDV) confers cell tropism as illustrated by CDV and measles virus complementation analysis. *J Virol* 69, 1661-1668.
- Strunk, D., Egger, C., Leitner, G., Hanau, D., and Stingl, G. (1997). A skin homing molecule defines the langerhans cell progenitor in human peripheral blood. *J Exp Med* 185, 1131-1136.
- Suryanarayana, K., Baczko, K., ter Meulen, V., and Wagner, R. R. (1994). Transcription inhibition and other properties of matrix proteins expressed by M genes cloned from measles viruses and diseased human brain tissue. *J Virol* 68, 1532-1543.
- Tailleux, L., Schwartz, O., Herrmann, J. L., Pivert, E., Jackson, M., Amara, A., Legres, L., Dreher, D., Nicod, L. P., Gluckman, J. C., *et al.* (2003). DC-SIGN is the major Mycobacterium tuberculosis receptor on human dendritic cells. *J Exp Med* 197, 121-127.
- Takeuchi, K., Kadota, S. I., Takeda, M., Miyajima, N., and Nagata, K. (2003). Measles virus V protein blocks interferon (IFN)-alpha/beta but not IFN-gamma signaling by inhibiting STAT1 and STAT2 phosphorylation. *FEBS Lett* 545, 177-182.
- Takeuchi, O., Kaufmann, A., Grote, K., Kawai, T., Hoshino, K., Morr, M., Muhlradt, P. F., and Akira, S. (2000). Cutting edge: preferentially the R-stereoisomer of the mycoplasmal lipopeptide macrophage-activating lipopeptide-2 activates immune cells through a toll-like receptor 2- and MyD88-dependent signaling pathway. *J Immunol* 164, 554-557.

- Tamashiro, V. G., Perez, H. H., and Griffin, D. E. (1987). Prospective study of the magnitude and duration of changes in tuberculin reactivity during uncomplicated and complicated measles. *Pediatr Infect Dis J* 6, 451-454.
- Tanabe, M., Kurita-Taniguchi, M., Takeuchi, K., Takeda, M., Ayata, M., Ogura, H., Matsumoto, M., and Seya, T. (2003). Mechanism of up-regulation of human Toll-like receptor 3 secondary to infection of measles virus-attenuated strains. *Biochem Biophys Res Commun* 311, 39-48.
- Taniguchi, T., and Takaoka, A. (2002). The interferon-alpha/beta system in antiviral responses: a multimodal machinery of gene regulation by the IRF family of transcription factors. *Curr Opin Immunol* 14, 111-116.
- Tassaneeritthep, B., Burgess, T. H., Granelli-Piperno, A., Trumfheller, C., Finke, J., Sun, W., Eller, M. A., Pattanapanyasat, K., Sarasombath, S., Birx, D. L., *et al.* (2003). DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J Exp Med* 197, 823-829.
- Tatsuo, H., Ono, N., Tanaka, K., and Yanagi, Y. (2000). SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature* 406, 893-897.
- Tober, C., Seufert, M., Schneider, H., Billeter, M. A., Johnston, I. C., Niewiesk, S., ter Meulen, V., and 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.
- Tybulewicz, V. L. (2002). Chemokines and the immunological synapse. *Immunology* 106, 287-288.
- Valsamakis, A., Schneider, H., Auwaerter, P. G., Kaneshima, H., Billeter, M. A., and Griffin, D. E. (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 Gisbergen, K. P., Paessens, L. C., Geijtenbeek, T. B., and van Kooyk, Y. (2005). Molecular mechanisms that set the stage for DC-T cell engagement. *Immunol Lett* 97, 199-208.
- van Kooyk, Y., and Geijtenbeek, T. B. (2003). DC-SIGN: escape mechanism for pathogens. *Nat Rev Immunol* 3, 697-709.
- van Stipdonk, M. J., Hardenberg, G., Bijker, M. S., Lemmens, E. E., Droin, N. M., Green, D. R., and Schoenberger, S. P. (2003). Dynamic programming of CD8+ T lymphocyte responses. *Nat Immunol* 4, 361-365.

Van Voorhis, W. C., Valinsky, J., Hoffman, E., Luban, J., Hair, L. S., and Steinman, R. M. (1983). Relative efficacy of human monocytes and dendritic cells as accessory cells for T cell replication. *J Exp Med* 158, 174-191.

Varani, S., Frascaroli, G., Homman-Loudiyi, M., Feld, S., Landini, M. P., and Soderberg-Naucler, C. (2005). Human cytomegalovirus inhibits the migration of immature dendritic cells by down-regulating cell-surface CCR1 and CCR5. *J Leukoc Biol* 77, 219-228.

Vidalain, P. O., Azocar, O., Lamouille, B., Astier, A., Rabourdin-Combe, C., and Sernet-Delprat, C. (2000). Measles virus induces functional TRAIL production by human dendritic cells. *J Virol* 74, 556-559.

von Pirquet, C. (1908). Das Verhalten der kutanen Tuberkulin-Reaktion während der Masern. *Deutsche Medizinische Wochenschau* 34, 1297-1300.

Vulcano, M., Albanesi, C., Stoppacciaro, A., Bagnati, R., D'Amico, G., Struyf, S., Transidico, P., Bonecchi, R., Del Prete, A., Allavena, P., *et al.* (2001). Dendritic cells as a major source of macrophage-derived chemokine/CCL22 in vitro and in vivo. *Eur J Immunol* 31, 812-822.

Ward, B. J., and Griffin, D. E. (1993). Changes in cytokine production after measles virus vaccination: predominant production of IL-4 suggests induction of a Th2 response. *Clin Immunol Immunopathol* 67, 171-177.

Wardrop, E. A., and Briedis, D. J. (1991). Characterization of V protein in measles virus-infected cells. *J Virol* 65, 3421-3428.

Wei, X., Tromberg, B. J., and Cahalan, M. D. (1999). Mapping the sensitivity of T cells with an optical trap: polarity and minimal number of receptors for Ca(2+) signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 8471-8476.

Weidmann, A., Fischer, C., Ohgimoto, S., Ruth, C., ter Meulen, V., and Schneider-Schaulies, S. (2000). Measles virus-induced immunosuppression in vitro is independent of complex glycosylation of viral glycoproteins and of hemifusion. *J Virol* 74, 7548-7553.

Weis, W. I., Taylor, M. E., and Drickamer, K. (1998). The C-type lectin superfamily in the immune system. *Immunol Rev* 163, 19-34.

WHO (2006). *Weekly Epidemiological record*. 81.

Wild, T. F., and Buckland, R. (1995). Functional aspects of envelope-associated measles virus proteins. *Curr Top Microbiol Immunol* 191, 51-64.

- Wild, T. F., Fayolle, J., Beauverger, P., and Buckland, R. (1994). Measles virus fusion: role of the cysteine-rich region of the fusion glycoprotein. *J Virol* 68, 7546-7548.
- Wild, T. F., Malvoisin, E., and Buckland, R. (1991). Measles virus: both the haemagglutinin and fusion glycoproteins are required for fusion. *J Gen Virol* 72 (Pt 2), 439-442.
- Wong, M. M., and Fish, E. N. (2003). Chemokines: attractive mediators of the immune response. *Semin Immunol* 15, 5-14.
- Wu, L., Martin, T. D., Carrington, M., and KewalRamani, V. N. (2004). Raji B cells, misidentified as THP-1 cells, stimulate DC-SIGN-mediated HIV transmission. *Virology* 318, 17-23.
- Wulfing, C., and Davis, M. M. (1998). A receptor/cytoskeletal movement triggered by costimulation during T cell activation. *Science* 282, 2266-2269.
- Wulfing, C., Sumen, C., Sjaastad, M. D., Wu, L. C., Dustin, M. L., and Davis, M. M. (2002). Costimulation and endogenous MHC ligands contribute to T cell recognition. *Nat Immunol* 3, 42-47.
- Yanagi, Y., Cubitt, B. A., and Oldstone, M. B. (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.
- Yasumura, Y., and Y, K. (1963). Vero Cells. *Nippon Rinsho* 21, 1209-.
- Yokota, S., Saito, H., Kubota, T., Yokosawa, N., Amano, K., and Fujii, N. (2003). Measles virus suppresses interferon-alpha signaling pathway: suppression of Jak1 phosphorylation and association of viral accessory proteins, C and V, with interferon-alpha receptor complex. *Virology* 306, 135-146.
- Yoneyama, H., Narumi, S., Zhang, Y., Murai, M., Baggiolini, M., Lanzavecchia, A., Ichida, T., Asakura, H., and Matsushima, K. (2002). Pivotal role of dendritic cell-derived CXCL10 in the retention of T helper cell 1 lymphocytes in secondary lymph nodes. *J Exp Med* 195, 1257-1266.
- Zaru, R., Cameron, T. O., Stern, L. J., Muller, S., and Valitutti, S. (2002). Cutting edge: TCR engagement and triggering in the absence of large-scale molecular segregation at the T cell-APC contact site. *J Immunol* 168, 4287-4291.

---

Zilliox, M. J., Parmigiani, G., and Griffin, D. E. (2006). Gene expression patterns in dendritic cells infected with measles virus compared with other pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 3363-3368.

## 9 Abkürzungen

7-AAD	7-Aminoaktinomycin D
AET	2-Aminoethylisothiuroniumbromid
APC	antigen-presenting-cell
ATV	adjusted Trypsin Versene
BDCA	Blood-DC-Antigen
BSA	bovines Serumalbumin
C	Celsius
CCR	Chemokinrezeptor
CD	cluster of differentiation
CFSE	Carboxyfluorescein-(5-,6-)diacetat
CHO	Chinese Hamster Ovary
CLA	cutaneous lymphocyte associated antigen
CPE	cytopathic effect
CRD	carbohydrate recognition domain
cSMAC	central SMAC
CTL	cytolytic t-lymphocytes, zytotoxische T-Lymphozyten
CYTIP	cytohesin interacting protein
Cytohesin-1	intracellular adhesion enhancing integrin binding molecule
Da	Dalton
DC	dendritic cell, Dendritische Zelle
DC-SIGN	dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule (ICAM)-3 grabbing non-integrin, (CD209)

---

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTH	delayed-type hypersensitivity
E	Glutaminsäure
ED	Edmonston
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
(e) GFP	(enhanced) green fluorescent protein
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ERK	extracellular signalling regulated kinase
FACS	fluorescence activated cell sorting
FAK	focal adhesion kinase
FIP	Fusions-inhibitorisches Peptid
FITC	Fluoresceinthiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
Flt-3	fms-like-tyrosinkinase-3
F-Protein	Fusionsprotein
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony stimulating factor
gp	Glykoprotein
h	Stunde
HCMV	humanes Cytomegalievirus
HEV	high endothelial venules
HIV	humanes Immundefizienzvirus
H-Protein	Hämagglutininprotein
HRP	horseradishperoxidase
HSV	humanes Herpes simplex Virus

---

ICAM	intercellular adhesion molecule
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IRF	interferon regulatory factor
IS	immunological synapse
ITAM	immunoreceptor tyrosin-based activation motif
kb	Kilobasen
l	Liter
L	Leucin
L-SIGN	DC-SIGNR (DC-SIGN-related, CD209L)
LFA	lymphocyte function-associated antigen
L-Protein	Polymerase
LPS	Lipopolysaccharid
LSEC	Liver sinusoidal endothelial cells
(m) RNA	(messenger) ribonucleinacid, Ribonukleinsäure
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MCP	membrane cofactor protein, CD46
MEM	minimal essential medium
MFI	mean fluorescens intensity
MHC	major histocompatibility complex
MIBE	measles inclusion body encephalitis, Einschlußkörperchen Enzephalitis
MoDC	monocyte-derived dendritic cell
moi	multiplicity of infection

---

M-Protein	Matrixprotein
MV	Masernvirus
NFκB	nuclear factor kappa B
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
nm	Nanogram
N-Protein	Nukleokapsidprotein
PBL	peripheral blood lymphocyte
PBMC	peripheral blood monocytes
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PE	Phycoerythin
pfu	plaque forming unit
p.i.	<i>post infectionem</i>
PIE	post infectious encephalitis
P-Protein	Phosphoprotein
PRR	pattern recognition receptor
pSMAC	peripheral SMAC
R	Arginin
RNP-Komplex	Ribonukleotidkomplex
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
SCR	short consensus repeats
SLAM	signaling lymphocyte activation molecule, CD150
SMAC	supramolecular activation cluster
SSPE	Subakute sklerosierende Enzephalitis

---

TCID <sub>50</sub>	tissue culture infectious dose 50
T <sub>CM</sub>	central memory T-cell
TCR	T-cell receptor
T <sub>EM</sub>	effector memory T-cell
TGF	tumor growth factor
TLR	toll-like receptor
TNF	tumor necrosis factor
TRAIL	TNF-related apoptosis inducing ligand
ü.N.	über Nacht
WTF	Wildtyp Fleckenstein
ZAP-70	zeta-associated protein-70

## **10 Filme**

Film 1: Ausgewählter Kontakt einer mit LPS behandelten DC mit einer durch Oxidative Mitogenese modifizierten T-Zelle.

Film 2: Ausgewählter Kontakt einer MV-infizierten DC mit einer durch Oxidative Mitogenese behandelten T-Zelle.

## 11 Veröffentlichungen

### 11.1 Publikationen

Klagge, I.M.; **Abt, M.**; Fries, B.; Schneider-Schaulies, S. (2004). Impact of measles virus on dendritic cell infection on T cell polarisation in vitro. J. Gen. Virol. 85:3239-3247.

**Abt, M.**; Müller, N.; Schneider-Schaulies, S. (2005). Dendritic cells in measles pathogenesis. In: Handbook of Dendritic Cells, disease and therapies, 2 Vol. Steinkasserer, A.; Lutz, M. (eds.) Wiley VCH, Deutschland

De Witte, L.\*; **Abt, M.\***; Schneider-Schaulies, S.; van Kooyk, Y.; Geijtenbeek, T. (2006) Measles Virus targets DC-SIGN to enhance DC infection. J. Virol., April 2006

\*Autoren haben gleichberechtigt an der Arbeit mitgewirkt

### 11.2 Vorträge

Ingo M. Klagge, **Marion Abt**, Bianca Fries, Sibylle Schneider-Schaulies. Impact of measles virus dendritic cell infection on T-cell polarisation *in vitro*. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Virologie, Tübingen, 17.–20. März 2004

Elita Avota, **Marion Abt**, Maren Klett, Volker ter Meulen, Sibylle Schneider-Schaulies. Measles virus interaction with lipid raft structure in t-cells. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Virologie, Berlin, 26.–29. März 2003

### 11.3 Posterpräsentationen

**Marion Abt**, Manfred Weidmann, Frank T. Hufert, 2003. Interaction of Puumalavirus with polarised MDCK cells. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Virologie, Berlin, 26.–29. März 2003

**Marion Abt**, Lot De Witte, Yvette van Kooyk, Teunis B. H. Geijtenbeek, Sibylle Schneider-Schaulies. Interaction of measles virus with the dendritic cell surface: differential role in viral tropism and functional implications. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Virologie, Hannover, 16.–19. März 2005

**Marion Abt**, Sibylle Schneider-Schaulies. Measles virus infection of dendritic cells: consequences for dendritic cell migration and t-cell attraction. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Virologie, München, 15.–18. März 2006

## 12 Lebenslauf

Marion Abt

geboren am 18. Januar 1977

in Bremen

### Ausbildung:

1996	Abitur, Gymnasium Osterholz-Scharmbeck
1996-1998	Grundstudium Diplom-Biologie, Universität Bremen
1998	Vordiplom in Biologie, Universität Bremen
1998-2001	Hauptstudium Diplom-Biologie, Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg im Breisgau
2001	Diplomarbeit am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg im Breisgau,  Thema der Diplomarbeit „Wechselwirkungen zwischen Puumalaviren und polarisierten Nierenepithelzellen“ Abschluss als Diplom-Biologin
2002-2006	Doktorarbeit am Institut für Virologie und Immunobiologie, Julius-Maximilians-Universität, Würzburg  Thema der Dissertation „Interaktion von Masernviren mit Dendritischen Zellen: Untersuchungen zur Rezeptorbenutzung, Chemotaxis und T-Zellkommunikation“

Würzburg, 08. Mai 2006

---

# DANKE!

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben und mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben.

Mein besonderer Dank gilt:

Frau Prof. Dr. Sibylle Schneider-Schaulies für die interessante Aufgabenstellung, die Betreuung meiner Arbeit sowie die Möglichkeit in verschiedenen Kooperationen mitzuarbeiten.

Herrn Prof. Dr. Krone für die freundliche Übernahme des Koreferats.

Dr. Theo Geijtenbeek und Lot De Witte, Vrije Universität Amsterdam für die gute Zusammenarbeit und den tollen Aufenthalt in Amsterdam.

Prof. Dr. Peter Friedl, Dr. Julian Storim und Martina Jossberger, Universitäts-Hautklinik, Würzburg für die Kooperationsbereitschaft und ihre Hilfe beim „Filmprojekt“.

Dr. Andreas Opitz, Abteilung für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie, Universitätsklinik Würzburg für seine Hilfe bei den Leukapheresen.

Allen Kollegen im Labor, die immer zur richtigen Zeit eine Tasse Tee und ein paar nette Worte bereitgehalten haben...

Elke, Christine und meinem Vater für unermüdliches Korrekturlesen!