

**Die Rolle definierter Subpopulationen humaner
peripherer Blutzellen für die Masernvirus-induzierte
Immunsuppression und Immunaktivierung**

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

Karen Bieback

aus
Bremen

Würzburg, 2002

Eingereicht am:

.....

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

.....

Gutachter : Prof. Dr. S. Schneider-Schaulies :

.....

Gutachter: Prof. Dr. Buchner

.....

Tag des Promotionskolloquiums:

.....

Doktorurkunde ausgehändigt am:

.....

Erklärung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, daß ich die vorliegende Dissertation „Die Rolle definierter Subpopulationen humaner peripherer Blutzellen für die Masernvirus-induzierte Immunsuppression und Immunaktivierung“ selbständig angefertigt habe und keine anderen, als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

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

Ich habe früher, außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden, keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den 03. Juni 2002

Danksagung

Frau Prof. Dr. Sibylle Schneider-Schaulies möchte ich herzlich danken für die Überlassung der abwechslungsreichen Themen, für ihre Unterstützung und ihr Interesse an dem Fortgang meiner Arbeit, für ihre Gesprächsbereitschaft, und für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Herrn Prof. Dr. Buchner danke ich für die Übernahme des Koreferates.

Herrn Prof. Dr. ter Meulen möchte ich für danken für sein Interesse an dem Fortschreiten der Arbeit und seine Unterstützung.

Mein ganz besonderer Dank gilt auch Dr. Egil Lien und Dr. Carsten Kirschning und ihren Mitarbeitern, die mir durch Ihre Kooperation, die Bereitstellung von Materialien und ihrem Wissen, und ihrer Diskussionsfreude sehr geholfen haben.

Ganz, ganz herzlich danke ich meinen Kollegen aus den 3 Masern-Arbeitsgruppen und ihren Chefs, Jürgen Schneider-Schaulies und Stefan Niewiesk. Ich danke für das stets angenehme Arbeitsklima und die große Hilfsbereitschaft und die ablenkenden Gespräche während der Kaffeepausen, der Weinfeste etc. Insbesondere danke ich Marion Seufert, die die Vorarbeiten für das $\gamma\delta$ T Zellprojekt erbracht hat und Ingo Klagge, der das TLR-Projekt zusammen mit Sibylle initiiert hat. Ingo gilt auch mein Dank für seine Geduld bei der Beantwortung meiner zahlreichen Fragen und seine stete Hilfe bei Problemen jeglicher Art. Danken möchte ich auch Elita Avota, die mir die Signaltransduktion nicht nur methodisch nahe gebracht hat. Dann möchte ich mich für die praktische Unterstützung von Maren Klett bedanken, die zu dem Gelingen des TLR-Projektes in so kurzer Zeit wesentlich beigetragen hat. Auch Claudia Rüth danke ich für ihre Hilfe und Freundschaft.

Siggi Löffler danke ich für die Herstellung und Bereitstellung der monoklonalen Antikörper und die vielen Stunden, in denen sie versucht hat, das MV-H Protein aufzureinigen. Ich hoffe, wir können es noch testen.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Sieghart Sopper und Carsten Scheller, die mir so manches Experiment am FACS gerettet haben oder mich während der oft langen Sitzungen dort unterhalten haben. Natürlich danke ich Ihnen auch für konstruktive Gespräche und die Hilfe bei den statistischen Auswertungen.

Aber auch danken möchte ich den Leuten außerhalb des Institutes, ohne deren Hilfe und Unterstützung ich dieses Ziel nicht hätte erreichen können: meiner Mutter und meinem Vater, meiner Großtante Herta, meinen Freundinnen Anja und Renata und ganz besonders Jens, der stets Geduld aufgebracht hat und mich desöfteren am Wochenende ins Institut begleiten mußte.

Obwohl diese Danksagung schon sehr lang ist, habe ich sicherlich nicht allen erwähnt, denen Dank gebührt- für diese nicht-Genannten ein abschließendes und großes und herzliches: **DANKE**

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Masern	1
1.1.1	Das Virus	1
1.1.1.1	MV Tropismus und Rezeptorbenutzung	3
1.1.2	Die Pathogenese der akuten Maserninfektion	4
1.1.3	Die Immunantwort nach akuten Masern und Impfung	5
1.1.4	Die MV-assoziierte Immunsuppression	6
1.2	Die Bedeutung der unspezifischen Immunität für die Infektabwehr	8
1.2.1	$\gamma\delta$ T Zellen und ihre Rolle in der Immunantwort	9
1.2.1.1	Die „Antigenerkennung“ von $\gamma\delta$ T Zellen	10
1.2.1.2	Die Rolle von $\gamma\delta$ T Zellen bei Erkrankungen	12
1.2.2	Die Toll-ähnlichen Rezeptoren	12
1.2.2.1	TLR-Agonisten	13
1.2.2.2	Die Signalwege	15
1.3	Zielsetzung der Arbeit	17
2	Material	18
2.1	Zellkultur	18
2.1.1	Zelllinien	18
2.1.2	Primäre Zellen	20
2.1.3	Medien und Zusätze	20
2.2	Mausstämme	21
2.3	Viren	21
2.4	Antikörper	22
2.5	Reagenzien, Puffer	23
2.5.1	Stimulantien	23
2.5.2	Chemikalien	23
2.5.3	Puffer und Lösungen	23
2.6	Radioaktivität	24
2.7	Kits	24
2.8	Verbrauchsmaterial	24
2.9	Geräte	25
3	Methoden	26
3.1	Zellkultur	26
3.1.1	Zelllinien	26

3.1.2	Primäre Zellen	26
3.1.2.1	Isolierung primärer humaner mononukleärer Zellen und weitere Aufreinigung der Zellpopulationen aus peripherem Blut	26
3.1.2.2	<i>In Vitro</i> -Generation humaner MoDC	27
3.1.2.3	Isolierung von Makrophagen aus dem Peritoneum von Mäusen	27
3.1.3	Zellzahlbestimmung	28
3.1.4	Einfrieren/Auftauen von Zellen	28
3.1.5	Mykoplasmentestung und Limulus Lysat Test	28
3.2	Viren	28
3.2.1	Zucht und Aufreinigung	28
3.2.2	Titerbestimmung der Virusstocks	29
3.2.3	Einstellung des MV-Glykoproteingehalts mittels „Western Blot-Analyse“	30
3.3	T Zell-Proliferationsteste	32
3.3.1	Presenterzellen (PC)	32
3.3.1.1	Persistierend infizierte Zelllinien	32
3.3.1.2	Infektion von MoDC	32
3.3.2	PHA Proliferationstest	32
3.3.3	IPP/IL-2-vermittelte $\gamma\delta$ T Zell-Expansion	34
3.3.4	Gemischte Leukozytenreaktion	34
3.4	Stimulation von Zellen	35
3.4.1	Stimulation der CHO Zellen	35
3.4.2	Stimulation von Monozyten und Makrophagen	35
3.5	Durchflußzytometrie	36
3.6	mRNA Nachweis mittels „RNase Protection Assay“	37
3.6.1	RNA-Isolation	37
3.6.2	Synthese der radioaktiven Probe	37
3.6.3	Präparation der RNA und Hybridisierung	38
3.6.4	RNase-Behandlung	38
3.6.5	Elektrophoretische Auftrennung der „geschützten“ Proben	39
3.7	Zytokinnachweis mittels „ELISA“ und Bioassay	39
3.8	Statistik	40
4	Ergebnisse	41
4.1	Die Interaktion zwischen Masernvirus und $\gamma\delta$ T Zellen	41
4.1.1	Die Expansion von $\gamma\delta$ T Zellen <i>in vitro</i>	41
4.1.2	Masernvirus-infizierte Probanden	43
4.1.3	Die $\gamma\delta$ T Zell-Proliferation ist nach Kontakt mit UV-inaktiviertem Virus inhibiert	47
4.1.4	Persistierend-infizierte T-Zell und Monozyten-ähnliche Zelllinien hemmen die $\gamma\delta$ T Zell Proliferation, nicht aber persistierend infizierte B-Zelllinien	48
4.1.5	Lytisch infizierte Dendritische Zellen hemmen zwar $\alpha\beta$ T Zellen, nicht aber $\gamma\delta$ T Zellen LPS	52

4.1.6	Monozyten werden benötigt, um eine Aufhebung des inhibitorischen Einflusses des Masernvirus auf die $\gamma\delta$ T Zell-Proliferation zu bewirken _____	53
4.1.6.1	Dieser Einfluß beruht auf der Sekretion von Zytokinen, bzw der Expression von Oberflächenmolekülen _____	56
4.2	Die Interaktion zwischen Masernvirus und den Toll-ähnlichen Rezeptoren _____	60
4.2.1	Masernvirus- Wildtyp, nicht aber Vakzine-Stämme, aktivieren Zellen via TLR2 _____	60
4.2.2	Die Aktivierung von Zellen über TLR2 erfordert weder den Viruseintrit noch Replikation, aber Kontakt zwischen Zelle und Virus _____	66
4.2.3	Die Fähigkeit des Wildtypen, Zellen über TLR2 zu aktivieren, ist nicht spezies-spezifisch und wird durch CD14 verstärkt _____	68
4.2.4	Das Hämagglutininprotein der Wildtyp-Masernstämme induziert die TLR2-abhängige Zellaktivierung. Diese Fähigkeit geht durch den Austausch einer einzigen Aminosäure verloren _____	70
4.2.5	Monozyten werden durch Wildtyp-Masern aktiviert _____	73
4.2.6	Der aktivierende Effekt der Wildtyp Masernviren auf die Monozyten ist abhängig von TLR2 _____	80
5	<i>Diskussion</i> _____	84
5.1	Die Interaktion zwischen MV und $\gamma\delta$ T Zellen _____	84
5.2	Die Interaktion von MV mit den Toll-ähnlichen Rezeptoren _____	94
6	<i>Zusammenfassung</i> _____	103
7	<i>Summary</i> _____	105
8	<i>Literatur</i> _____	107
9	<i>Abkürzungen</i> _____	134
10	<i>Lebenslauf</i> _____	138
11	<i>Veröffentlichungen</i> _____	139
11.1	Publikationen _____	139
11.2	Vorträge _____	139
11.3	Posterpräsentationen _____	140

1 Einleitung

1.1 Masern

Die akuten Masern sind eine hochgradig ansteckende Erkrankung, die durch das Masernvirus (MV) verursacht werden. Sie zählen zu den bekanntesten Kinderkrankheiten. Obwohl eine Lebendvakzine verfügbar ist, erkranken pro Jahr etwa 40 Millionen Menschen an Masern, und nach wie vor sterben jährlich bis zu 1 Million Infizierte weltweit an den Folgen der Erkrankung (Clements und Cutts, 1995). Die hohen Morbiditäts- und Mortalitätsraten basieren auf einer generellen Immunsuppression, die eine MV-Infektion begleitet, in deren Folge es zu bakteriellen oder viralen Superinfektionen kommen kann.

Dennoch löst die Masernvirusinfektion eine effiziente und protektive MV-spezifische Immunantwort aus, die zu einer lebenslangen Immunität führt (Panum, 1938).

1.1.1 Das Virus

Die Erkrankung wird durch ein ausschließlich humanpathogenes, negativ-einzelsträngiges, nichtsegmentiertes, umhülltes RNA-Virus hervorgerufen. Es gehört zum Genus Morbillivirus in der Familie der Paramyxoviren.

Das Genom, das etwa eine Länge von ca. 16.000 Nukleotiden hat, kodiert für 6 Strukturproteine (Abbildung 1.1), die zwei transmembranen Glykoproteine F (Fusionsprotein) und H (Hämagglutininprotein), das Matrixprotein (M), das Nukleokapsidprotein (N), das Phosphoprotein (P), als kleiner Untereinheit der RNA-abhängigen RNA-Polymerase, und die große Untereinheit der Polymerase (L).

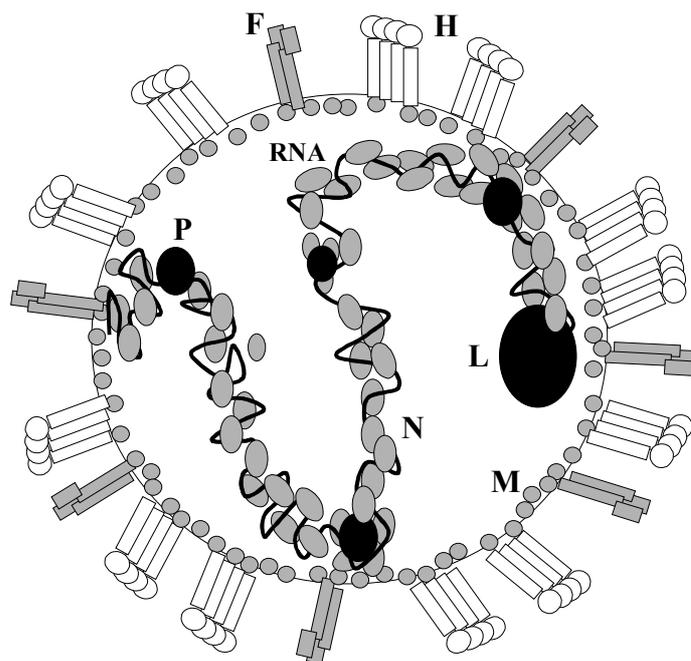


Abbildung 1.1: Schematische Übersicht über den Aufbau des MV Partikels.

Das Masernvirus besteht aus 6 Strukturproteinen: F- Fusionsprotein, H- Hämagglutininprotein, M- Matrixprotein, N- Nukleokapsidprotein und der RNA-Polymerase, die aus dem P- Phosphoprotein und L- der großen Untereinheit zusammengesetzt ist. Nähere Erläuterungen finden sich im Text.

Das Nukleokapsid enthält die virale RNA, die eng mit den N Proteinen assoziiert ist und durch den viralen Polymerasekomplex, bestehend aus dem L Protein und dem Kofaktor P, transkribiert wird. Das P Gen kodiert für weitere Nichtstrukturproteine, das R Protein, das stark basische C Protein, und das V Protein, die für die Replikation *in vitro* nicht benötigt werden, aber, nachgewiesen für das C und das V Protein, eine Rolle für die Pathogenität *in vivo* spielen (Radecke und Billeter, 1996; Schneider et al., 1997; Tober et al., 1998; Liston und Briedis, 1995). Das Nukleokapsid des MV wird von dem stark basischen Matrixprotein umgeben und durch dieses mit einer lipidhaltigen Hüllstruktur verbunden, aus der die glykosilierten Transmembranproteine herausragen. Das H Protein vermittelt die Bindung der Virionen an den zellulären Rezeptor. Daraufhin erfolgt wahrscheinlich eine Konformationsänderung des oligomeren F/H-Komplexes, der fusogene Strukturen des F Proteins exponiert (Joshi et al., 1998; Samuel und Shai, 1995).

Das MV ist monotypisch, d.h. es ist nur ein Serotyp beschrieben. Eine Einteilung in Genotypen basiert auf dem Vergleich der Nukleotidsequenzen, die die C-terminale Region des N Proteins, als variabelster Region des MV Genoms, und das gesamte H Protein kodieren (Rima et al., 1997). Durch das serielle Passagieren auf heterologen Zellen und Geweben konnte ein klinisches Isolat (Edmonston Wildtyp = EDwt) abgeschwächt werden

und dient als Basis für die derzeit verwendeten Vakzine. Infolge der Adaptation an andere Zelltypen zeigen alle von dem Wildtyp-Isolat ausgehenden Vakzinestämme einen erweiterten Zelltropismus mit typischen Mutationen.

1.1.1.1 MV Tropismus und Rezeptorbenutzung

Die Interaktion besonders des MV-H Proteins mit dem zellulären Rezeptor determiniert den Tropismus des Virus (Tatsuo et al., 2000a). Als erster MV-Rezeptor wurde CD46 (auch MCP- *membrane cofactor protein*) identifiziert, dessen physiologische Funktion der Schutz gesunder Zellen gegenüber Komplement-vermittelter Lyse ist und das von jeder humanen kernhaltigen Zelle exprimiert wird (Doerig et al., 1993; Nanche et al. 1993; Schneider-Schaulies 1995b). Die Interaktion des MV-H Proteins mit CD46 reicht für dessen Herunterregulation von der Oberfläche uninfizierter Zellen aus, was zu einer erhöhten Sensitivität dieser Zellen gegenüber aktiviertem Komplement führt (Krantic et al., 1995; Schneider-Schaulies et al., 1995a und 1996). Da unterschiedliche MV Stämme differenziell die CD46 Herunterregulation modulieren können, wurden die für diese biologische Fähigkeit sowie die für die Rezeptorbindung relevanten Aminosäuren identifiziert (Lecoutier et al., 1996, Schneider-Schaulies et al.; 1995a und c; Bartz et al., 1996 und 1998). Doch gleichzeitig lieferten diese Untersuchungen Evidenzen dafür, daß CD46 nicht der einzige MV-Rezeptor sein kann, da CD46 selektiv von attenuierten Masernviren genutzt wird. Klinische Isolate zeigen gegenüber den Vakzinestämmen einen restringierten Zelltropismus. Obwohl eine Arbeitsgruppe postuliert, daß auch klinische Isolate CD46 benutzen können (Manchester et al., 2000), konnten andere für MV Wildtypstämme, die ausschließlich über B Zellen (BJAB und Marmoset B95a Zellen) passagiert wurden, keine Bindung an CD46 und keine Herunterregulation von CD46 nachweisen (Bartz et al., 1996).

Kürzlich konnte CD150 (oder SLAM- *signaling lymphocyte activation molecule*) als zellulärer Rezeptor für MV Vakzine- und Wildtypstämme auf Lymphozyten identifiziert werden (Ono et al., 2001b; Tatsuo et al., 2000b; Hsu et al., 2001, Erlenhöfer et al., 2001 und 2002). CD150 gehört zu der CD2 Untergruppe der Immunglobulin (Ig)-Superfamilie und kann als Selbstligand unter anderem die Kostimulation von T und B Zellen induzieren (Howie et al., 2002). Da allerdings die Expression von CD150 auf aktivierte T Zellen, B Zellen und reife dendritische Zellen (DC) beschränkt ist (Aversa et al., 1997; Punnonen et al., 1997; Sidorenko und Clark, 1993; Ohgimoto et al., 2001), ist es möglich, daß besonders MV Wildtypstämme weitere Moleküle als Rezeptoren nutzen. Monozyten, die

während der akuten Infektion ein natürliches Ziel für MV darstellen, exprimieren kein CD150 (Cocks et al., 1995; Tatsuo et al., 2000b). Auch die bei Immuninkompetenz generalisierte Ausbreitung von MV, die Infektion von epithelialen, endothelialen und neuronalen Zellen suggeriert die Anwesenheit eines weiteren Rezeptors für MV Wildtypviren.

1.1.2 Die Pathogenese der akuten Maserninfektion

Das Virus ist hoch-kontagiös und löst nach kurzer Exposition bei 95% der Infizierten nach einer Inkubationszeit von 10-14 Tagen klinische Symptome aus (Abbildung 1.2). Die Übertragung erfolgt über eine Tröpfcheninfektion. Die Infektion wird in den Epithelzellen des Respirationstraktes etabliert (Riley et al., 1978). Infolge einer polarisierten Freisetzung des Virus aus diesen Zellen (Naim et al., 2000; Maisner et al., 1998) und vermutlich durch Makrophagen (Esolen et al., 1993) oder DC erfolgt eine Ausbreitung in das lokale lymphatische Gewebe. Es schließt sich eine starke Amplifikation des Virus und eine primäre Virämie an, in deren Folge Zellen des retikuloendothelialen Systems fast aller Gewebe infiziert werden (Ruckle und Rogers, 1957). Im Blut liegt das Virus mit Leukozyten, vornehmlich Monozyten, zellassoziiert vor (Salonen et al., 1988).

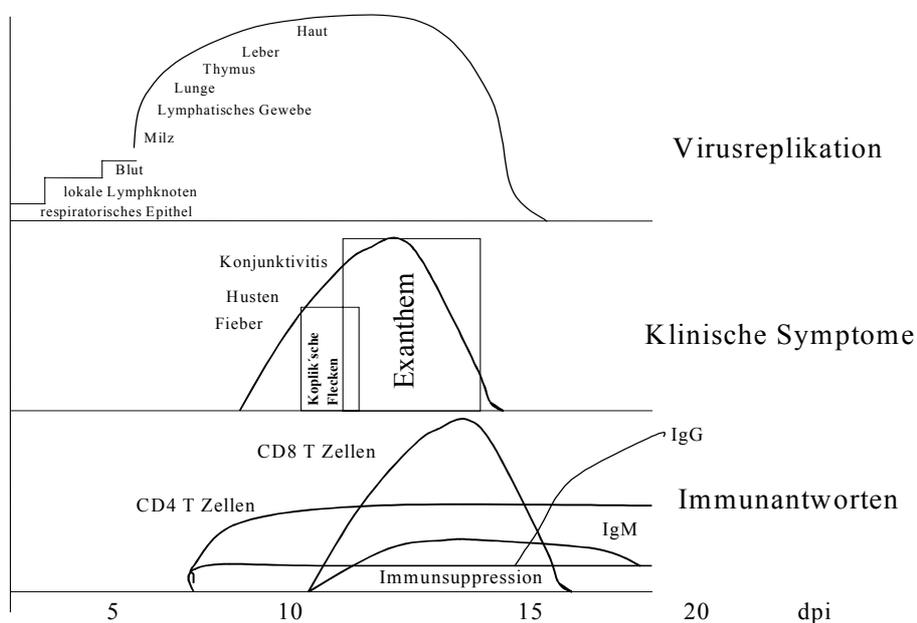


Abbildung 1.2: Schema des zeitlichen Ablaufs der MV-Infektion: Virusreplikation, klinische Symptomatik und Immunantworten.

Infolge einer sekundären Virämie erreicht das Virus Zellen der peripheren Endothelien und der Epithelien. Zu diesem Zeitpunkt, etwa 10 - 14 Tage nach der initialen Infektion, setzt eine starke zelluläre Immunantwort gegen MV ein, die mit dem Beginn der klinischen Symptomatik korreliert (Griffin et al., 1994). Diese beinhaltet Fieber, Konjunktivitis, Schnupfen, Husten und ein Exanthem am Gaumen. Pathognomonisch sind die oft auftretenden Koplik-Flecken (weiße Flecken an der Mundschleimhaut). Der charakteristische makulopapulöse Ausschlag entsteht am 3. - 7. Tag nach dem Auftreten erster Symptome. Er wird durch eine T zellvermittelte Lyse infizierter dermaler Endothelzellen und epidermaler und epithelialer Zellen des Stratum granulosum verursacht (Katz, 1995).

Die Hauptkomplikationen, die die hohe Morbidität der akuten Masern verursachen, umfassen Otitis media, Bronchitis, Pneumonie, Diarrhoen oder die postinfektiöse Enzephalitis, welche bei etwa 10-20 % der Betroffenen tödlich endet und bei 20-30% Residualschäden im zentralen Nervensystem (ZNS) hinterläßt (Clements und Cutts, 1995). In den Entwicklungsländern sind die Komplikationsraten wesentlich höher und Pneumonie und Diarrhöe nehmen durch virale, bakterielle und parasitäre Sekundärinfektionen einen oft tödlichen Verlauf.

1.1.3 Die Immunantwort nach akuten Masern und Impfung

Eine Masernvirusinfektion induziert eine MV-spezifische Immunantwort, die einen lebenslangen Schutz vor einer klinisch apparenten Reinfektion bietet. Bei der Aufrechterhaltung der Immunität spielt das humorale System eine wichtige Rolle. Ob MV-spezifische Antikörper aber auch bei der Beseitigung des Virus relevant sind, ist unklar. Essentiell hierfür ist die zell-vermittelte Immunantwort (Van Binnendijk et al., 1990).

Das Einsetzen der MV-spezifischen Immunantwort ist charakterisiert durch das Auftreten antiviraler Antikörper, virusspezifischer T Zellen und die Infiltration mononukleärer Zellen in infizierte Gewebe. Die Aktivierung der T Zellen korreliert mit der Expression spezifischer Marker und erhöhten Spiegeln löslicher T Zell-Oberflächenmoleküle und Zytokine im Plasma (Griffin et al., 1992, 1990a, 1989), die indikativ für eine T Helferzell-Antwort des Typs 1 (Th1) sind. Da nach dem Abklingen des Exanthems die Plasmawerte für IL-4 ansteigen und für Wochen erhöht bleiben (Griffin und Ward, 1993), scheint eine veränderte T Helferzellpolarisierung in Richtung einer Th2-Antwort zu erfolgen, die die Ausbildung der humoralen Immunität fördert (Griffin, 95; kontrovers: Schnorr et al.,

2001). Die humorale Immunantwort ist charakterisiert durch das Auftreten von IgG₁ und IgG₄ (Mathiesen et al., 1990) gegen die Virusproteine N>H>F>M (Griffin, 1995).

Die humorale Immunantwort gegenüber der Lebendvakzine gleicht der, die durch die natürliche Infektion induziert wird und ist protektiv gegenüber Infektionen mit allen MV Stämmen. Allerdings sind im allgemeinen die Antikörperspiegel niedriger als nach einer akuten Infektion und verschwinden mit der Zeit, weshalb eine zweite Impfung empfohlen wird (Clements und Cutts, 1995; Griffin und Bellini, 1996). Im Gegensatz zu der akuten Infektion scheint die zelluläre Immunantwort nach der Vakzinierung eher einer Th1-Antwort zu entsprechen (Griffin et al., 1994).

1.1.4 Die MV-assoziierte Immunsuppression

Obwohl eine akute MV-Infektion eine starke MV-spezifische, humorale und zelluläre Immunantwort induziert, wird eine transiente, aber klinisch relevante Immunsuppression ausgelöst, welche fatale opportunistische Infektionen ermöglichen kann. Auch nach der Vakzinierung mit attenuiertem MV lassen sich immunologische Veränderungen beobachten, die in ihrer Schwere aber weniger ausgeprägt sind (Hussey et al., 1996).

Koinzident mit dem Einsetzen MV-spezifischer Immunantworten, läßt sich *in vivo* eine starke Lymphopenie nachweisen. Diese betrifft hauptsächlich die T Zellen, ohne das Verhältnis zwischen CD4 und CD8 Zellen zu beeinträchtigen (Arneborn und Biberfeld, 1983; Arneborn et al., 1983). Die Ursachen hierfür könnten zum einen Zellverluste aufgrund infektionsbedingter zytopathischer Effekte sein. Noch Wochen nach dem Exanthem lassen sich in mitogenstimulierten Lymphozyten infektiöses Virus, virale Antigene und RNA nachweisen (Forthal et al., 1992; Schneider-Schaulies et al., 1991). Zum anderen könnten erhöhte Apoptoseraten der Lymphozyten (Addae et al., 1995; Okada et al., 2000) oder ein verändertes Migrationsverhalten aktivierter T Zellen für die Lymphopenie verantwortlich sein (Nanan et al., 1999).

Das auffälligste Merkmal der MV-vermittelten Immunsuppression ist, daß die Proliferation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) von Patienten oder geimpften Personen nach *ex vivo* Stimulation mit Mitogenen und Antigenen deutlich herabgesetzt ist (Borysiewicz et al., 1985). Diesen *ex vivo* Daten entsprechen Befunde, daß in dieser Zeit die Tuberkulinreaktion negativ ist (von Pirquet, 1908) und es zu einer Reaktivierung von Tuberkulose (Tamashiro et al., 1987) und latenter Herpesvirusinfektionen (Black, 1987) kommen kann. Die Veränderungen der T Zellantworten können auch auf dem veränderten

Zytokinprofil basieren, das in Richtung Th2 polarisiert zu sein scheint (Griffin und Ward, 1993). Diese Theorie wird dadurch bekräftigt, daß antigenpräsentierende Zellen (APC) *ex vivo* und *in vitro* eine verringerte Produktion von Interleukin (IL-) 12 aufweisen (Atabani et al., 2001; Karp et al., 1996). Da man im Blut von Patienten hauptsächlich MV-infizierte Monozyten nachweisen kann (Esolen et al., 1993), die vermindert IL-1 und Tumornekrose Faktor (TNF) α produzieren, wäre es möglich, daß infolge gestörter APC Funktionen (Zytokinproduktion und Antigenpräsentation) eine adäquate Immunaktivierung ausbleibt (Griffin, 1995; Martilla et al., 2001). *In vitro* generierte Ergebnisse belegen, daß eine Interferenz von MV mit den Funktionen von APC für die Immunsuppression ursächlich sein könnte. Infizierte Monozyten präsentieren effizient MV Antigene, nicht aber andere Antigene (Leopardi et al., 1993) und zeigen *ex vivo* und *in vitro* eine veränderte Zytokinfreisetzung (Ward et al., 1991; Leopardi et al., 1992; Griffin et al., 1986). Da aber Monozyten nicht in der Lage sind, naive T Zellen zu aktivieren, können die Veränderungen ihrer Funktionen keine primären Antworten modulieren. Daher scheinen eher die Funktionen von DC das Ziel für die immunsuppressiven Effekte von MV zu sein. Möglicherweise beinhalten die Störungen der DC einen abnormalen Reifungsprozeß (Servet-Delprat et al., 2000), den Verlust allostimulatorischer Fähigkeiten (Grosjean et al., 1997; Schnorr et al., 1997; Klagge et al., 2000), eine veränderte Zytokinfreisetzung und die Depletion der DC und T Zellen durch Fusion infizierter Zellen (Steineur et al., 1998; Klagge, 2001) oder Apoptose (Fugier-Vivier et al., 1997; Servet-Delprat et al., 2000; Vidalain et al., 2000).

Über eine Interferenz von MV mit APC hinaus, kann eine MV Infektion auch direkt die Funktion und Proliferation von Lymphozyten behindern. T und B Zellen sind *in vitro* nach einer Stimulation mit Mitogenen gut mit MV infizierbar. Diese Zellen zeigen eine herabgesetzte Proliferation (McChesney und Oldstone, 1987; McChesney et al., 1987; McChesney et al., 1997), die auf einem Arrest in der Zellzyklusprogression zu beruhen scheint (McChesney et al., 1988; Naniche et al., 1999). Da die Frequenz MV-infizierter PBMC sehr niedrig ist, die *ex vivo* zu beobachtende Proliferationshemmung aber infizierte und nicht-infizierte Zellen betrifft, scheinen die funktionellen Störungen nicht ausschließlich auf einer Infektion der PBMC zu basieren, sondern auch durch indirekte Mechanismen vermittelt zu werden. Zunächst wird ein löslicher immunsuppressiver Faktor postuliert. Dieser wird sowohl von MV-infizierten B und T Zellen produziert und hemmt die Proliferation nicht-infizierter Zellen. (Fujinami et al., 1998; Sun et al., 1998). Andere

Untersuchungen weisen jedoch auf eine kontaktvermittelte Immunsuppression hin. Der Kontakt mit infizierten Zellen generiert ein dominant-inhibitorisches Signal, das die stimulationsabhängige Proliferation kontaktierter Zellen inhibiert (Sanchez-Lanier et al., 1988; Yanagi et al., 1992). Bereits der kurze Kontakt mit dem MV F/H Komplex ist ausreichend, dieses inhibitorische Signal zu übertragen (Schlender et al., 1996). Die kontaktierte Zelle zeigt eine Reihe an Störungen: Es wird ein Arrest vom Übergang der G0/G1-Phase in die S-Phase des Zellzyklus induziert, der durch eine Deregulation der Zellzyklusproteine charakterisiert ist (Schnorr et al., 1997; Engelking et al., 1999; McChesney et al., 1988; Nanche et al., 1999). Weiterhin ergibt sich, daß durch den Kontakt von MV mit T Zellen eine IL-2-abhängige Aktivierung der Proteinkinase B/Akt inhibiert ist. Die Aktivierung von Akt ist essentiell für die Proliferation einer Zelle, so daß die Inhibition der Kinase-Aktivität für eine Inhibition der Proliferation die Voraussetzung sein könnte (Avota et al., 2001).

1.2 Die Bedeutung der unspezifischen Immunität für die Infektabwehr

Während einer natürlichen Maserninfektion gibt es Evidenzen für eine starke MV-spezifische Aktivierung des Immunsystems, die den immunologischen Funktionsstörungen vorangeht. Diese frühen Antworten beinhalten die Spontanproliferationen mononukleärer Zellen (Ward et al., 1990), lösliche T Zellantigene (IL-2R, CD4, CD8 (Griffin et al., 1989; Griffin und Ward, 1993) und erhöhte Plasmaspiegel von Interferon (IFN) γ und Neopterin (Griffin et al., 1990). Da diese Antworten aber bereits auf eine Aktivierung des spezifischen, erworbenen Immunsystems hinweisen, fehlen Daten, die die Lücke, zwischen der ersten Erkennung von MV als infektiöses Agens durch das angeborene Immunsystem und die nachfolgende Aktivierung des erworbenen Immunantworten, schließen.

Das Immunsystem verfügt neben physiologischen Barrieren, wie der Haut, dem Mukus, dem Epithel, der Magensäure und der Galle, die den Eintritt eines Pathogens behindern, auch über zelluläre Abwehrmechanismen, die die Etablierung von Infektionen beschränken. Durch Chemokine und proinflammatorische Zytokine werden phagozytierende Zellen (Granulozyten, Makrophagen, DC und natürliche Killer- (NK) Zellen an den Ort einer Entzündung gelockt und aktiviert. Besonders die Infektion mit RNA-Viren induziert die Freisetzung von Typ I IFN, die einen antiviralen Status in nicht infizierten Zellen etablieren können (Stark et al., 1998). Allerdings gibt es keine Evidenzen, daß diese unspezifischen Effektoren eine Rolle bei der Bekämpfung der MV

Infektion spielen: Die Plasmaspiegel von Typ I IFN sind nicht deutlich erhöht (Crespi et al., 1988; Shiozawa et al., 1988; Tilles et al., 1988), und es gibt widersprüchliche Aussagen bezüglich der Aktivität von NK Zellen (gehemmt: Griffin et al., 1990; aktiviert: Okada et al., 2001). Daher stellt sich die Frage, welche Zellen bei der MV spezifischen Aktivierung der Immunantwort beteiligt sind. Möglicherweise handelt es sich dabei um $\gamma\delta$ T Zellen und APC, die die Toll-ähnlichen Rezeptoren exprimieren, die bei verschiedenen viralen Infektionen als Effektoren der angeborenen Immunantwort antigenspezifische Reaktionen modulieren können.

1.2.1 $\gamma\delta$ T Zellen und ihre Rolle in der Immunantwort

Der weitaus größte Teil der T Zellen ist thymisch gereift, Klasse I oder Klasse II MHC restringiert und exprimiert den $\alpha\beta$ T Zellrezeptor (TCR). Neben diesen Zellen, die die Träger der adaptiven Immunantwort sind, existieren die durch die Expression des $\gamma\delta$ TCR definierten $\gamma\delta$ T Zellen, die nicht MHC restringiert sind (Abbildung 1.3). Diese Zellen sind vor allem in die frühe Primärantwort und in die Immunmodulation involviert (Carding und Egan, 2002). Im Gegensatz zu den $\alpha\beta$ T Zellen gibt es nur wenige variable (V) Gensegmente, um funktionelle γ und δ Ketten zu formen. Es gibt 6 exprimierte $V\gamma$ Gene ($V\gamma 2, 3, 4, 5, 8$ und 9) und eine vergleichbar kleine Anzahl $V\delta$ Gene. Dennoch wird durch Genrearrangements und die Translation in allen 3 möglichen Leserahmen eine große Diversität erreicht. Die wenigen verfügbaren $V\gamma$ und $V\delta$ Gene werden nicht zufällig von den $\gamma\delta$ T Zellen in verschiedenen anatomischen Lagen genutzt. Daher postuliert man eine wichtige Funktion in der lokalen Immunüberwachung. Im peripheren Blut von Erwachsenen findet man eine klare Dominanz von bis zu 95% an $\gamma\delta$ T Zellen, die $V\gamma 9$ in Kombination mit $V\delta 2$ aufweisen. Im Blut von Neugeborenen dominiert diese Klasse nicht, allerdings expandieren sie graduell, was dafür spricht, daß eine Exposition gegenüber Umwelt-, oder bakteriellen Antigenen das $\gamma\delta$ TCR Repertoire während der postnatalen Entwicklung formt (Morita et al., 1994; Hayday, 2000). Der nachfolgend häufigste Subtyp, bis zu 10-30 % der $\gamma\delta$ T Zellen, besteht aus $V\delta 1$ mit verschiedenen $V\gamma$ Elementen. Die primäre Lokalisation dieser Zellen ist das intraepitheliale T Zellkompartiment des Intestinums.

Sowohl im aktivierten als auch im ruhenden Zustand gleichen sich $\gamma\delta$ und $\alpha\beta$ T Zellen phänotypisch und funktionell. Abgesehen von der Expression von CD4 und CD8 besitzen

$\gamma\delta$ T Zellen die meisten T zellspezifischen Gene. Sie produzieren ebenfalls die zytolytischen Effektoren Perforine, Granulysin und Fas/FasL und sezernieren Zytokine: $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IFN}\gamma$ (Kabelitz, 1999; Kabelitz et al., 1999; Lang et al., 1995; Poccia et al., 1999b, Tsukaguchi et al., 1995), die CC-Chemokine MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES, Lymphotaktin, (Cipriani et al., 2000; Poccia et al., 1999a) und IL-10 (Szczepanik et al., 1998). Daher sind sie in der Lage, zytotoxisch zu agieren und T und B zellvermittelte Antworten zu aktivieren (Kabelitz et al., 2000). Sie können die Zeitspanne zwischen dem Erkennen eines Pathogens und dem Einsetzen antigenspezifischer Antworten überbrücken und an der Amplifikation der erworbenen Immunantwort partizipieren (Sciammas und Bluestone, 1999).

1.2.1.1 Die „Antigenerkennung“ von $\gamma\delta$ T Zellen

$\gamma\delta$ T Zellen unterscheiden sich von konventionellen T Zellen in der Art der Antigenerkennung: konventionell polymorphe MHC Antigene werden selten erkannt (Haas 1993). Dieses steht in Einklang mit der fehlenden Expression der Oberflächenmoleküle CD4 und CD8 der meisten $\gamma\delta$ T Zellen. $\gamma\delta$ T Zellen erkennen eine strukturelle Vielfalt von Liganden, die sich grob in nichtklassische MHC Klasse Ia/Ib- und II- artige Moleküle (Bonneville et al., 1989; Matis et al., 1987; Spada et al., 2000; Mami-Chouaib et al., 1990), unter Stressbedingungen exprimierte Moleküle (Groh et al., 1998; Porcelli et al., 1989; Haregewoin et al., 1989; Holoshitz et al., 1989; Haas, 1993; Johnson et al., 1992; Rust et al., 1990; Fikri et al., 2001) und Phosphoantigene untergliedern lassen. Als Phosphoantigene werden nichtproteinartige, phosphatase-sensitive Substanzen mit niedrigem Molekulargewicht zusammengefaßt. Verschiedene Arten dieser phosphorylierten Liganden konnten aus Mykobakterien isoliert werden, z.B. phosphorylierte Nukleotid-enthaltende Verbindungen (TUBag) oder Isoprenoid-Pyrophosphate wie Isopentenyl-Pyrophosphat (IPP) (Janis et al., 1989; O'Brien et al., 1989). Diese Substanzen induzieren *in vitro* hocheffizient und selektiv die Expansion der humanen $\gamma\delta$ T Zellen und lassen sich für eine gezielte Expansion dieser Zellen nutzen (Wesch et al., 1997).

Da die Antigenerkennung kaum mit den konventionellen T Zellen überlappt, ist es wahrscheinlich, daß $\gamma\delta$ T Zellen eine zu diesen komplementäre Funktion in der Immunantwort übernehmen.

Es gibt verschiedene Berichte über die Notwendigkeit akzessorischer Zellen bei der Antigenerkennung von $\gamma\delta$ Zellen. Zum Teil scheint der Kontakt zwischen $\gamma\delta$ T Zellen alleine auszureichen, ihre Expansion zu bewirken (Morita et al., 1995; Tanaka et al., 1996; Hayday, 2000). Allerdings steigern verschiedene kostimulatorische Moleküle wie CD2 (Wang 2000), CD7, LFA-1, CD50, CD69 (Takamizawa et al., 1995; Carrel et al., 1991; Hernández-Caselles et al., 1993; González-Amaro et al., 2000), CD28 und CD40L (Ramsdell et al., 1994), die von T Zellen, B Zellen oder Zellen der myelomonozytären Linie exprimiert werden, die Reaktivität von $\gamma\delta$ T Zellen gegenüber mykobakteriellen Antigenen.

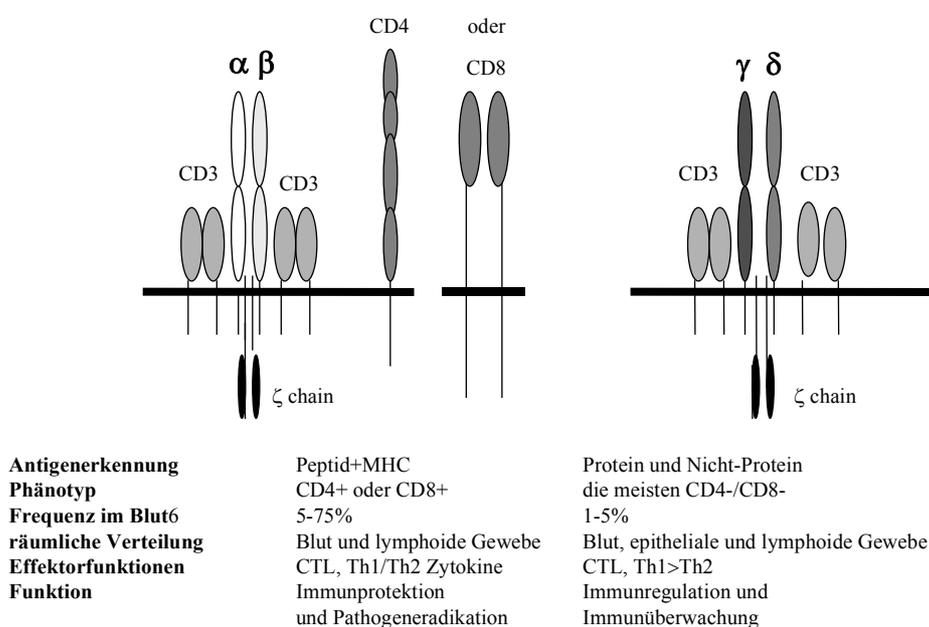


Abbildung 1.3: Unterschiede zwischen $\alpha\beta$ und $\gamma\delta$ T Zellen

Die Effizienz der Liganderkennung und Aktivierung der $\gamma\delta$ T Zellen kann durch inhibitorische Rezeptoren wie CD94/NKG2A (Fisch et al., 1997; Boullier et al., 1998) oder Zytokine moduliert werden. Während IL-12 (Marx et al., 1997), TGF β (Cipriani et al., 2000), TNF α (Lahn et al., 1998) und IL-15 (García et al., 1998) die Antwort der $\gamma\delta$ T Zellen steigern, reguliert IL-10 die Aktivierung herunter (Pechhold et al., 1994). IL-4 und IFN γ scheinen ohne Einfluß auf die IPP-vermittelte Expansion von $\gamma\delta$ T Zellen (Cipriani et al., 2000).

1.2.1.2 Die Rolle von $\gamma\delta$ T Zellen bei Erkrankungen

Im Menschen weisen starke Expansionen von $\gamma\delta$ T Zellen während verschiedenster Infektionen auf ihre Bedeutung hin. Dabei scheinen die $\gamma\delta$ T Zellsubtypen unterschiedliche Spezialitäten bezüglich der Antigenerkennung entwickelt zu haben: Während Infektionen mit Mykobakterien speziell den V γ 9 δ 2 Subtyp aktivieren, induzieren andere Bakterien wie Borrelien die Expansion von V δ 1 Zellen (Vincent et al., 1996; 1998).

Auch im Verlauf einiger viraler Infektionen finden sich im Blut erhöhte $\gamma\delta$ T Zellzahlen und es erfolgt die Zunahme und Migration von $\gamma\delta$ T Zellen zu Orten viraler Infektion. Im humanen System ist dies unter anderem für das humane Immundefizienzvirus 1 (HIV-1) (Autran et al., 1989; de Maria et al., 1992; de Paoli et al., 1991), das Zytomegalievirus (CMV) (Lafarge et al., 2001), das Epstein-Barr Virus (EBV) (de Paoli et al., 1990) und das Herpes simplex Virus 1 (HSV-1) (Bukowski et al., 1994; Maccario et al., 1993) beschrieben. Im murinen System gibt es Evidenzen einer Beteiligung von $\gamma\delta$ T Zellen bei Infektionen mit Influenzaviren (Carding et al., 1990), Sendaiviren (Hou et al., 1992; Ogasawara et al., 1994), Vacciniaviren (Welsh et al., 1997), Coxsackieviren (Huber et al., 1992), dem Vesikulären Stomatitis Virus (VSV) (Maloy et al., 1998) und HSV-1 (Liu et al., 1996).

Im humanen System ist die exakte Funktion $\gamma\delta$ T Zellen in der Immunantwort noch unbekannt. In Mäusen, denen die CD4 und CD8 Zellen fehlen, spielen $\gamma\delta$ T Zellen bei der Bekämpfung zahlreicher Pathogene und einer Reihe immunologischer Fehlfunktionen eine modulierende Rolle.

1.2.2 Die Toll-ähnlichen Rezeptoren

Bei Toll und den Toll-ähnlichen Rezeptoren (TLRs) handelt es sich um Typ I Transmembranproteine. Toll wurde zunächst in *Drosophila* als ein Molekül identifiziert, das eine Rolle bei der Embryonalentwicklung spielt. Erst später bemerkte man seine Funktion in der Abwehr gegen Pilze. In Säugern fanden sich homologe Moleküle, die Toll-ähnlichen Rezeptoren (Rock et al., 1997).

Seit der Entdeckung der TLRs weiß man, daß das angeborene Immunsystem hoch spezifisch konservierte Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMP) erkennen kann (Akira et al., 2001; Medzhitov, 2001). Basierend auf einer Homologie der cytoplasmatischen Domänen ähneln die TLRs den IL-1 Rezeptoren (IL-1R, O'Neill und

Dinarello, 2000). Die extrazellulären Domänen unterscheiden sich jedoch signifikant. In Säugern differenziert man mittlerweile 10 TLRs. Diese werden unterschiedlich auf APC exprimiert (Tabelle 1.1) und können zwischen pathogenen Mustern unterscheiden. Die Expressionsdichte, die im allgemeinen sehr gering ist, kann durch Stimuli (Flo et al., 2001; Hajjar et al., 2001; Hornung et al., 2002) oder die Reifung und Differenzierung von Zellen (Visintin et al., 2001; Kadowaki et al., 2001) modifiziert werden.

1.2.2.1 TLR-Agonisten

Lipopolysaccharid (LPS), als Hauptbestandteil der Zellmembran gramnegativer Bakterien war der erste identifizierte TLR Agonist. Es war bereits lange bekannt, daß LPS im Komplex mit einem LPS-bindenden Molekül (LBP) mit CD14 interagiert. Da CD14 jedoch keine intrazelluläre Domäne besitzt, die Signale vermitteln kann, wurde die Präsenz eines weiteren Rezeptors postuliert. Mithilfe eines Mausstammes (C3H/HeJ), der hyporesponsiv gegenüber LPS ist, wurde TLR4 als Molekül identifiziert, das LPS Signale vermittelt (Janeway und Medzhitov, 2002). Später wurde ein weiteres Molekül, MD-2, entdeckt, das ebenfalls physisch mit TLR4 interagiert und für die Erkennung von LPS benötigt wird (Schromm et al, 2001; da Silva Correia und Ulevitch, 2002; Shimazu et al., 1999). Im Laufe der Zeit wurden neben LPS weitere Substanzen entdeckt, die TLR4-abhängig Zellen des Immunsystems aktivieren (Tabelle 1.1).

Weiterhin gut charakterisiert ist TLR2, der über das breiteste Erkennungsspektrum bakterieller Strukturen verfügt (Tabelle 1.1). Der Schlüssel für die spezifische Erkennung dieses breiten Repertoires an Ligandspezifitäten scheint die kooperative Nutzung verschiedener TLR-Heterodimere und oder/ Korezeptoren zu sein (Janeway und Medzhitov, 2002). So ist eine Heterodimerisierung mit TLR1 oder TLR6, oder die Komplexbildung mit CD14 für die Erkennung verschiedener bakterieller Produkte notwendig (Wyllie et al., 2000).

Auch für die meisten der übrigen TLRs sind mittlerweile Agonisten identifiziert worden. Sie reichen von bakteriellen Strukturen, über bakterienspezifische DNA-Motive (CpG DNA) zu endogenen Substanzen, wie Hitzeschock- Proteinen (HSPs) (Tabelle 1.1).

Tabelle 1.1: Die Expression der verschiedenen TLRs und ihre Agonisten

	Vorkommen (RNA)	Agonisten
TLR1 (mit TLR2)	Monozyten, myeloide DC, B Zellen, Neutrophile und NK Zellen	Bakterielle Produkte
TLR2 (mit CD14 oder TLRx)	Monozyten, Neutrophile, myeloide DC, MoDC, Endothelzellen	Lipoproteine, Peptidoglykan grampositiver Bakterien, Lipoarabinomannan, Zymosan, Mykobakterien und mykobakterielle Produkte, LPS von grampositiven oder nichtenterischen Bakterien, Pam ₃ CSK ₄ , HSP60, Fragmente nekrotischer Zellen
TLR3	Unreife myeloide DC	Poly(I:C) (virale ds RNA)
TLR4	Endothelzellen, Monozyten, B Zellen, Neutrophile, myeloide DC	u.a. LPS gramnegativer Bakterien, Taxol (Pflanzen) RSV-F, MMTV-env, HSP60, Fibronektin
TLR5	Monozyten, myeloide DC	Flagellin
TLR6 (mit TLR2)	Monozyten, myeloide und plasmacytoide DC	MALP-2, Peptidoglykan, Zymosan, Pam ₃ CSK ₄
TLR7	plasmacytoide DC	Imidazoquinoline: Imiquimod und R-848
TLR8	Monozyten, myeloide DC	
TLR9	Monozyten, plasmacytoide DC	CpG DNA
TLR10	unreife DC	

Zur Übersicht: Lien und Ingalls, 2002; Aderem und Ulevitch, 2000; Means et al., 2000a und b; Akira et al., 2001; Janeway und Medzhitov, 2002.

Es ist seit kurzem bekannt, daß auch virale Genprodukte die Aktivität von TLRs regulieren können. Das Fusionsprotein des respiratorischen Syncytialvirus (RSV) aktiviert Zellen über TLR4 und CD14 (Kurt-Jones et al., 2000). Auch die Hüllproteine (*env*) von murinen Retroviren (MMTV) aktivieren B Zellen über TLR4 (Rassa et al., 2002). Extrazelluläre virale doppelsträngige RNA kann als TLR3 Agonist fungieren. Im Gegensatz dazu haben Pockenviren Strategien entwickelt, dem angeborenen Immunsystem zu entgehen. Sie verfügen über zwei Leseraster A46R und A52R, die der TIR-Domäne (siehe folgender Absatz) in ihrer Aminosäuresequenz gleichen, und die IL-1-, IL-18- und TLR4- vermittelten Signalwege hemmen.

1.2.2.2 Die Signalwege

Die TLR- und IL-1R- Familie besitzt eine homologe cytoplasmatische Domäne, die TIR genannt wird. Das Adaptormolekül MyD88 (*myeloid differentiation protein*) assoziiert mit den TLRs und IL-1R durch die TIR-Domäne (Abbildung 1.4). Zusätzlich besitzt MyD88 eine *death*-Domäne, die die Interaktion mit der IL-1Rezeptor-assoziierten Kinase (IRAK) vermittelt. Bei der Rekrutierung von IRAK ist ein weiteres Molekül, das Toll-interagierendes Protein (TOLLIP) genannt wird, involviert (Zhang und Ghosh, 2002). Die Phosphorylierung von IRAK rekrutiert den TNF Rezeptor-assoziierten Faktor 6 (TRAF6) (Muzio et al., 1998; Shuto et al., 2001). Weitere Moleküle, die TGF β -assoziierte Kinase 1 (TAK-1) und zwei TAK-1-bindende Moleküle (TAB1/2) sind an den Signalwegen beteiligt (Irie et al., 2000). Der Komplex aus TRAF6, TAK1 und TAB1/2 phosphoryliert den NF κ B-inhibierenden Faktor I κ B und ermöglicht damit, daß NF κ B in den Kern wandern kann. Infolge dessen wird die Transkription verschiedenster Gene aktiviert: Zytokine wie TNF α , IL-1, IL-6, G-CSF, GM-CSF, M-CSF, Chemokine wie IL-8, MCP-1, Rezeptoren wie IL-2R α , Transkriptionsfaktoren wie p50, c-Rel, Egr-1, IRF-1, I κ B α und andere Moleküle wie iNOS (Guha und Mackmann, 2001; Nau et al., 2002).

Ein weiteres Molekül, ECSIT (*evolutionary conserved signaling intermediate in Toll pathway* Kopp et al., 1999) bildet die Brücke von TRAF6 zu den MAP-Kinase-Wegen. (Ardesha et al., 2000; Guha et al., 2001).

Durch das Molekül TIRAP (*TIR domain containing adaptor protein*) kann ein MyD88-unabhängiger Weg beschriftet werden, der nur von TLR4 genutzt wird (Horng et al., 2001; Kaisho und Akira, 2001; Kaisho et al., 2001). Aber auch TLR2 besitzt eine Parallelroute, die Rac1, als Mitglied der Rho-GTPasen, und die Proteinkinase Akt beinhaltet. Weitere

Befunde implizieren, daß die p85 regulatorische Unreinheit der Phosphatidylinositol-3 Kinase (PI3K) direkt mit der intrazellulären Domäne von TLR2 assoziiert und Akt aktiviert (Arbibe et al., 2000).

Die Diversität der TLR assoziierten Signalwege ist verantwortlich dafür, daß z.B. Zytokine differentiell durch TLR Agonisten induziert werden. So gibt es keine Unterschiede für $\text{TNF}\alpha$, IL-1, IL-6, wohingegen nur TLR4 Agonisten Typ 1 IFN (Hirschfeld et al., 2001; Jones et al., 2001), $\text{IFN}\gamma$ und IL-12p70 induzieren. TLR2 Agonisten scheinen eher eine Th2 Antwort, d.h. die Produktion von IL-13, IL-5 und IL-10 zu fördern (Pulendran et al., 2001a und b).

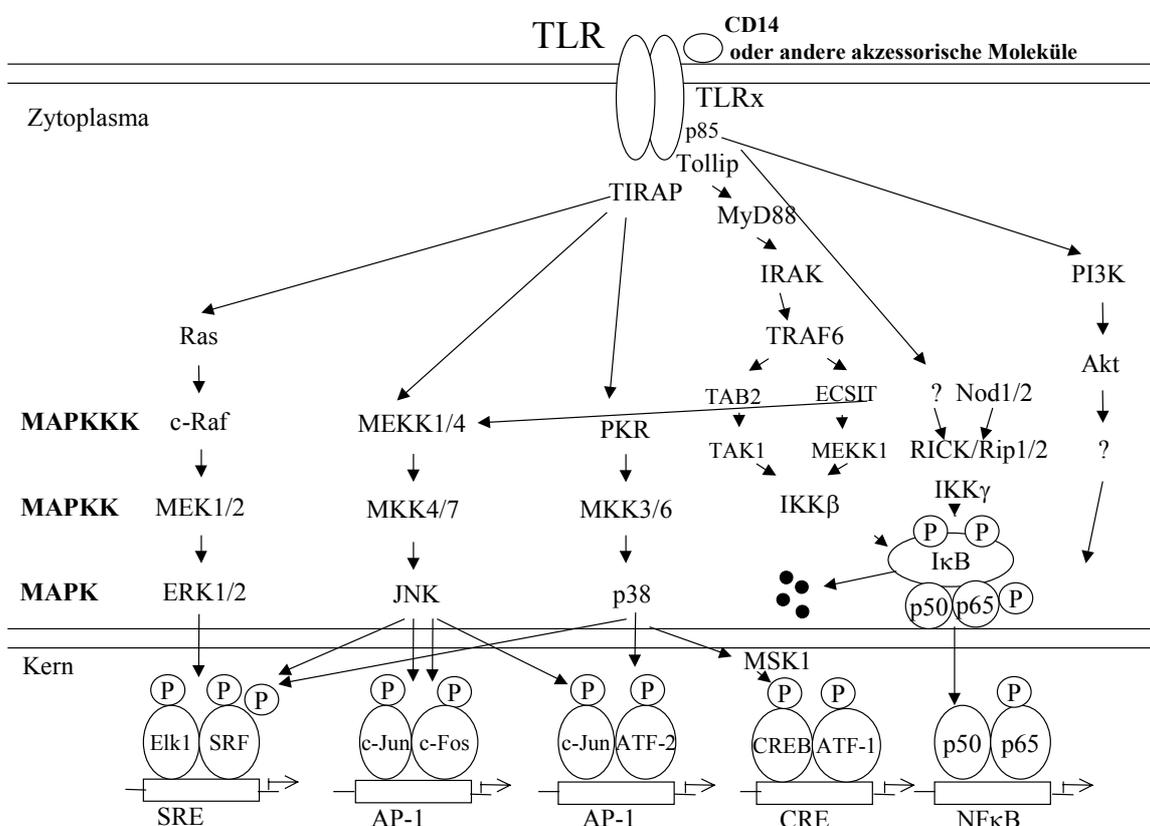


Abbildung 1.4: Signalwege nach der Aktivierung von TLRs

TLR Agonisten aktivieren verschiedene Signalwege und Transkriptionsfaktoren. Der TLR Agonist interagiert mit akzessorischen Molekülen wie CD14 und einem TLR Homo- oder Heterodimer. Dies aktiviert verschiedene Signalwege (von den meisten TLRs wird der MyD88-abhängige Weg genutzt), die direkt oder indirekt eine Reihe von Transkriptionsfaktoren phosphorylieren und aktivieren. Weitere Erläuterungen finden sich im Text. (Abbildung modifiziert nach Guha et al., 2000)

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Obwohl während einer Infektion mit MV eine effiziente virusspezifische Immunreaktion ausgelöst wird, kann eine MV- assoziierte Leukopenie und eine Störung der zellulären Immunantworten beobachtet werden. Von dieser Immunsuppression sind am stärksten T Zell-vermittelte Antworten betroffen, so daß PBMC von MV-Patienten ex vivo weder auf Mitogene noch auf Allogene oder *Recall*-Antigene antworten können. In dem Modell der Kontakt-vermittelten Immunsuppression führt die Bindung an die MV Glykoproteine F und H zu einem Signal in den kontaktierten lymphoiden oder myeloiden Zellen, das die Proliferation der Zellen hemmt (Schlender et al., 1996). Bislang konnte *in vitro* keine Interferenz mit dem negativen Proliferationssignal von MV nachgewiesen werden. Die vorliegende Arbeit sollte unter der Verwendung eines T Zellsubtyps, der $\gamma\delta$ T Zellen untersuchen, ob diese Zellen eine andere Permissivität für die MV-vermittelte Immunsuppressivität besitzen. Über einen möglichen Einfluß einer MV-Infektion auf diese Zellen, die aufgrund ihrer Antigenerkennung als Mediatoren der angeborenen Immunantwort angesehen werden, ist nichts bekannt. Falls die Expansion von $\gamma\delta$ T Zellen eine andere Sensitivität gegenüber den die Proliferation-hemmenden MV Glykoproteinen aufweisen, sollen die Ursachen für die Unterschiede evaluiert werden.

Der zweite Aspekt der vorliegenden Arbeit beschäftigt sich mit einer möglichen Aktivierung der angeborenen Immunantwort durch eine Interaktion von MV mit den Toll-ähnlichen Rezeptoren. Nachdem bereits zwei virale Proteine bekannt sind, die als TLR4-Agonisten fungieren (Kurt-Jones et al., 2000; Rassa et al., 2002), wäre es denkbar, daß auch MV TLR-abhängig eine Aktivierung von APC induzieren könnte. Dies wäre ein erstes Indiz dafür, wie MV eine spezifische Immunantwort induzieren könnte.

2 Material

2.1 Zellkultur

2.1.1 Zelllinien

Die Zelllinien, die in Tabelle 2.1 aufgeführt sind, waren im Institut verfügbar und wurden wie beschrieben kultiviert.

Tabelle 2.1: Verwendete Zelllinien, deren Ursprung und Kulturparameter

Zelllinie	Ursprung	Medium	Passage
Vero	Afrikanische Grüne Meerkatze, Nierenfibroblasten	MEM, 5% FCS	adhärent 2* wöchentlich mit ATV, 1:10
BJAB	Human, lymphoblastoide B Lymphozyten	RPMI, 10% FCS	Suspensionskultur, 2*wöchentlich 1:10
B95a	Krallenaaffe, Subklon der EBV-transformierten B-Zelllinie B95, epithelial	RPMI, 5% FCS	semiadhärent 2* wöchentlich mit ATV, 1:10
Wil-2	Human, lymphoblastoide B Lymphozyten	RPMI, 10% FCS	Suspensionskultur, 2*wöchentlich 1:10
8866	Human, lymphoblastoide B Lymphozyten	RPMI, 10% FCS	Suspensionskultur, 2*wöchentlich 1:10
Molt-4	Human, T Lymphoblasten	RPMI, 10% FCS	Suspensionskultur, 2*wöchentlich 1:10
U-937	Human, Makrophagen; Histozyten	RPMI, 10% FCS	Suspensionskultur, 2*wöchentlich 1:10
THP-1	Human, Monozyten	RPMI, 10% FCS	Suspensionskultur, 2*wöchentlich, 1:10
HL-60	Human, Promyelozyten	RPMI, 10% FCS	Suspensionskultur, 2*wöchentlich, 1:10

Die Zelllinien BJAB, 8866, Wil-2, Molt-4 und U937 lagen parallel auch als persistierend mit dem MV-ED Vakzinestamm infizierte Zellen (BJAB pED, 8866 pED, Wil-2 pED, Molt-4 pED, U937 pED) vor, die in gleicher Weise wie die Ursprungszellen kultiviert wurden. Nur BJAB Zellen waren mit dem WTF MV-Wildtypvirusstamm persistierend infiziert (BJAB pWTF).

Die CHO Zelllinien (Tabelle 2.2) wurden uns freundlicherweise von Dr. Egil Lien zur Verfügung gestellt. Basierend auf der Zelllinie CHO-K1 wurden verschiedene stabil

transfizierte Linien hergestellt, die stabil mit einem CD25-Reporter gen (ELAM.tac) transfiziert worden waren, das unter der Kontrolle eines NFκB-abhängigen Promotors steht. Während die CHO-Zellen endogen zwar ein funktionelles Hamster TLR4 Molekül exprimieren, kann das TLR2 Molekül aufgrund eines funktionellen Defektes keine Signalwege aktivieren. Um TLR-spezifische Signalwege analysieren zu können, wurden humane oder murine TLR Orthologe in diesen Zellen transgen überexprimiert (Tabelle 2.2 und Medvedev et al., 2001). Da für viele bekannte TLR Agonisten die Anwesenheit von CD14 als Korezeptor für eine NFκB-Aktivierung essentiell ist, standen auch Zellen mit und ohne stabil exprimiertem CD14 zur Verfügung.

Je nach verwendetem Plasmid wurden die Zellen unter dem Einfluß verschiedener Selektionsantibiotika kultiviert. Als Medium wurde Ham's F12 mit einem FCS-Anteil von 10% und Penicillin/Streptomycin als Antibiotika benutzt. In dem Elam.tac Reporterplasmid ist ein Resistenzgen für Hygromycin B integriert, so daß bei der Kultur aller Zellen, die stabil mit diesem Plasmid transfiziert worden waren, dem Medium 400U/ml Hygromycin B beigefügt wurden. Sowohl die für TLR2 als auch TLR4 codierenden Plasmide tragen eine Geneticin (G418) Resistenz, folglich wurden dem Kulturmedium 0,5mg/ml G418 zugesetzt. Bei den Doppeltransfektanten enthielt das Medium beide Selektionsantibiotika in den angegebenen Konzentrationen.

Die adhärennten Zellen wurden zweimal wöchentlich mit Trypsin/EDTA abgelöst und im Verhältnis 1:10 bis 1:20 verdünnt ausgesät.

Tabelle 2.2: CHO Transfektanten

	Stabile Expression von		
	ELAM.tac	CD14, human	TLR2 bzw. TLR4
EL1	+	ohne	ohne
3E10	+	+	ohne
3E10 hTLR2	+	+	TLR2, human
3E10 hTLR4	+	+	TLR4, human
EL1 mTLR2	+	ohne	TLR2, murin
3E10 mTLR2	+	+	TLR2, murin
CHO hTLR2	ohne	ohne	TLR2, human

2.1.2 Primäre Zellen

PBMC wurden aus Lymphozytenkonzentraten („Buffy Coats“) aufgereinigt, die von der Abteilung für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie, Universitätsklinik Würzburg, zur Verfügung gestellt wurden.

Makrophagen wurden aus dem Peritoneum von Thioglycollat-behandelten Mäusen isoliert (Peritoneal-Makrophagen).

2.1.3 Medien und Zusätze

AET (2-Aminoethylisothiuroniumbromidhydrbromid)	ICN
Alsevers	Medienküche
Antibiotika (Penicillin und Streptomycin)	Medienküche
ATV	Medienküche
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Roth
EDTA (Ethyldiamintetraacetat)	sigma
FCS	Seromed
Ficoll-Paque	Amersham
Genitacin- G418	GIBCO Life Science
GM-CSF	Krankenhausapotheke
Ham's F12	BioWhittacker
Hammelerythrozyten	Virion
Hygromycin B	Calbiochem
Interleukine und Zytokine (IL-2, IL-12, etc.)	Strathman
Interferon- γ , human	Strathman
MACS-Antikörper (anti-CD14, CD16, CD56, CD4,CD8)	Miltenyi
MACS-Säulen	Miltenyi
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Medienküche
PBS	Medienküche
PFA (Paraformaldehyd)	Sigma
RPMI 1640	Medienküche
Trypanblau	Gibco Lifescience
Trypsin/EDTA	BioWhittacker
Versene	Medienküche
Vitamin D3	Calbiochem
Z-D-Phe-L-Phe-Gly-OH (FIP)	Bachem

2.2 Mausstämme

Alle verwendeten Mausstämme wurden uns freundlicherweise von Dr. Carsten Kirschning zur Verfügung gestellt.

Der C3H/HeJ Mausstamm, der eine Punktmutation im TLR4 Gen besitzt, (Poltorak et al., 1998; Qureshi et al., 1999) wird im folgenden kurz mit TLR4^{d/d} bezeichnet, um ihn von dem C3H/HeN Stamm, der das Wildtyp TLR4 Allel trägt, zu unterscheiden.

Die TLR2^{-/-} Mäuse wurden von der Firma Tularik (South San Francisco, CA) bereitgestellt. Die TLR2^{-/-} Mäuse wurden fünfmal in den C3H/HeN oder C3H/HeJ Stamm zurückgekreuzt. Der Genotyp wird als C3H/TLR2^{-/-} bzw. als C3H/HeJ TLR2^{-/-} bezeichnet. Mäuse der folgenden vier Genotypen für TLR2 und TLR4 wurden durch Kreuzen des F1 Nachwuchses gezüchtet und 5 Tage nach Injektion von Thioglycollat als Quelle von Peritoneal-Macrophages genutzt:

TLR2^{+/+}/TLR4^{+/+} (C3H/HeN), TLR2^{-/-}/TLR4^{+/+} (C3H/TLR2^{-/-}), TLR2^{+/+}/TLR4^{d/d} (C3H/HeJ) und TLR2^{-/-}/TLR4^{d/d} (C3H/HeJ TLR2^{-/-}).

2.3 Viren

Sämtliche der verwendeten Masernviren (siehe Tabelle 2.3) waren im Institut verfügbar.

Die Masernviren sind eingehender in Johnston et al., 1999 und Erlenhöfer et al., 2002 und in Abbildung 4.18 charakterisiert.

Tabelle 2.3: Virusstocks und ihre Charakteristika

Virusstamm	Abkürzung im Text	Isolation und Passage	Virusanzucht
AIK-C			Vero
Moraten			Vero
Edmonston	ED	Vero	Vero, BJAB
Chicago		Vero	ED
Wildtyp Fleckenstein	WTFb	BJAB	BJAB
Wildtyp Fleckenstein	WTFv	BJAB, Vero	Vero
Bilthoven		B-LCL	BJAB
Wü5404		BJAB	BJAB
WÜ5679		BJAB	BJAB
Wü4797		BJAB	BJAB
MV-NSE	EDtag	BJAB, Vero	Vero, BJAB
MV(WTF-F)ED	ED(WTF-F)	BJAB, Vero	BJAB
MV(WTF-H)ED	ED(WTF-H)	BJAB	BJAB
MV(WTF-F/H)ED	ED(WTF-F/H)	BJAB	BJAB
MV(WTF-H481N→Y)ED	ED(WTF-H;N→Y)	BJAB, Vero	BJAB

2.4 Antikörper

Die verwendeten Antikörper wurden von den in Tabelle 2.4 angegebenen Herstellern geliefert, oder wurden von Dr. Egil Lien (anti-TLR2, TLR4, CD14) bzw. Sieglinde Löffler (anti-CD150, MV-H, MV-N, MV-F) als aufgereinigte IgG-Fractionen zur Verfügung gestellt. Es wurden monoklonale (mAK) und polyklonale (pAK) Antikörper verwendet.

Tabelle 2.4: Verwendete Antikörper und ihre Charakteristika

Antikörperspezifität	Klon	Isotyp	Konjugat	Hersteller	Verdünnung
Pan- $\gamma\delta$ -TCR			FITC	Immunotech	1 μ l/5x10 ⁴ Zellen
CD3	UCHT1	Maus-IgG1	FITC/R-PE	Immunotech	2 μ l/5x10 ⁴ Zellen
CD14	RMO52	Maus-IgG2a	FITC	Immunotech	2 μ l/5x10 ⁴ Zellen
CD19	J4.119	Maus-IgG1	FITC	Immunotech	2 μ l/5x10 ⁴ Zellen
CD25	B1.49.9	Maus-IgG2a	R-PE	Immunotech	2 μ l/5x10 ⁴ Zellen
CD3/CD16/CD56			R-PE	Immunotech	2 μ l/5x10 ⁴ Zellen
HLA-DR	IMMU 357	Maus-IgG1	PC5	Immunotech	1 μ l/5x10 ⁴ Zellen
CD150	5C6	Maus-IgG		S. Löffler	1:500
TLR2	TL2.1	Maus-IgG2a		T. Espevik	1:100
TLR4	HTA125	Maus-IgG2a		K. Miyake	1.100
CD14	3C10	Maus-IgG2a			1.100
MV-F	A504	Maus-IgG		S. Löffler	1:500
MV-N	F227	Maus-IgG		S. Löffler	1:500
MV-H	Serum	Kaninchen			1:500
MV-F	Serum	Kaninchen			1:500
Maus-IgG		Ziege	FITC/PE	Dianova	1:50/1:100
Kaninchen- IgG		Ziege	Meerretich-Peroxidase	BioLabs	1:10.000

2.5 Reagenzien, Puffer

Wenn nicht anders aufgeführt wurden die Reagenzien von Sigma bezogen.

2.5.1 Stimulantien

Isopentenyl-Pyrophosphat (IPP)	Sigma
Lipopolysaccharid (LPS)	Sigma
Pam ₃ CysSer(Lys) ₄ (Pam ₃ CSK ₄)	EMC Microcollections GmbH
Phytohämagglutinin (PHA)	Sigma
Staphylococcus aureus (SAC)	Calbiochem
Thioglycollat	Sigma

2.5.2 Chemikalien

Acrylamid	Applichem/Roth
Ammoniumperoxidisulfat (APS)	BioRad
BenchMark™ SDS PAGE Standard	Gibco
Bisacrylamid	Roth
Chloroform-Isoamylalkohol (50:1)	Applichem
Ethanol (100%, 90%)	Applichem
Polyoxethylensorbitanmonolaurat (Tween 20)	Sigma
Rinder Serum Albumin (BSA)	Sigma
Sequenziergelkonzentrat	Roth
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Applichem
Sucrose	Sigma
Tetramethyldiamin (TEMED)	BioRad
Tris-gesättigtes Phenol, pH 8,0	Roth
TRIZMA™ Base (Tris)	Sigma
Ultrareines Wasser	
Urea	Sigma

2.5.3 Puffer und Lösungen

10x NTE	0,1M Tris/HCL, 1M NaCl, 0,01M EDTA, pH7,4
10x TAE	0,4M Tris/HCl, 0,01MEDTA, pH 7,2
10x TBE	0,89M Tris/HCl, 0,89M Borsäure, 20mM EDTA, pH 8,0

Anodenpuffer 300mM	300mM Tris/HCl, 20% Methanol, pH 10,4
Anodenpuffer 30mM	30mM Tris/HCl, 20% Methanol, pH 10,4
Blockierungs“milch“	5% Magermilchpulver in PBS/Tween
FACS-Puffer	0,4% BSA, 0,02% NaN ₃ in PBS, pH 7,4
Kathodenpuffer	39,6mM 6-Amino-n-Hexansäure, 25mM Tris/HCl, 20% Methanol, pH 9,4
MACS-Puffer	0,5% BSA, 2mM EDTA in PBS, pH 7,2
PBS/Tween	0,5 % Tween in PBS, pH 8,3
Proteingelfixierlösung	30% (v/v) Essigsäure, 10% (v/v) Methanol
Proteingelpuffer	250mM Tris/HCl, 1,9M Glycin, 1% (w/v) SDS, pH 8,7
Saponinpuffer	0,33% Saponin in FACS-Puffer, pH 7,4

2.6 Radioaktivität

[Methyl- ³ H]-Thymidin (5 Ci/mmol)	Amersham
[α- ³² P] UTP (3000 Ci/mmol, 10mCi/ml)	Amersham

2.7 Kits

BM-Cyclin	Boehringer Ingelheim
Enhanced Chemiluminiszenz (ECL) Reagenz	Amersham
IL-12p70 Elisa DuoSet	R&D Systems
IL-6 Elisa DuoSet	R&D Systems
Kalibrierungsbeads	Sigma
Mycoplasma-PCR	Stratagene
Proteinbestimmung: Bizinchoninsäure, Kupfer (II)Sulfat, Pentahydrat, 4% (w/v)-Lösung	Sigma
Proteinstandard	Sigma
RiboQuant RNase Protection Assay hCK-2	PharMingen
TriFast	PeqLab

2.8 Verbrauchsmaterial

3MM-Whatmanpapier	Schleicher & Schuell
Einmalküvetten	Roth
Einmalspritzen und -kanülen	Servopharma

Entwickler und Fixierer für Röntgenfilme	Kodak
FACS-Röhrchen	Elkay
Glasfasermatten	Wallac
MACS-Trennsäulen	Miltenyi
Nitrozellulose Transfermembran	Schleicher & Schuell
Pipettenspitzen	Eppendorf, Roth
Plastikmaterial für die Zellkultur	Greiner, Nunc, Falcon
Röntgenfilme	Kodak
Sterilfilter	Millipore
Zweikammerkultureinsätze	Nunc

2.9 Geräte

Biolinker	Vilber Lourmat
CO ₂ -Brutschrank	Heraeus
FACScan	Becton-Dickinson
Flüssigkeitsszintillationszähler	Wallac
Gelelektrophoresekommer, vertikal	Institutswerkstatt
Geltrockner	BioRad
Halbtrockenblottingapparatur	Institutswerkstatt
Heizblock	Hartenstein
Mikroskop	Leitz
Mikrozentrifuge	Eppendorf
Netzgeräte	Gibco, BioRad
pH-Meter	WTW
Sterilwekbank	Heraeus
Ultrazentrifuge	Hettich
Vortexmischgeräte	GLW
Wasserbäder	GFL
Zellerntegerät	Wallac
Zentrifugen	Sorvall, Beckman

3 Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Zelllinien

Sämtliche Zellen wurden in Plastikflaschen oder –multilochplatten für die Zellkultur in Brutschränken bei 37°C in einer humidifizierten Atmosphäre bei einem CO₂-Gehalt von 5% kultiviert. Die Suspensionszelllinien wurden zweimal wöchentlich etwa im Verhältnis 1:10 gesplittet und in frischem Medium kultiviert. Adhärente Zellen wurden 1-2mal wöchentlich mit Trypsin abgelöst und im Verhältnis 1:10-1:20 gesplittet.

3.1.2 Primäre Zellen

3.1.2.1 Isolierung primärer humaner mononukleärer Zellen und weitere Aufreinigung der Zellpopulationen aus peripherem Blut

PBMC wurden aus Leukozytenkonzentraten, den sogenannten „Buffy-Coats“, mittels Ficolldichtegradientenzentrifugation gewonnen. Das Konzentrat wurde mit Versen 1:1 verdünnt, auf ein Ficollkissen geschichtet und die Zellen wurden durch Zentrifugation (400xg, 30min, Raumtemperatur= RT) entsprechend ihrer Dichte aufgetrennt. Nach mehrmaligem Waschen wurden die Zellen gezählt und mit einem mAK Gemisch (CD3-FITC, CD19-FITC, CD14-FITC, CD16-PE, CD56-PE und HLA-DR-CyChrome™ (Tabelle 2.4)) gefärbt, um die Populationen zu charakterisieren und die Effizienz der Aufreinigungsschritte zu kontrollieren. Je nach Verwendungszweck wurden sie nun als PBMC kultiviert oder weiterbehandelt. PBMC setzen sich aus T Zellen, B Zellen, NK Zellen und Monozyten zusammen.

Eine selektive Anreicherung der T Zellpopulation kann durch Rosettierung an Hammelerythrozyten erzielt werden. Die Hammelerythrozyten wurden mit AET vorbehandelt, um die Bindung an das von T Zellen exprimierte CD2 zu erhöhen, und dann mit den PBMC 1 Stunde aus Eis inkubiert. Die nachfolgende Dichtegradientenzentrifugation über Ficoll-Paque pelletiert die T Zell/Erythrozytenkonjugate, während sich die übrigen Zellen in der Interphase sammeln.

Die Erythrozyten wurden lysiert und die T Zellen mehrmals gewaschen, gezählt und durchflußzytometrisch charakterisiert.

Die Zellen der Interphase wurden nach dem Waschen und Zählen in MACS-Puffer resuspendiert ($1 \times 10^7 / 100 \mu\text{l}$) und mit CD56- und CD19-spezifischen Microbeads markiert. Entsprechend den Herstellerangaben wurden die NK und B Zellen über einen Säulenschritt depletiert. Das Eluat bestand aus einer stark angereicherten Monozytenpopulation, deren Qualität durchflußzytometrisch kontrolliert wurde. Diese Monozyten dienten zum einen als Ausgangsmaterial für die Generierung von dendritischen Zellen (MoDC) oder wurden direkt in Stimulationsexperimenten verwendet.

3.1.2.2 *In Vitro*-Generation humaner MoDC

Durch die Kultur in IL-4 und GM-CSF-haltigem Medium reifen Monozyten binnen 6-7 Tagen zu MoDC aus. Die aufgereinigten Monozyten wurden in einer Dichte von 2×10^7 Zellen in RPMI 10% FCS in einer T80 Kulturflasche ausgesät und im Brutschrank inkubiert. Nach einer Stunde wurden die nicht-adhären Zellen abgewaschen und die verbliebenen Zellen in 20ml Medium (RPMI 10% FCS; 2.000 U/ml GM-CSF und 3.000 U/ml IL4) kultiviert. Nach 3 Tagen wurden weitere 20 ml dieses Mediums zugegeben. Unter dem Einfluß der Zytokine differenzierten die adhären Monozyten während der 6-7tägigen Kultur zu Suspensionszellen mit typischer DC-Morphologie und spezifischen Markern unreifer DC aus.

3.1.2.3 Isolierung von Makrophagen aus dem Peritoneum von Mäusen

Durch die Injektion von Thioglycollat in die Bauchhöhle wurde die Einwanderung von Makrophagen in das Peritoneum induziert. Nach 5 Tagen wurden die verwendeten Mäuse, mit vier verschiedenen Genotypen für TLR2 und TLR4 [TLR2^{+/+}/TLR4^{+/+} (C3H/HeN), TLR2^{-/-}/TLR4^{+/+} (C3H/TLR2^{-/-}), TLR2^{+/+}/TLR4^{d/d} (C3H/HeJ) und TLR2^{-/-}/TLR4^{d/d} (C3H/HeJ TLR2^{-/-})], getötet. Das Bauchfell wurde geöffnet und die Bauchhöhle mit $2 \times 5 \text{ ml}$ sterilem PBS gespült. Die derart eluierten Zellen wurden gewaschen, gezählt und in einer Dichte von 1×10^5 /Vertiefung einer 48well Platte ausgesät. Nach 1stündiger Adhärenz der Gewebsmakrophagen wurden die nichtadhären Zellen abgespült und die adhären Zellen stimuliert.

3.1.3 Zellzahlbestimmung

Ein Aliquot der Zellsuspension wurde mit Trypanblau vermischt und lebende Zellen (nicht angefärbt) mit Hilfe einer Zählkammer ausgezählt. Durch Multiplikation mit dem Kammerfaktor konnte die Zellzahl/ml berechnet werden.

3.1.4 Einfrieren/Auftauen von Zellen

Zellen können in einem Gemisch aus FCS/10% DMSO eingefroren werden. Die Zellen wurden in einer Konzentration von 1×10^7 /ml in dem Einfriermedium resuspendiert, schonend eingefroren und in flüssigem Stickstoff gelagert. Um die Zellen wieder zu kultivieren, wurden sie rasch im Wasserbad aufgetaut, mehrmals mit dem entsprechenden Medium gewaschen und ausgesät. Am Folgetag wurde das Medium durch frisches Medium ersetzt.

3.1.5 Mykoplasmentestung und Limulus Lysat Test

Die Kontamination einer Zellkultur mit Mykoplasmen kann zu verändertem Zellwachstum führen. Aber zusätzlich sind diese Mikroorganismen als Aktivatoren der angeborenen Immunantwort bekannt. Damit die in den Experimenten beobachteten Effekte unbeeinflusst von möglichen Kontaminationen bleiben, wurden die Zelllinien regelmäßig auf Mykoplasmen getestet. Für 3 Tage wurden die Zelllinien in Medium ohne Antibiotika kultiviert. Der Nachweis der Mykoplasmen erfolgte über PCR mittels mykoplasmenspezifischer Primer (Stratagene) aus dem zellfreien Überstand dieser Kulturen. Positive Kulturen, aber auch Virusstocks, wurden eliminiert, und durch nicht-kontaminierte ersetzt, bzw. durch 3wöchige Kur mit BM-Cyclin von der Mykoplasmen-Kontamination befreit.

Um eine mögliche Kontamination der Viruspräparationen mit Endotoxin auszuschließen, wurden alle verwendeten Virusstocks im Labor von Dr. Egil Lien mittels des Limulus Lysat Testes (Cape Cod Associates) auf ihren LPS-Gehalt getestet. In allen Viruspräparationen lag der Endotoxin-Gehalt unterhalb von 10pg/ml.

3.2 Viren

3.2.1 Zucht und Aufreinigung

Die Viren wurden wie in der letzten Spalte der Tabelle 2.3 angegeben gezüchtet. Obwohl sowohl Edmonston als auch einige der auf Edmonston basierenden rekombinanten Viren in

Vero Zellen gut replizieren, wurden sie auch auf BJAB gezüchtet, um für einen Großteil der Experimente denselben zellulären Hintergrund für die Virusstocks zu erhalten.

Für die Virusvermehrung wurden Vero bzw. BJAB Zellen mit einer m.o.i. von 0,01 des jeweiligen Virusstocks in Medium ohne FCS infiziert. Nach 2stündiger Inkubation wurden die Zellen gewaschen und in Medium mit geringerem FCS-Anteil kultiviert. Parallel zur Viruszucht wurde eine Kultur nur mit Medium zum Schein (Mock) infiziert und identisch wie die übrigen Kulturen behandelt. Das gewonnene Lysat dient als Kontrolle für die zellulären Bestandteile in der Viruspräparation. Nach Erreichen eines zytopathischen Effektes, der ca. 80% der Zellen umfaßt, wurde das Virus geerntet. Der Überstand wurde verworfen, die MV- als auch Mock-infizierten Zellen mit PBS zweimal gewaschen und anschließend in wenig PBS eingefroren. Durch Einfrieren, Auftauen und mehrmaliges Homogenisieren wurden die Zellen aufgebrochen und das Virus wurde freigesetzt. Der Zelldebris wurde durch hochtouriges Zentrifugieren (4°C, 30min, 500xg, ohne Bremse) vom virushaltigen Überstand getrennt. Dieser wurde aliquotiert und bei -80°C eingefroren. Für die meisten Experimente wurde aufgereinigtes Virus verwendet, um die zellulären Bestandteile, die durch das Lysieren der Zellen freigesetzt werden und sich mit dem Virus im Überstand sammeln, abzutrennen. Der virushaltige Überstand wurde auf ein 25%iges Sucrosekissen geschichtet und ultrazentrifugiert (4°C, 90min, 90.000xg, ohne Bremse). Das Pellet wurde in NTE-Puffer aufgenommen, 10min äquilibriert und auf einen diskontinuierlichen Sucrosegradienten (5ml 60%, 10ml 54%, 10ml 25% Sucrose) geschichtet und erneut ultrazentrifugiert (4°C, 120min, 90.000xg, ohne Bremse). Die Interphase zwischen 25 und 54% Sucrose wurde abgenommen, mit NTE-Puffer auf einen Sucroseanteil unter 25% verdünnt und erneut ultrazentrifugiert (4°C, 90min, 100.000xg, ohne Bremse). Das verbleibende Pellet wurde in einem geringen Volumen PBS aufgenommen, aliquotiert und bei -80°C gelagert. Um eine adäquate Kontrolle zu erhalten, wurde mit der Mock-Präparation identisch verfahren.

3.2.2 Titerbestimmung der Virusstocks

Um eine genormte Menge Virus in den Experimenten einsetzen zu können, muß die Menge an infektiösem Virus in jeder Viruspräparation bestimmt werden. Es stehen hierfür zwei Methoden zur Verfügung: die Endpunktiteration mittels Plaqueassays oder die Berechnung der TCID₅₀/ml nach Spearman und Kärber. Um die Infektiosität von Vakzine- und Wildtypenstämmen vergleichen zu können, wurde letzere Methode angewendet. B95a Zellen wurden in 96-Lochplatten mit halber Kulturfläche in einer Dichte von 5×10^4 am

Vortag ausgesät (RPMI 10% FCS). Die Virusstocks wurden je nach zu erwartender Infektiosität 10- oder 5-fach logarithmisch verdünnt (RPMI ohne FCS) und im Achtfachansatz auf die Zellen pipettiert. Nach einer 2stündigen Adsorptionsphase bei 37°C wurde der Überstand entfernt, die Zellen wurden zweimal gewaschen und anschließend in RPMI 5% FCS kultiviert.

Nach 5 Tagen wurde täglich die Anzahl der CPE (zytopathischer Effekt)-positiven Näpfe lichtmikroskopisch bestimmt und protokolliert. Sobald sich keine virus-spezifischen Veränderungen mehr zeigten, wurde die TCID₅₀/ml wie folgt berechnet.

Gleichung 3-1 Darstellung der Formel zur Berechnung der TCID₅₀ nach Spearman und Kärber

Die Formel berechnet den dekadischen Logarithmus der Verdünnungsstufe, bei der %=% der Zellen (Näpfe) einen CPE aufweisen. Dabei steht $x_{p=1}$ für den dekadischen Logarithmus der höchsten Verdünnungsstufe bei der noch in allen Näpfen ein CPE zu beobachten ist. d steht für den dekadischen Logarithmus des Verdünnungsfaktors. p entspricht dem Anteil an CPE-positiven Näpfen pro Verdünnungsstufe. Σp ist die Summe aller p ab der Verdünnungsstufe $x_{p=1}$ und den p -Werten aller höheren Verdünnungen mit beobachtetem CPE.

$$\log \text{TCID}_{50} = \frac{x_{p=1}}{2} + 1d - d \Sigma p$$

Anhand dieses errechneten Wertes läßt sich, bezogen auf die Zellzahl, die Menge an Virus bestimmen, die in den Experimenten eingesetzt wird. Dieses Maß wird als „multiplicity of infection (m.o.i.)“ bezeichnet, dabei entspricht eine m.o.i von 1 einem infektiösen Partikel pro Zelle.

3.2.3 Einstellung des MV-Glykoproteingehalts mittels „Western Blot-Analyse“

Da sich in den Viruspräparationen ein Großteil defekter Partikel befinden kann, die die mit Rezeptoren wechselwirkenden viralen Glykoproteine F und H enthalten, aber durch die Bestimmung der Infektiosität nicht erfaßt werden, wurde der Gehalt an viralen Glykoproteinen in der jeweiligen Viruspräparation bestimmt und adjustiert.

Die Proteine werden unter Verwendung einer diskontinuierlichen Polyacrylamidelektrophorese ihrer Größe entsprechend aufgetrennt und nach dem Transfer auf eine Proteinbindende Membran mit Hilfe von Antikörpern detektiert.

Der Proteingehalt der Viruspräparationen wurde kolorimetrisch mittels des Proteinkonzentrationsbestimmungskits (Sigma) bestimmt. 25µg Protein und davon ausgehende Verdünnungen wurden in reduzierendem Probenpuffer aufgekocht und auf ein

SDS-Polyacrylamidgel [Trenngel (10%): 8ml 1,5mM Tris/HCl, pH 8,7; 15,6 ml H₂O; 8ml Acrylamid/Bisacrylamid (40g/1,3g pro 100ml); 160µl 20% SDS; 10µl APS; 10µl TEMED; Sammelgel: 1,25ml 1M Tris/HCl, pH 6,8; 6ml H₂O; 1,3ml Acrylamid/Bisacrylamid (7,5g/0,325g pro 25ml); 50µl 20% SDS; 50µl 10% APS; 5µl TEMED] aufgetragen. Durch das denaturierende Agens SDS werden die Proteine in eine zylindrische Form aufgefaltet und mit einer Hülle aus SDS-Molekülen umgeben. Aufgrund der daraus resultierenden negativen Ladung können die Proteine innerhalb einer Gelmatrix durch Anlegen eines elektrischen Feldes ihrer Größe entsprechend aufgetrennt werden (25mA, 2h).

Um die aufgetrennten Proteine nachweisen zu können, müssen sie aus dem Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran transferiert werden. Das Gel wurde in Kathodenpuffer äquilibriert und auf drei in Kathodenpapier getränkten Whatmanpapieren™ auf der Kathodenseite der „Blottingapparatur“ aufgelegt. Bedeckt wurde es mit einer in Kathodenpuffer eingeweichten Nitrozellulosemembran und je drei Lagen Whatmanpapieren™, die in 30mM und 300mM Anodenpuffer getränkt waren. Der Transfer erfolgte innerhalb einer Stunde unter Anlegen unbegrenzter Spannung und einer Stromstärke von 100mA.

Bevor der Immunnachweis der MV Proteine auf der Nitrozellulosemembran erfolgte, mußten die unspezifischen Bindungen durch Inkubation in PBS/Tween 5% Magermilchpulver geblockt werden (1h, RT). Es folgte der spezifische Nachweis der viralen Glykoproteine mit einem anti-H- und anti-F- spezifischem Kaninchenserum (1:500 in PBS/Tween/10% Magermilch, 1h, RT). Nach dreimaligem jeweils 10minütigem Waschen erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Ziege-anti-Kaninchen mAK, gekoppelt an Meerrettichperoxidase, 1:5.000 in PBS/Tween/10% Magermilch, 1h, RT). Nach erneutem Waschen erfolgt der Nachweis der spezifischen Proteininteraktion mittels des ECL™-Systems. Dabei setzt die Meerrettichperoxidase ein Substrat um, das durch Freisetzung von Photonen einen angelegten Röntgenfilm schwärzt. Mithilfe eines Größenmarkers lassen sich die Proteine spezifisch zuordnen. Anhand der Verdünnungsreihe ließen sich die Volumina der Viruspräparationen bestimmen, die identische Konzentration an Glykoproteinen enthielten. Dies wurde durch einen weiteren Elektrophorese und Blot- Schritt kontrolliert.

3.3 T Zell-Proliferationsteste

3.3.1 Presenterzellen (PC)

3.3.1.1 Persistierend infizierte Zelllinien

Lymphozytäre Zelllinien lassen sich effizient mit dem Masernvirus infizieren. Dabei kann es in Zellen, die nicht durch zytopathische Effekte oder Apoptose sterben, zu einem Erreichen eines Zustandes kommen, der als persistierende Infektion bezeichnet wird. Diese Zellen zeigen ein normales Wachstumsverhalten und setzen kaum infektiöses Virus frei.

Zelllinien, die persistierend mit MV infiziert sind, ließen sich herstellen, indem sie wie beschrieben infiziert wurden. Statt die Zellen nach Erreichen des CPE zu ernten, wurden sie weiterkultiviert und regelmäßig mit frischem Medium versorgt. Die nach 2-6 Wochen überlebenden Zellen wurden auf die Expression der viralen Glykoprotein überprüft und im folgenden mit dem Zusatz pED bezeichnet. Nur BJAB Zellen ließen sich auch mit dem Wildtyp Stamm WTF persistierend infizieren (BJAB pWTF).

3.3.1.2 Infektion von MoDC

Unreife MoDC wurden in einem geringen Volumen RPMI (ohne FCS, +GM-CSF und IL-4) resuspendiert und mit MV, bzw. der jeweiligen Mock Kontrolle für 2h im Brutschrank infiziert. Anschließend wurde nicht gebundenes Virus gründlich abgewaschen und die Zellen für drei Tage in Medium (RPMI 10% FCS, 800 U/ml GM-CSF, 500 U/ml IL-4) kultiviert. Als positive Aktivierungskontrolle wurde ein Teil der MoDC mit 100ng/ml LPS stimuliert. Nach dem Erreichen eines typischen CPE (2-3 Tage) wurden die Zellen geerntet, gezählt und durchflußzytometrisch charakterisiert.

3.3.2 PHA Proliferationstest

Durch die Inkubation von T Zellen mit einem polyklonal wirkenden Mitogen kann deren Proliferation induziert werden. Eine Klasse solcher Mitogene, zumeist pflanzliche Lektine, bindet unspezifisch an Kohlenhydratseitenketten von Membranproteinen der T Zellen. Diese werden dabei kreuzvernetzt und vermitteln Signale, die die Zellteilung aktivieren.

Die Presenterzellen (persistierend oder lytisch Masernvirus infizierte Zellen und ihre jeweiligen MV-negativen Kontrollen), aber auch Viruspräparationen, wurden vor der Kokultur mit den PBMC (im folgenden als Responderzellen (RC) bezeichnet) UV-

inaktiviert, um zum einen die Proliferation der Zellen zu verhindern und zum anderen die Infektion der Responderzellen zu vermeiden. Da persistierend infizierte Zellen kaum infektiöses Virus produzieren, reichte eine UV- (Ultraviolett-Licht) Dosis von $0,8\text{J}/\text{cm}^2$ im dem Biolinker aus, um die Infektiosität zu zerstören und die Proliferation der Zelllinien zu unterbinden. Lytisch infizierte Zellen, aber auch Viruspräparationen wurden mit einer Dosis von $1,5\text{J}/\text{cm}^2$ im Biolinker UV-inaktiviert. Um die Effizienz der Inaktivierung zu kontrollieren, wurden Aliquots der Präparationen, verglichen mit der Ausgangspräparation, auf B95a Zellen titriert.

Die RC wurden auf eine Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml eingestellt und mit $5\mu\text{g}/\text{ml}$ PHA (Endkonzentration $2,5\mu\text{g}/\text{ml}$) versetzt. Die PC wurden ebenfalls auf eine Ausgangskonzentration von 1×10^6 Zellen/ml eingestellt, und zusätzliche eine Verdünnungsreihe im Verhältnis 1:2 hergestellt. Je $100\mu\text{l}$ der PC, bzw. der Viruspräparation, der jeweiligen Verdünnungsstufe wurden im Dreifachansatz in Vertiefungen einer 96-Loch-Flachbodenplatte pipettiert. Anschließend wurden $100\mu\text{l}$ der RC-Suspension hinzugegeben und für 48h im Brutschrank inkubiert. Nach Zugabe von $50\mu\text{l}$ einer [^3H]-Thymidin-Lösung ($5\text{mCi}/\text{ml}$) wurden die Ansätze für weitere 16h kultiviert. In einem Zellerntegerät wurden die Zellen lysiert und die DNA wurde auf Glasfasermatten übertragen. Mittels eines Flüssigkeitsszintillationszählers konnte die in die DNA inkorporierte Radioaktivität gemessen werden. Dabei diente die Einbaurate der Radioaktivität als Maß für die Proliferationsrate der Zellen. Als Kontrolle wurde stets ein Teil der ursprünglichen Responderzellen ohne PHA in die Platte pipettiert und deren Spontanproliferation von der PHA-induzierten Proliferation abgezogen. Die Effizienz der UV-Inaktivierung der Zelllinien wurde kontrolliert, indem diese im Vergleich zu den nicht inaktivierten Ursprungszellen ebenfalls mit auf die Platte aufgetragen wurden und der Thymidineinbau bestimmt wurde.

Berechnet wurde nun zum einen der Stimulationsindex, d.h. das Verhältnis des Thymidineinbaus PHA-stimulierter T Zellen zu dem ruhender T Zellen und zum anderen die Proliferationsinhibition PHA-stimulierter T Zellen, die mit infizierten Presenterzellen oder Virus kokultiviert worden waren, gegenüber denen, die mit den Kontrollpräparationen kokultiviert worden waren.

3.3.3 IPP/IL-2-vermittelte $\gamma\delta$ T Zell-Expansion

Die Proliferation von $\gamma\delta$ T Zellen erfolgt als Antwort auf eine Stimulation mit dem Phosphoantigen Isopentenyl-Pyrophosphat (IPP) und IL-2. Unter ähnlichen Bedingungen wie eben beschrieben, wurden PBMC mit den Presenterzellen bzw. Virus kokultiviert und mittels IPP und IL-2 expandiert. Die Zellzahl der PBMC wurde ebenfalls auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellt und mit IL-2 versetzt (100U/ml, Endkonzentration im Ansatz 50U/ml). Jeweils 50 μ l dieser Suspension wurden im Doppelansatz in Vertiefungen einer 96-Loch-Rundbodenplatte pipettiert. Hinzu kamen 50 μ l der PC (bzw. des Virus) in den Verdünnungen 1:10, 1:50 und 1:100. Zu der Hälfte der Ansätze wurde IPP (0,25 μ g/ml) pipettiert. Die Zellen wurden für 7 Tage kultiviert, anschließend aus den Vertiefungen in FACS-Röhrchen überführt und wie unter 3.5 beschrieben behandelt. Die Zellen wurden mit Antikörpern gegen den $\gamma\delta$ T Zell-Rezeptor ($\gamma\delta$ -FITC) und CD3-PE markiert und der Anteil doppelt positiver Zellen im Verhältnis zu einfach CD3 positiven Zellen durchflußzytometrisch bestimmt. Die IPP vermittelte Expansion der $\gamma\delta$ T Zellen wurde im Vergleich zu der nur IL-2 enthaltenden Probe ermittelt und als relative Expansion bezeichnet. Die Inhibition der $\gamma\delta$ T Zell-Expansion nach der Kokultur mit den MV-infizierten Presenterzellen (oder dem Virus) wurde anhand der entsprechenden Kontrolle berechnet.

3.3.4 Gemischte Leukozytenreaktion

DC als professionelle Antigenpräsentierende Zellen, haben die Aufgabe, eine T Zell-Aktivierung und Proliferation zu induzieren, um eine adäquate Immunantwort zu erreichen. Dabei präsentieren die DC naiven, ruhenden T Zellen neben kostimulatorischen Molekülen auch spezifische Antigene.

In der gemischten Leukozytenreaktion („Mixed Leukocyte Reaction“, MLR) werden allogene Zellen gemischt, so daß die DC eines Spenders ihre MHC-Moleküle den T Zellen des anderen Spenders als Fremdanigen präsentieren. Aufgrund der hohen Frequenz alloreaktiver T Zellen werden sie aktiviert und proliferieren. Die Proliferation läßt sich über den Einbau radioaktiven Thymidins in die DNA messen.

Die aufgereinigten T Zellen wurden in einer Konzentration von 5×10^4 Zellen/100 μ l in einer 96-Loch Rundbodenplatte ausgesät und mit verschiedenen Verdünnungen (\log_3) der MoDC für 5 Tage kokultiviert. Während der letzten 16h wurde radioaktives Thymidin dem Medium beigegeben und der Einbau anschließend gemessen.

Da für diese Versuche die MoDC nicht UV-inaktiviert werden konnten, wurde dem Kulturmedium das Fusionsinhibierende Peptid (FIP 200 μ M) zugegeben, um eine Infektion der T Zellen zu vermeiden.

3.4 Stimulation von Zellen

3.4.1 Stimulation der CHO Zellen

CHO Zellen (siehe hierzu Tabelle 2.2) wurden am Vortag in einer Dichte von $3-5 \times 10^4$ /Napf einer 48-Loch-Platte in dem entsprechenden Medium ausgesät. Die Zellen wurden gewaschen und wie im folgenden beschrieben in Ham's F12 10% FCS stimuliert. In der Regel diente Medium als Negativkontrolle und Lipopolysaccharid (LPS) und (Pam₃CSK₄) als Positivkontrollen. Nach 12 Stunden bzw. der Kultur über Nacht (maximal 16h) wurde der Überstand abgenommen und für den Nachweis von freigesetztem IL-6 eingefroren. Die Zellen wurden mit Trypsin abgelöst und die Expression von CD25 durchflußzytometrisch (Kapitel 3.5) bestimmt.

3.4.2 Stimulation von Monozyten und Makrophagen

THP-1 und HL-60 Zellen wurden für den Nachweis zytokin-spezifischer mRNA in einer Dichte von 1×10^7 Zellen/Napf einer 6-Loch-Platte ausgesät. Für einige Experimente wurden diese Zellen für 3 Tage mit 100mM Vitamin D3 behandelt, um eine Reifung zu induzieren. Anschließend wurden die Stimulanzen in RPMI 10%FCS zugegeben und für 12h inkubiert. Die Überstände wurden für den Nachweis freigesetzter Zytokine bei -80°C gelagert, die Zellen wurden in TriFAST™ geerntet, um daraus die RNA zu isolieren.

Primäre humane Monozyten und auch Peritoneal-Makrophagen wurden nach der Isolation in einer Dichte von 1×10^5 Zellen/Napf einer 48-Loch-Platte ausgesät. Nach 2stündiger Inkubation wurden die nicht-adhärenenten Zellen abgewaschen und die Stimulanzen in RPMI 10% FCS zugegeben. Für den Nachweis der IL-12p70-Freisetzung wurden die Zellen für 2h mit 300U/ml h-IFN- γ vorstimuliert und anschließend die Stimulanzen zugefügt (Wittmann et al., 1999). Nach 12 Stunden wurden die Überstände abgenommen und für den Nachweis freigesetzter Zytokine bei -80°C gelagert, während die Zellen in eiskaltem PBS abgeschabt wurden, um die Expression spezifischer Oberflächenmarker durchflußzytometrisch zu bestimmen.

3.5 Durchflußzytometrie

Die Charakterisierung der Expression populationsspezifischer und Aktivierungsmarker von Zellen erfolgte durch Immunfluoreszenzfärbungen, die mit einem Becton-Dickenson FACSScan™ unter Verwendung der Lysis II™-Software aufgenommen und der CellQuest™-Software ausgewertet wurden.

Im allgemeinen wurden 50.000 Zellen pro Färbung eingesetzt, in FACS-Puffer gewaschen und in 50µl FACS-Puffer mit den entsprechenden Antikörpern resuspendiert und bei 4°C 30min inkubiert. Die Antikörperverdünnung erfolgte wie in Tabelle 2.4 aufgelistet.

Die nicht-markierten Antikörper wurden durch Fluorochrom-markierte Sekundäntikörper detektiert (Zige-anti-Maus IgG (Fab-Fragment)- FITC- oder PE-gekoppelt, von Dianova; 1:50 bzw. 1:100 verdünnt).

Bei Mehrfachfärbungen mit nicht-markierten Primäntikörpern erfolgte zunächst die Inkubation mit diesem, anschließend die Detektion mit dem Fluorochrom-markierten Sekundäntikörper. Daraufhin wurden die verbliebenen freien Bindungsstellen des Antikörpers mit 25µl Mausserum (10%ig in FACS-Puffer) blockiert (4°C, 10min). Die direkt-markierten Antikörper wurden direkt hinzugegeben und weitere 30min mit den Zellen inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Zellen in 50µl Propidiumiodid (1µg/ml) bzw. 7AAD resuspendiert und analysiert. Sowohl Propidiumiodid als auch 7AAD interkalieren in die Membranen toter Zellen. Durch die tiefrote Fluoreszenz dieser Farbstoffe lassen sich die toten Zellen im Durchflußzytometer leicht ausgrenzen.

Intrazelluläre FACS-Färbungen unterschieden sich nur geringfügig von obigem Protokoll: Nach der Fixierung der Zellen (3,7% PFA in PBS, 20min, RT) wurden sie in FACS-Puffer gewaschen und für 10 min bei RT permeabilisiert (0,33% Saponin in FACS-Puffer). Auch die Antikörper bzw. das Mausserum wurden in Saponinpuffer verdünnt eingesetzt. Als letzter Waschpuffer wurde FACS-Puffer benutzt. Pro Ansatz wurden im allgemeinen 10.000 morphologisch intakte, Propidiumiodid- bzw. 7AAD- negative Zellen aufgenommen. Um die Hintergrundfärbung zu kontrollieren und Kompensationen bei den Doppel- und Dreifachfärbungen einstellen zu können, wurden jeweils Färbungen mit Isotypen durchgeführt.

3.6 mRNA Nachweis mittels „RNase Protection Assay“

Um mehrere mRNA Spezies parallel zu detektieren und zu quantifizieren, eignet sich der „RNase Protection Assay“ (RPA). Dabei wird eine Ziel-RNA durch Hybridisierung mit einer überlappenden Antisense-RNA definiert. Nur doppelsträngige Bereiche bleiben im Ansatz vor der Spaltung durch zugegebene RNasen geschützt. Anhand unterschiedlich langer radioaktiv markierter RNA-Antisense-Sonden kann man das Vorhandensein verschiedener homologer basengepaarter Regionen in der Probe nachweisen.

3.6.1 RNA-Isolation

Zur Lyse wurden die Zellen in 1ml TriFAST™ intensiv resuspendiert. Nach 5minütiger Inkubation bei RT wurden 200µl Chloroform zugegeben und 30sek geschüttelt. Nach 5minütiger Inkubation und Zentrifugation (4°C, 12.000xg, 15min) wurden 500µl der farblosen, wäßrigen Phase in ein neues Eppendorf-Cap überführt und mit gleichem Volumen Isopropanol gemischt. Die Präzipitation der RNA erfolgte während der 10minütigen Inkubation bei RT. Durch Zentrifugation (4°C, 12.000xg 15min und 10sek) wurde die RNA pelletiert. Das Isopropanol wurde komplett abgezogen, dann wurde die RNA in 90µl RNase-freiem Wasser, 10µl 10x DNaseI-Puffer, 1µl DNase resuspendiert und 30min bei 37°C inkubiert. Die DNase wurde 10min bei 65°C inaktiviert. Anschließend folgte eine weitere Reinigung der RNA mithilfe des „RNeasy“ clean-up- Protokoll nach Angaben des Herstellers: Zu der RNA wurden 100µl Wasser, 350µl RTL (frisch angesetzt), 250µl Ethanol (100%) pipettiert, gemischt und direkt auf die Trennsäule gegeben. Diese wurde in ein cap gestellt und 15 sek bei 10.00xg zentrifugiert. Dabei bindet die RNA an die Silicabeads. Die Trennsäule wurde zweimal mit 700µl RW1 gewaschen (RT, 15sek, 10.000xg), in ein frisches Gefäß gesetzt und mit 500µl RPE gewaschen (RT, 15sek, 10.000xg). Die Elution der RNA erfolgte mit 2x50µl RNase freiem Wasser in ein frisches cap (RT, 15sek, 10.000xg). Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte photometrisch, parallel wurde die Qualität der RNA auf einem 1% Agarosegel kontrolliert.

3.6.2 Synthese der radioaktiven Probe

Die folgenden Schritte entsprechen dem Protokoll aus dem RiboQuant™ Handbuch.

Alle Agenzien wurden auf RT erwärmt und wie folgt in ein cap pipettiert und gemischt: 1µl RNasin, 1µl GACU-Nukleotide, 2µl DTT, 4µl 5x Transkriptionspuffer, 1µl RPA template, 10µl [α -³²P]UTP, 1µl T7 RNA Polymerase. Nach kurzem Abzentrifugieren

wurde das Gemisch eine Stunde bei 37°C inkubiert. Durch die Zugabe von 2µl DNase wurde die Reaktion gestoppt (37°C, 30min). Anschließend wurden 26µl 20mM EDTA, 25µl Tris-gesättigtes Phenol, 25µl Chloroform:Isoamylalkohol (50:1), 2µl tRNA der Hefe hinzupipettiert, gut gemischt und zentrifugiert (RT, 10.000xg, 5min). Die obere wäßrige Phase wurde in ein neues cap transferiert und mit 50µl Chloroform:Isoamylalkohol gemischt und 2min zentrifugiert. Die obere wäßrige Phase wurde überführt und mit 50µl 5M Ammoniumazetat und 250µl eiskaltem Ethanol (100%) 30min bei -70°C präzipitiert und zentrifugiert (4°C, 10.000xg, 15min). Das Pellet wurde mit 100µl eiskaltem Ethanol (90%) gewaschen (4°C, 10.000xg, 5min) und komplett getrocknet. Anschließend wurde es in 50µl Hybridisierungspuffer gelöst und die Radioaktivität in einem Szintillationszähler gemessen. Mit Hybridisierungspuffer wurde die Probe auf 3×10^5 Cherenkov-cpm/µl verdünnt und die Probe bei -20°C gelagert.

3.6.3 Präparation der RNA und Hybridisierung

5-10 µg der RNA (siehe 3.6.1) wurden mit 250µl eiskaltem Ethanol (100%) und 50µl Ammoniumazetat (4M) 30min bei -70°C präzipitiert. Das Pellet (4°C, 10.000xg, 15min) wurde luftgetrocknet und in 8µl Hybridisierungspuffer gelöst. 2µl der radioaktiven Probe (siehe 3.6.2) wurden hinzupipettiert und die Proben in einen auf 90°C vorgeheizten Thermoblock gestellt. Die Hybridisierung erfolgte für 12-16 Stunden, wobei sich die Temperatur allmählich auf 56°C abkühlte. Vor der RNase-Behandlung mußten die Proben für 15min bei 37°C inkubiert werden.

3.6.4 RNase-Behandlung

Es wurde ein Gemisch aus 2,5ml RNase Puffer und 6µl RNase A +T1 Mix (ausreichend für 20 Ansätze) hergestellt, davon wurden je 100µl zu den hybridisierten Proben pipettiert und für 45min bei 30°C inkubiert. Dabei verdaut die RNase die einzelsträngige RNA, so daß Fragmente verbleiben, die aus der Ziel-RNA und daran gebundener radioaktiv-markierter Probe bestehen. Vor Beendigung des Verdaus wurden 390µl Proteinase K Puffer, 30µl Proteinase K und 30µl tRNA der Hefe gemischt (ausreichend für 20 Ansätze). Je 18µl dieses Gemisches wurden zu den Proben pipettiert und für weitere 15min bei 37°C inkubiert. Die RNA-Fragmente wurden durch Zugabe von 65µl Tris-gesättigtem Phenol und 65µl Chloroform-Isoamylalkohol aufgereinigt. Nach Zentrifugation (RT, 10.000xg, 5min) wurde die wäßrige Phase abgenommen und mit 120µl Ammoniumazetat und 650µl

eiskaltem Ethanol bei -70°C für 30min präzipitiert. Das Pellet (4°C , $10.000\times g$, 15min) wurde mit $100\mu\text{l}$ eiskaltem Ethanol (90%) gewaschen (4°C , $10.000\times g$, 5min) und komplett getrocknet. Es wurde in $5\mu\text{l}$ 1x Beladungspuffer gelöst, 3min bei 90°C erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt.

3.6.5 Elektrophoretische Auftrennung der „geschützten“ Proben

Das Gel setzte sich aus 23,7 ml Acrylamid, 7,5ml 5x TBE mit 7M Urea, 43,8ml Wasser mit 7M Urea, $400\mu\text{l}$ APS und $40\mu\text{l}$ TEMED zusammen. Es wurde zwischen die Glasplatten gegossen, die durch Abstandhalter einer Dicke von 0,4mm getrennt waren. Sofort wurde der Kamm, der die Beladungstaschen formt, eingesteckt. Das Gel polymerisierte während einer Stunde, wurde in die Apparatur eingespannt, und nach gründlichem Waschen der Geltaschen mit 0,5x TBE bei 40Watt ca. 45min äquilibriert. Die Taschen wurden erneut gewaschen und die Proben aufgetragen. Zusätzlich wurde die radioaktive Probe, verdünnt auf 1000-2000 cpm/Tasche, als Marker geladen. Das Gel lief, bis das Bromphenolblau des Beladungspuffers die Unterkante des Gels erreicht hatte, wurde dann abgebaut, in 30% Methanol, 10% Essigsäure fixiert und vakuumgetrocknet. Die Detektion erfolgte autoradiographisch an einem PhosphorImager. Die Intensität jeder Probe wird auf die konstitutiv exprimierten zellulären Gene (GAPDH oder L32) geeicht, so daß ein Vergleich der Proben erfolgen kann.

3.7 Zytokinnachweis mittels „ELISA“ und Bioassay

Um die Freisetzung von Zytokinen und deren Konzentration nachzuweisen, eignet sich der „enzyme-linked immunosorbent assay“ (ELISA), der sandwichartig mittels spezifischer Antikörper das zu untersuchende Zytokin aus der Probe herausfängt und bindet.

Den Herstellerangaben folgend wurden zunächst die spezifischen Antikörper („Capture“), in diesem Falle gegen die humanen Zytokine IL 6 und IL 12p70, an die Plastikoberfläche der Vertiefungen einer 96 Lochplatte gebunden. Darauf wurde der zu analysierende Zellkulturüberstand pipettiert. Die darin enthaltenden Zytokine wurden durch den spezifischen Antikörper eingefangen und gebunden, die übrigen Proteine gründlich abgewaschen. Ein weiterer, gegen das Zytokin gerichteter Antikörper, an den Biotin gekoppelt ist, bindet an den Komplex. Die Detektion erfolgte über ein Streptavidin-Enzym-Konjugat, wobei durch die Enzymreaktion (Meerrettichperoxidase) unter geeigneten Bedingungen ein farbiges Produkt entsteht, dessen Intensität direkt mit der

Menge des vorhandenen Zytokins korreliert. Durch den Vergleich mit einer Referenzstandardkurve ließ sich die Konzentration des Zytokins in der jeweiligen Probe berechnen.

Die IL-6 Freisetzung der CHO Zellen wurde mittels des B9 Proliferationstests im Labor von Dr. Egil Lien nachgewiesen. Das Wachstum des B Zellhybridoms B9 ist stark abhängig von der Präsenz von IL-6, irrelevant der Spezies des Cytokins. Während der normalen Kultivierung dieser Zellen wird das Medium mit 5ng/ml rekombinantem humanem IL-6 versetzt. Um die IL-6 Konzentrationen in den Zellkulturüberständen der CHO Zellen nachzuweisen, wurden die B9 Zellen in einer Dichte von 5000 Zellen/well einer 96well Platte ausgesät. Eine Verdünnungsreihe von rekombinantem humanem IL-6 als Standardreferenz wurde, ausgehend von einer Konzentration von 2 ng/ml, hergestellt. Parallel wurden die zu testenden Zellkulturüberstände seriell verdünnt. Diese Proben, inklusive einer Negativkontrolle wurden im Dreifachansatz zu den Zellen gegeben und für 3 Tage im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die Proliferation der Zellen mittels ³H-Thymidineinbau bestimmt. Durch den Vergleich der Zellproliferation nach Zugabe standardisierter IL-6 Konzentrationen ließ sich die Konzentration des Zytokins in der jeweiligen Probe berechnen.

3.8 Statistik

Statistische Berechnungen, wie Mittelwert, Standardabweichung und studentischer T-Test, wurden mit Hilfe der Statistikfunktionen von Excel durchgeführt. Die den Berechnungen zugrunde liegenden Werte repräsentieren im allgemeinen mindestens 3 individuelle Experimente, die jeweils im Doppel- oder Dreifachansatz durchgeführt wurden. Der studentische T-Test wurde bis auf einige Ausnahmen nur dann durchgeführt, wenn die Anzahl der Einzelergebnisse $n=5$ überschritt. In wenigen Ausnahmen, wenn das Material für weitere Experimente nicht ausreichte, wurden statistische Analysen auch bei einer geringeren Stichprobenzahl durchgeführt. Der studentische T-Test war stets zweiseitig und ergab beim Vergleich zweier Stichproben ein Signifikanzniveau, dessen Fehlerwahrscheinlichkeit ($p<0,05$ oder $p<0,01$) in der jeweiligen Abbildung oder Tabelle angegeben ist.

4 Ergebnisse

4.1 Die Interaktion zwischen Masernvirus und $\gamma\delta$ T Zellen

Eine akute Maserninfektion induziert eine transiente Immunsuppression. Diese begünstigt Sekundärinfektionen, die zu den weltweit hohen Morbiditäts- und Mortalitätsraten, besonders bei Säuglingen und Kleinkindern beitragen. Bisherige Ergebnisse zeigten, daß ein durch die MV-Glykoproteine F und H- vermitteltes Signal die mitogenabhängige und anti-CD3-induzierte Proliferation von lymphozytären Zellen, sowie die Spontanproliferation transformierter Zelllinien hämatopoetischen Ursprungs hemmt (Schlender et al. 1996). Bislang war es nicht möglich, eine gegenüber dem negativen MV-Signal refraktäre Zellpopulation zu identifizieren.

$\gamma\delta$ T Zellen unterscheiden sich funktionell kaum von den $\alpha\beta$ T Zellen, fallen aber durch ihre Art der Antigenerkennung auf. $\gamma\delta$ T Zellen exprimieren in der Regel kein CD4 und CD8 und erkennen ihr Antigen nicht MHC-restringiert (Hayday 2000, Kaufmann 1996). *In vitro* lassen sich die $V\gamma 9/\delta 2$ T Zellen durch eine Reihe von nichtpeptidischen Phospholiganden wie Isopentenyl-Pyrophosphat (IPP) in Gegenwart von IL-2 expandieren (Wesch et al., 1997).

4.1.1 Die Expansion von $\gamma\delta$ T Zellen *in vitro*

Zunächst wurde ein System etabliert, um den Einfluß der MV-Glykoproteine auf die Expansion der $\gamma\delta$ T Zellen zu untersuchen. PBMC, oder aber aufgereinigte T Zellen wurden für 7 Tage mit IL-2 +/- IPP kultiviert. Die Analyse der $\gamma\delta$ T Zell-Expansion erfolgte durchflußzytometrisch anhand einer Doppelfärbung gegen den $\gamma\delta$ TCR (Pan $\gamma\delta$ -FITC) und den allgemeinen T Zell-Marker CD3 (CD3-PE). Die Stimulation mit IPP/IL-2 resultierte in einer bis zu 7fachen Zunahme an $\gamma\delta$ T Zellen, allerdings erforderte sie die Präsenz CD4 positiver T Zellen (Abbildung 4.1).

Wie quantitative Analysen zeigten, korrelierte der prozentuale IPP/IL-2 induzierte Anstieg an $\gamma\delta$ T Zellen mit einer selektiven Zunahme der Zellzahl $\gamma\delta$ TCR-positiver Zellen und ist somit auf eine Proliferation der $\gamma\delta$ T Zellen zurückzuführen (Abbildung 4.2). IPP-

unabhängig scheinen IL-2 responsive T Zellen zu proliferieren. Aus diesem Grunde wurden sämtliche Experimente unter der Zugabe von IL-2 aber mit/ohne IPP durchgeführt und die relative Expansion der $\gamma\delta$ T Zellen als Antwort auf IPP berechnet. Eine Stimulation mit dem Mitogen PHA induzierte ebenfalls die Proliferation von $\gamma\delta$ T Zellen, diese ist jedoch maginal gegenüber der starken Expansion der $\alpha\beta$ T Zellen.

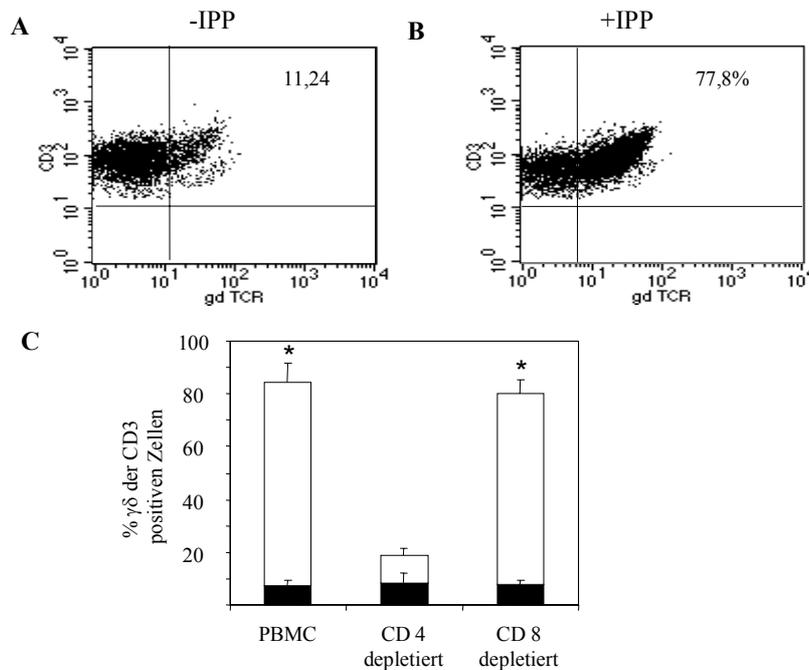


Abbildung 4.1: Expansion von $\gamma\delta$ T Zellen in vitro

PBMC (5×10^4 /well) bzw. aufgereinigte T Zellen (z.T. wurden CD4 oder CD8 positiven Zellen immunmagnetisch depletiert, die Zellzahlen entsprachen dem prozentualen Verhältnis in der PBMC-Fraktion) wurden in Gegenwart von IL-2 (A, bzw. schwarze Balken in C) bzw. IL-2 +IPP (B, bzw. weiße Balken in C) für 7d kultiviert. Anschließend wurde der Anteil der $\gamma\delta$ bzw. $\alpha\beta$ T Zellen an den CD3 positive Zellen durchflußzytometrisch ermittelt (Zahl im Quadranten bei A und B oder als Balken in C). Dabei wurden CD3 negative Zellen durch die Wahl geeigneter Regionen ausgegrenzt. A und B sind repräsentativ für weitere Experimente, C stellt die Mittelwerte von 3 individuellen Experimenten dar, die jeweils im Doppelansatz durchgeführt wurden. Die * symbolisieren eine signifikante Zunahme ($p < 0,05$) der $\gamma\delta$ positiven Zellen infolge der IPP+IL-2 Stimulation. [IL-2 50U/ml, IPP 0,25 μ g/ml]

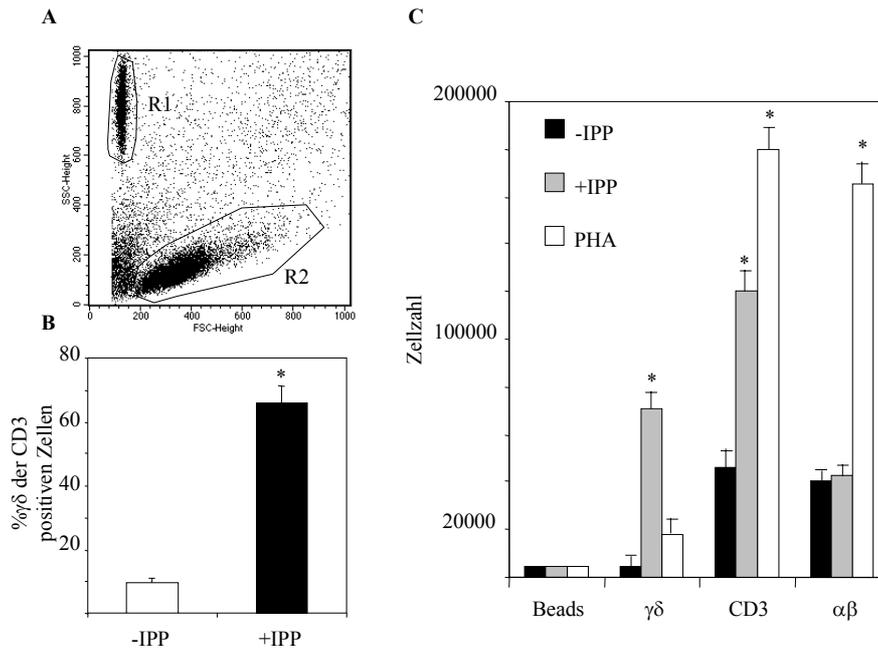


Abbildung 4.2: Stimulation mit IL-2+IPP resultiert in der Proliferation der $\gamma\delta$ T Zellen

PBMC (5×10^4 /well) wurden mit IL2+/-IPP für 7 Tage und parallel für 3 Tage mit PHA stimuliert. Anschließend wurde der Anteil der $\gamma\delta$ bzw. $\alpha\beta$ T Zellen an den CD3 Zellen mittels FACS-Färbung ermittelt. Die tatsächlichen Zellzahlen wurden durch Eichung mit Kalibrierungsbeads (R1 in A) in jedem Ansatz bestimmt. Die Graphik B zeigt den prozentualen Anteil an $\gamma\delta$ T Zellen, C die tatsächliche Zellzahl der einzelnen Populationen nach der Stimulation ohne IPP (schwarz), mit IPP (grau) und mit PHA (weiß). B und C stellen die Mittelwerte von mindestens 3 unabhängigen Experimenten, die im Doppelansatz durchgeführt wurden dar. Die * symbolisieren eine signifikante Zunahme ($p < 0,05$) Zellzahl infolge der Stimulation. [IL-2 50U/ml, IPP 0,25 μ g/ml, PHA 2,5 μ g/ml]

Nach der Etablierung des experimentellen Systems zur Expansion von $\gamma\delta$ T Zellen, wurden verschiedene Parameter, die in dem ursprünglichen Testsystem, mit PHA als T Zell-Mitogen, als proliferationshemmend erwiesen worden waren, untersucht.

4.1.2 Masernvirus-infizierte Probanden

Es ist unbekannt, welchen Einfluß die MV-Infektion auf $\gamma\delta$ T Zellen hat. Im Rahmen einer Zusammenarbeit mit Dr. Ralph Nanan und der Kinderklinik der Universität Würzburg standen Verlaufspuren von Probanden einer Vakzinierungsstudie mit dem Mumps/Masern/Röteln- (MMR-) Impfstoff zur Verfügung. Erwachsene Personen, die über keine Masernimmunität verfügten, wurden geimpft und serielle Blutproben, vor der Impfung (= präimmun) und zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Impfung (= p.i.), entnommen. Durch die Impfung entwickelten alle Probanden eine spezifische Masernimmunität, die serologisch kontrolliert wurde (nicht dargestellt).

Die Zusammensetzung der PBMC Fraktionen wurde mit Hilfe von Färbungen gegen typische Marker (B Zellen: CD19, T Zellen: CD3, Monozyten: CD14, NK-Zellen: CD16/CD56) genauer charakterisiert. Parallel wurden die Zellen mit Antikörpern gegen das MV-H Protein gefärbt, um einen Hinweis auf eine Infektion der Zellen zu erhalten. Während sich die prozentualen Anteile der B Zellen, NK Zellen und Monozyten an den Gesamt-PBMC im Verlauf der Infektion nicht signifikant veränderten, verminderte sich der Anteil an T Zellen deutlich (Tabelle 4.1). Diese Lymphopenie war jedoch transient, und das ursprüngliche prozentuale Verhältnis der Zellen innerhalb der PBMC Fraktion war nach etwa 3 Wochen wiederhergestellt. Die beobachtete Abnahme der T Zellzahlen korrelierte jedoch nicht mit einer Infektion, da sich in keiner der PBMC Populationen MV-H nachweisen ließ (nicht dargestellt, da der Anteil MV-H positiver Zellen nie 0,5 % der Zellen überschritt). Der Anteil der $\gamma\delta$ T Zellen *ex vivo* variierte bezogen auf die Gesamtzahl CD3 positiver Zellen von Patient zu Patient zwischen 5 und 25%. Ein Einfluß der Masernvirusinfektion auf die Zusammensetzung der T Zellpopulationen ließ sich nicht feststellen (Abbildung 4.3A), so daß sich aufgrund des gleichbleibenden Verhältnisses zwischen $\gamma\delta$ und CD3 Zellen die Lymphopenie auch auf die $\gamma\delta$ T Zellen zu beziehen scheint.

Um die Sensitivität der $\gamma\delta$ T Zellen gegenüber dem proliferationshemmenden Signal von MV *ex vivo* zu überprüfen, wurden die PBMC für 7 Tage mit IL-2 +/-IPP kultiviert. Es zeigt sich deutlich, daß die Proliferation der Zellen zu den Zeitpunkten kurz nach Immunisierung (1-21 Tage p.i.) signifikant gehemmt war (Abbildung 4.3B). Erst nach etwa 3 Wochen erholten sich die Zellen und waren wieder mit IPP expandierbar. Das Erreichen des Ausgangsniveaus der Expandierbarkeit der $\gamma\delta$ T Zellen benötigte jedoch über ein halbes Jahr.

Dieses Muster gleicht dem Verhalten *ex vivo* polyklonal oder antigen-spezifisch stimulierter T Zellen, die ebenfalls eine transiente Hemmung ihrer Proliferationskapazität zeigen (Borrow und Oldstone, 1995; Schneider-Schaulies und ter Meulen 1999; Schneider-Schaulies et al., 2001).

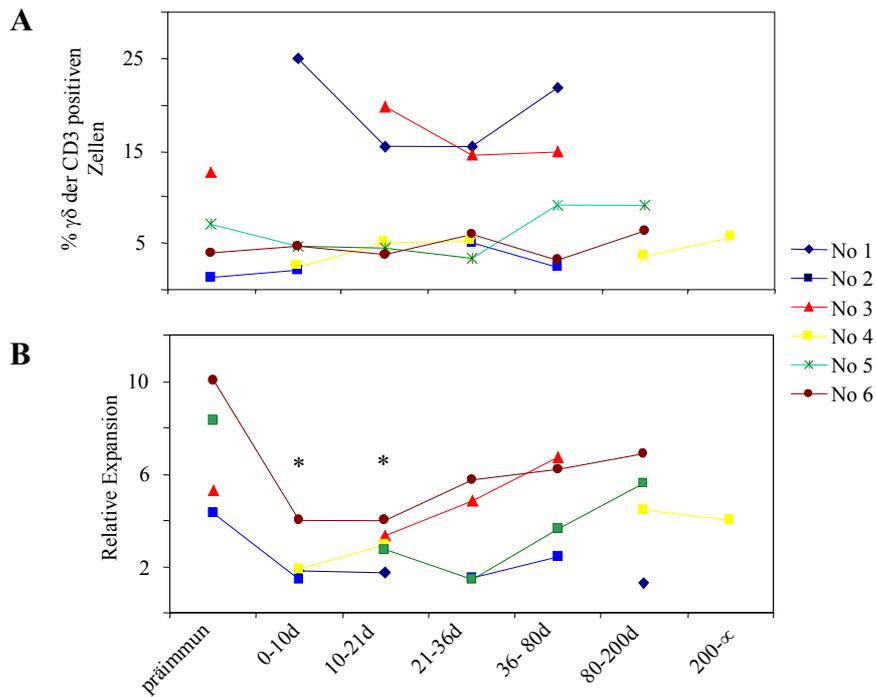


Abbildung 4.3: $\gamma\delta$ T Zell- Entwicklung in Verlaufsproben MMR-vakzinierter Probanden

Der prozentuale Anteil der $\gamma\delta$ T Zellen an den Gesamt-T Zellen (CD3+) innerhalb der PBMC wurde durchflußzytometrisch bestimmt (A), oder die PBMC (5×10^4 /well) mit IL-2 +/- IPP für 7d kultiviert. Anschließend wurde der Anteil der $\gamma\delta$ T Zellen an den CD3+ Zellen ermittelt und die relative Expansion (prozentualer Anteil an $\gamma\delta$ T Zellen nach IL-2 +IPP Stimulation/ prozentualer Anteil an $\gamma\delta$ T Zellen nach IL-2 Gabe) berechnet (B). Die * repräsentieren signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten der einzelnen Probanden für die Zeitpunkte post-infektionem und präimmun ($p < 0,05$). [IL-2 50U/ml, IPP 0,25 μ g/ml]

Tabelle 4.1: Prozentuale Zusammensetzung der PBMC Zellpopulationen in Verlaufsproben MMR-vakzinierter Probanden

6 Probanden, ohne spezifische Masernvirus-Immunität, wurden MMR-vakziniert. Vor und zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Impfung wurden Blutproben abgenommen. Der prozentuale Anteil an T Zellen (CD3+), B Zellen (CD19+), Monozyten (CD14+), NK Zellen (CD16/56+) innerhalb der PBMC wurde durchflußzytometrisch bestimmt. Deutliche Unterschiede zwischen den Proben vor und nach Vakzinierung sind mit * gekennzeichnet. Parallel zu den *lineage*-typischen Oberflächenmarkern wurden die Zellen mit anti-MV-H Antikörpern gefärbt, aber es ließen sich nicht mehr als 0,5 % der Zellen positiv gegenüber der Isotyp-Kontrolle darstellen.

T Zellen	präimmun	0-10d	10-21d	21-36d	36-80d	80-200d	200d-
No. 1		42,4	41,9	42,4	49,3		
No. 2	56,8	41,1*		52,9	52,4		
No. 3	62,7		53,2*	59,5	58,8		
No. 4		52,5	55,6	55,2		53,4	61,7
No. 5	57,0	44,8*	43,5*	53,3	50,1	51,2	
No. 6	55,9	41,6*	46,4*	49,3	53,1	51,3	
B Zellen	präimmun	0-10d	10-21d	21-36d	36-80d	80-200d	200d-
No. 1		22,2	17,5	18,4	19,3		
No. 2	13,3	20,4		17,9	18,3		
No. 3	14,4		13,8	14,7	14,2		
No. 4		15,5	15	15,9		13,9	13,6
No. 5	14,8	19,7	19,5	18,3	16,9	19,2	
No. 6	17,9	20,6	21,7	19,3	16,1	16,3	
Monozyten	präimmun	0-10d	10-21d	21-36d	36-80d	80-200d	200d-
No. 1		16,4	18,7	19,2	17,3		
No. 2	14,9	14,3		16,7	12,4		
No. 3	12,7		13,8	14,5	14,8		
No. 4		12,6	15,1	15,3		13,5	11,7
No. 5	15,04	14,7	14,6	15,4	19,57	19,2	
No. 6	13,9	14,1	18,6	16,4	13,5	16,5	
NK Zellen	präimmun	0-10d	10-21d	21-36d	36-80d	80-200d	200d-
No. 1		16	18,9	17	11,1		
No. 2	12	21,2		9,5	13,9		
No. 3	7,2		16,2	8,3	9,2		
No. 4		16,4	11,3	10,6		16,2	10
No. 5	10,16	17,8	13,4	10	11,43	9,4	
No. 6	11,3	20,7	8,3	12	14,3	12,9	

4.1.3 Die $\gamma\delta$ T Zell-Proliferation ist nach Kontakt mit UV-inaktiviertem Virus inhibiert

Nachdem sich die Expansion der $\gamma\delta$ T Zellen nach Vakzinierung *ex vivo* als gehemmt erwies, wurden *in vitro* weitere Experimente durchgeführt, um die Antworten von $\gamma\delta$ T Zellen auf das negative Proliferationsignal von MV genauer zu charakterisieren. Zunächst wurde der direkte Einfluß der Masernviren ED als Vakzinestamm und WTF als Wildtypstamm auf die Expansion der $\gamma\delta$ T Zellen analysiert.

PBMC wurden, um eine Infektion der Zellen zu verhindern, mit UV-inaktiviertem Virus kokultiviert und mit PHA bzw. IPP/IL-2 stimuliert. In beiden Testsystemen (Abbildung 4.4) zeigte sich die dosisabhängige inhibitorische Wirkung beider Masernstämmen auf die Proliferation der T Zellen. PHA-stimulierte T Zellen bauten nach Kontakt mit hohen Konzentrationen von sowohl dem Vakzinestamm ED als auch dem Wildtypstamm WTF kaum radioaktiv markiertes Thymidin in die DNA ein, ein Anzeichen dafür, daß diese Zellen nicht als Antwort auf das Mitogen proliferieren konnten. In gleichem Maße war auch die IPP/IL-2-vermittelte Expansion der $\gamma\delta$ T Zellen in Abhängigkeit von der jeweiligen Virusdosis inhibiert. WTF scheint bei der Expansion der $\gamma\delta$ T Zellen einen stärkeren inhibitorischen Effekt zu induzieren als ED. Im Gegensatz dazu scheint der hemmende Einfluß von ED auf die PHA-vermittelte Proliferation stärker zu sein als der von WTF.

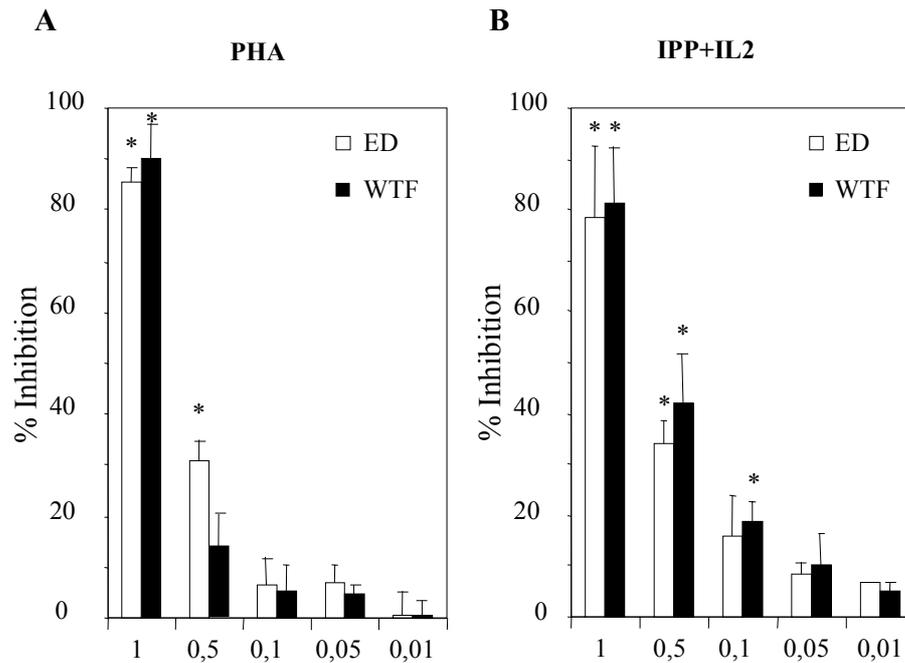


Abbildung 4.4: Proliferationsinhibition PHA bzw. IPP+IL2 stimulierter PBMC nach Kokultur mit UV-inaktiviertem MV

PBMC (5×10^4 /well) wurden mit UV-inaktivierten MV (ED und WTF) in unterschiedlichen Konzentrationen (m.o.i. 1- 0,1) kokultiviert und mit PHA oder IPP/IL-2 stimuliert. Nach 3 bzw. 7 Tagen wurde die Proliferation oder Expansion der Zellen bestimmt (^3H -Thymidin-Einbau bei PHA bzw. durchflußzytometrisch bei IL-2+IPP). Die Inhibition der Proliferation nach Kontakt mit MV wurde im Vergleich zu der jeweiligen Mock Kontrolle berechnet. Die Graphik repräsentiert die Ergebnisse von 3 unabhängigen Experimenten, die jeweils im Doppelansatz durchgeführt wurden. Ein * symbolisiert einen signifikanten Unterschied zwischen Mock und MV mit $p < 0,05$. [PHA $2,5 \mu\text{g/ml}$, IL-2 50U/ml , IPP $0,25 \mu\text{g/ml}$]

4.1.4 Persistierend-infizierte T-Zell und Monozyten-ähnliche Zelllinien hemmen die $\gamma\delta$ T Zell Proliferation, nicht aber persistierend infizierte B-Zelllinien

Vorangegangene Untersuchungen konnten zeigen, daß der Kontakt mit Zellen, die die MV-Glykoproteine F und H auf ihrer Oberfläche exprimieren, ausreicht, um PHA stimulierte PBMC in ihrer Proliferation zu hemmen. Nachdem bislang keine Unterschiede zwischen den konventionellen $\alpha\beta$ T Zellen und den $\gamma\delta$ T Zellen festgestellt werden konnten, wurde untersucht, ob ähnlich wie für die PHA-induzierte Proliferation gezeigt, unterschiedliche MV-infizierte Zelllinien (im folgenden als Presenterzellen = PC zusammengefaßt) die IPP/IL-2-abhängige Proliferation der $\gamma\delta$ T Zellen als Responderzellen (RC) hemmen.

Persistierend ED-infizierte U937, eine monozytäre Zelllinie, und persistierend ED-infizierte Molt-4, eine T Zelllinie, inhibierten in Abhängigkeit von der zugegebenen Zellzahl sowohl die PHA- als auch IPP/IL-2- vermittelte Proliferation der T Zellen (Abbildung 4.5A bzw.

B). Auch persistierend WTF-infizierte BJAB, eine B-Zelllinie, hemmten die Proliferation beider T Zell Populationen. Erstaunlicherweise hatten im Gegensatz dazu persistierend ED infizierte BJAB keinen negativen Einfluß auf die Expansion der $\gamma\delta$ T Zellen, während sie die PHA- induzierte Proliferation signifikant hemmten (Abbildung 4.5C). Dieser nicht-inhibitorische Effekt auf die $\gamma\delta$ T Zell-Expansion konnte auch bei anderen B Zelllinien nachgewiesen werden (Abbildung 4.5D). Der hemmende Effekt auf die PHA-vermittelte Zell-Proliferation war konzentrationsabhängig und korrelierte mit der Expressionsdichte der viralen Glykoproteine auf den PC. Die Zelllinien U937 pED, 8866 pED und Wil-2 pED exprimierten mehr virale Glykoproteine auf ihrer Oberfläche als die Zelllinien BJAB pED und Molt-4 pED (Tabelle 4.2). Im Gegensatz dazu scheinen die Effekte auf die Expansion der $\gamma\delta$ T Zellen weniger von der Zellzahl und der Glykoproteindichte abzuhängen. Unter diesen experimentellen Bedingungen hemmten Molt-4 pED Zellen die IPP/IL-2-vermittelte Proliferation stärker, als die U937 pED Zellen. Dahingegen scheint der nicht-inhibitorische Effekt der B Zelllinien invers mit ihrer Zellzahl zu korrelieren, da bei geringen Konzentrationen wieder eine leichte Hemmung zu beobachten war.

Um zu klären, ob der nicht-inhibitorische Effekt der B Zelllinien auf der persistierenden Infektion beruht, wurden die B Ziellinien lytisch ED infiziert, UV-inaktiviert ($1,5\text{J}/\text{cm}^2$) und als PC mit den PBMC kokultiviert. Allerdings reichte weder die UV-Behandlung noch die Zugabe eines Fusionsinhibierenden Peptides aus, die Infektion der PBMC im Verlauf der 7tägigen Kokultur zu verhindern, so daß keine Auswertung des Experimentes möglich war.

Tabelle 4.2: Expressionsdichte der MV-Glykoproteine F und H auf der Oberfläche persistierend infizierter PC. Die Werte repräsentieren die mittlere Fluoreszenzintensität.

	U937 pED	Molt-4 pED	BJAB pED	BJAB pWTF	8866 pED	Wil-2 pED
MV-H	412,6	168,9	300,2	245,6	486,7	512,4
MV-F	367,2	212,6	352,7	312,8	366,4	412,7

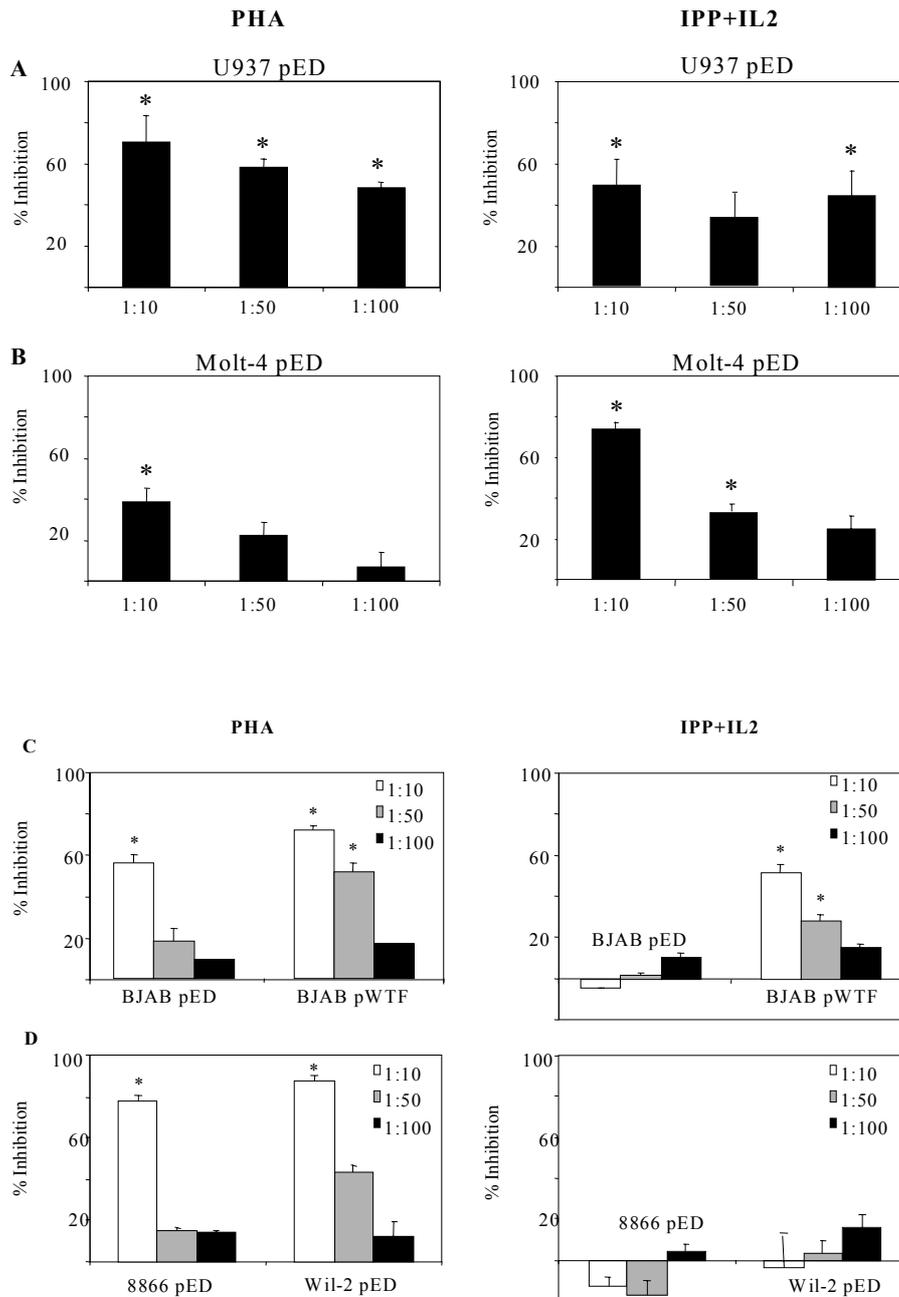


Abbildung 4.5: Proliferationsinhibition PHA bzw. IPP+IL-2 stimulierter PBMC nach Kokultur mit den Presenterzellen

PBMC (5×10^4 /well) wurden entweder mit PHA (links) oder IPP/IL-2 (rechts) stimuliert und mit den UV-inaktivierten persistierend infizierten Zelllinien und ihren Kontrollen (A-U937, B-Molt-4, C-BJAB, D-8866 und Wil-2) in den angegebenen Verdünnungen kultiviert. Die Proliferation PHA-stimulierter Zellen wurde anhand des Einbaus radioaktiv-markierten Thymidins berechnet, die Expansion der $\gamma\delta$ T Zellen durchflußzytometrisch bestimmt. Die Proliferationsinhibition wurde berechnet, indem die Proliferation der PBMC in Gegenwart nicht-infizierter Zellen mit der in Gegenwart persistierend infizierter Zellen verglichen wurde. Die Ergebnisse repräsentieren mindestens 3 unabhängige Experimente. Ein * symbolisiert signifikante Unterschiede bei $p < 0,05$. [PHA 2,5 μ g/ml, IL-2 50U/ml, IPP 0,25 μ g/ml]

4.1.5 Lytisch infizierte Dendritische Zellen hemmen zwar $\alpha\beta$ T Zellen, nicht aber $\gamma\delta$ T Zellen

Eine Interferenz der $\gamma\delta$ T Zellen mit dem immunsuppressiven Signal des Masernvirus war bislang auf persistierend ED-infizierte B Zelllinien beschränkt. Wünschenswert wäre jedoch, wenn auch primäre Zellen diese Charakteristika aufweisen würden. Es wurde beschrieben, daß $\gamma\delta$ T Zellen neben einer Vielzahl anderer Zellen auch mit professionellen antigenpräsentierenden Zellen interagieren. Um dieses im Kontext der MV-Infektion zu studieren, wurden MoDC lytisch mit ED oder WTF infiziert und mit PBMC kokultiviert.

Da MoDC durch die Stimulation mit LPS, gemessen an einer erhöhten Oberflächenexpression der kostimulatorischen Moleküle HLA-DR, CD83 und CD86, ausreifen (Tabelle 4.3), vermögen sie die allogene, MHC-vermittelte Proliferation naiver konventioneller $\alpha\beta$ T Zellen zu induzieren. Auch ED- und WTF-infizierte MoDC reifen, gemessen an der verstärkten Expression kostimulatorischer Moleküle, aus. Trotz dieser Aktivierung sind MV-infizierte MoDC nicht fähig, eine T Zell-Proliferation zu induzieren, sondern inhibieren sie deutlich (Schnorr et al., 1997; Klagge et al., 2000; Klagge, 2001). Diese Beobachtungen ließen sich auch in der vorliegenden Arbeit reproduzieren: In Abhängigkeit von der Zellzahl MV-infizierter MoDCs war die allogene vermittelte Proliferation der T Zellen deutlich eingeschränkt, während LPS-ausgereifte, aber auch Mock-infizierte MoDC, abhängig vom Aktivierungsgrad, die T Zellproliferation stimulierten (Abbildung 4.6A).

Um die allostimulatorische Kapazität der MoDC zu erhalten, konnten die MoDC nicht UV-inaktiviert werden. Um dennoch eine Infektion der RC zu inhibieren, wurde dem Medium ein fusionsinhibierendes Peptid zugesetzt (Epanand et al., 1993). FIP verhinderte effizient eine Fusion der MV-infizierten MoDC mit den T Zellen. Nach einer Woche Kultur in der MLR oder nach Stimulation mit IPP und IL-2 waren weniger als 2 % der CD3-positiven Zellen infiziert (nicht gezeigt). FIP führte aber zu keiner Blockade des von den viralen Glykoproteinen induzierten negativen Proliferationssignals. Denn in gleicher Weise erwiesen sich auch UV-inaktivierte, MV-infizierte MoDC in dem PHA-Proliferationstest in Abhängigkeit von der eingesetzten Zellzahl als proliferationshemmend (Tabelle 4.4).

Tabelle 4.3: Die Ausreifung unreifer MoDC nach der MV-Infektion.

MoDC wurden wie unter 3.1.2.2 generiert und mit LPS stimuliert, oder mit Mock, ED (m.o.i. 0,1) oder WTF (m.o.i. 0,05) infiziert. Nach 2 Tagen wurden die Zellen durchflußzytometrisch charakterisiert. Die Expression von HLA-DR, CD83 und CD86 ist als mittlere Fluoreszenzintensität angegeben. Für MV-H sind die % positiven Zellen ausgewertet. Die in der Tabelle angegebenen Mittelwerte \pm Standardabweichung repräsentieren drei unabhängige Experimente.

	HLA-DR [MFI]	CD83 [MFI]	CD86 [MFI]	MV-H [%]
LPS	870 \pm 120	65 \pm 15	70 \pm 20	0,8 \pm 1,3
Mock	110 \pm 60	18 \pm 2	15 \pm 3	1,2 \pm 0,5
ED	550 \pm 80	45 \pm 12	58 \pm 8	30 \pm 6
WTF	680 \pm 60	58 \pm 10	65 \pm 12	39 \pm 7

Tabelle 4.4: Proliferationsinhibition PHA-stimulierter RC nach Kokultur mit UV-inaktivierten MV-Infizierten MoDC

Die MoDC (Tabelle 4.3) wurden als PC 1:3 - 1:243 verdünnt, UV-inaktiviert und mit autologen PHA-stimulierten PBMC ($1 \cdot 10^5$ Zellen/well) für 3 Tage kokultiviert. Für weitere 16h wurde [3H]-Thymidin zugegeben. Anschließend wurde die Proliferation der PBMC, gemessen an dem Einbau radioaktiv-markierten Thymidins, bestimmt. Die Proliferationsinhibition wurde anhand der Mock-infizierten Kontrolle berechnet. Die in der Tabelle angegebenen Werte repräsentieren 3 unabhängige Experimente. [PHA 2,5 μ g/ml]

% Proliferationsinhibition	1:3	1:9	1:27	1:81	1:243
MoDC-ED	76 \pm 12	61 \pm 6	39 \pm 5	34 \pm 7	9 \pm 6
MoDC-WTF	82 \pm 7	70 \pm 3	52 \pm 9	41 \pm 3	13 \pm 4

Da MoDC eine erhöhte Permissivität gegenüber einer Infektion mit MV-Wildtypstämmen zeigen (Ohgimoto et al., 2001), wurden sie mit unterschiedlichen Dosen ED und WTF infiziert, um nahezu die gleiche Anzahl infizierter DC (ca. 35% nach 2 Tagen) zu erreichen. Aufgrund der höheren Expressionsdichte der viralen Glykoproteine auf den WTF-infizierten MoDC, die durchflußzytometrisch bestimmt wurde, war der inhibitorische Effekt dieser Zellen gegenüber den ED infizierten MoDC etwas ausgeprägter.

Erstaunlicherweise konnte nach einem Kontakt mit den ED-infizierten MoDC, kein proliferationshemmender Einfluß auf die Expansion der $\gamma\delta$ T Zellen festgestellt werden. Unabhängig von der Zellzahl und Expressionsdichte der Glykoproteine wirkten sich nur WTF-infizierte MoDC negativ auf die IL-2 und IPP induzierte Expansion der $\gamma\delta$ T Zellen aus, während ED-infizierte MoDC die Proliferation eher förderten. Auch höhere

Konzentrationen stärker ED-infizierter MoDC (Verhältnis 1:2 mit 60% infizierten Zellen) vermochten die Proliferation der $\gamma\delta$ T Zellen nicht negativ zu beeinflussen (nicht gezeigt).

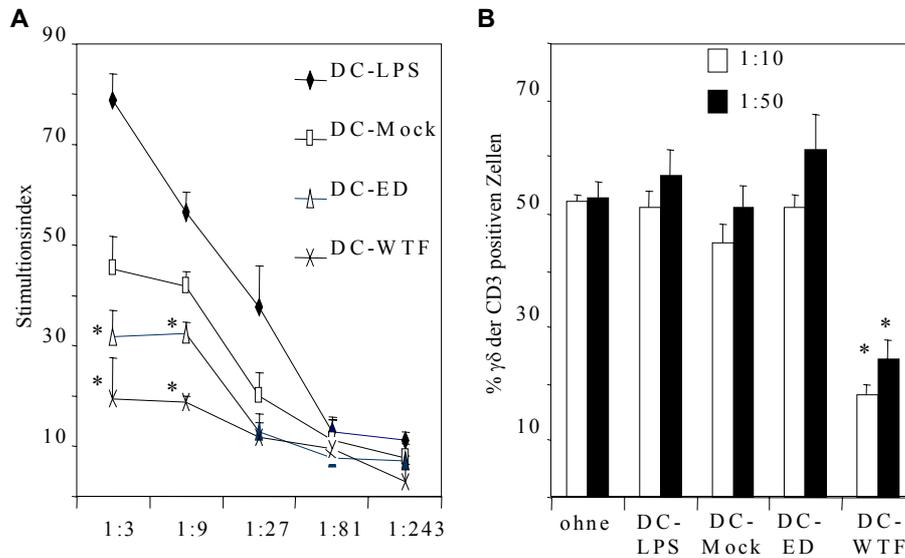


Abbildung 4.6: MV-infizierte MoDC hemmen die T Zell-Proliferation in der gemischte Leukozyten-Reaktion und im PHA-Test, nicht aber die Expansion der $\gamma\delta$ T Zellen

DC wurden mit LPS (100ng/ml) stimuliert oder Mock, ED (m.o.i. 0,1) oder WTF (m.o.i. 0,05) 2-3 Tage infiziert und anschließend in unterschiedlichen Verdünnungen (1/3-1/243) mit allogenen aufgereinigten T Zellen (5×10^4 /well) in einer MLR kokultiviert. Die Proliferation wurde anhand des Einbaus radioaktiv-markierten Thymidins gemessen. Dieselben DC wurden im Verhältnis 1:10 und 1:50 mit IL-2+/- IPP stimulierten autologen PBMC (5×10^4 /well) kokultiviert und die Expansion der $\gamma\delta$ T Zellen wurde durchflußzytometrisch bestimmt. Um eine Infektion der T Zellen zu verhindern, wurde dem Medium FIP zugegeben, das die Fusion der viralen Hüllmembran mit der Zellmembran verhindert. Die dargestellten Ergebnisse basieren auf mindestens drei individuellen Experimenten, die im Dreifachansatz (A) bzw. im Doppelsatz (B) mit Zellen unterschiedlicher Spender durchgeführt wurden. Die * symbolisieren eine signifikante ($p < 0,05$) Inhibition der Expansion, berechnet auf der Basis der Mock-Kontrolle. [FIP 200 μ M, IL-2 50U/ml, IPP 0,25 μ g/ml]

4.1.6 Monozyten werden benötigt, um eine Aufhebung des inhibitorischen Einflusses des Masernvirus auf die $\gamma\delta$ T Zell-Proliferation zu bewirken

Die durch MV gehemmte mitogenabhängige Responderzellproliferation erwies sich als refraktär gegenüber zusätzlichen exogenen Signalen wie PMA/Ionomycin oder IL-2. Im Gegensatz dazu zeigen sich humane $\gamma\delta$ T Zellen unter gewissen Umständen insensitiv gegenüber der MV-vermittelten Immunsuppression. Diese beobachtete Interferenz liegt nicht in einer prinzipiellen „Nicht-Hemmbarkeit“ der IPP/IL-2 vermittelten Expansion, da sowohl die UV-inaktivierten Masernviren als auch bestimmte persistierend infizierte Zelllinien die Expansion der $\gamma\delta$ T Zellen deutlich inhibieren. Vielmehr scheinen die persistierend infizierten B Zelllinien und lytisch infizierte MoDC über einen Oberflächenkontakt oder lösliche Faktoren mit den $\gamma\delta$ T Zellen direkt oder indirekt zu

interagieren, und so die durch die MV-F/H Proteine vermittelten negativen Proliferationssignale zu neutralisieren. Dieses könnte ein direkter oder indirekter, d.h. durch eine dritte involvierte Zellpopulation vermittelter, Effekt sein.

Um dies zu analysieren, wurden die Responderzellen in die einzelnen PBMC Populationen aufgetrennt und zunächst aufgereinigte T Zellen als isolierte Fraktion untersucht. Die T Zell-Aufreinigung erfolgte über die CD2-vermittelte Rosettierung an Schafserythrozyten. Die resultierende Zellpopulation bestand zu über 90% aus CD3 positiven Zellen. Erstaunlicherweise antworteten reine T Zellen deutlich vermindert auf die Stimulation mit IPP und IL-2 (30% gegenüber 60% bei den Gesamt-PBMC). Gleichzeitig erwiesen sich sowohl die persistierend ED-infizierten U937 als auch 8866 als suppressiv für die $\gamma\delta$ T Zell-Expansion (Abbildung 4.7A). Im Vergleich dazu erfolgte bei den Gesamt-PBMC nur eine durch U937 pED-vermittelte Hemmung der $\gamma\delta$ T Zellproliferation, während 8866 pED keine Inhibition induzierten (Abbildung 4.4B).

Dieser Befund impliziert, daß nicht die persistierend infizierten B Zellen in der Lage sind, die Expansion der $\gamma\delta$ T Zellen zu bewirken, sondern daß die „Hilfe“ über eine dritte, in den ursprünglichen PBMC vorhandene, Zellpopulation geleistet wird.

Aufgereinigte T Zellen wurden daher mit den einzelnen PBMC Populationen, d.h. B Zellen, NK Zellen oder Monozyten, resubstituiert und mit den PC kokultiviert. Diese Zellfraktionen wurden immunomagnetisch mit Antikörpern gegen CD19, CD14 oder CD56 isoliert. Nach der Anreicherung auf über 95% positive Zellen wurden sie entsprechend des prozentualen Verhältnisses innerhalb der PBMC (Tabelle 4.5) zu den T Zellen, deren Zellzahl konstant gehalten wurde, gegeben und mit den PC kokultiviert.

Tabelle 4.5: Prozentuale Zusammensetzung der PBMC-Zellpopulation

%	T Zellen	B Zellen	NK Zellen	Monozyten
Spender 1	54,8	12,6	9,8	15,3
Spender 2	61,9	16,9	12,4	8,3
Spender 3	58,2	14,2	14,2	12,9

Weder die Resubstitution von B Zellen (Abbildung 4.7C), noch von NK Zellen (nicht gezeigt) zu den reinen T Zellen konnte den immunsuppressiven Effekt der viralen Glykoproteine auf die Proliferation der $\gamma\delta$ T Zellen aufheben. Erst die Präsenz von Monozyten (Abbildung 4.7D) neutralisierte den negativen Einfluß der persistierend

infizierten B Zelllinie auf die Expansion der $\gamma\delta$ T Zellen. Bei der Kokultur der PBMC mit T Zellen und Monozyten zeigte sich ein vergleichbares Bild wie nach der Kokultur der PC mit den Gesamt-PBMC. Die Hilfe der Monozyten, das MV-vermittelte negative Proliferationssignal zu neutralisieren, bezieht sich aber nur auf persistierend ED-infizierte B Zelllinien und ED-infizierte MoDC, während die übrigen Effektoren (UV-inaktiviertes Virus, persistierend infizierte Monozyten und T Zellen oder WTF-infizierte Zellen) nicht modifiziert werden können.

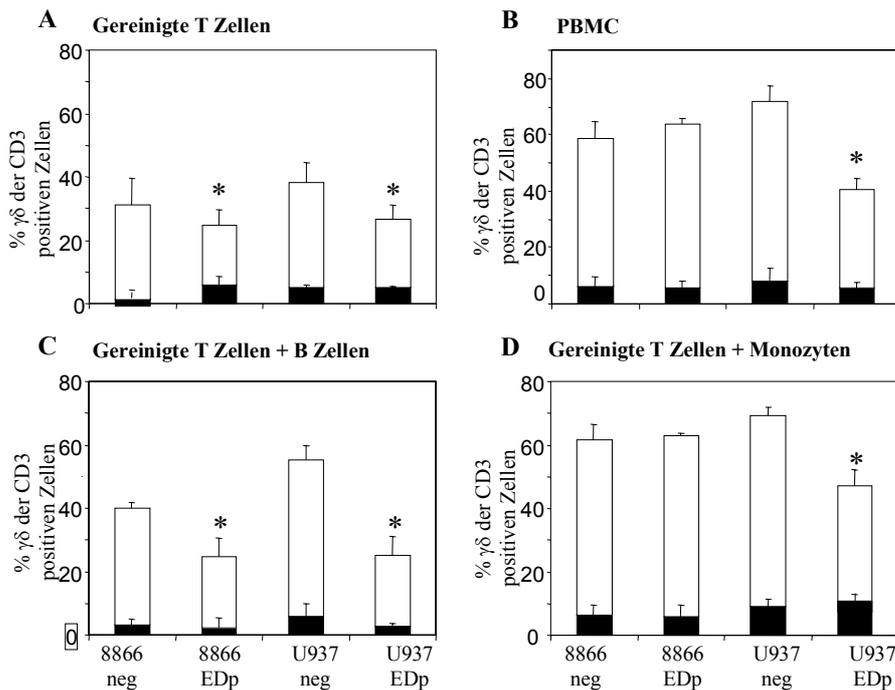


Abbildung 4.7: $\gamma\delta$ T Zell Expansion nach Kokultur verschiedener PBMC Fraktionen mit den UV-inaktivierten Effektorzelllinien

UV-inaktivierte, nicht infizierte und persistierend ED-infizierte Zelllinien (nicht-inhibitorische B Zellen: 8866 pED und inhibitorische Monozyten: U937 pED) wurden im Verhältnis 1:50 mit Gesamt- PBMC (die Zellzahl war spenderabhängig relativ zu der Anzahl CD3 positiver Zellen) bzw. aufgereinigten T Zellen ($2,5 \cdot 10^4$ Zellen/well) in Gegenwart von IL-2 (schwarz) + IPP (weiß) kokultiviert. Die T Zell-Aufreinigung erfolgte über die CD2-vermittelte Rosettierung an Schafserythrozyten. Für die Resubstitution der B Zellen bzw. Monozyten wurden sie mittels MACS- Antikörpern gegen CD19 bzw. CD14 positiv selektioniert und entsprechend dem prozentualen Anteil an den Gesamt-PBMC zu den gereinigten T Zellen gegeben. Die Graphiken repräsentieren die Mittelwerte von 3 unabhängigen Experimenten, die im Doppelansatz mit Zellen unterschiedlicher Blutspender durchgeführt wurden. Die * symbolisieren eine im Vergleich zu der nicht-infizierten Kontrolle signifikante ($p < 0,05$) Inhibition der IPP/IL-2-vermittelten Expansion der T Zellen. [IL-2 50U/ml, IPP 0,25 μ g/ml]

4.1.6.1 Dieser Einfluß beruht auf der Sekretion von Zytokinen, bzw der Expression von Oberflächenmolekülen

Durch das Auftrennen der PBMC in die einzelnen Zellpopulationen und die anschließende Kokultur mit Zellen, die die viralen Glykoproteine exprimieren, ergab sich, daß die $\gamma\delta$ T Zellen per se empfänglich gegenüber dem proliferationsinhibierenden Signal des MV sind. Die Interaktion der PC mit den Monozyten oder aber eine Art Rückkopplungsprozeß zwischen den PC, den $\gamma\delta$ T Zellen und den Monozyten neutralisiert jedoch diesen Effekt oder liefert einen additiven Stimulus, so daß die $\gamma\delta$ T Zellen expandieren können. Es sind verschiedene Interaktionen denkbar (Abbildung 5.1). Dabei könnten sowohl Oberflächenkontakte zwischen den beteiligten Zellen aber auch lösliche Faktoren eine Rolle spielen. Um letzteres zu evaluieren, wurden die Überstände von ED-infizierten DC in Kokulturen von IPP/IL-2 stimulierten T Zellen und Monozyten mit UV-inaktiviertem MV transferiert. Allerdings reichte der Transfer des Überstandes nicht aus, den inhibitorischen Effekt weder von ED noch von WTF zu neutralisieren (nicht gezeigt). Es ist folglich eher anzunehmen, daß der direkte Kontakt zwischen den DC, Monozyten und $\gamma\delta$ T Zellen eine Reaktion hervorruft, die die ungehemmte Expansion der $\gamma\delta$ T Zellen ermöglicht. Diese Fragestellung sollte durch das räumliche Trennen der PC und RC beantwortet werden. Eine Membran trennt die Kompartimente der Zellkulturschale, so daß kein Kontakt zwischen den Zellen erfolgen kann, aber lösliche Mediatoren, die Membran passieren können.

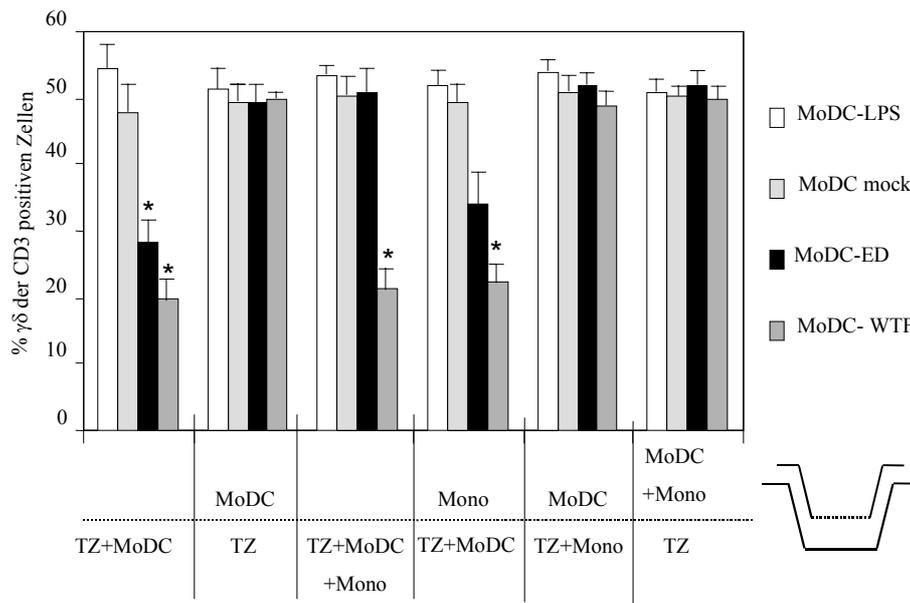


Abbildung 4.8: Der das negative MV-Signal neutralisierende Einfluß der Monozyten auf die Expansion der $\gamma\delta$ T Zellen ist kontaktabhängig

Wie zuvor beschrieben wurden die MoDC als PC im Verhältnis 1/50 eingesetzt. Autologe aufgereinigte T Zellen ($2,5 \cdot 10^4$ Zellen/well) und Monozyten (Anzahl relativ zum prozentualen Anteil innerhalb der PBMC) wurden verwendet. Nach dem in der Abbildung angegebenen Schema wurden die Zellen durch eine Membran in unterschiedliche Kompartimente geteilt, so daß kein Kontakt der Zellen erfolgen kann. Lösliche Mediatoren können jedoch die Membran passieren. Die Expansion der $\gamma\delta$ T Zellen wurde nach 7tägiger Kultur mit IPP und IL-2 durchflußzytometrisch bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten, als Doppelansatz mit Zellen unterschiedlicher Blutspender. Eine signifikante ($p < 0,05$) Inhibition der Expansion ist durch ein * symbolisiert. [IL-2 50U/ml, IPP 0,25 μ g/ml]

Wie bereits beobachtet, reichte die Präsenz von Monozyten aus, das von den ED-infizierten DC ausgehende Signal zu neutralisieren. Wurden die Monozyten jedoch räumlich von den übrigen Zellen getrennt, ging dieser Effekt weitestgehend verloren, und die $\gamma\delta$ T Zell-Expansion war gehemmt (Abbildung 4.8). Diese Beobachtung bestätigt, daß ein Kontakt zwischen den PC und den Monozyten, jedoch kein löslicher Mediator, notwendig zu sein scheint, um den Proliferationsarrest zu kompensieren. Da der Kontakt zwischen ED-infizierten MoDC und Monozyten scheinbar keinen additiven Stimulus für die räumlich getrennte $\gamma\delta$ T Zellproliferation lieferte, ist die Präsenz eines löslichen Faktors, der von den Monozyten sezerniert wird, nicht wahrscheinlich. Um diese Möglichkeit jedoch genauer zu evaluieren, wurden Zytokine, deren $\gamma\delta$ T Zell-Antworten modulierende Eigenschaften beschrieben wurden, den Kokulturen aus aufgereinigten T Zellen und MV-infizierten MoDC anstelle von IL-2 oder additiv zu IL-2 und IPP zugegeben. Obwohl sich bestätigte, daß IL-12 anstelle von IL-2 die Expansion von $\gamma\delta$ T

Zellen stimulieren, und IL-10 die Proliferation hemmen kann, war keines der verwendeten Zytokine ausreichend, den MV-vermittelten Proliferationsarrest zu neutralisieren. Auch konditioniertes Medium LPS- und Pam₃CSK₄-stimulierter Monozyten, das eine Vielzahl proinflammatorischer Zytokine enthalten müßte (zum Vergleich Abbildung 4.21), konnte das negative Signal nicht kompensieren. Da offenbar kein von den Monozyten sezerniertes Zytokin als „Helferfaktor“ für die Expansion der $\gamma\delta$ T Zellen in Frage kommt, scheint ein Oberflächenkontakt dieses neutralisierende Signal zu generieren.

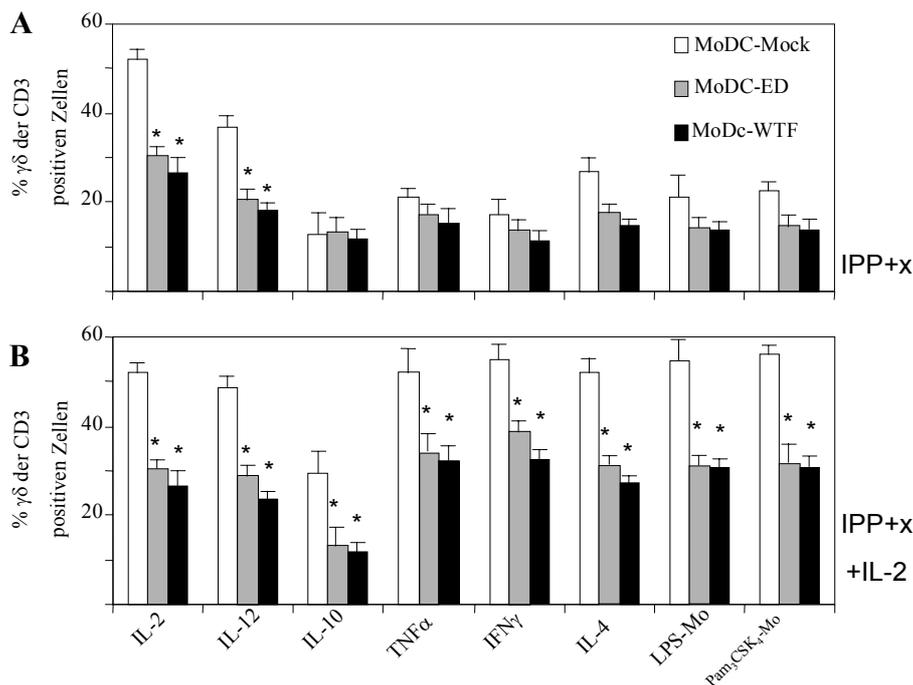


Abbildung 4.9: Zytokine scheinen für die Kompensation des negativen MV-Signals für die Expansion der $\gamma\delta$ T Zellen nicht ausreichend zu sein

Aufgereinigte T Zellen wurden in Gegenwart autologer Mock- oder MV-infizierter MoDC (Infektion wie zuvor beschrieben, im Verhältnis 1:50 eingesetzt) für 7 Tage mit IPP stimuliert. Anstelle von IL-2 (A) oder additiv zu IL-2 (B) wurden die Zytokine IL-12, IL-10, TNF α , IFN γ , IL-4 oder 50 μ l konditioniertes Medium LPS- oder Pam₃CSK₄-stimulierter Monozyten (nach 24h Stimulation 10ng/ml LPS und 2,5 μ g/ml Pam₃CSK₄) zu den Kulturen aufgereinigter T Zellen ($2,5 \cdot 10^4$ Zellen/well) gegeben. Die Expansion der $\gamma\delta$ T Zellen wurden durchflußzytometrisch bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte von 3 unabhängigen Experimenten (jeweils im Doppelansatz mit Zellen unterschiedlicher Blutspender). Eine signifikante ($p < 0,05$) Inhibition der Expansion ist durch ein * symbolisiert. [IL-2 50U/ml, IPP 0,25 μ g/ml; IL-12 10ng/ml, IL-10 10ng/ml, IL-4 10ng/ml (Boullier et al., 1999), TNF α 100ng/ml (Lahn et al., 1998), IFN γ 100U/ml (Cipriani et al., 2000)]

Es gibt eine Vielzahl von Publikationen, die Monozyten als akzessorische Zellen für $\gamma\delta$ T Zellen beschreiben. Jedoch ist unklar, ob eine Modulation der Monozyten erfolgen muß, damit diese akzessorisch wirken können. Im bovinen System exprimieren Monozyten konstitutiv ein Oberflächenmolekül, das eine allogene Expansion von $\gamma\delta$ T Zellen

induzieren kann (Sathiyaseelan et al., 2002). Unter anderen experimentellen Konditionen müssen aber $\gamma\delta$ T Zell-Liganden von Monozyten präsentiert werden (Miyagawa et al., 2001). Um festzustellen, ob die Präsenz von Monozyten ausreicht, oder ob eine Reaktion dieser Zellen auf den Kontakt mit den MV-infizierten MoDC notwendig ist, um den „Helferfaktor“ zu induzieren, wurden Monozyten mit Paraformaldehyd (PFA) fixiert und anschließend 4 Stunden kultiviert, um eine Sekretion vorgefertigter Proteine zu erlauben. Diese Zellen wurden mit IPP/IL-2-stimulierten reinen T Zellen und MV-infizierten MoDC kultiviert. Es zeigte sich, daß die fixierten Monozyten nicht fähig sind, das negative Proliferationssignal der MV-Glykoproteine zu neutralisieren und eine Expansion der $\gamma\delta$ T Zellen zu erlauben.

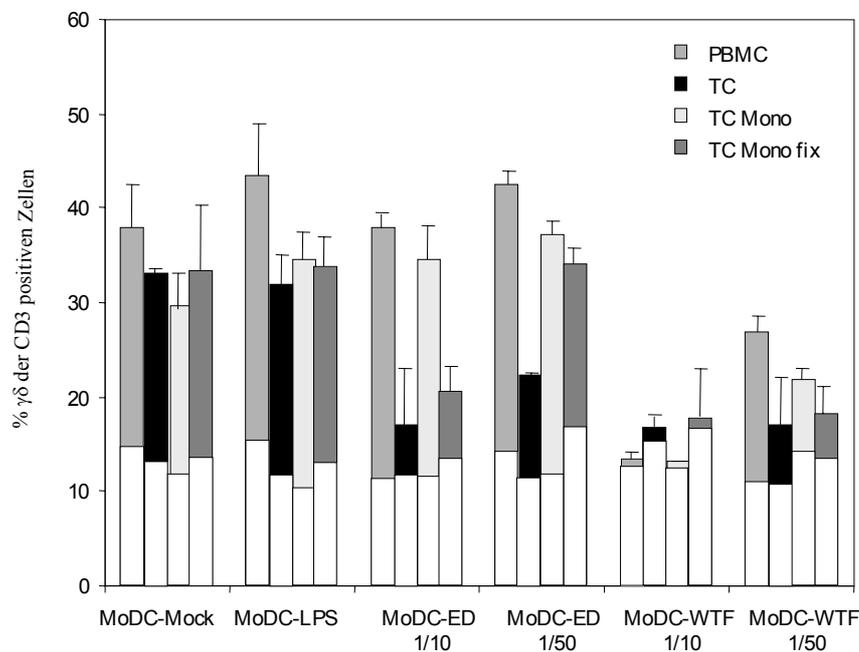


Abbildung 4.10: PFA-fixierte Monozyten sind nicht in der Lage, das negative MV-Signal für die Expansion der $\gamma\delta$ T Zellen zu neutralisieren.

Monozyten wurden für 30min mit 4% PFA fixiert, intensiv gewaschen und für 4 Stunden inkubiert, um eine Sekretion vorgefertigter Proteine zu erlauben. Anschließend wurden sie (als Kontrollen wurden nicht-fixierte Monozyten verwendet) mit autologen aufgereinigten T Zellen ($2,5 \cdot 10^4$ Zellen/well) und MoDC als PC kokultiviert. Die MoDC wurden wie bereits beschrieben generiert und infiziert und wurden in den Verhältnissen 1/10 und 1/50 eingesetzt. Als Kontrollen wurden Gesamt-PBMC (mit identischer Anzahl CD3 positiver Zellen) oder aufgereinigte T Zellen mit IPP/IL-2 für 7 d in Gegenwart der PC stimuliert. Die Expansion der $\gamma\delta$ T Zellen wurde durchflußzytometrisch quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei individuellen Experimenten, die mit Zellen unterschiedlicher Blutspender, jeweils im Doppelansatz, durchgeführt wurden. Eine mit $p < 0,05$ signifikante Inhibition der Expansion, verglichen mit der Mock-Kontrolle, ist durch ein * symbolisiert. [IL-2 50U/ml, IPP 0,25 μ g/ml]

4.2 Die Interaktion zwischen Masernvirus und den Toll-ähnlichen Rezeptoren

Obwohl das Masernvirus das adaptiven Immunsystems supprimiert und so sekundäre Infektionen ermöglicht und verstärkt, wird dennoch eine sehr effiziente virus-spezifische Immunantwort induziert, die eine langanhaltende protektive Immunität verleiht. Allerdings unterscheiden sich eine natürliche Infektion und eine Vakzinierung deutlich hinsichtlich der Stärke und der Dauer dieser Antworten, wobei eine differentielle Regulation der Aktivierung von APC dafür ursächlich sein könnte. Während eine Vielzahl mikrobieller Produkte bekannt ist, die APC über die Toll-ähnlichen Rezeptoren aktiviert, sind bislang nur zwei virale Proteine, das F Protein von RSV (Kurt-Jones et al., 2000) und das *env* Protein muriner Retroviren (Rassa et al., 2002) beschrieben, die TLR4-abhängige Signalwege aktivieren.

4.2.1 Masernvirus- Wildtyp, nicht aber Vakzine-Stämme, aktivieren Zellen via TLR2

Mithilfe eines Reporter-gen-Testes sollte ermittelt werden, ob das Masernvirus, möglicherweise stammspezifisch, TLR-abhängige Signale aktivieren kann. Im Rahmen einer Zusammenarbeit mit Dr. Egil Lien stand uns ein Reporterzellsystem zur Verfügung, mit dessen Hilfe diese Fragestellung beantwortet werden konnte.

CHO Zellen, die zwar ein endogenes Hamster-TLR4 exprimieren, aber kein funktionelles TLR2, wurden stabil mit einem CD25 Reporter-gen transfiziert, das unter der Kontrolle eines NF κ B-abhängigen Promotor steht (EL1). Zusätzlich wurden humanes CD14 (3E10), humanes CD14 und humanes TLR2 (3E10 hTLR2) oder humanes CD14 und humanes TLR4 (3E10 hTLR4) stabil transgen in diesen Zellen überexprimiert (Medvedev et al., 2001). Die Expression dieser Proteine wurde durchflußzytometrisch mit Hilfe der Antikörper TL2.1 und HTA125 und anti-CD14 kontrolliert (nicht gezeigt).

Diese Reporterzellen wurden mit bekannten Substanzen, LPS als TLR4 Agonist und Pam₃CSK₄ als TLR2 Agonist, stimuliert und die NF κ B-abhängige CD25 Expression auf der Zelloberfläche durchflußzytometrisch bestimmt. In Abbildung 4.11 sind repräsentativ die Histogramme eines derartigen Experimentes dargestellt.

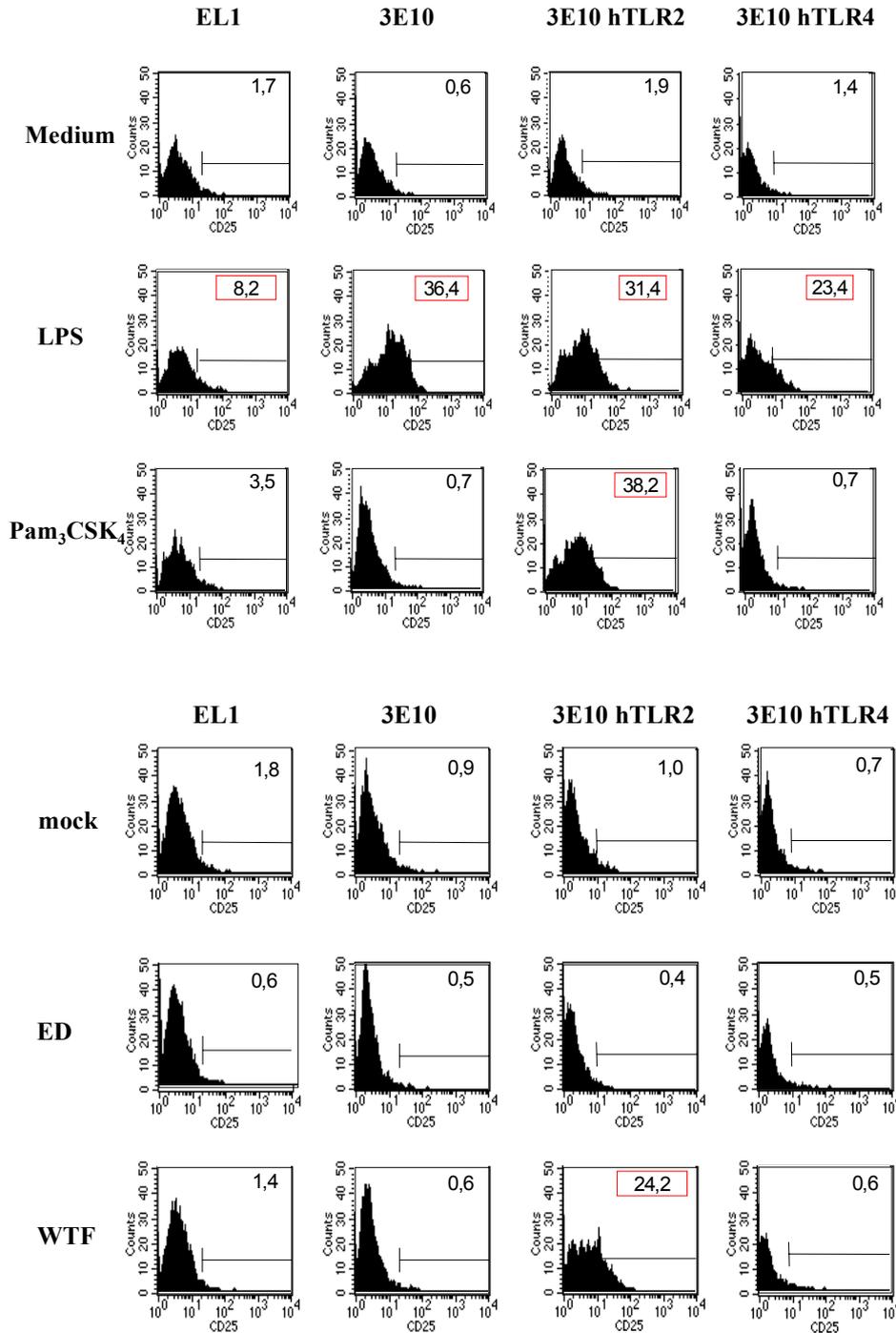


Abbildung 4.11: WTF induziert die Expression von CD25 auf hTLR2 exprimierenden Reporterzellen

CHO Zellen wurden mit LPS (10ng/ml), Pam₃CSK₄ (2,5µg/ml), Mock, ED und WTF (die Viren jeweils mit einer m.o.i. von 1, Mock mit dem größten Volumen der Virusverdünnung) 12-16h stimuliert. Anschließend wurde die Reporteraktivität, gemessen als CD25 Expression, durchflußzytometrisch bestimmt. Dargestellt sind die Histogramme für die einzelnen Zelllinien (in Spalten), stimuliert mit den verschiedenen Substanzen (in Zeilen) mit % CD25 positiven Zellen als in den Histogrammen angegeben Zahlenwert.

Da CHO Zellen endogenes Hamster-TLR4 exprimieren, können alle 4 Zelllinien auf LPS mit erhöhter CD25 Expression, als Maß für eine induzierte NFκB-Aktivität, antworten, allerdings wird diese Fähigkeit deutlich durch die Anwesenheit des Korezeptors CD14

verstärkt und die Zahl CD25 positiver Zellen steigt von etwa 8% (EL1) auf ca. 30% (3E10) an. Die Überexpression des humanen TLR4 hat keinen synergistischen Effekt auf die LPS induzierte NF κ B-Aktivierung. Pam₃CSK₄ kann nur in Zellen, die ein funktionelles TLR2 besitzen, eine CD25 Expression induzieren. Somit sind nur die als 3E10 hTLR2 bezeichneten Zellen in der Lage, auf eine Stimulation mit Pam₃CSK₄ mit einer etwa um das 20fach erhöhten Reporterogenaktivität (etwa 40% gegenüber 2%) zu antworten. Diese beiden Agonisten sind also geeignet, spezifisch die TLR2- und die TLR4- abhängige Aktivierung der Zellen kontrollieren.

Im Vergleich wurden nun die Masernviren ED und WTF und als Kontrolle eine Mock-Präparation als Stimulanzen getestet. Erstaunlicherweise induziert nur WTF, nicht aber ED, eine Reporterogenaktivierung in den TLR exprimierenden CHO Zellen. Diese war aber nicht, wie bei RSV oder MMTV, TLR4 vermittelt, sondern TLR2-abhängig. Während verschiedene WTF-Präparationen immer einen dosisabhängigen NF κ B-aktivierenden Effekt (im allgemeinen stieg der Prozentsatz CD25 positiver Zellen um das 20fache) in den 3E10 hTLR2 Zellen aufwiesen, blieben verschiedene ED-Präparationen inaktiv. Auch bis zu 10fach höhere Konzentrationen von ED zeigten keinen aktivierenden Effekt auf die Reporterzellen (Abbildung 4.12 und Abbildung 4.13), während WTF noch bei einer m.o.i. von 0,1 eine deutlich stimulierende Wirkung erzielen konnte.

CHO Zellen unterstützen im Falle der Expression von CD46 und CD150, die als Masernvirusrezeptoren fungieren, die Infektion und Replikation von MV (u.a. Erlenhöfer et al., 2001 und 2002). Da aber trotz der Verwendung hochdosierter und infektiöser Viruspräparationen nie ein cytopathischer Effekt in den TLR exprimierende Reporterzellen zu beobachten war, und nie mehr als 2% MV-N positive Zellen nachweisbar waren (Abbildung 4.12), läßt sich ausschließen, daß die untersuchten TLRs als Eintrittsrezeptoren für Masernviren fungieren.

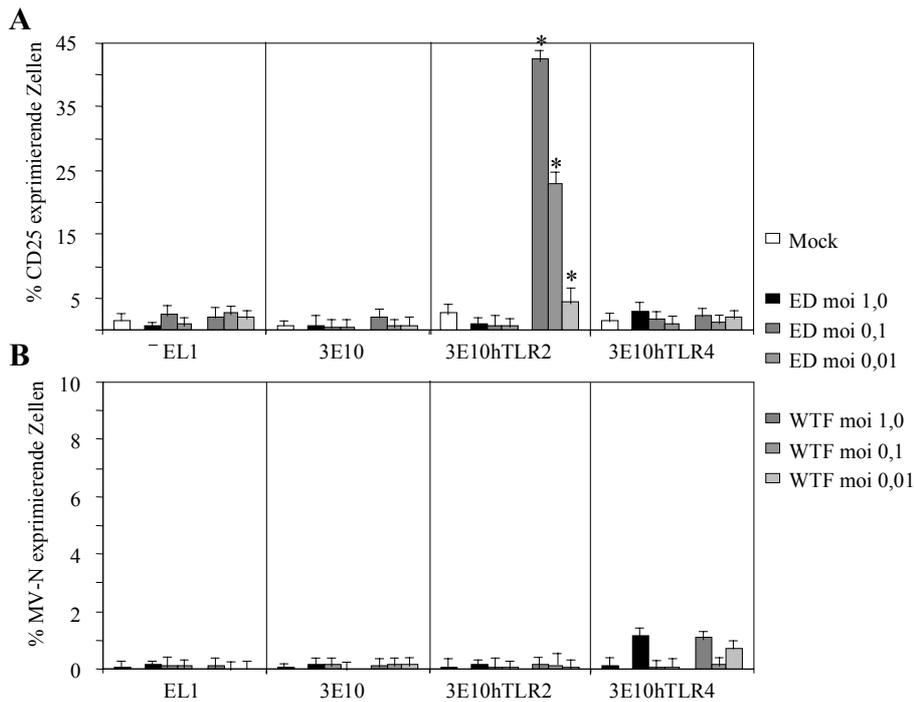


Abbildung 4.12: WTF induziert konzentrationsabhängig die Expression von CD25 auf TLR2 exprimierenden Reporterzellen

CHO Reporterzellen wurden mit Mock, ED und WTF in den angegebenen Konzentrationen 12-16h stimuliert und anschließend die Reporteraktivität, gemessen als CD25 Expression, im FACS bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens 3 Experimenten: in A die % CD25 positiven Zellen nach Abzug der Mediumkontrolle, und in B die % MV-N positiven Zellen. Ein * symbolisiert signifikante ($p < 0,01$) Unterschiede zwischen der Mock- und den MV-Präparationen.

Um einen Eindruck über die Effizienz der WTF induzierten TLR2 Aktivierung zu gewinnen, wurden die Reporterzellen mit unterschiedlichen Konzentrationen der bekannten Agonisten und der MV Präparationen stimuliert. Wie aus Abbildung 4.13 ersichtlich, besitzen die Agonisten ein Konzentrationsoptimum für die maximale Induktion der Reporteraktivität, während geringere, aber auch höhere Konzentrationen weniger effizient sind. Auch WTF zeigt eine vergleichbare Kinetik: hohe Konzentrationen haben keinen additiven Effekt, die optimale Konzentration liegt bei einer m.o.i von etwa 2. ED allerdings induziert in keiner der verwendeten Konzentrationen eine Reporteraktivität.

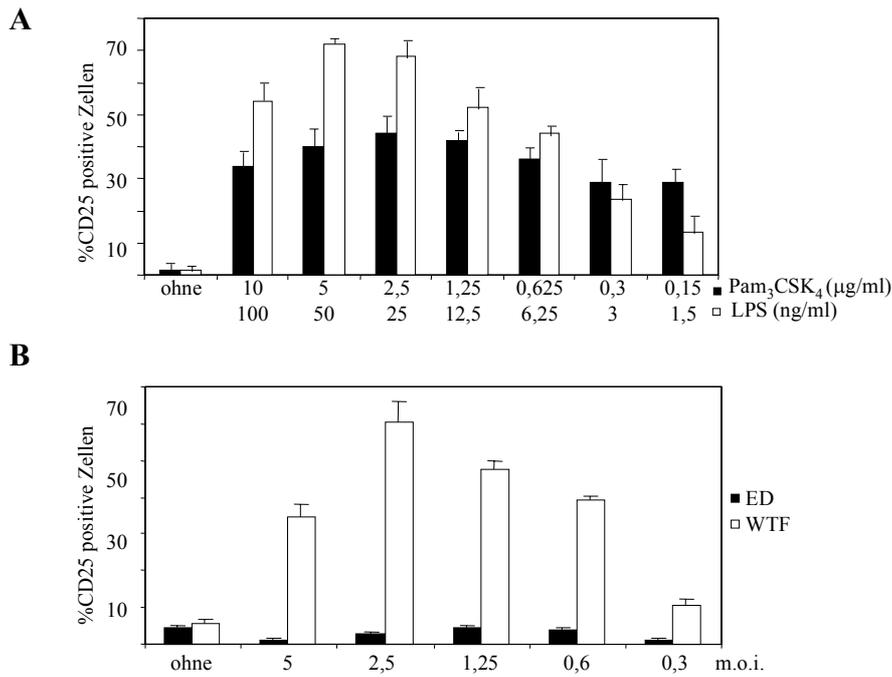


Abbildung 4.13: Titration von ED und WTF auf den TLR exprimierenden Reporterzellen

3E10 hTLR4 Zellen wurden mit LPS, bzw. 3E10 hTLR2 Zellen mit Pam₃CSK₄, Mock, ED und WTF in den angegebenen Konzentrationen 12-16h stimuliert und anschließend die Reporterogenaktivität, gemessen als CD25 Expression, im FACS bestimmt. Dargestellt sind die %CD25 positiven Zellen, in A stimuliert mit den bekannten TLR Agonisten und in B mit den MV Stämmen ED und WTF als Mittelwerte von mindestens 2 unabhängigen Experimenten.

Aufgrund der Diskrepanz zwischen der fehlenden und der starken TLR2 agonistischen Eigenschaft von ED gegenüber WTF, wurden weitere Vakzine- und Wildtypvirusstämme (Rima et al., 1997; Erlenhöfer et al., 2002) auf ihre TLR-stimulierende Aktivität analysiert. Tatsächlich zeigten alle als Vakzine klassifizierten Masernstämme keinerlei TLR agonistische Aktivität, während die getesteten lymphotropen Wildtyp-Stämme auf den TLR2 transgenen CHO Zellen eine Reporterogenaktivität induzierten (Abbildung 4.14). Die einzige Ausnahme stellte der als Wildtyp-klassifizierte Stamm Chicago dar, der keine TLR2 agonistischen Eigenschaften zeigte.

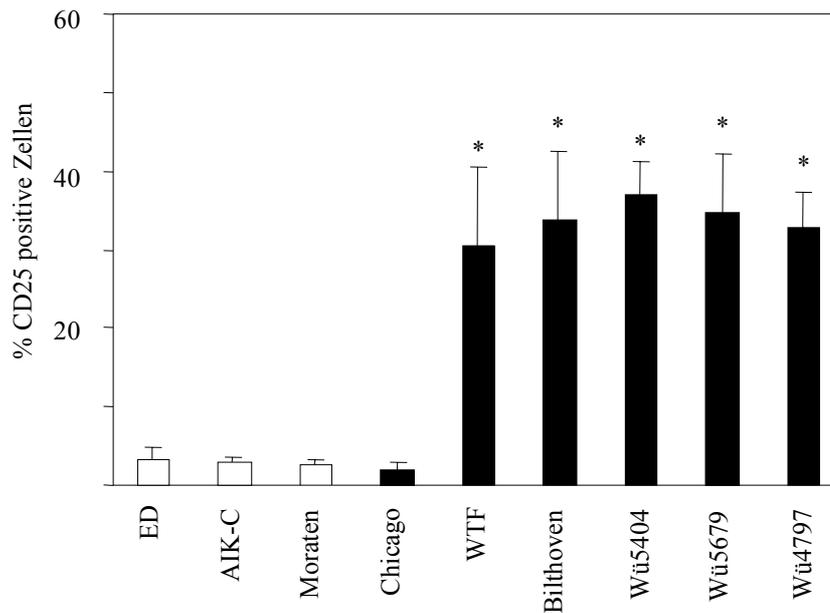


Abbildung 4.14: Lymphotrope MV-Wildtyp-, nicht aber Vakzine-Stämme, haben TLR2 agonistische Eigenschaften

CHO wurden mit ED, AIK-C, Moraten, Chicago, WTF, Bilthoven, WÜ5404, WÜ5679 und Wü4797, jeweils mit einer m.o.i. von 1 12-16h stimuliert und anschließend die Reporterogenaktivität, gemessen als CD25 Expression, im FACS bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte von mindestens 3 individuellen Experimenten der % CD25 exprimierenden Zellen nach Abzug der jeweiligen Mock-Kontrollen. Die MV-Vakzinestämme sind in weiß, die Wildtypstämme in schwarz dargestellt. Die * symbolisieren eine signifikante ($p < 0,01$) Induktion der Reporterogenaktivierung verglichen mit der Mock- (aber auch der ED-) Präparation.

Da die Vakzine- und Wildtyp- Viren auf unterschiedlichen Zelllinien passagiert werden, könnte der zelluläre Hintergrund die unterschiedlichen Eigenschaften, TLR2 zu aktivieren, verursachen. Um dies auszuschließen, wurden ein auf BJAB gezogenes ED und ein an Vero Zellen adaptiertes WTF (WTFv) auf den Reporterzellen getestet. Es zeigte sich, daß der zelluläre Hintergrund, auf dem die Viren passagiert werden, die Fähigkeit, als TLR2 Agonist zu fungieren, nicht beeinflusst (Abbildung 4.15). Denn ED, gezogen auf Vero oder auf BJAB, induzierte keine Reporterogenaktivität auf TLR2 transgenen Zellen, während WTFv, die Eigenschaft, über TLR2 eine CD25 Expression zu induzieren, beibehielt.

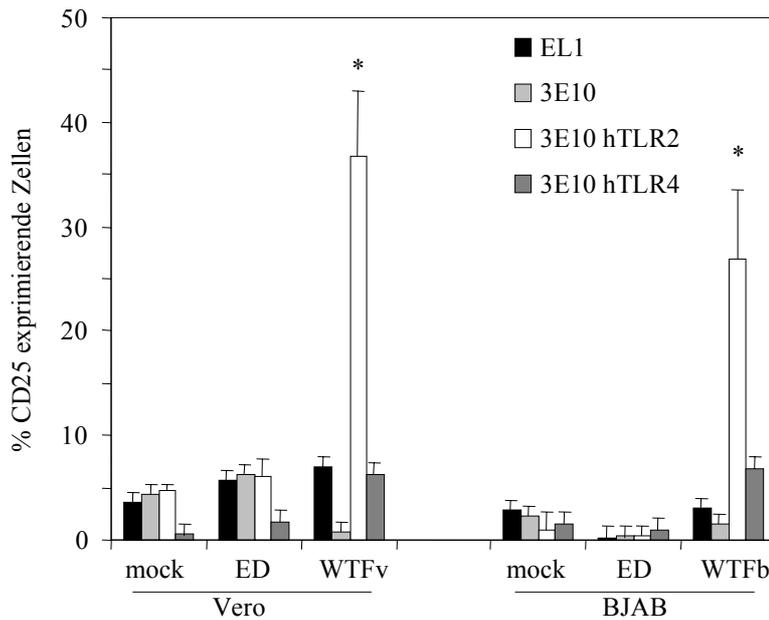


Abbildung 4.15: Der zelluläre Hintergrund hat keinen Einfluß auf die TLR2 agonistischen Eigenschaften

CHO Zellen wurden mit ED (entweder auf Vero oder BJAB Zellen gezogen), WTFb, und WTFv, jeweils mit einer m.o.i. von 1, bzw. der jeweiligen Mock Kontrolle 12-16h stimuliert und anschließend die Reporterexpression, gemessen als CD25 Expression, im FACS bestimmt. Dargestellt sind die % CD25 exprimierenden Zellen als Mittelwerte von 3 individuellen Experimenten, die im Doppelansatz durchgeführt wurden. Die * symbolisieren signifikante ($p < 0,05$) Unterschiede zwischen der Mock-Präparation (aber auch ED) und WTF.

4.2.2 Die Aktivierung von Zellen über TLR2 erfordert weder den Viruseintritt noch Replikation, aber Kontakt zwischen Zelle und Virus

Bislang ist in den Experimenten infektiöses Virus eingesetzt worden. Wie bereits erwähnt lassen sich CHO Zellen, da sie die erforderlichen Eintrittsrezeptoren nicht exprimieren, nicht mit MV infizieren. Auch die TLR können diese Funktion nicht übernehmen, sondern lediglich Signale übermitteln. Dennoch war nachzuweisen, ob eine Inaktivierung des Virus, seine Fähigkeit, als TLR2 Agonist zu fungieren, beeinflusst. Weder UV-, noch Hitze-Inaktivierung, beides Maßnahmen, die eine Replikation des Virus effektiv verhinderten (nicht dargestellt), veränderten die Aktivität von WTF (Abbildung 4.16A). Auch ein die Fusionsinhibierendes Peptid (FIP), das das Vermischen der äußeren Membranen von Virus und Wirtszelle verhindert, hatte keinen hemmenden Einfluß auf die Induktion der Reporterexpression. Werden die Zellen jedoch in einem Zweikammersystem kultiviert, dessen Membran für das Virus nicht permeabel ist, und das

den Kontakt zwischen dem Virus und der Reporterzelle verhindert, erfolgt, unabhängig von der für die Viruszucht verwendeten Zellen, keine NF κ B-Aktivierung. Demzufolge ist ein Kontakt zwischen dem Virus und der TLR exprimierenden Zelle offensichtlich notwendig, um die Aktivierung zu induzieren.

Durch die Verwendung dieses Zweikammersystemes konnten mögliche Kontaminationen der Viruspräparationen ausgeschlossen werden, da mikrobielle Bestandteile wie LPS und Pam₃CSK₄, den Filter passieren und eine Stimulation der Zellen bewirken konnten. Gesamt-Bakterien (SAC= Staphylococcus aureus, Cowan strain) konnte dagegen nach der Trennung durch die Membran keine Stimulation der Reporterzellen mehr induzieren (Abbildung 4.16B). Eine Kontamination der Viruspräparationen mit Endotoxinen und Mycoplasmen ist bereits im Vorfeld der Experimente durch einen Limulus-Test und eine Mycoplasmen-PCR ausgeschlossen worden.

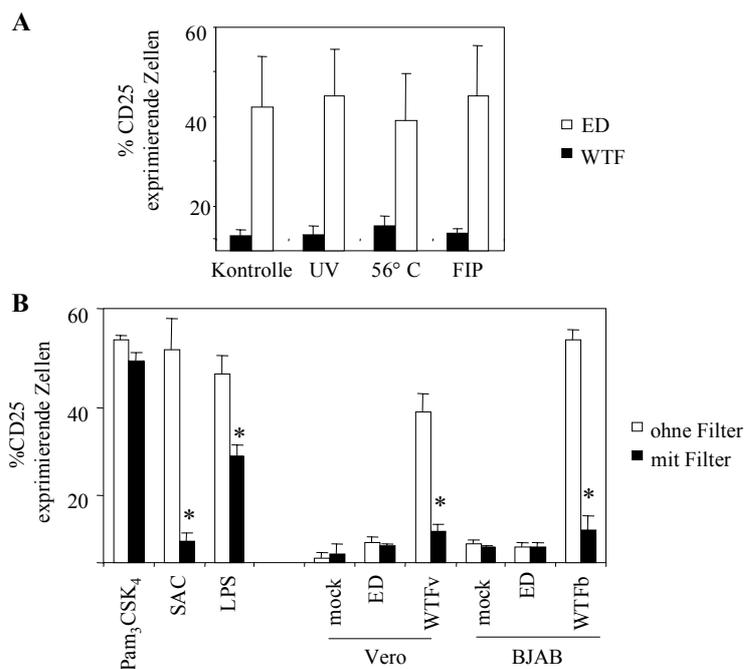


Abbildung 4.16: Die agonistische Aktivität von WTF ist kontaktabhängig, aber unabhängig von der Infektiosität

A- Mock, ED und WTF wurden UV-(1,5J/cm²) oder hitzeinaktiviert (1h 56°C). Infektiöses und inaktiviertes Virus (m.o.i. 1, gezogen auf Vero oder BJAB Zellen) wurden als Stimuli verwendet. FIP wurde in einer Konzentration von 200 μ M dem Medium zugesetzt. B- Im Zweikammersystem wurden die TLR2 exprimierenden Zellen im unteren Kompartiment ausgesät, die Membran, die keinen Virusdurchtritt erlaubt, eingesetzt und das Virus ins obere Kompartiment pipettiert und 12-16h inkubiert. Ein * symbolisiert eine signifikante (p<0,05) Inhibition der Reporterogenaktivität als Folge der Trennung durch die Membran, berechnet auf der Basis von 3 unabhängigen Experimenten (jeweils als Doppelansatz).

Um für die nachfolgenden Experimente einheitliche Konditionen zu schaffen, wurden sämtliche Viren auf BJAB gezogen und über einen diskontinuierlichen Sucrosegradienten aufgereinigt. Die Konzentration der viralen Glykoproteine F und H der jeweiligen Viruspräparation wurde mittels eines Western-Blots angeglichen und entsprach in etwa einer m.o.i. von 0,5 bei WTF (nicht dargestellt).

4.2.3 Die Fähigkeit des Wildtypen, Zellen über TLR2 zu aktivieren, ist nicht spezies-spezifisch und wird durch CD14 verstärkt

Neben den bislang beschriebenen CHO Reporterzellen standen uns weitere Linien zur Verfügung, die die Möglichkeit boten, Fragestellungen bezüglich der Spezies-Spezifität und der möglichen Korezeptorfunktion des CD14 Moleküles zu klären. CHO Reporterzellen waren stabil mit dem murinen TLR2-Ortholog alleine (EL1 mTLR2) oder zusammen mit humanem CD14 (3E10 mTLR2) transfiziert.

Auch in diesen Zellen induzierte gereinigtes WTF (Abbildung 4.17) die Aktivierung des NF κ B-abhängigen Reportergens. Allerdings reduzierte das Fehlen des CD14 Oberflächenmoleküls die Reporterogenaktivität nach Stimulation mit WTF deutlich, nicht aber nach Stimulation mit Pam₃CSK₄.

CHO Zellen, die das humane TLR2-Ortholog in Abwesenheit von CD14 exprimierten, fehlte das Reporterogen, so daß eine TLR-vermittelte Aktivierung über einen anderen Mechanismus nachgewiesen werden mußte. IL-6 ist ein Zytokin, das nach einer NF κ B-Aktivierung synthetisiert und sezerniert wird. Mittels eines Biotestes, der die IL-6-abhängige Proliferation der murinen Hybridomlinie B9 nachweist, wurden die Zytokinkonzentrationen in den Zellkulturüberständen stimulierter CHO Zellen im Labor von Dr. Egil Lien bestimmt. In gleicher Weise wie die CD25 Aktivierung, erfolgte auch die Pam₃CSK₄-vermittelte IL-6 Freisetzung CD14-unabhängig, nur in TLR2 exprimierenden Zellen. Die LPS-induzierte IL-6 Sekretion war CD14-abhängig und TLR4-vermittelt. CD14 verbesserte nicht nur die Wechselwirkung zwischen WTF und murinem TLR2, sondern auch mit humanem TLR2, da CHO Zellen, die zwar hTLR2 exprimieren, nicht aber CD14 (CHO hTLR2), auf eine Stimulation mit WTF nicht mit erhöhter IL-6 Freisetzung antworten konnten (Tabelle 4.6).

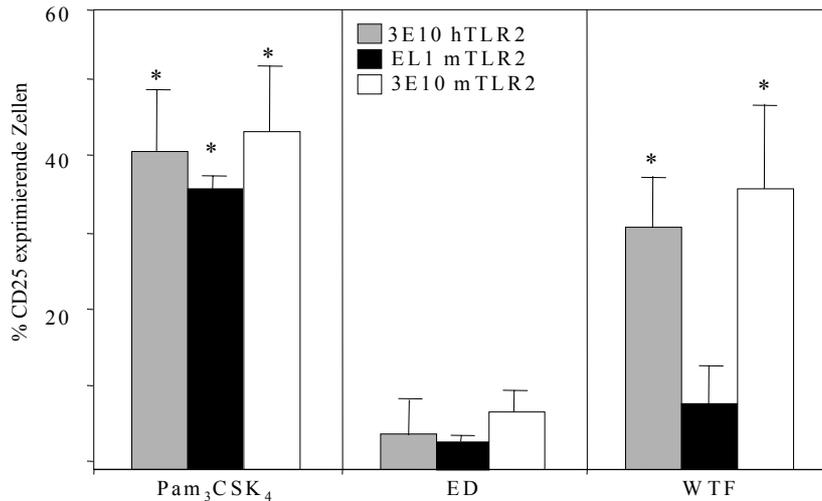


Abbildung 4.17: CHO Reporterzellen, die murines TLR2 exprimieren, sind ebenfalls durch WTF stimulierbar, CD14 interagiert dabei additiv

CHO Transfektanten (3E10= CD14 positiv, exprimierten die humane oder murine Form von TLR2, EL1= CD14 negativ), wurden mit Pam₃CSK₄ (2,5µg/ml), ED und WTF (gezogen auf BJAB, aufgereinigt und mit angeglichenem Glykoproteingehalt) 12-16h stimuliert und anschließend die Reporterergenaktivität, gemessen als % CD25 Expression, im FACS bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte von 5 unabhängigen Experimenten. Die * symbolisieren eine signifikante (p<0,01) Aktivierung der Reporterzellen, verglichen mit der Mock-Kontrolle.

Tabelle 4.6: Induktion der IL-6 Freisetzung in CHO Transfektanten durch WTF

CHO Zellen wurden mit LPS (10ng/ml), Pam₃CSK₄ (2,5µg/ml), Mock, ED und WTF (gezogen auf BJAB, aufgereinigt und mit gleichem Glykoproteingehalt) 12-16h stimuliert. Die Überstände (Triplikate) wurden in dem B9 Zellproliferationstest auf die Freisetzung bioaktiven IL-6 (pg/ml) getestet (im Labor von Dr. Egil Lien). Durch den Vergleich der Zellproliferation nach Zugabe standardisierter rhIL-6 Konzentrationen ließ sich die Konzentration des Zytokins in der jeweiligen Probe berechnen und ist ± Standardabweichung angegeben. Die Daten repräsentieren zwei unabhängige Experimente. Die * symbolisieren deutliche Unterschiede im Vergleich zu der nicht-stimulierten Probe.

	Stimulation					
	Medium	LPS	Pam ₃ CSK ₄	Mock	ED	WTF
EL1	27,1 ±4,6	46,7 ±2,8	39,2 ±4,8	32,5 ±9,2	49,7 ±2,8	39,6 ±8
3E10	8,9 ±4,1	152 ±3,3*	35,6 ±5,8	31,2 ±6,2	54,3 ±5,2	31,4 ±6,4
3E10 hTLR2	13,8 ±6,3	127,2 ±1,8*	199,0 ±2,7*	27,7 ±1,1	60,7 ±2,5	131,2 ±4,6*
CHO hTLR2	8,1 ±7,4	32,4 ±7,0	155,5 ±3,3*	14,4 ±4,8	34 ±4,8	27,4 ±4,7
3E10 hTLR4	18,7 ±3,6	133,9 ±3,3	22,53 ±6,7	23,2 ±4,6	40,8 ±2,3	19,37 ±5,5

4.2.4 Das Hämagglutininprotein der Wildtyp-Masernstämme induziert die TLR2-abhängige Zellaktivierung. Diese Fähigkeit geht durch den Austausch einer einzigen Aminosäure verloren

Es ist evident, daß eines oder beide der viralen Glykoproteine H und F der Masernvirus-Wildtypstämme als TLR2 Agonisten fungiert/fungieren. Um dies zu analysieren, wurden verschiedene rekombinante Masernviren verwendet. In diesen sind auf dem Hintergrund des Edmonston-Vakzinestammes die Glykoproteine F und H einzeln oder doppelt gegen die des Wildtypstammes WTF ersetzt (Abbildung 4.18; Johnston et al., 1999; Erlenhöfer et al., 2002), so daß deren Funktionen kontextabhängig untersucht werden können. Alle Viren wurden auf BJAB gezogen, aufgereinigt und der Proteingehalt anhand eines Western-Blots auf die gleiche Konzentration eingestellt.

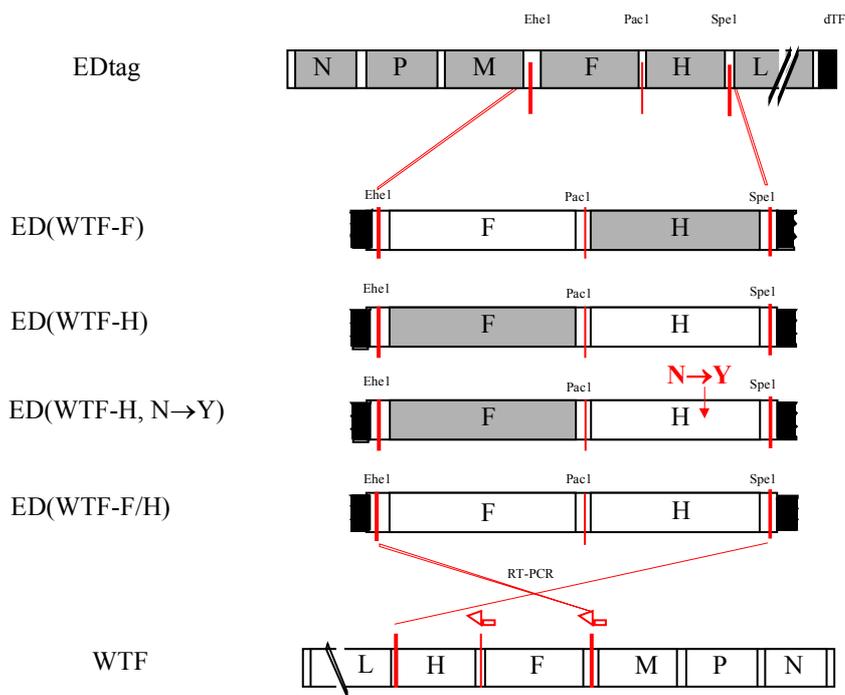


Abbildung 4.18: Rekombinante Masernviren

Schematische Darstellung der verwendeten rekombinanten Masernviren. Die F und H Glykoprotein-Gene des ED Stammes (EDtag als molekularer MV-Klon, grau) wurden gegen die jeweiligen F und H Gene des WTF Stammes (weiß) ausgetauscht. Der Aminosäureaustausch im WTF-H Protein an der Position 481 von N, charakteristisch für Wildtypstämmen, zu Y, gefunden in Vakzinestämmen, ermöglicht die Bindung an CD46.

Während weder EDtag, noch ED(WTF-F) die TLR2 exprimierenden Zellen aktivieren konnten, induzierten die rekombinanten Masernviren, die das Hämagglutinin-Protein des WTF enthalten, mit einer dem WTF vergleichbaren Effizienz eine NFκB-Aktivierung

(Abbildung 4.19). Wiederum ist diese Eigenschaft nicht auf das humane TLR2 beschränkt, denn auch Zellen, die das murine TLR2-Ortholog exprimieren, waren durch Viren, die das WTF-H Protein exprimieren, aktivierbar. Es zeigt sich erneut die Abhängigkeit von CD14 als Korezeptor. Ein weiteres rekombinantes Virus, das eine Mutation im H Protein des WTF besitzt, ein Aminosäureaustausch an der Position 481 von Asparagin zu Tyrosin, war erstaunlicherweise nicht in der Lage, die TLR2 Transfektanten zu aktivieren.

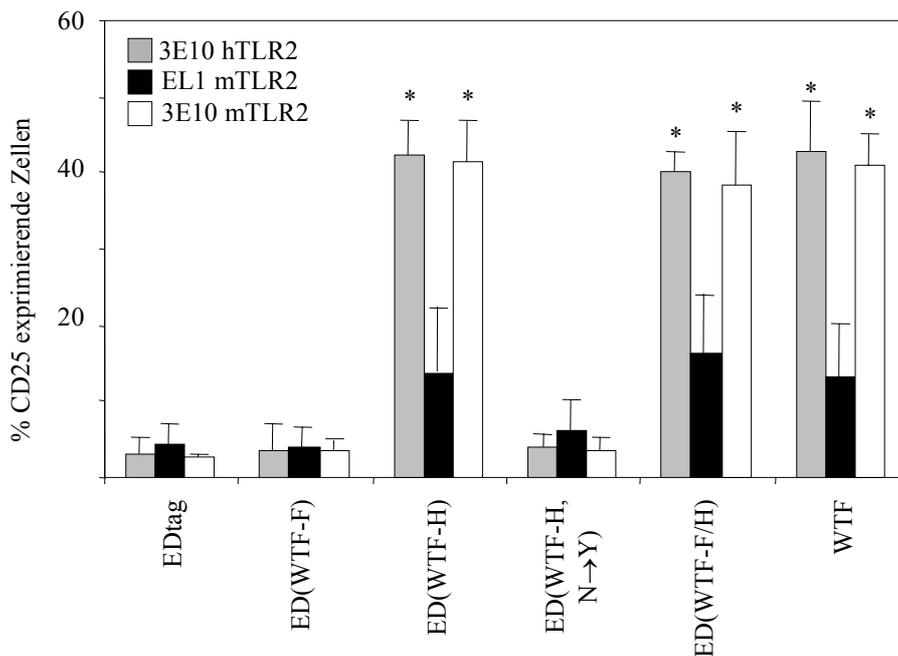


Abbildung 4.19: Das H Protein von WTF besitzt TLR2 agonistische Aktivität, welche durch Austausch einer einzigen Aminosäure verloren geht

CHO Reporterzellen, die die humane oder murine Form des TLR2 exprimieren, wurden mit den rekombinanten Masernviren stimuliert. Am folgenden Tag wurde die CD25 Expression durchflußzytometrisch bestimmt. Dargestellt sind die % CD25 positiven Zellen als Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Die * symbolisieren einen signifikanten ($p < 0,01$) Unterschied zwischen der Mock-Kontrolle und der Viruspräparation.

Um zu verifizieren, daß das H Protein der Masernvirus Wildtypstämme tatsächlich als TLR2 Agonist fungiert, wurde versucht, die Wechselwirkung dieser Proteine durch monoklonale Antikörper, sowohl gegen die Rezeptoren als auch die viralen Proteine, zu blockieren. Der Einsatz der monoklonalen Antikörper gegen TLR2, TLR4 und CD14 konnte die Aktivierung der Signalwege weder durch Pam₃CSK₄ noch durch LPS inhibieren (nicht dargestellt). Dies liegt vermutlich an der hohen Expressionsrate der jeweiligen Transgene, die durch die Antikörper nicht abgesättigt werden konnten.

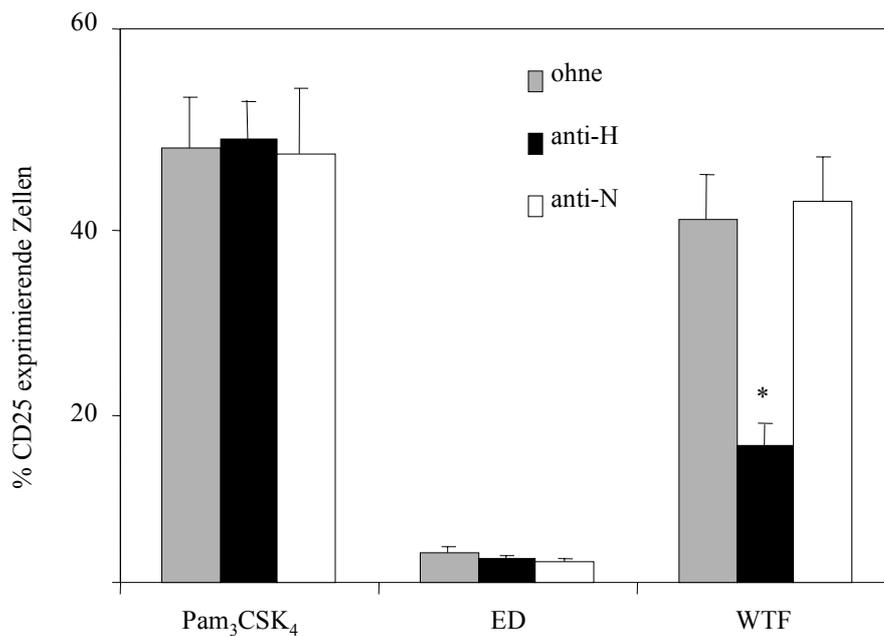


Abbildung 4.20: Monoklonale Antikörper gegen MV H hemmen die WTF induzierte Reporteraktivität

Pam₃CSK₄, ED und WTF wurden mit monoklonalen Antikörpern gegen das H Protein (L77, K83, K29 jeweils 10µg/ml) oder gegen das N Protein (F227 30µg/ml) bzw. Medium als Negativkontrolle für 30 min bei 4°C vorinkubiert. Bei den Viren handelte es sich um aufgereinigtes Material, der Gehalt der MV Glykoproteine wurde angeglichen und entsprach etwa einer m.o.i. von 1 bei ED und einer von 0,2 bei WTF. Die Expression von CD25 wurde durchflußzytometrisch bestimmt und ist als Zusammenfassung von 2 unabhängigen Experimenten dargestellt, die im Doppelansatz pipettiert wurden. Das * symbolisiert eine deutliche Inhibition der Aktivierung nach der Vorbehandlung mit dem Antikörper.

Eine Präadsorption des WTF mit MV-H spezifischen Antikörpern reduzierte deutlich die Induktion der Reporteraktivierung, während Antikörper gegen das MV-N Protein keinen inhibitorischen Einfluß hatten (Abbildung 4.20). Die Pam₃CSK₄-vermittelte Induktion von CD25 blieb durch den Einsatz der MV-spezifischen Antikörper unbeeinflusst und auch ED konnte unter keiner Bedingung zu einer Aktivierung der Zellen führen. Die ebenfalls als Kontrollantikörper eingesetzten F-spezifischen Antikörper induzierten aufgrund einer Endotoxinkontamination bereits eine Reporteraktivierung.

4.2.5 Monozyten werden durch Wildtyp-Masernvirus aktiviert

Nachdem die TLR2 agonistischen Eigenschaften des Masern-Wildtypvirus mithilfe der CHO Transfektanten gut charakterisiert waren, mußten diese Befunde auf monozytären Zellen verifiziert werden. Zunächst wurden die Effekte der Masernviren auf die Aktivierung von monozytären Zelllinien, gemessen an der Induktion proinflammatorischer Zytokine getestet. Um eine Infektion der Zellen zu verhindern, wurden die Masernviren UV-inaktiviert, eine Behandlung, die nachgewiesen die TLR2 agonistischen Eigenschaften von WTF nicht zerstört.

THP-1 und HL-60 Zellen wurden mit Pam₃CSK₄, Mock, ED und WTF für 12h stimuliert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die mRNA isoliert. Um mehrere mRNA-Spezies parallel zu detektieren und zu quantifizieren, eignet sich der „RNase Protection Assay“ (RPA). Dabei wird eine Ziel-RNA durch Hybridisierung mit einer überlappenden Antisense-RNA definiert. Nur doppelsträngige Bereiche bleiben im Ansatz vor der Spaltung durch zugegebene RNasen geschützt. Anhand unterschiedlich langer radioaktiv markierter RNA-Antisense-Sonden kann man das Vorhandensein verschiedener homologer basengepaarter Regionen in der Probe nachweisen.

Sowohl THP-1 als auch HL-60 Zellen reagierten mit einer Induktion IL-12p40-, IL-1 α -, IL-1 β -, IL-1Ra (Rezeptor-Antagonist)- und IL-6- spezifischer Transkripte auf eine Stimulation mit LPS und Pam₃CSK₄ (Abbildung 4.21). IL-12p35-, IL-10- und IFN γ - spezifische mRNA ließ sich nicht reproduzierbar nachweisen.

Auch WTF, nicht aber ED oder Mock, induzierte ein den bekannten TLR-Agonisten vergleichbares mRNA-Muster: Die mRNA für IL-12p40 (nicht aber IL-12p35), IL-1 α , IL-1 β und IL-1Ra wurde induziert.

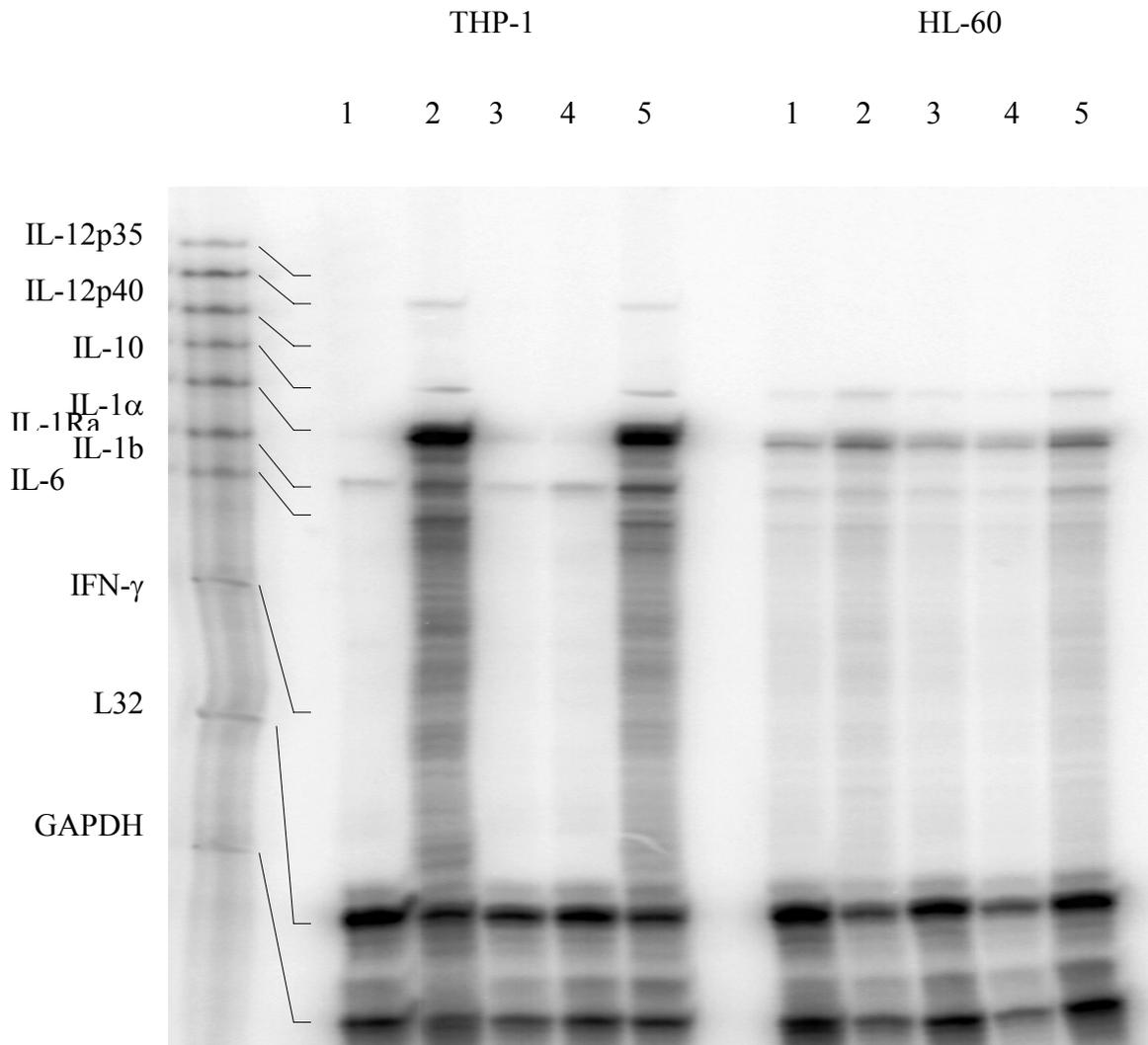


Abbildung 4.21: Die Induktion monozytenspezifischer Zytokin-Transkripte in THP-1 und HL60 Zellen

THP-1 und HL-60 Zellen (1×10^7 Zellen/Ansatz) wurden mit 1- Medium, 2- Pam₃CSK₄, 3- Mock, 4- ED und 5- WTF für 12h stimuliert. Die Viruspräparationen waren aufgereinigt, der Glykoproteingehalt angeglichen und UV-inaktiviert, um eine Infektion der Zellen zu verhindern. Nach 12 Stunden wurde die Gesamt-RNA der Zellen isoliert und ein RNase Protection Assay (hCK-2 Kit von Pharmingen) durchgeführt. Die „ungeschützte“ radioaktive Sonde ist links als Marker aufgetragen, die „geschützten“ Proben in den nachfolgenden Spuren.

Die Aktivierung der THP-1 Zellen durch die TLR-Agonisten war reproduzierbar und deutlich stärker als die der HL-60 Zellen. Da beide Zelllinien frühe Stadien in der monozytären Entwicklung darstellen, wurden sie für 3 Tage mit Vitamin D₃ ausgereift. Diese Behandlung der Zellen resultiert unter anderem in einer erhöhten Expression von CD14 (Tabelle 4.7), TLR2 und LPS-bindender Moleküle (Yang et al., 2001; Liu et al., 2001; Pedron et al., 1995).

Tabelle 4.7: CD14 Expression von THP-1 und HL-60 Zellen vor und nach der Vitamin D3 Behandlung

% CD14 positive Zellen	THP-1	HL-60
Vor Vitamin D3-Behandlung	19,4±4,3	2,6±1,3
Nach Vitamin D3-Behandlung	73,8±8,6	64,8±6,2

Die Zellen wurden mit den TLR-Agonisten und rekombinanten Viren stimuliert, die mRNAs wurden isoliert und mit Hilfe des RPA analysiert. Vitamin D3 gereifte THP-1 (Abbildung 4.22 und Tabelle 4.8) antworteten auf eine Stimulation mit den bekannten TLR Agonisten mit der Transkription proinflammatorischer Zytokine. LPS und Pam₃CSK₄ induzieren eine IL-12p40-, IL-1 α -, IL-1 β - und IL-6- spezifische mRNA-Expression. IL-12p35-, IL-10- und IFN γ - spezifische Transkripte wurden auch in den differenzierten Zelllinien durch die Stimulation mit den TLR Agonisten nicht induziert. In der Tabelle sind die relativen Expressionsstärken der jeweiligen zytokinspezifischen mRNAs aufgeführt, die auf das konstitutiv exprimierte zelluläre Gen L32 normalisiert wurden. Die HL-60 Zellen zeigten nach der Ausreifung mit Vitamin D3 eine stärkere Antwort auf die TLR Agonisten als vor der Ausreifung. Da die Antworten aber denen der THP-1 Zellen ähneln, sind diese Ergebnisse nicht dargestellt.

In Übereinstimmung mit den auf den CHO Transfektanten erhaltenen Befunden zeigte sich, daß nur die Masernviren, die das authentische WTF-H Protein besitzen, die Zytokin-spezifischen Transkripte induzieren, nicht aber die Viren, die das ED-H Protein exprimieren. Verglichen mit der Mock-Kontrolle, aber auch den Viren, die das ED-H Protein enthalten, induzieren die rekombinanten MV ED(WTF-H) und ED(WTF-F/H) und WTF signifikant stärker die Expression IL-1 β - und IL-6-spezifischer Transkripte. ED(WTF-F/H) und WTF aktivieren zusätzlich signifikant die Induktion IL-12 p40, IL-1 α und IL-1 RA- spezifischer mRNAs. Das rekombinante Virus, das das an Position 481 mutierte Wildtyp H Protein (N \rightarrow Y) besitzt, ist auch in diesen Zellen nicht in der Lage, eine Transkription proinflammatorischer Zytokine zu aktivieren.

Die Expression von IL-12p35, IL-10 und IFN γ mRNA wird durch keines der Masernviren induziert.

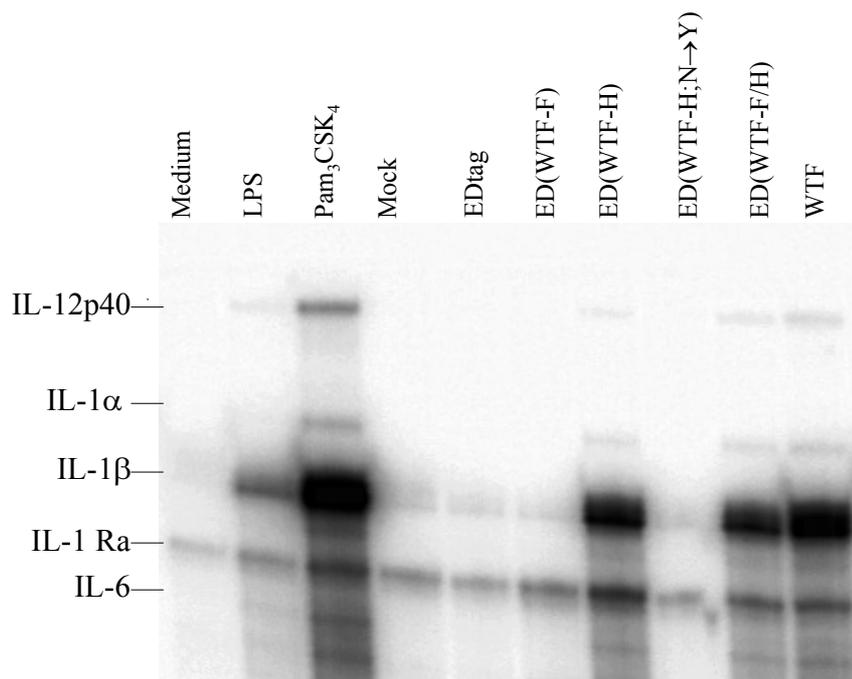


Abbildung 4.22: Die Induktion monozytenspezifischer Zytokin-Transkripte in Vitamin D3 gereiften THP-1 Zellen

THP-1 Zellen wurden für 72 Stunden mit 100mM Vitamin D3 ausgereift. 1×10^7 Zellen/Ansatz wurden mit Medium, LPS (10ng/ml) Pam₃CSK₄(2,5μg/ml), Mock, und den rekombinaten Viren (aufgereinigt, der Glykoproteingehalt angeglichen) stimuliert. Die Viruspräparationen waren UV-inaktiviert, um eine Infektion der Zellen zu verhindern. Nach 12 Stunden wurde die Gesamt-RNA der Zellen isoliert und ein RNase Protection Assay (hCK-2 Kit von Pharmingen) durchgeführt.

Tabelle 4.8: Die relative Expression monozytenspezifischer Zytokin-Transkripte in Vitamin D3 gereiften THP-1 Zellen

Die Expressionsstärken, gemessen als PhosphorImager Einheiten, der cytokinspezifischen mRNAs Vitamin D3 gereifter, stimulierter THP-1 Zellen wurden auf L32, als konstitutiv exprimiertes zelluläres Gen, normalisiert. Die angegebenen Werte sind in Relation gesetzt zu denen, die durch Pam₃CSK₄ induziert wurden (=100%). Die Daten repräsentieren drei individuelle Experimente. Die * symbolisieren deutliche Unterschiede im Vergleich zu der Mock-Kontrolle.

	Stimulation						
	Mock	ED	ED(WT F-F)	ED(WTF-H)	ED(WTF -H;N->Y)	ED(WTF-F/H)	WTF
IL-12p40	0,5 ±1,3	1,8 ±0,9	1,7 ±1,1	12,1 ±5,5	2,0 ±2,2	9,9 ±1,3*	10,6 ±2,7*
IL-1α	0,9 ±4,2	-2,2 ±3,7	-1,1 ±3,5	12,2 ±2,2	0,2 ±4,2	25,6 ±3,9*	29,6 ±6,2*
IL-1β	1,5 ±0,6	0,0 ±2,1	-0,8 ±2,4	36,6 ±2,8*	1,0 ±2,9	40,2 ±1,2*	58,8 ±1,5*
IL-1 Ra	7,1 ±3,3	2,6 ±1,3	12,4 ±1,7	66,4 ±14,8	9,9 ±1,2	67,4 ±2,3*	55,3 ±5,4*
IL-6	1,7 ±1,7	0,3 ±0,7	0,4 ±1,4	21,1 ±1,3*	1,7 ±1,0	20,7 ±2,7*	30,1 ±2,7*

Die Zellkulturüberstände der zuvor auf mRNA-Ebene analysierten THP-1 Zellen wurden auf die Freisetzung von IL-6 überprüft. Die Stimulation mit den TLR Agonisten, aber auch den Wildtyp-Masernviren induziert nicht nur die Transkription monozytenspezifischer Zytokine, sondern korreliert mit deren Freisetzung (Abbildung 4.23). Sowohl LPS, Pam₃CSK₄ und die Viren, die das authentische WTF-H Protein besitzen, stimulieren eine signifikant erhöhte IL-6 Sekretion.

Primäre humane Monozyten wurden aus PBMC über eine Depletion der T Zellen, B Zellen und NK Zellen (siehe Methode) isoliert und waren zu 80-90% rein. Durch einen anschließenden Adhärenzschritt konnte die Reinheit auf über 95% erhöht werden. Auch die primären Monozyten antworten auf eine Stimulation mit den bekannten TLR Agonisten mit einer Aktivierung, gemessen an der Sekretion von IL-6 in den Kulturüberstand. Im Vergleich zu der Zelllinie THP-1 ist die Konzentration des nach Stimulation sezernierten IL-6 der primären Monozyten deutlich, um etwa das 10fache, höher. Die Freisetzung von IL-6 wird auch in diesen Zellen durch Masernviren, die das ursprüngliche WTF-H Protein besitzen, signifikant erhöht. Und auch in primären

Monozyten reicht der Austausch einer einzigen Aminosäure (N→Y an Position 481) im Wildtyp H Protein aus, den agonistischen Effekt dieses Proteines zu zerstören.

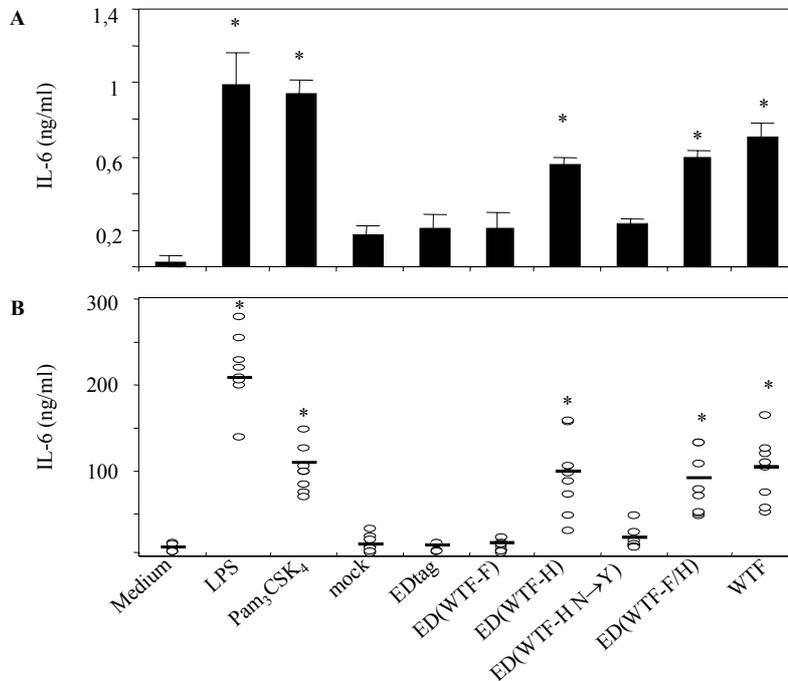


Abbildung 4.23: Das WTF-H Protein induziert eine IL-6 Freisetzung in THP-1 Zellen (A) und primären Monozyten (B)

THP-1 Zellen (A) bzw. primäre Monozyten (B) (jeweils 1×10^5 Zellen/well) wurden mit Medium, LPS (10ng/ml), Pam₃CSK₄ (2,5µg/ml), Mock, und den rekombinanten Viren (aufgereinigt, der Glykoproteingehalt angeglichen) stimuliert. Die Viruspräparationen waren UV-inaktiviert, um eine Infektion der Zellen zu verhindern. Nach 12 Stunden wurden die Überstände abgenommen und die IL-6 Konzentration mittels ELISA bestimmt. Die Daten repräsentieren drei unabhängige Experimente (A) bzw. die Zellen von 7 Blutspendern. Die Statistik wurde auf der Basis der Mock induzierten Werte durchgeführt, dabei symbolisieren die * eine signifikante ($p < 0,01$) Induktion der IL-6 Sekretion.

Das Zytokin IL-12 scheint in der Pathogenese der Masernvirusinfektion eine entscheidende Rolle für die T-Helferzellpolarisierung zu spielen. Es existieren zwei kovalent gebundenen Polypeptidketten von etwa 40 kD (p40) und etwa 35 kD (p35), die unabhängig voneinander reguliert werden. Im Gegensatz zu p40 wird p35 nur als Bestandteil des p70 Heterodimers sezerniert, welches die biologisch aktive Form repräsentiert. Das p40 Homodimer agiert als IL-12 Antagonist (Wittmann et al., 1999). Während zahlreiche Publikationen eine MV-vermittelte Suppression der IL-12 Freisetzung von APCs beschreiben, konnte gezeigt werden, daß WTF nach IFN γ Priming von MoDC die Produktion von IL-12p40 und IL-12p70 induziert (Klagge, 2001). Weder in THP-1 noch

HL-60 Zellen konnten in den RPA-Analysen IL-12p35 mRNA-Spezies nachgewiesen werden. In Übereinstimmung damit konnte eine Induktion der bioaktiven Form des Zytokins IL-12p70, unter den gewählten experimentellen Bedingungen (Stimulation nur für 12 Stunden), auch nach 2h Priming der primären humanen Monozyten mit 300U/ml IFN γ (Wittmann et al., 1999), nicht nachgewiesen werden (nicht abgebildet).

Es ist deutlich, daß MV Wildtypstämme über TLR2-abhängige Signalwege Monozyten aktivieren können, Zytokine zu produzieren. Es ist wahrscheinlich, daß auch die Expression von Oberflächenmolekülen auf diesen Zellen stimuliert wird. Tatsächlich wird die Expression kostimulatorischer Moleküle, wie HLA-DR auf Monozyten nach einer Stimulation mit LPS, Pam₃CSK₄ oder den Viren, die das WTF-H, nicht aber ED-H oder das WTF-H N \rightarrow Y Protein enthalten, aufreguliert (Abbildung 4.24A).

Frisch isolierte Monozyten gesunder Spender exprimieren kein CD150, auch auf den Monozyten, die für die Experimente verwendet wurden, ließ sich frisch nach der Isolation durchflußzytometrisch kein CD150 nachweisen (nicht dargestellt). Allerdings wird dieses Molekül nach der Aktivierung von Monozyten heraufreguliert (Minagawa et al., 2001). Dieser Effekt könnte durch TLR-abhängige Signalwege induziert werden. Tatsächlich exprimierten Monozyten, die 12h mit den bekannten TLR Agonisten stimuliert wurden, CD150 (Abbildung 4.24B). Mit vergleichbarer Effizienz induzierten auch die Masernviren, die das authentische WTF-H Protein besitzen, die Expression von CD150. In Übereinstimmung mit den bisher gezeigten Ergebnissen konnten die Viren, die das ED-H, oder das mutierte WTF-H Protein exprimieren, keine Aufregulation von CD150 bewirken. Somit ist evident, daß die Masernvirus-Wildtypviren durch eine Aktivierung TLR-vermittelter Aktivierungssignale für die Expression ihres Eintrittsrezeptors sorgen.

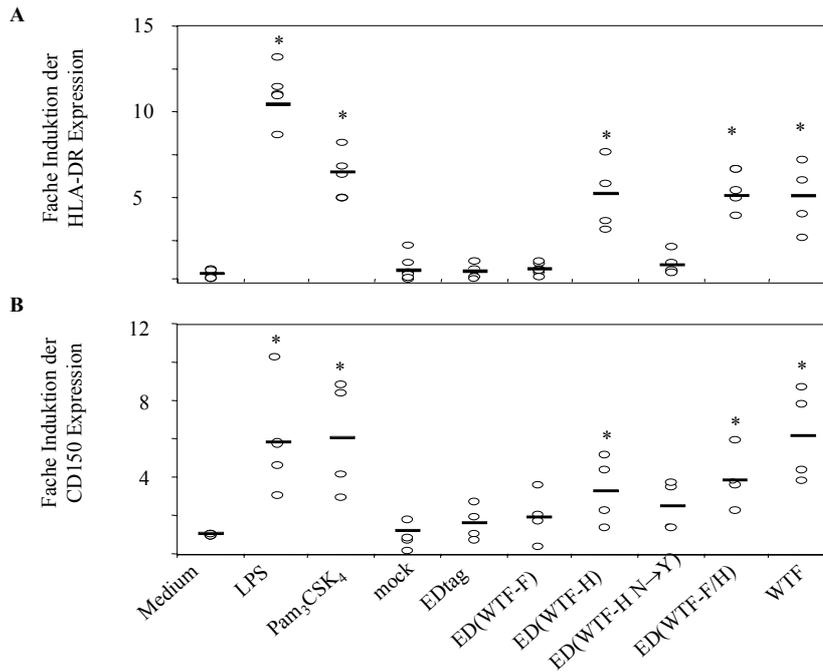


Abbildung 4.24: Die Expression von HLA-DR und CD150 auf primären Monozyten wird durch TLR-Agonisten induziert

Primäre Monozyten wurden wie in Abbildung 4.19 beschrieben stimuliert. Die Zellen wurden mit Antikörpern gegen HLA-DR (A) und CD150 (B) gefärbt. Die Induktion wurde basierend auf den Werten der Mediumkontrolle berechnet. Die verwendeten Monozyten stammten von 4 verschiedenen Spendern und wurden als Doppelansatz analysiert. Die Statistik wurde auf der Basis der Mock-induzierten Werte durchgeführt. Die * symbolisieren eine signifikante (A= $p < 0,01$ und B= $p < 0,05$) Induktion der Oberflächenexpression der kostimulatorischen Moleküle.

4.2.6 Der aktivierende Effekt der Wildtyp Masernviren auf die Monozyten ist abhängig von TLR2

Es ist offensichtlich, daß in CHO Zellen, die Anwesenheit von TLR2 und CD14 notwendig ist, um eine Aktivierung der Zellen durch Viren, die das authentische WTF-H Protein enthalten, zu vermitteln. Auch die Aktivierung der primären Monozyten scheint durch diese Moleküle verursacht zu werden, da eine 30minütige Vorbehandlung mit TLR- bzw. MV-H-spezifischen Antikörpern, eine Stimulation inhibiert (Abbildung 4.25). Sowohl eine Präadsorption des WTF mit MV-H-spezifischen Antikörpern, als auch eine Inkubation der Zellen mit TLR2-spezifischen Antikörpern reduzierte die WTF-vermittelte IL-6 Freisetzung signifikant. Auch Antikörper gegen CD14 hemmten die WTF induzierte IL-6 Freisetzung, während die durch Pam₃CSK₄ stimulierte IL-6 Freisetzung nur durch TLR2 spezifische Antikörper zu blockieren war. Bei einer suboptimalen Konzentration der Agonisten (0,5µg/ml Pam₃CSK₄ und 2µg WTF) war zwar die Aktivierung der Zellen schwächer, aber der blockierende Effekt der Antikörper ausgeprägter.

In vergleichbarer Weise inhibierten Antikörper gegen MV-H, TLR2 und CD14, nicht aber Antikörper gegen TLR4 oder MV-N, auch die WTF verursachte CD150 Induktion.

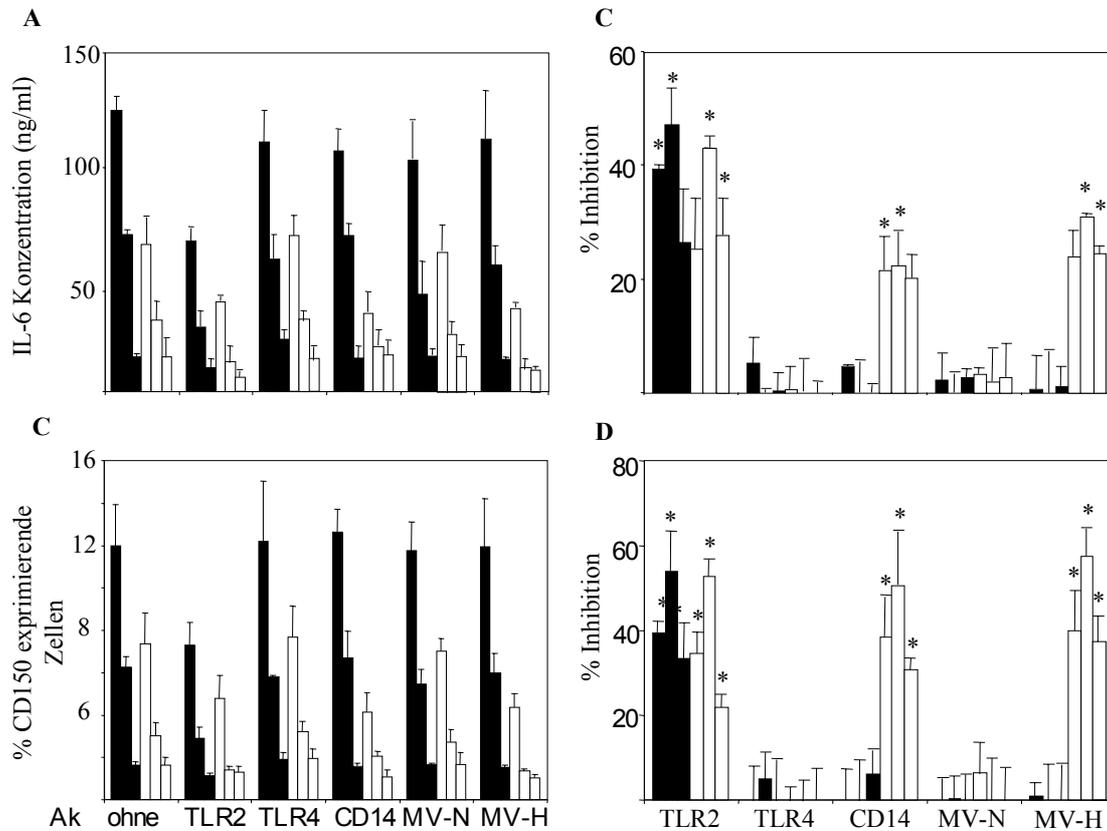


Abbildung 4.25: Monoklonale Antikörper gegen TLR2 und MV-H hemmen die WTF vermittelte Freisetzung von IL-6 und Expression von CD150

Primäre Monozyten wurden mit Antikörpern gegen TLR2 (TL2.1 10 μ g/ml), TLR4 (HTA 125 10 μ g/ml) oder CD14 (3C10 10 μ g/ml) für 30min bei Raumtemperatur vorinkubiert und anschließend mit Pam₃CSK₄ (schwarz, von links nach rechts: 2,5 μ g/ml, 0,5 μ g/ml, 0,1 μ g/ml) oder WTF (weiß, von links nach rechts: 10, 2, 0,4 μ g gereinigtes, UV-inaktiviertes Virus) stimuliert. Alternativ wurden die Stimulanzien in den angegebenen Konzentrationen mit Antikörpern gegen MV-H (L77, K83, K29 je 10 μ g/ml) bzw. MV-N (F227 10 μ g/ml) bei 4 $^{\circ}$ C 30min vorinkubiert und dann zu den Zellen pipettiert. Nach 12h wurde das in den Überstand sezernierte IL-6 mittels ELISA detektiert (A) und die CD150 Oberflächenexpression auf den Zellen durchflußzytometrisch (B) bestimmt. In (C) ist die prozentuale Inhibition der IL-6 Freisetzung, bzw. in (D) der CD150 Induktion, berechnet auf der Basis der Kontrolle ohne Antikörper, angegeben. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte von drei individuellen Experimenten mit Zellen unterschiedlicher Blutspender. Die * symbolisieren eine deutliche Inhibition der Aktivierung durch die Verwendung der blockierenden Antikörper.

Diese Blockade war jedoch nur partiell und beträgt ca. 40-50%. Dies spricht entweder für eine zu geringe Effizienz der Antikörper, die Wechselwirkungen zu inhibieren, oder zum anderen für mögliche weitere Interaktionen, die TLR2- und MV-H-unabhängig zu einer Aktivierung der Monozyten führen.

Zum Nachweis einer selektiven Interaktion von Wildtyp-Masern mit TLR2 wurden Wildtyp mit TLR2-defizienten Mäusen verglichen. Da bei letzteren das TLR2 Gen zerstört wurde, aber alle übrigen Moleküle vorhanden sind, lassen sich alle Veränderungen in den Antworten der Zellen dieser Tiere auf eine Beteiligung dieses Rezeptors zurückführen.

Durch die LPS- und Pam₃CSK₄-Kontrollen konnten die Phänotypen der Mäuse verifiziert werden. Während die Peritoneal- Makrophagen der TLR4-defizienten HeJ-Mäuse, und der doppelt, d.h. TLR4- und TLR2-, defizienten Mäuse, auf LPS nicht mehr mit erhöhter IL-6 Freisetzung antworten konnten, konnten die Zellen der TLR2-Knockout-Mäuse weiterhin, wenngleich etwas vermindert, auf eine LPS Stimulation reagieren. Pam₃CSK₄ kann die Makrophagen der TLR2^{-/-}-Mäuse, sowohl des Einzel- als auch des Doppel-Knockouts, nicht zu einer IL-6 Sekretion aktivieren, wodurch sich die Relevanz von TLR2 als Interaktionspartner für Pam₃CSK₄ bestätigt.

Die aus TLR2^{-/-}-Mäusen (Einzel- und Doppel-Knockout) isolierten Peritoneal-Makrophagen, zeigen keine MV-stammspezifischen Unterschiede bezüglich der IL-6 Freisetzung, während aus Wildtyp-Mäusen (C3H/HeN) oder TLR4-defizienten Mäusen (C3H/HeJ) isolierte Zellen mit deutlich erhöhter IL-6 Freisetzung auf eine Stimulation mit WTF, nicht aber mit ED, reagieren. Somit ist auch die Bedeutung von TLR2 als Mediator für eine MV-Wildtyp-vermittelte Aktivierung von Monozyten und Makrophagen evident.

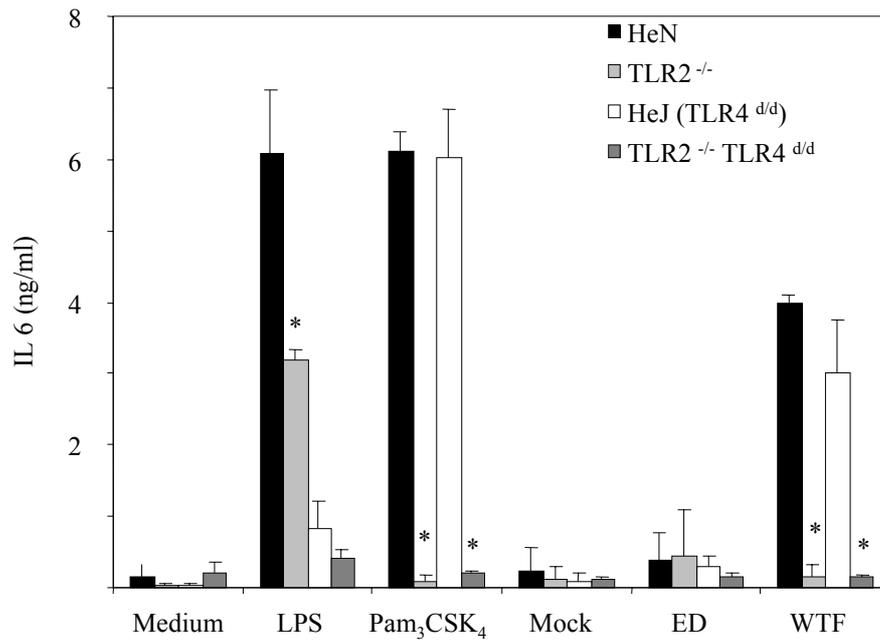


Abbildung 4.26: TLR2 defiziente Mäuse lassen sich nicht durch WTF aktivieren

Makrophagen, isoliert aus dem Peritoneum von Mäusen (C3H/HeN [TLR2^{+/+}/TLR4^{+/+}], C3H/TLR2^{-/-} [TLR2^{-/-}/TLR4^{+/+}], C3H/HeJ [TLR2^{+/+}/TLR4^{d/d}] und C3H/HeJ TLR2^{-/-} [TLR2^{-/-}/TLR4^{d/d}]) wurden mit LPS (10ng/ml), Pam₃CSK₄ (2,5µg/ml), Mock, ED und WTF (aufgereinigt, der Glykoproteingehalt angeglichen und UV-inaktiviert) stimuliert. Nach 12-16 h wurde die IL-6 Konzentration im Überstand mittels ELISA bestimmt. Die Werte repräsentieren drei unabhängige Experimente, die jeweils im Doppelansatz durchgeführt wurden. Die * symbolisieren einen signifikanten (p<0,05) Unterschied zwischen den Antworten der Wildtyp- und der TLR-defizienten Makrophagen.

5 Diskussion

Obwohl eine Infektion mit dem Masernvirus eine generelle Suppression des adaptiven Immunsystems, vor allem der T Zell-vermittelten Immunantwort, verursacht, induziert sie dennoch eine sehr effiziente virus-spezifische Immunantwort, die eine lebenslange protektive Immunität verleiht. Während Mechanismen, die die MV-vermittelte Störung des Immunsystems bewirken, detailliert erforscht werden, ist wenig bekannt, wie die spezifische Immunantwort gegen das Masernvirus generiert wird. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit liefern Hinweise darauf, daß das wirtseigene angeborene Immunsystem über Fähigkeiten verfügt, eine Stimulation der MV-spezifischen Abwehr zu induzieren.

5.1 Die Interaktion zwischen MV und $\gamma\delta$ T Zellen

$\gamma\delta$ T Zellen werden bei einer Reihe von Infektionskrankheiten aktiviert, wobei die Aktivierung sowohl durch Zyto- oder Chemokine als auch durch den direkten Kontakt mit Erreger- oder Zielzellmolekülen erfolgt. Ebenso wie $\alpha\beta$ T Zellen können sie nach einer Aktivierung in Effektorzellen ausdifferenzieren, die zytotoxische Funktionen haben oder immunstimulatorische Mediatoren sezernieren. Über die Aktivierung dieser Zellen während der Masernvirusinfektion, ihre Bedeutung für deren Kontrolle, und eine mögliche Suppression von $\gamma\delta$ T Zellen während oder nach der Infektion liegen bislang weder epidemiologische noch experimentelle Daten vor.

Es ist unbekannt, ob *in vivo* neben $\alpha\beta$ T Zellen auch $\gamma\delta$ T Zellen mit MV infiziert werden können, und welchen Einfluß eine Maserninfektion auf die Aktivität und Expansion von $\gamma\delta$ T Zellen *in vivo* hat. In seriellen, vor und nach der MMR-Immunisierung, erhaltenen Proben konnte beobachtet werden, daß keine *in vivo* Infektion und Expansion der $\gamma\delta$ T Zellen gemessen werden kann (Tabelle 4.1 und Abbildung 4.3). Die Vakzinierung führt zu einer transienten Abnahme der $\gamma\delta$ T Zellzahl, die mit einer generellen Abnahme der T Zellzahlen korreliert (Tabelle 4.1 und Pabst et al., 1997). Im allgemeinen ist eine MV-Infektion von einer Lymphopenie begleitet, die jedoch bei der Infektion mit MV-Wildtypstämmen deutlich ausgeprägter ist und länger anhält (Okada et al., 2001). Da sich trotz der geringen Probandenzahl (n=6) die für eine MV-Infektion typische Lymphopenie,

nachweisen läßt, scheinen auch die Aussagen über die Rolle der $\gamma\delta$ T Zellen in diesen Proben zulässig. Da sich der prozentuale Anteil der CD3 Zellen an der PBMC Zusammensetzung verringert (Tabelle 4.1) und das Verhältnis $\gamma\delta$ zu CD3 Zellen erhalten bleibt (Abbildung 4.3A), reduziert sich folglich auch der Anteil der $\gamma\delta$ T Zellen an den Gesamt-PBMC.

Ex vivo zeigen PBMC von MV-infizierten oder immunisierten Probanden eine deutlich verringerte Proliferation gegenüber Mitogenen (Sanchez-Lanier et al., 1988; Schlender et al., 1996). Um den Einfluß von MV auf die Expansion von $\gamma\delta$ T Zellen zu analysieren, wurde ein *in vitro* System etabliert, daß die Befunde von Wesch et al., 1997 nutzt, $\gamma 9\delta 2$ T Zellen in der Gegenwart von IL-2 und IPP innerhalb von 7 Tagen zu expandieren (Abbildung 4.1). Diese Expansion basiert auf einer selektiven Zunahme der $\gamma\delta$ T Zellen, während die Zahl der $\alpha\beta$ T Zellen von der Stimulation unbeeinflusst bleibt (Abbildung 4.2). $\gamma\delta$ T Zellen, die nach der Immunisierung *ex vivo* mit IPP/IL-2 stimuliert wurden, expandieren deutlich vermindert gegenüber dem Zeitpunkt vor der Impfung (Abbildung 4.3B). Diese Suppression der Proliferation ist transient und ist drei Wochen nach der Immunisierung nicht mehr als signifikant nachzuweisen. Da diese Art der Stimulation selektiv den $\gamma 9\delta 2$ Subtyp der $\gamma\delta$ T Zellen aktiviert, ist über den Einfluß von MV auf die übrigen $\gamma\delta$ Subtypen keine Aussage möglich.

Folglich betrifft die MV Infektion die konventionellen $\alpha\beta$ und die $\gamma\delta$ T Zellen in gleicher Weise: Ebenso wie die $\alpha\beta$ T Zellen sind *in vivo* die $\gamma\delta$ T Zellen nach der MMR-Vakzinierung in der Zahl reduziert und zeigen *ex vivo*, ebenso wie PHA-stimulierte T Zellen eine verminderte Expansion nach IPP/IL-2 Zugabe.

Um die Empfänglichkeit der $\gamma\delta$ T Zellen gegenüber dem proliferationsarretierenden MV-Signal *in vitro* zu überprüfen, wurde die IPP/IL-2-vermittelte Expansion von $\gamma\delta$ T Zellen aus humanen PBMC Kulturen nach Kontakt mit MV untersucht. Ebenso wie *ex vivo* waren *in vitro* keine Unterschiede zwischen konventionellen T Zellen und $\gamma\delta$ T Zellen zu beobachten, die mit UV-inaktivierten MV kokultiviert wurden. Sowohl der Vakzinestamm ED als auch der Wildtypstamm WTF hemmen konzentrationsabhängig die Proliferation PHA-stimulierter $\alpha\beta$ T Zellen und die Expansion IPP/IL-2-stimulierter $\gamma\delta$ T Zellen (Abbildung 4.4). Auch persistierend ED-infizierte T Zelllinien oder monozytäre Zelllinien hemmen in gleicher Weise die Proliferation von $\alpha\beta$ und $\gamma\delta$ T Zellen, während nicht-infizierte Kontrollzellen keinen Einfluß auf die Proliferation der Zellen haben (Abbildung

4.5A und B). Einige Publikation beschreiben, daß Tumorantigene, die von Daudi, und anderen Burkitt's Lymphomzellen (Bukowski et al., 1995; Haecker und Wagner 1994), aber auch von U937 und Molt-4 Zellen (de Libero et al., 1991) exprimiert werden, die Proliferation von $\gamma\delta$ T Zellen induzieren können. Auch *in vivo* Daten implizieren, daß $\gamma\delta$ T Zellen eine Rolle bei der Überwachung der Entstehung von Tumoren und ihrer Progression spielen (Hayday, 2000). In den durchgeführten Experimenten läßt sich aber keine IPP-unabhängige Proliferation der $\gamma\delta$ T Zellen als Antwort auf den Kontakt mit den Tumorzelllinien nachweisen. Die prozentualen Anteile an $\gamma\delta$ T Zellen, die in Gegenwart der PC und IL-2 kultiviert wurden, gleichen denen der Mediumkontrolle (Abbildung 4.7). Bis zu diesem Punkt können weder *in vivo* noch *in vitro* Unterschiede im Verhalten der $\gamma\delta$ T Zellen und der konventionellen T Zellen nach einem Kontakt mit MV nachgewiesen werden.

Überraschend ist jedoch der Befund, daß in der Gegenwart persistierend ED-infizierter B Zelllinien kein Proliferationsarrest der $\gamma\delta$ T Zellen auftritt, obwohl diese Zelllinien die Proliferation PHA-stimulierter Zellen signifikant hemmen (Abbildung 4.5 C und D). Neben weiteren persistierend ED-infizierten B Zelllinien sind auch primär ED-infizierte DC nicht in der Lage, die IPP/IL-2-vermittelte Proliferation von $\gamma\delta$ T Zellen zu inhibieren (Abbildung 4.6). Primär ED-infizierte B Zelllinien wurden ebenfalls in $\gamma\delta$ T Zell-Expansionsexperimenten eingesetzt. Da diese Zellen aber, im Gegensatz zu lytisch infizierten DC (Klagge, 2001), infektiöses Virus produzieren, wurden die $\gamma\delta$ T Zellen im Verlauf der 7tägigen Kokultur infiziert. Auch die Zugabe eines Fusionsinhibierenden Peptids (FIP) konnte die zytopathischen Effekte der MV-Infektion nicht blockieren, so daß eine Auswertung der Experimente nicht möglich war.

Diese Beobachtungen implizieren, daß $\gamma\delta$ T Zellen per se sensitiv gegenüber dem MV-vermittelten Proliferationsarrest sind, aber daß durch Effektorstrukturen auf DC oder B Zellen ein zusätzliches Signal generiert wird, das mit dem negativen Proliferationsignal von MV interferiert. Dies ist jedoch kein genereller Effekt, da persistierend ED-infizierte T Zellen und Monozyten, aber auch WTF-infizierte B Zellen oder DC diese Interferenz nicht vermitteln.

In vitro ließen sich bislang keine Unterschiede in der Stärke des proliferationsinhibitorischen Signals von ED und WTF finden (Schlender et al., 1996). Dennoch belegen epidemiologische Studien, daß die Immunsuppressivität von MV-Wildtypen stärker ist als die von Impfstämmen. So treten klinisch apperente

opportunistische Infektionen nur nach akuten Masern, nicht aber nach einer Vakzinierung auf. Dies könnte, neben einer differentiellen Modulation von APC Funktionen, möglicherweise daran liegen, daß das durch die Glykoproteine der MV-Wildtypstämme vermittelte negative Proliferationssignal stärker ist, als das der Impfstämme. Vielleicht besitzen $\gamma\delta$ T Zellen einen höheren Schwellenwert für die Etablierung eines Proliferationsarrestes als konventionelle T Zellen, so daß sich bei der Expansion der $\gamma\delta$ T Zellen ein Unterschied zwischen WTF als Wildtypstamm und ED als Vakzinestamm manifestieren kann (Abbildung 4.5C Abbildung 4.6B), der sich bei der Expansion von $\alpha\beta$ T Zellen nicht beobachten läßt. Um diese Hypothese zu validieren, müßte jedoch geklärt werden, warum einige ED-infizierte Zellen die Proliferation hemmen und andere nicht. Für die Hemmung der Expansion der $\gamma\delta$ T Zellen ergibt sich keine Abhängigkeit von der Expression der viralen Glykoproteine. Es scheint sich eher eine inverse Korrelation zwischen der Expressionsdichte der viralen Glykoproteine (Tabelle 4.2) und der Proliferationsinhibition der $\gamma\delta$ T Zellen abzuzeichnen (Abbildung 4.5). Diese Beobachtung könnte ein Indiz dafür sein, daß von der Zellzahl-abhängige Prozesse zu der nicht-gehemmten Expansion der $\gamma\delta$ T Zellen beitragen.

Es ist bekannt, daß $\gamma\delta$ T Zellen mit einer Vielzahl von Zellen interagieren, um kontrolliert zu funktionieren. So erfordert die IPP/IL-2 abhängige Expansion der $\gamma\delta$ T Zellen die Präsenz von CD4⁺ T Zellen (Abbildung 4.1). Eine derartige Interaktion wurde bereits bei der Aktivierung von $\gamma\delta$ T Zellen durch den Kontakt mit Daudi Zellen oder einem Malariaantigen beobachtet (Fayen und Tykocinski, 1999; Elloso et al., 1996).

Vielleicht basiert die nicht-gehemmte Expansion der $\gamma\delta$ T Zellen auf einem „Helferfaktor“, der differentiell von den MV-infizierten PC generiert wird, und das MV-Signal neutralisieren kann. Es ist aber unwahrscheinlich, daß die ED-infizierten B Zellen und DC alleine diese Hilfe liefern, da die Kokultur aufgereinigter T Zellen mit den MV-infizierten PC in allen Fällen in einer verminderten Expansion der Zellen resultiert. Daher scheint eher eine dritte Zellpopulation vonnöten zu sein, die die „Hilfe“ liefert, das MV-Signal zu kompensieren. Die Rekonstitutionsexperimente, in denen entweder B Zellen, NK Zellen oder Monozyten zu den aufgereinigten T Zellen gegeben wurden, ergeben, daß Monozyten notwendig und ausreichend sind, den MV-vermittelten Proliferationsarrest aufzuheben (Abbildung 4.7).

Aufgrund dieser Beobachtung ergeben sich verschiedene Möglichkeiten, wie eine nicht-gehemmte Expansion der $\gamma\delta$ T Zellen induziert werden könnte. Diese sind in Abbildung 5.1 schematisch dargestellt.

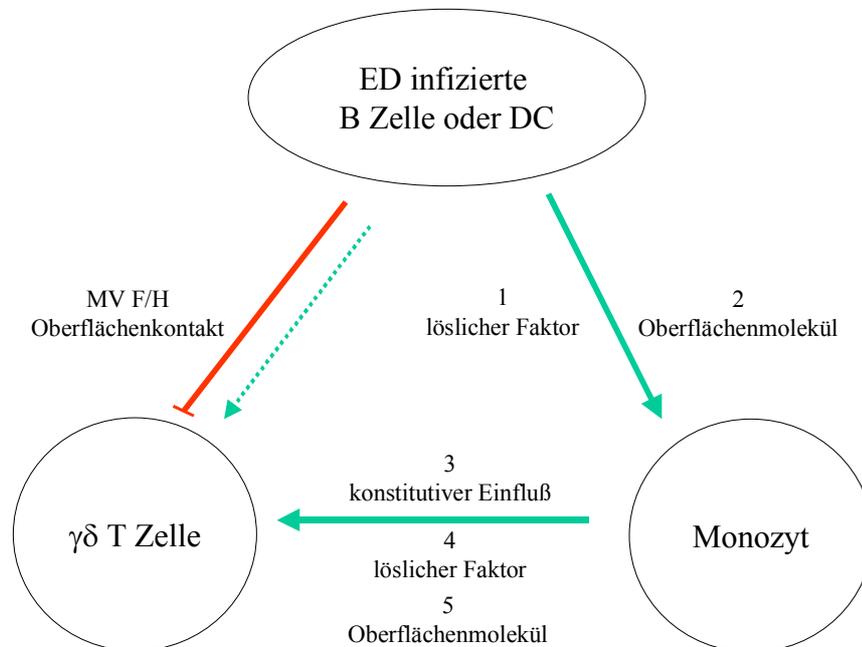


Abbildung 5.1: Mögliche Interaktionen zwischen PC Monozyten und $\gamma\delta$ T Zellen

Die potentiellen Ursachen für die nicht-gehemmte Proliferation der $\gamma\delta$ T Zellen trotz des negativen Proliferationssignals von MV sind durch Zahlen gekennzeichnet und werden im nachfolgenden Text erläutert.

Ad 1 und 2: Auf die Möglichkeit, daß die Infektion mit MV einen löslichen Faktor oder aber ein Oberflächenmolekül in DC und B Zellen induzieren könnte, der den $\gamma\delta$ T Zellen ein additives Stimulationssignal liefert, ist bereits eingegangen worden. Es ist allerdings evident, daß dieses Signal nur bei der Anwesenheit von Monozyten generiert wird oder nur in der Gegenwart von Monozyten ausreicht, das negative MV-Signal zu kompensieren.

Von der Prämisse ausgehend, daß MV-Wildtypstämme ein stärkeres immunsuppressives Signal generieren als Vakzinestämme, wäre es möglich, daß gleichartige „positive“ Signale existieren, die nur die schwächeren negativen MV-Vakzinesignale neutralisieren können. Eine mögliche Quelle für einen additiven Effekt könnte doppelsträngige (ds) RNA sein. DsRNA ist ein Intermediat, das während des Replikationszyklus vieler Viren, besonders

der RNA Viren, auftritt. DsRNA stimuliert hocheffektiv die Sekretion von Typ I IFN. Diese Wirkung kann durch eine synthetische dsRNA, poly(I:C), imitiert werden. Kretschmar et al. beobachteten, daß poly(I:C) keinen direkten stimulatorischen Effekt auf die Proliferation von $\gamma\delta$ T Zellen hat, aber die IPP/IL-2-induzierte Expansion von $\gamma\delta$ T Zellen erhöhen kann. Dieser Effekt ist abhängig von der Präsenz akzessorischer Zellen und kann durch Zytokine moduliert werden (Kretschmar et al., nicht publiziert). Allerdings kann diese Hypothese nur den beobachteten Unterschied zwischen WTF- und ED-infizierten Zellen erklären, nicht den Unterschied zwischen B Zellen und DC auf der einen und T Zellen und Monozyten auf der anderen Seite. Allerdings konnte der Überstand ED-infizierter MoDC, transferiert in die Kokultur von PBMC mit UV-inaktiviertem Virus, keine Neutralisation des negativen Proliferationssignals, ausgehend von dem MV-F/H Komplex, induzieren. Demnach scheint die differentielle Sekretion löslicher Mediatoren für die Kompensation des MV Signals nicht auszureichen.

Der Frage, ob eine Interaktion zwischen den PC und den Monozyten eine Modulation dieser Zellen verursachen kann, und worauf eine derartige Veränderung basieren könnte, wurde nicht im Detail nachgegangen. Es wurde vielmehr versucht, das Wechselspiel zwischen den Monozyten und den $\gamma\delta$ T Zellen genauer zu charakterisieren.

Ad 3: Im bovinen System reicht bereits die Anwesenheit intakter autologer Monozyten aus, die Proliferation von $\gamma\delta$ T Zellen in einer gemischten Lymphozytenkultur zu stimulieren (Fikri et al., 2001; Okragly et al., 1996). Im humanen System ist dieser Effekt jedoch nicht nachzuweisen. Allerdings fördert die Anwesenheit der Monozyten die IPP/IL-2 vermittelte Expansion der $\gamma\delta$ T Zellen, so daß der Anteil von etwa 30% auf etwa 60% ansteigt (Abbildung 4.7A und D). Da durch die Anwesenheit der Monozyten jedoch nur das negative MV-Signal, das durch ED-infizierte B Zellen und DC generiert wird, kompensiert werden kann, scheint ein komplizierterer Mechanismus, als eine konstitutive autologe Stimulation der $\gamma\delta$ T Zellen durch Monozyten, vorzuliegen.

Es gibt Hinweise, daß die Konzentration von Makrophagen über eine Stimulation oder Suppression von $\gamma\delta$ T Zellen entscheiden kann (Balaji et al., 1995). Alveolar-Makrophagen gesunder Spender fördern die Expansion von $\gamma\delta$ T Zellen nur bis zu einer bestimmten Schwellenkonzentration, und sind in höherer Menge inhibitorisch. Diese Möglichkeit scheint als Erklärung für die beobachteten Effekte jedoch unwahrscheinlich, da sich die Konzentration der Monozyten in der Kultur nicht ändert. Auch als Ursache für die

gehemmte Proliferation der $\gamma\delta$ T Zellen bei Anwesenheit der persistierend infizierten Monozyten scheidet sie aus, da die nicht-infizierten Kontrollzellen die Proliferation nicht beeinflussen (Abbildung 4.5A).

Ad 4: Da Monozyten Zytokine sezernieren, könnten diese die $\gamma\delta$ T Zellantwort modulieren. Es ist bekannt, daß von Monozyten und Makrophagen produziertes IL-12, IL-15 und TNF α die Reaktivität von $\gamma\delta$ T Zellen gegenüber IPP steigern (Garcia et al., 1998; Boullier et al., 1999) oder $\gamma\delta$ T Zellen direkt stimulieren können (Lahn et al., 1998). IL-10 scheint die Expansion von $\gamma\delta$ T Zellen zu hemmen (Gonzalez-Amaro et al., 2000) oder ebenso wie IL-4 nicht zu beeinflussen (Boullier et al., 1999). Aber da weder das Trennen der $\gamma\delta$ T Zellen, der PC und der Monozyten in unterschiedliche Kompartimente (Abbildung 4.8), die Zugabe der oben erwähnten Zytokine und eines Zytokincocktails stimulierter Monozyten (Abbildung 4.9) ausreichen, die Neutralisation des negativen Proliferationssignals von MV zu induzieren, ist es eher unwahrscheinlich, daß lösliche Mediatoren für den beobachteten Effekt verantwortlich sind. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, da fixierte Monozyten, die keine Zytokine mehr produzieren können, nicht in der Lage sind, das immunsuppressive Signal des F/H Komplexes zu kompensieren (Abbildung 4.10).

Ad 5: Andere Arbeiten beschreiben, daß bestimmte Liganden durch Zellen der myelomonozytären Linie den $\gamma\delta$ T Zellen präsentiert werden müssen (Miyagawa et al., 2001; Hayday, 2000). Im Gegensatz dazu zeigen Sireci et al., 1997, daß APC die Reaktivität von $\gamma\delta$ T Zellen erhöhen, aber daß für diesen Effekt weder die Prozessierung und Internalisierung der Phosphoantigene, noch die Expression von MHC I oder II Molekülen vonnöten ist. Folglich gibt es verschiedene Möglichkeiten, wie die Interaktion zwischen PC, Monozyten und $\gamma\delta$ T Zellen erfolgen könnte, um das negative Proliferationssignal, das kontaktabhängig durch die MV-Glykoproteine geliefert wird, zu neutralisieren.

Es wäre möglich, daß MV-infizierte PC (B Zelllinien und DC, nicht aber T Zellen) Moleküle exprimieren, die den $\gamma\delta$ T Zellen von Monozyten präsentiert werden müssen, um eine maximale Expansion zu vermitteln. Alternativ könnte der Kontakt mit den PC die Expression neuer Oberflächenmoleküle auf den Monozyten induzieren, die als Ligand additiv zu dem IPP/IL-2 Stimulus die Proliferation der $\gamma\delta$ T Zellen fördern. Dieser Ligand könnte, ähnlich wie in dem bovinen System, in dem Monozyten konstitutiv ein noch nicht

identifiziertes $\gamma\delta$ T Zellen stimulierendes Oberflächenmolekül exprimieren, an die δ Kette des TCR binden (Sathiyaseelan et al., 2002).

Offensichtlich muß eine Reaktion der Monozyten auf den Kontakt mit den PC erfolgen, um ein Oberflächenmolekül (oder ein Zytokin) zu induzieren, das wiederum eine verstärkte Expansion von $\gamma\delta$ T Zellen induzieren kann, da fixierte Monozyten nicht in der Lage sind, effizient diesen „Helferfaktor“ zu generieren (Abbildung 4.5). Um welches Molekül es sich dabei handeln könnte, ist noch spekulativ. Es sind eine Reihe kostimulatorischer Moleküle wie CD2, CD7, CD28, CD30, CD48, CD50, CD69, CD81, LFA-1 und CD40L beschrieben, die die Reaktivität von $\gamma\delta$ T Zellen gegenüber Phosphoantigenen steigern können (Lopez et al., 2000; Wesselborg et al., 1991; Flament et al., 1996; Carrel et al., 1991; Gonzalez-Amaro et al., 2000). Da jedoch eine Vielzahl verschiedenster Zellen diese Moleküle exprimieren, ist die Relevanz für die beobachteten Effekte unklar.

Ein möglicher Kandidat wäre von APC exprimiertes CD86, das die proliferative Antwort boviner $\gamma\delta$ T Zellen auf bakterielle Superantigene in Abhängigkeit von der Expressionsstärke von CD86 steigert (Fikri et al., 2002). Da aber in den Experimenten der vorliegenden Arbeit DC, die nach der Infektion mit MV CD86 aufregulieren (Tabelle 4.3), in Abwesenheit von Monozyten die Proliferation der $\gamma\delta$ T Zellen inhibieren, scheint dieses Molekül nicht als „Helferfaktor“ in Frage zu kommen. Aus demselben Grund erscheint auch CD80 für diese Effekte als irrelevant.

Es wäre auch möglich, daß der Kontakt der PC mit den Monozyten in diesen eine Streßantwort auslöst, die wiederum $\gamma\delta$ T Zellen aktiviert. Denn $\gamma\delta$ T Zellen reagieren, wie erwähnt, auf eine Vielzahl von Molekülen, die als Reaktion auf Streß produziert werden. Allerdings ist spekulativ, ob MV-infizierte B Zellen und DC andere Streßantworten induzieren als T Zellen und Monozyten.

Eine Interaktion zwischen PC, Monozyten und $\gamma\delta$ T Zellen könnte auch einen negativen Kontrollmechanismus inhibieren. Es existieren inhibitorische Oberflächenmoleküle oder Rezeptorkomplexe wie CD94/NKG2, die vermutlich die Aktivierungsschwelle der $\gamma\delta$ T Zellen erhöhen (Poccia et al., 1997; Carena et al., 1997). Vielleicht generiert die Interaktion der Zellen ein Signal, das die Aktivität dieser Moleküle inhibiert, und so ein „unkontrolliertes“ Expandieren der $\gamma\delta$ T Zellen erlaubt.

Die vorliegende Arbeit zeigt, daß sich die Antworten der konventionellen T Zellen und der $\gamma\delta$ T Zellen gegenüber einem Kontakt mit MV unter gewissen Umständen nicht gleichen. Bei Anwesenheit von Monozyten, CD4 T Zellen und persistierend ED-infizierten B Zellen oder ED-infizierten DC erfolgt die IPP/IL-2-abhängige Expansion der $\gamma\delta$ T Zellen unbeeinflußt. Allerdings ist nicht untersucht worden, ob dieser Effekt spezifisch für die Stimulation mit IPP ist, oder ob er für alle $\gamma\delta$ T Zellen charakteristisch ist. Daher ist spekulativ, ob Unterschiede in den aktivierenden Signalwegen eine Rolle spielen. Lafont et al zeigten, daß die Signalwege, die durch IPP induziert werden, in ihrer Kinetik von der, die durch das Kreuzvernetzen des TCR induziert werden, divergieren (Lafont et al., 2001). Es wäre möglich, daß daher IPP-stimulierte $\gamma\delta$ T Zellen eine geringere Sensitivität gegenüber dem Signal des MV-F/H Komplexes haben, was eine Interferenz durch zusätzliche Signale ermöglichen könnte. Daher wäre es interessant zu untersuchen, ob die für die Proliferation von T Zellen essentielle Kinase Akt (oder Proteinkinase B PKB) in den gehemmten und nicht gehemmten $\gamma\delta$ T Zellen eine unterschiedliche Aktivität zeigt. Avota konnte beobachten, daß die diese Kinase nach dem Kontakt mit MV trotz einer Stimulation mit IL-2 (Avota et al., 2001), anti-CD3, oder anti-CD28 (Avota et al., noch nicht publiziert) keine Aktivität zeigt. Dies konnte aber nicht untersucht werden, da die IPP/IL-2 abhängige Expansion der $\gamma\delta$ T Zellen die Präsenz CD4+ Zellen benötigt (Abbildung 4.1), und demzufolge keine reine $\gamma\delta$ T Zellpopulation auf diese Signaltransduktionsprozesse analysiert werden konnte.

Bislang ist die Natur des immunsuppressiven Signals des MV F/H Komplexes unklar und war in den konventionellen T Zellen nicht exogen revertierbar. Die Beobachtung, daß die Hemmung von $\gamma\delta$ T Zellen ebenso effizient ist, wie die von $\alpha\beta$ T Zellen, daß aber dennoch eine Interferenz mit dem bislang als dominant angesehenen proliferationshemmenden MV-Signal möglich ist, bietet die Möglichkeit, einen tieferen Einblick in die Immunaktivierung und –suppression nach der MV Infektion zu gewinnen. Allerdings beschreiben die durchgeführten Untersuchungen nur eine Interferenz der $\gamma\delta$ T Zellen auf der Basis der Expandierbarkeit der Zellen. Um die Relevanz dieser Interaktionen zu validieren, müßte überprüft werden, ob die Stimulation mit IPP und IL-2 in Gegenwart von MV auch zu einer funktionellen Aktivierung der Zellen führt. Hierfür wäre eine cytotoxische Aktivität und die Sekretion immunmodulierender Botenstoffe nachzuweisen.

5.2 Die Interaktion von MV mit den Toll-ähnlichen Rezeptoren

Nach der Entdeckung, daß auch virale Proteine, die angeborene Immunantwort über Wechselwirkungen mit den Toll-ähnlichen Rezeptoren aktivieren können, zeigen die vorliegenden Ergebnisse, daß diese Interaktionen nicht auf TLR4 beschränkt sind. Die lymphotropen MV Wildtypstämme aktivieren spezifisch TLR2 und nicht TLR4, wie das F Protein von RSV (Kurt-Jones et al., 2000) und die *env* Proteine muriner Retroviren (Rassa et al., 2002). Die Wechselwirkungen zwischen TLR2 und MV sind virusstammspezifisch, da nur MV-Wildtypstämme (mit der Ausnahme des an Vero Zellen adaptierten Stammes Chicago), nicht aber Vakzinestämme eine TLR2-abhängige Aktivierung von Zellen bewirkten (Abbildung 4.11, Abbildung 4.12, Abbildung 4.13, Abbildung 4.14). Vakzinestämme konnten auch in hohen Konzentrationen infektiöser Partikel (angegeben als m.o.i.) keine TLR2 Aktivierung induzieren (Abbildung 4.12, Abbildung 4.13). Möglich wäre jedoch, daß defekte Partikel, die in unterschiedlichen Konzentrationen in den Viruspräparationen vorkommen, die unterschiedlichen Effekte verursachen. Durch das Aufreinigen der Viren und das Einstellen der Glykoproteinkonzentration konnten jedoch derartige dosisabhängige Unterschiede ausgeschlossen werden. Da der Austausch des H Proteines des Wildtypstammes in den Hintergrund des Vakzinestammes ausreichte, das Virus in einen TLR2 Agonisten zu verwandeln (Abbildung 4.19, Abbildung 4.22, Abbildung 4.23, Abbildung 4.24), ist es wahrscheinlich, daß dieses Protein den eigentlichen TLR2 Agonisten repräsentiert. Dies wird auch durch weitere Befunde belegt: Es sind keine Kontaminationen mit Endotoxinen oder Mykoplasmen in den Präparationen nachweisbar, die TLR4- oder TLR2-abhängig (Rawadi und Roman-Roman, 1996) die Zellen aktivieren könnten.

Eine mögliche Verunreinigung der Wildtypviren mit EBV (EBV kann IL-6 induzieren und NF κ B aktivieren (D'Addario et al., 1999)), ist unwahrscheinlich, da sich in BJAB Zellen kein EBV nachweisen läßt. Und obwohl alle rekombinanten Viren auf BJAB isoliert wurden, zeigen nur die Viren, die das WTF-H Protein enthalten, TLR2 agonistische Aktivität (Abbildung 4.19, Abbildung 4.22, Abbildung 4.23, Abbildung 4.24).

Der für die Viruszucht verwendete zelluläre Hintergrund scheint irrelevant zu sein, da Viren, die entweder auf Vero oder BJAB Zellen passagiert wurden, keine Unterschiede in der TLR2-abhängigen Aktivierung zeigen (Abbildung 4.15 und Abbildung 4.16B).

Die Aktivierung der Reporterzellen ist kontaktabhängig, da das Trennen der Viren und Zellen durch eine Membran keine CD25 Expression induziert (Abbildung 4.16B)

Möglich wäre jedoch, daß nur MV Wildtypen in den infizierten Zellen Proteine induzieren oder mit ihnen interagieren und so TLR2 aktivieren. Dabei könnte es sich um Hitzeschockproteine (HSP) handeln: Eine Interaktion von MV mit HSP konnte bereits gezeigt werden (Bolt et al., 2001; Sheshberadaran und Norrby, 1984; Parks et al. 1999) und es gibt Evidenzen, daß HSP TLR2 aktivieren (Vabulas et al., 2001; Aseat et al., 2002).

Aber auch nekrotische Zellen oder dsRNA können TLRs aktivieren. Da sich die cytopathischen Effekte, die durch MV Wildtyp- und Vakzinestämme induziert werden, nicht wesentlich unterscheiden, beide Viren dsRNA produzieren und die Aktivierung TLR2 und TLR4, bzw. TLR3 abhängig erfolgen müßte (Gough et al., 2001; Li et al., 2001; durch ds RNA: Ishii et al., 2001), erscheinen die Möglichkeiten jedoch als unwahrscheinlich.

Für die Relevanz des MV-H Proteins als TLR Agonist sprechen die Experimente, in denen Antikörper gegen das MV-H Protein, nicht aber Isotypen als Kontrollen, eine Stimulation der Zellen mit WTF blockieren konnten (Abbildung 4.20 und Abbildung 4.25). Es wäre möglich, daß ähnlich wie bei der kontaktvermittelten Immunsuppression, der Komplex aus F und H für die Aktivierung notwendig ist, wobei H die agonistischen Eigenschaften kontextabhängig determiniert. Da der im Labor verfügbare F-spezifische Antikörper aber infolge einer Endotoxinkontamination eine Aktivierung der TLR2 und TLR4 Reporterzellen induziert, war es bislang nicht möglich, die Effekte einer Blockade des F Proteins zu studieren.

Der Austausch einer einzigen Aminosäure in dem WTF-H Protein reicht für den Verlust der stimulatorischen Kapazität dieses Moleküles aus (Abbildung 4.19, Abbildung 4.20, Abbildung 4.21, Abbildung 4.22, Abbildung 4.24). Bemerkenswerterweise ist gerade dieser Aminosäureaustausch an der Position 481 von N zu Y signifikant für eine Adaption von MV-Wildtypen an Vero Zellen und damit die Benutzung von CD46 als Eintrittsrezeptor (Erlenhöfer et al., 2002). Eine Attenuierung von Wildtypstämmen durch serielle Passagen in Zellkultur und eine Adaptation an eine Benutzung von CD46 scheint somit invers mit der Fähigkeit, Zellen TLR2-abhängig zu aktivieren, zu korrelieren. Vielleicht ist dieser Verlust, derart das angeborene Immunsystem zu aktivieren, ein Attenuierungsmarker der MV Vakzinestämme. Einer generellen inversen Korrelation zwischen CD46 Nutzung und TLR2 Aktivierung widerspricht jedoch der Befund, daß beide WTF Stämme, sowohl der auf BJAB Zellen passagierte Stamm WTFb, als auch der

an Vero Zellen adaptierte, und daher CD46 benutzende, Stamm WTFv, TLR2 aktivieren können (Abbildung 4.15 und Abbildung 4.16B). Obwohl sich die Rezeptornutzung unterscheidet, weist WTFv gegenüber WTFb nur zwei exprimierte Nucleotidaustausche im H Protein auf: an der Position 192 von Isoleucin zu Threonin und an der Position 546 von Serin zu Glycin (Rima et al., 1997).

Der als Wildtypstamm klassifizierte, aber über Vero Zellen passagierte Stamm Chicago (Abbildung 4.14), liefert Indizien dafür, daß auch andere Aminosäuren die TLR2 agonistische Aktivität des H Proteins definieren können. Ebenso wie WTF exprimiert Chicago an Position 481 das für Wildtypviren charakteristische Asparagin, zeigt jedoch keine TLR2 agonistische Aktivität. Dies spricht dagegen, daß der Austausch der Aminosäure an Position 481 ausreicht, über die agonistische Aktivität zu entscheiden. Durch die Adaptation an CD46 erfolgten andere Mutationen im H, die für diesen Verlust verantwortlich sein könnten. Es ist unwahrscheinlich, daß die Aminosäure Glycin an der Position 546 dafür verantwortlich ist, da Chicago in dieser Sequenz dem Stamm WTFv entspricht. Daher könnten auch Mutationen an den Positionen 303, 405, 451 und 616, in denen Chicago dem Edmonstonstamm gleicht, darüber entscheiden, ob ein Masernvirus als TLR2 Agonist fungieren kann oder nicht. Die Bedeutung dieser, eine CD46 Nutzung determinierenden, Aminosäuren für die Interaktion mit TLR2 muß noch evaluiert werden. Da die Mutationen im H Protein keine neuen Glykosilierungsstellen schaffen, scheint eher eine Veränderung der dreidimensionalen Struktur des H Proteins dafür ursächlich zu sein, daß eine Aktivierung von TLR2 nach der Adaption an CD46 nicht mehr möglich ist. Nach einem Modell von Langedijk et al., 1997, kann das H Protein in 3 Domänen untergliedert werden: eine cytoplasmatische Domäne, eine Transmembran- und eine Ektodomäne. Diese besteht aus einer β Propellerstruktur, die von der Zellmembran durch zwei helixreiche Stammstrukturen abgegrenzt wird. Sämtliche Mutationen, die durch die Adaptation an CD46 verursacht wurden, finden sich in der Propellerstruktur, die die Interaktion mit dem zellulären Rezeptor vermittelt. Bis die Kristallstruktur des H Proteins aufgeklärt werden kann, sind nur Spekulationen über mögliche Konformationsänderungen des Moleküls möglich.

Es ist wahrscheinlich, daß CD14, ähnlich wie für LPS, RSV und andere TLR Agonisten, ebenfalls als Korezeptor für die MV-abhängige TLR2 Aktivierung fungiert. So ist die WTF-vermittelte Aktivierung (CD25 Expression und IL-6 Produktion) der TLR2 exprimierenden CHO Zellen (Abbildung 4.17, Abbildung 4.19, Tabelle 4.6) und der Vitamin D3

behandelten Zelllinien (Abbildung 4.21, Abbildung 4.22, Tabelle 4.8) bei Anwesenheit dieses Moleküls erhöht. Zusätzlich können CD14 blockierende Antikörper die WTF-induzierte Freisetzung von IL-6 von primären Monozyten inhibieren (Abbildung 4.25). Dies wirft die Frage auf, ob DC, die kein CD14 exprimieren, TLR2 abhängig durch MV-Wiltypviren aktiviert werden können.

Neben CD14 können auch andere TLRs mit TLR2 heterodimerisieren. Die durchgeführten Experimente lassen keine Aussage darüber zu, ob eventuell ein Komplex von TLR2 und TLRx für die Aktivierung der Monozyten und CHO Zellen durch MV Wildtypen erforderlich ist. Durch die Verwendung TLR2-blockierender Antikörper und des TLR2-defizienten Mausstammes ist aber evident, daß TLR2 essentiell für die MV vermittelte Aktivierung benötigt wird (Abbildung 4.25 und Abbildung 4.26).

Nur wenige *in vivo* Befunde bestätigen eine Immunaktivierung nach einer MV Infektion, diese beschreiben zudem meist eine T und B zellspezifische Aktivierung. Die Aktivierung von Monozyten, gemessen an der Freisetzung monozytenspezifischer Zytokine, wurde nur in einer Studie adressiert, in der bei akuten Masern eine erhöhte Spontanfreisetzung von IL-6 gemessen wurde (Furukawa et al., 1992). Die Resultate übriger Studien, die klinisches Material oder Material aus experimentell MV-infizierten Makaken verwendeten, basieren meist auf der Analyse einer sekundären Zytokinfreisetzung nach *in vitro* Restimulation (Auwärter et al., 1999; Atabani et al., 1999). Daher können sie nicht mit den Ergebnissen dieser Arbeit, die primäre Antworten reflektieren, verglichen werden.

Während MV-Wildtypstämme eine Aktivierung von Monozyten über TLR2 Signalwege induzieren können, sind offensichtlich auch attenuierte und CD46-benutzende MV-Stämme in der Lage, antigenpräsentierende Zellen *in vivo* zu aktivieren. Die Aktivierung von Monozyten in geimpften Personen ist gemessen an der Produktion von Monokinen allerdings wenig ausgeprägt: die spontane Freisetzung von IL-1 α und die Konzentration von TNF α im Serum scheint gehemmt und die Produktion von IL-1 β unverändert (Ward et al., 1991). Dennoch gibt es Hinweise, daß auch an CD46 adaptiertes MV *in vitro* -TLR2 unabhängig- die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen induzieren kann. In primären Monozyten und THP-1 Zellen, die mit einem an Vero Zellen adaptierten und damit CD46-benutzenden MV-Stamm infiziert waren, konnten Leopardi et al., 1992, eine erhöhte Produktion von IL-1 β und eine verringerte Sekretion von TNF α nachweisen. In

MoDC induzierte der dem ED verwandte Stamm Halle eine schwache IL-12p40 und eine starke IL-1 β spezifische mRNA Transkription (Servet Delprat et al., 2000).

Die Mechanismen der TLR2-unabhängigen Immunaktivierung sind unbekannt, aber sie könnten die Ligation von CD46 beinhalten. Kurita-Taniguchi postulieren, daß CD46 ähnlich den TLRs eine Funktion bei der angeborenen Immunantwort übernehmen könnte: Monozyten/Makrophagen, deren CD46 kreuzvernetzt ist, sind in der Lage, IL-12 zu sezernieren, NO zu produzieren und kostimulatorische Moleküle zu exprimieren (Kurita-Taniguchi et al., 2000). Für diese Effekte ist ein gewisses Reifungsstadium der Monozyten erforderlich (6 Tage unter dem Einfluß von GM-CSF), bei dem die Phosphatase SHP-1, CD9 und α 3- β 1 Integrin an CD46 gebunden ist, die infolge der Kreuzvernetzung SHP-1 rasch vom dem cytoplasmatischen Teil von CD46 dissoziiert. SHP-1 könnte dabei weitere Signalwege integrieren. Durch diesen Mechanismus könnten auch MV-Vakzinestämme eine Aktivierung von APC *in vivo* und *in vitro* verursachen. Da in der vorliegenden Arbeit jedoch frische Monozyten kultiviert wurden, die daher keine Reifungsprozesse erfahren hatten, ist keine Aktivierung durch die CD46 bindenden MV Stämme zu erwarten.

Auch in T Zellen induziert die Koligation von CD46 und CD3 neben einer verstärkten Proliferation die Aktivierung von p120^{CBL}, Vav, Rac und ERK (Astier et al., 2000; Zaffran et al., 2001).

Unabhängig von einer CD46 Ligation kann die auch die Infektion mit CD46 benutzenden MV Vakzinestämmen eine Immunaktivierung induzieren. So kann replizierendes MV in einer Reihe von Zelltypen direkt NF κ B aktivieren (Dhib-Jalbout et al., 1999; Helin et al., 1999; Bolt et al., 2002).

Darüberhinaus scheinen MV Vakzinestämme, nach einer Publikation von Naniche et al., 2000, in infizierten PBMC deutlich höhere Konzentrationen an Typ I Interferonen zu induzieren, während MV Wildtypstämme die Produktion dieser antiviralen Zytokine aktiv zu inhibieren scheinen. Dieser Mechanismus wäre auch als Auslöser einer angeborenen Immunantwort durch Vakzinestämme denkbar. Allerdings ist nicht bekannt, ob es sich um einen generellen Unterschied zwischen allen Vakzine- und Wildtypstämmen handelt und ob sich diese Beobachtung auch auf Monozyten beziehen läßt.

Im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit, wurde jedoch in diesen Studien, die eine Aktivierung von Immunzellen durch Vakzinestämme beschreiben, infektiöses Virus verwendet. Die in der vorliegenden Arbeit beobachteten Wechselwirkungen zwischen

TLR2 und WTF-H erfolgen gänzlich unabhängig von einer Infektion der Zielzellen (CHO Zellen exprimieren nicht die erforderlichen MV Eintrittsrezeptoren und sind daher nicht infizierbar; auch UV-, Hitze und FIP- behandeltes Virus sind TLR2 agonistisch (Abbildung 4.16A)). Die Aktivierung von TLR2 durch WTF-H enthaltende Viren ist nur abhängig von einem Kontakt, wobei unbekannt ist, ob eine direkte Interaktion in Form einer Ligand-Rezeptorwechselwirkung erfolgt. Bisher konnten nur für LPS und erstaunlicherweise die env Proteine muriner Retroviren direkte Kontakte mit TLR4 nachgewiesen werden. Daher wird auch allgemein in der TLR-Literatur der Begriff „Agonist“ dem Begriff „Ligand“ vorgezogen.

Obwohl die Aktivierung von TLR2 durch MV-Wildtypstämme eine entscheidende Rolle bei der Induktion der Immunantworten spielen könnte, könnte die Aktivierung dieser Signalwege auch für die Pathogenese und Induktion der Immunsuppression beteiligt sein. Die Aktivierung der Monozyten durch TLR Agonisten, eingeschlossen MV-Wildtypstämme, induziert die Expression von CD150. Nach bisherigem Kenntnisstand ist dies das erste Beispiel, daß ein Virus die Expression seines zellulären Bindungsrezeptors bewirken kann. Die Notwendigkeit von CD150 als Eintrittsrezeptor für lymphotrope Wildtypstämme ist eindeutig belegt, während Vakzinestämme neben CD150 noch CD46 benutzen können (Tatsuo et al., 2001; Tatsuo und Yanagi, 2002; Tanaka et al., 2002; Erlenhöfer et al., 2001 und 2002). Die durch MV-Wildtypen TLR2-abhängige induzierte Expression von CD150 (Abbildung 4.24, Abbildung 4.25) könnte die Suszeptibilität von Monozyten *in vivo* erklären. Da Minagawa und Nau bereits beschrieben haben, daß CD150 auf Monozyten durch Stimulation mit LPS, PHA und auch mit MV-Wildtypviren induziert wird und daß dies eine Infektion mit MV ermöglicht (die durch anti-CD150 blockierbar ist), wurde dieser Ansatz in der vorliegenden Arbeit nicht weiter verfolgt (Minagawa et al., 2001; Nau et al., 2002). Es wurde auch nicht evaluiert, ob die TLR-abhängige Induktion von CD150 auf direkten Signalen oder aber indirekten Effekten z.B. Zytokinen beruht. Es ist aber wahrscheinlich, daß ein Rückkopplungsmechanismus für die CD150 Expression zuständig ist, da auf reifen DC IL-1 β (ein Zytokin, das durch die TLR Signalwege auch in Monozyten induziert wird (Abbildung 4.21 und Abbildung 4.22)) CD150 hochregulieren kann (Kruse et al., 2001).

Die TLR2-abhängige Expression von CD150 könnte für die Pathogenese der MV-Infektion relevant sein, da sie durch die Suszeptibilität der Monozyten die Ausbreitung des Virus

propagieren, aber auch die Depletion von Monozyten induzieren könnte. Denn neben der Aktivierung von NF κ B können, ausgehend von MyD88, TLR2 Signalwege auch die Aktivierung von Apoptose induzieren. Dieses beinhaltet die Rekrutierung von FADD (Fas-associated death domain protein) und Caspase 8 (Aliprantis et al., 2000). Esolen et al. publizierten, daß eine MV-Infektion eine späte Depletion der Monozyten durch Apoptose verursacht, die kausal mit der induzierten Immunsuppression in Zusammenhang stehen könnte (Esolen et al., 1995). Allerdings zeigen die durchgeführten Experimente nach 12stündiger Kokultur der Monozyten mit UV-inaktiviertem MV nur eine Ausreifung der Zellen, die durch eine veränderte Zellmorphologie charakterisiert ist und durch die Expression von Oberflächenmolekülen bestätigt werden kann (Abbildung 4.24). Anzeichen auf apoptotische Prozesse wurden nicht beobachtet und daher nicht analysiert.

Da die Aktivierung der Zellen mit den TLR Agonisten (LPS, Pam₃CSK₄ und WTF-H enthaltenden Viren) eine Induktion der IL-12p40 Transkription induziert (Abbildung 4.21, Abbildung 4.22), könnte dies ein weiterer Faktor sein, der die Pathogenese der Maserninfektion determiniert. IL-12 spielt eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung von CD4 Zellen des Th1 Typs, da es die Proliferation, die Erneuerung und das Überleben von Th1 Zellen fördert und gleichzeitig die Entwicklung und Proliferation von Th2 Zellen verhindert (Park und Scott, 2001). Viele Studien analysierten die IL-12 Freisetzung nach einer Voraktivierung mit IFN γ und einer Restimulation mit den TLR4 bzw. TLR2 Agonisten LPS oder SAC. TLR2 aktivieren. Nach Kontakt mit MV (durch eine natürliche Infektion (Atabani et al., 2001), die Immunisierung (Gans et al., 1999), die Infektion von Monozyten oder den Kontakt mit UV-inaktiviertem Virus (Karp et al., 1996) ist nach 24 Stunden die stimulierte Freisetzung von IL-12p40 und p70 gehemmt. Da in der vorliegenden Arbeit nur kurze Inkubationsphasen (12 Stunden) erfolgten, läßt sich keine Aussage darüber treffen, ob MV infolge der Interaktion mit TLR2 die Produktion von bioaktivem IL-12p70 hemmt oder fördert. Die Transkription von IL-12p40 mRNA wird jedoch bereits nach 12 Stunden durch die TLR Agonisten induziert. Dies korreliert mit Beobachtungen, daß die TLR2-abhängige Aktivierung von Monozyten und DC generell keine Produktion von IL-12p70 aktiviert, sondern vornehmlich von IL-12p40. (Jones et al., 2001; Nau et al., 2002; Re und Strominger, 2001; Thoma-Uszynski et al., 2000). Da aber auch LPS, als TLR4 Agonist, 12 Stunden nach der Stimulation noch keine IL-12p70 spezifische Transkription aktiviert, müßten spätere Zeitpunkte analysiert werden, um eine genauere Aussage über die Produktion von IL-12 treffen zu können.

Die Interaktion von MV-Wildtypstämmen und TLR2 bietet die Möglichkeit, die erhöhte Suszeptibilität gegenüber sekundären Infektionen zu erklären: Bemerkenswert ist, daß verschiedene TLR Agonisten sowohl synergistisch eine Aktivierung von Zellen bewirken können oder aber antagonistisch eine nachfolgende Aktivierung hemmen können (Wittmann et al., 1999; Sato et al., 2000). Dieser nichtresponsive Status wird als Toleranz bezeichnet. Sowohl eine veränderte Expression der TLRs und ihrer Korezeptoren (An et al., 2002; Medvedev et al., 2001; Martin et al., 2001), dominante TLR4 Signalwege, eine Veränderung signaltransduzierender Moleküle (c-Jun, p38 Kinasen, I κ B, NF κ B und seine Untereinheiten, AP-1) und Zytokine (IL-1, IL-4, IL-10, TGF β), die die Schwellenwerte für die Aktivierung modulieren (Li et al., 2000; Medvedev et al., 2000) könnten für diese Effekte verantwortlich sein. Obwohl in der vorliegenden Arbeit keine Untersuchungen durchgeführt wurden, um derartige Mechanismen zu analysieren, gibt es erste Hinweise, daß auch MV eine Toleranz induzieren könnte: Während eine Infektion von MoDC mit WTF bereits eine IL-12p70 Produktion induziert, die sich durch LPS steigern läßt, ist die SAC- (als gesamtes Bakterium TLR2 und TLR4 Agonist) induzierte IL-12p70 Produktion deutlich inhibiert (Klagge, 2001). Daher wäre es denkbar, daß die MV-vermittelte primäre Aktivierung von APC über TLR2 einen Zustand der Toleranz induzieren könnte. Infolge einer ausbleibenden Erkennung oder Aktivierung von TLRs durch opportunistische Pathogene, könnten sich sekundäre Infektionen etablieren.

Masernviren, die stark mit CD46 interagieren, scheinen darüberhinaus eine Aktivierung von TLRs direkt blockieren zu können. Im Monozyten verhindert die Ligation von CD46 durch Antikörper oder auch durch MV die Induktion von IL-12 durch eine nachfolgende LPS oder SAC Stimulation (Karp, 1999; Karp und Wills-Karp, 2001). Folglich müssen weitere Experimente durchgeführt werden, um eine mögliche Induktion von Toleranz oder eine Interferenz von TLR und CD46 Signalwegen zu belegen.

Eine weitere Frage, die unbeantwortet bleiben muß, beinhaltet die Kinase Akt: Wie zuvor erwähnt, konnten Avota et al., 2001, zeigen, daß in T Zellen der Kontakt mit den MV Glykoproteinen ausreicht, eine Aktivierung von Akt durch IL-2, anti-CD3 und anti-CD28 zu verhindern. Akt ist auch ein Intermediat in den Signalwegen von TLR2. Obwohl die vorliegenden Ergebnisse keine deutlichen Unterschiede zwischen einer Stimulation mit Pam₃CSK₄ und WTF-H enthaltenden Viren zeigen, ist nicht auszuschließen, daß eine Modulation der TLR2-abhängigen Signalwege über Akt erfolgen könnte.

Die vorliegende Arbeit zeigt deutlich, daß die Stimulation von Monozyten mit MV Wildtypstämmen die Aktivierung dieser Zellen verursacht, die sich in einer erhöhten Produktion von Zytokinen und in einer erhöhten Expression kostimulatorischer Moleküle manifestiert (Abbildung 4.23 und Abbildung 4.24), und eine Aktivierung der angeborenen Immunantwort reflektiert. Es ist jedoch noch nicht bekannt, welche Folgen diese Immunaktivierung für den Organismus hat. Die Interaktion zwischen RSV und TLR4 spielt eine essentielle Rolle bei der *in vivo* Immunantwort gegen das infektiöse Agens, denn durch die Aktivierung TLR4-abhängiger Signalwege reduziert sich die Viruslast (Kurt-Jones NI 2000). Es ist eine Aktivierung der Zytokinfreisetzung (IL-2, IFN γ und IL-12) und eine Infiltration der Gewebe mit Monozyten und NK Zellen nachweisbar. Die zytotoxische Aktivität der NK Zellen ist dabei stark abhängig von den Konzentrationen an IL-12 (Haynes et al., 2001).

Ob die Aktivierung der angeborenen Immunantwort durch MV diesem Muster folgt und ob sich Unterschiede in den Antworten nach einer Infektion mit Wildtypstämmen und Vakzinestämmen in Abhängigkeit von der Expression von TLR2 ausmachen lassen, ist noch zu analysieren. Die hierfür erforderlichen Tierexperimente sind jedoch limitiert, da Mäuse für die entsprechenden Materialien vorhanden sind, kein geeignetes Modell für die MV-Pathogenese darstellen. Die Benutzung von Baumwollratten wäre in dieser Hinsicht eine bessere Wahl, jedoch stehen hierfür nicht die notwendigen Reagenzien zur Verfügung. Dennoch müßte die Immunisierung von Wildtyp- und TLR2^{-/-} Mäusen eine *in vivo* Relevanz der beobachteten Interaktionen aufzeigen können.

6 Zusammenfassung

Eine Masernvirus- (MV) Infektion induziert eine effiziente virus-spezifische Immunantwort. Aber parallel erfolgt eine generelle Suppression immunologischer Funktionen, die sekundäre Infektionen ermöglichen und verstärken kann. Eine Lymphopenie und die *ex vivo* beobachtete stark verminderte proliferative Antwort peripherer Lymphozyten auf polyklonale oder antigenspezifische Aktivierung gilt als zentraler Befund für diese Immunsuppression. Bislang konnte *in vitro* keine Interferenz mit dem von den MV-Glykoproteinen generierten negativen Proliferationssignal nachgewiesen werden. Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Befunde zeigen jedoch, daß der MV induzierte Proliferationsarrest unter bestimmten Bedingungen in IPP/IL-2 (Isopentenylpyrophosphat und Interleukin-2) stimulierten $\gamma\delta$ T Zellen aufgehoben werden kann. Die Sensitivität der $\gamma\delta$ T Zellen gegenüber dem von den MV-Glykoproteinen vermittelten Signal gleicht der der konventionellen T Zellen. Dennoch reicht der Kontakt zu Monozyten und mit dem MV Vakzinestamm Edmonston (ED)-infizierten B Zellen oder dendritischen Zellen (DC) aus, eine ungehemmte Expansion der $\gamma\delta$ T Zellen zu induzieren. Durch eine Interaktion mit ED-infizierten B Zellen und DC reagieren Monozyten wahrscheinlich mit einer Regulation stimulatorischer oder inhibitorischer Oberflächenmoleküle, die bei dem Kontakt mit $\gamma\delta$ T Zellen einen additiven Stimulus liefert, der das negative Proliferationssignal von MV neutralisiert.

Auch Funktionen antigenpräsentierender Zellen (APC) scheinen differentiell durch MV-Stämme regulierbar zu sein. Die Erkennung von molekularen Mustern von Pathogenen über die Toll-ähnlichen Rezeptoren (TLR) ist ein wichtiger Schritt bei der Aktivierung einer Immunantwort durch APCs. Nachdem die Fähigkeit, mikrobieller Produkte APC über TLRs zu aktivieren, dokumentiert ist, sind nur zwei virale Proteine bekannt, die mit TLR4 interagieren.

Mithilfe transgener Reporterzellen konnte demonstriert werden, daß MV-Wildtypstämme, nicht aber Vakzinestämme humanes und murines TLR2, wahrscheinlich mit CD14 als Korezeptor, und nicht TLR4, aktivieren. Die TLR2 agonistische Eigenschaft konnte dem MV-Wildtyp Hämagglutininprotein (H) zugeordnet werden. Der Austausch einer einzigen Aminosäure im WTF-H, Asparagin zu Tyrosin an der Position 481, welche in an CD46 adaptierten Vakzinestämmen zu finden ist, reichte für den Verlust TLR agonistischer

Aktivität aus. Auch in humanen Monozyten konnten Viren, die das authentische WTF-H Protein enthielten, die Expression TLR responsiver Gene wie IL-6 induzieren. Gleichzeitig verursachte die Aktivierung der Monozyten durch die TLR Agonisten, einschließlich der Wildtyp MV, die Expression des allgemeinen MV Rezeptors CD150, der von ruhenden Monozyten nicht exprimiert wird.

Die Spezifität der WTF-H und TLR2 Interaktion konnte durch blockierende Antikörper und TLR2^{-/-} Mäuse, die kein IL-6 nach Stimulation mit WTF freisetzen, gezeigt werden.

Die Fähigkeit von MV-Wildtypstämmen TLR2 zu aktivieren, könnte wesentlich zu der Immunaktivierung, aber auch zur Ausbreitung und Pathogenese der Infektion beitragen und die Attenuierung von Vakzinestämmen erklären.

Zusammenfassend liefern die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit Hinweise auf eine MV-stammspezifische Aktivierung angeborener Immunantworten, welche die adaptive Immunität modulieren können.

7 Summary

Measles virus (MV) infection induces an efficient virus-specific immune response, but also a general suppression of immune functions, which favors and aggravates secondary infections. Lymphopenia and a diminished expansion of polyclonal or antigen-specific stimulated lymphocytes *ex vivo* are hallmarks of the immunosuppression. No interference with the negative signal of the MV-glycoprotein complex could be observed *in vitro* as yet. The results of the present study, however, show that $\gamma\delta$ T cells are –under specific conditions- refractory towards the immunosuppressive signal of the MV glycoproteins. While the sensitivity of $\gamma\delta$ T cells against the MV-mediated signal is comparable to $\alpha\beta$ T cells, the contact between ED-infected B cells and dendritic cells (DC) and monocytes is necessary and sufficient to neutralize this negative signal and to allow the IPP/IL-2 (isopentenylpyrophosphate and interleukin 2) dependent expansion of $\gamma\delta$ T cells. Most likely, the interaction with the MV vaccine strain Edmonston (ED) infected B cells or DC with monocytes modulates the expression of costimulatory or inhibitory surface molecules, which efficiently compensate the inhibitory MV signal.

As the immunostimulatory and inhibitory responses differ between natural infection and vaccination, a differential regulation of APC activation and function might be central for both processes. While the ability of microbial products to activate antigenpresenting cells (APC) via Toll-like receptors (TLR) is well established, triggering of TLR4 signaling by viruses is confined to the RSV Fusion protein and the envelope protein of murine retroviruses as yet. Using transgenic CHO cells, we found that MV wildtype, but not vaccine strains were able to activate TLR2, but not TLR4, most likely in the context of CD14. This property was dependent on the expression of the hemagglutinin (H) protein of the MV wildtype strain, WTF, and could be abrogated by a single amino acid exchange within the H-protein, found in attenuated virus strains. Importantly, in human monocytes particularly the MV wildtype strain efficiently induced the activation of TLR-responsive genes including IL-6 and also the surface expression of the common MV receptor, CD150. As peripheral blood monocytes normally do not express CD150, MV triggers the expression of its receptor and thereby probably enhances infection and viral spread.

By comparing TLR2- deficient to wild-type mice we could proof the unique involvement of TLR2. Thus, activation of TLR-signaling by wildtype MV H-protein may essentially contribute to the immune activation during acute measles. Differential interaction of MV wildtype and vaccine strains with APC provides a novel explanation for the attenuated immune responses after vaccination. On the other hand, MV-strain dependent desensitization of TLR activation, as described for microbial products, may essentially contribute to the impairment of APC functions towards opportunistic infections.

Altogether the results of the present study provide suggestions how a MV-strain dependent activation of innate immune responses might occur, to modulate adaptive immunity.

8 Literatur

Adam D, Heinrich M, Kabelitz D, Schutze S. Ceramide: does it matter for T cells? Trends Immunol. 2002 Jan;23(1):1-4.

Addae MM, Komada Y, Zhang XL, Sakurai M. Immunological unresponsiveness and apoptotic cell death of T cells in measles virus infection. Acta Paediatr Jpn. 1995 Jun;37(3):308-14.

Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. Nature. 2000 Aug 17;406(6797):782-7.

Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. Nat Immunol. 2001 Aug;2(8):675-80.

Aliprantis AO, Yang RB, Weiss DS, Godowski P, Zychlinsky A. The apoptotic signaling pathway activated by Toll-like receptor-2. EMBO J. 2000 Jul 3;19(13):3325-36.

An H, Yu Y, Zhang M, Xu H, Qi R, Yan X, Liu S, Wang W, Guo Z, Guo J, Qin Z, Cao X. Involvement of ERK, p38 and NF-kappaB signal transduction in regulation of TLR2, TLR4 and TLR9 gene expression induced by lipopolysaccharide in mouse dendritic cells. Immunology. 2002 May;106(1):38-45.

Arbibe L, Mira JP, Teusch N, Kline L, Guha M, Mackman N, Godowski PJ, Ulevitch RJ, Knaus UG. Toll-like receptor 2-mediated NF-kappa B activation requires a Rac1-dependent pathway. Nat Immunol. 2000 Dec;1(6):533-40.

Ardeshna KM, Pizzey AR, Devereux S, Khwaja A. The PI3 kinase, p38 SAP kinase, and NF-kappaB signal transduction pathways are involved in the survival and maturation of lipopolysaccharide-stimulated human monocyte-derived dendritic cells. Blood. 2000 Aug 1;96(3):1039-46.

Arneborn P, Biberfeld G, Forsgren M, von Stedingk LV. Specific and non-specific B cell activation in measles and varicella. Clin Exp Immunol. 1983 Jan;51(1):165-72.

Arneborn P, Biberfeld G. T-lymphocyte subpopulations in relation to immunosuppression in measles and varicella. Infect Immun. 1983 Jan;39(1):29-37.

Asea A, Rehli M, Kabingu E, Boch JA, Bare O, Auron PE, Stevenson MA, Calderwood SK. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. J Biol Chem. 2002 Apr 26;277(17):15028-34.

Astier A, Trescol-Biemont MC, Azocar O, Lamouille B, Rabourdin-Combe C. Cutting edge: CD46, a new costimulatory molecule for T cells, that induces p120CBL and LAT phosphorylation. *J Immunol.* 2000 Jun 15;164(12):6091-5.

Atabani SF, Byrnes AA, Jaye A, Kidd IM, Magnusen AF, Whittle H, Karp CL. Natural measles causes prolonged suppression of interleukin-12 production. *J Infect Dis.* 2001 Jul 1;184(1):1-9.

Autran B, Triebel F, Katlama C, Rozenbaum W, Hercend T, Debre P. T cell receptor gamma/delta+ lymphocyte subsets during HIV infection. *Clin Exp Immunol.* 1989 Feb;75(2):206-10.

Auwaerter PG, Rota PA, Elkins WR, Adams RJ, DeLozier T, Shi Y, Bellini WJ, Murphy BR, Griffin DE. Measles virus infection in rhesus macaques: altered immune responses and comparison of the virulence of six different virus strains. *J Infect Dis.* 1999 Oct;180(4):950-8.

Aversa G, Chang CC, Carballido JM, Cocks BG, de Vries JE. Engagement of the signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) on activated T cells results in IL-2-independent, cyclosporin A-sensitive T cell proliferation and IFN-gamma production. *J Immunol.* 1997 May 1;158(9):4036-44.

Avota E, Avots A, Niewiesk S, Kane LP, Bommhardt U, ter Meulen V, Schneider-Schaulies S. Disruption of Akt kinase activation is important for immunosuppression induced by measles virus. *Nat Med.* 2001 Jun;7(6):725-31.

Balaji KN, Schwander SK, Rich EA, Boom WH. Alveolar macrophages as accessory cells for human gamma delta T cells activated by Mycobacterium tuberculosis. *J Immunol.* 1995 Jun 1;154(11):5959-68.

Bartz R, Brinckmann U, Dunster LM, Rima B, Ter Meulen V, Schneider-Schaulies J. Mapping amino acids of the measles virus hemagglutinin responsible for receptor (CD46) downregulation. *Virology.* 1996 Oct 1;224(1):334-7.

Bartz R, Firsching R, Rima B, ter Meulen V, Schneider-Schaulies J. Differential receptor usage by measles virus strains. *J Gen Virol.* 1998 May;79 (Pt 5):1015-25.

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

Bolt G, Berg K, Blixenkrone-Moller M. Measles virus-induced modulation of host-cell gene expression. *J Gen Virol.* 2002 May;83(Pt 5):1157-1165.

Bonneville M, Ito K, Krecko EG, Itohara S, Kappes D, Ishida I, Kanagawa O, Janeway CA, Murphy DB, Tonegawa S. Recognition of a self major histocompatibility complex TL region product by gamma delta T-cell receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989 Aug;86(15):5928-32.

Borrow P, Oldstone MB. Measles virus-mononuclear cell interactions. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1995;191:85-100.

Borysiewicz LK, Casali P, Rogers B, Morris S, Sissons JG. The immunosuppressive effects of measles virus on T cell function--failure to affect IL-2 release or cytotoxic T cell activity in vitro. *Clin Exp Immunol.* 1985 Jan;59(1):29-36.

Boullier S, Poquet Y, Debord T, Fournie JJ, Gougeon ML. Regulation by cytokines (IL-12, IL-15, IL-4 and IL-10) of the Vgamma9Vdelta2 T cell response to mycobacterial phosphoantigens in responder and anergic HIV-infected persons. *Eur J Immunol.* 1999 Jan;29(1):90-9.

Boullier S, Poquet Y, Halary F, Bonneville M, Fournie JJ, Gougeon ML. Phosphoantigen activation induces surface translocation of intracellular CD94/NKG2A class I receptor on CD94- peripheral Vgamma9 Vdelta2 T cells but not on CD94- thymic or mature gammadelta T cell clones. *Eur J Immunol.* 1998 Nov;28(11):3399-410.

Bukowski JF, Morita CT, Brenner MB. Recognition and destruction of virus-infected cells by human gamma delta CTL. *J Immunol.* 1994 Dec 1;153(11):5133-40.

Bukowski JF, Morita CT, Tanaka Y, Bloom BR, Brenner MB, Band H. V gamma 2V delta 2 TCR-dependent recognition of non-peptide antigens and Daudi cells analyzed by TCR gene transfer. *J Immunol.* 1995 Feb 1;154(3):998-1006.

Carding SR und Egan PJ. Gamma delta T cells: Functional plasticity and heterogeneity. *Nat Immunol* 2002; 2: 336-45

Carding SR, Allan W, Kyes S, Hayday A, Bottomly K, Doherty PC. Late dominance of the inflammatory process in murine influenza by gamma/delta + T cells. *J Exp Med.* 1990 Oct 1;172(4):1225-31.

Carena I, Shamshiev A, Donda A, Colonna M, Libero GD. Major histocompatibility complex class I molecules modulate activation threshold and early signaling of T cell

antigen receptor-gamma/delta stimulated by nonpeptidic ligands. *J Exp Med.* 1997 Nov 17;186(10):1769-74.

Carrel S, Salvi S, Rafti F, Favrot M, Rapin C, Sekaly RP. Direct involvement of CD7 (gp40) in activation of TcR gamma/delta+ T cells. *Eur J Immunol.* 1991 May;21(5):1195-200.

Cipriani B, Borsellino G, Poccia F, Placido R, Tramonti D, Bach S, Battistini L, Brosnan CF. Activation of C-C beta-chemokines in human peripheral blood gammadelta T cells by isopentenyl pyrophosphate and regulation by cytokines. *Blood.* 2000 Jan 1;95(1):39-47.

Clements CJ. und Cutts FT. The epidemiology of measles:Thirty years of vaccination. In: Billeter M:A: und ter Meulen V. (eds): *Measles virus.* Springer Verlag KG, Berlin, 1995; p.13-35

Cocks BG, Chang CC, Carballido JM, Yssel H, de Vries JE, Aversa G. A novel receptor involved in T-cell activation. *Nature.* 1995 Jul 20;376(6537):260-3.

Crespi M, Struthers JK, Smith AN, Lyons SF. Interferon status after measles virus infection. *S Afr Med J.* 1988 Jun 18;73(12):711-2.

da Silva Correia J, Ulevitch RJ. MD-2 and TLR4 N-linked glycosylations are important for a functional lipopolysaccharide receptor. *J Biol Chem.* 2002 Jan 18;277(3):1845-54.

D'Addario M, Ahmad A, Xu JW, Menezes J. Epstein-Barr virus envelope glycoprotein gp350 induces NF-kappaB activation and IL-1beta synthesis in human monocytes-macrophages involving PKC and PI3-K. *FASEB J.* 1999 Dec;13(15):2203-13.

de Libero G, Casorati G, Giachino C, Carbonara C, Migone N, Matzinger P, Lanzavecchia A. Selection by two powerful antigens may account for the presence of the major population of human peripheral gamma/delta T cells. *J Exp Med.* 1991 Jun 1;173(6):1311-22.

de Maria A, Ferrazin A, Ferrini S, Ciccone E, Terragna A, Moretta L. Selective increase of a subset of T cell receptor gamma delta T lymphocytes in the peripheral blood of patients with human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Infect Dis.* 1992 May;165(5):917-9.

de Paoli P, Gennari D, Martelli P, Basaglia G, Crovatto M, Battistin S, Santini G. A subset of gamma delta lymphocytes is increased during HIV-1 infection. *Clin Exp Immunol.* 1991 Feb;83(2):187-91

de Paoli P, Gennari D, Martelli P, Cavarzerani V, Comoretto R, Santini G. Gamma delta T cell receptor-bearing lymphocytes during Epstein-Barr virus infection. *J Infect Dis.* 1990 May;161(5):1013-6.

Dhib-Jalbut S, Xia J, Rangaviggula H, Fang YY, Lee T. Failure of measles virus to activate nuclear factor-kappa B in neuronal cells: implications on the immune response to viral infections in the central nervous system. *J Immunol.* 1999 Apr 1;162(7):4024-9.

Dorig RE, Marcil A, Chopra A, Richardson CD. The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain). *Cell.* 1993 Oct 22;75(2):295-305.

Elloso MM, van der Heyde HC, Troutt A, Manning DD, Weidanz WP. Human gamma delta T cell subset-proliferative response to malarial antigen in vitro depends on CD4+ T cells or cytokines that signal through components of the IL-2R. *J Immunol.* 1996 Sep 1;157(5):2096-102.

Engelking O, Fedorov LM, Lilischkis R, ter Meulen V, Schneider-Schaulies S. Measles virus-induced immunosuppression in vitro is associated with deregulation of G1 cell cycle control proteins. *J Gen Virol.* 1999 Jul;80 (Pt 7):1599-608.

Epanand RM, Epanand RF, Richardson CD, Yeagle PL. Structural requirements for the inhibition of membrane fusion by carbobenzoxy-D-Phe-Phe-Gly. *Biochim Biophys Acta.* 1993 Oct 10;1152(1):128-34.

Erlenhoefler C, Wurzer WJ, Loffler S, Schneider-Schaulies S, ter Meulen V, Schneider-Schaulies J. CD150 (SLAM) is a receptor for measles virus but is not involved in viral contact-mediated proliferation inhibition. *J Virol.* 2001 May;75(10):4499-505.

Erlenhöfer C, Duprex WP, Rima BK, ter Meulen V, and Schneider-Schaulies J. Analysis of receptor (CD46, CD150) usage by measles virus. *J Gen Virol* 2002 Jun; 83(6): 1431-6

Esolen LM, Park SW, Hardwick JM, Griffin DE. Apoptosis as a cause of death in measles virus-infected cells. *J Virol.* 1995 Jun;69(6):3955-8.

Esolen LM, Ward BJ, Moench TR, Griffin DE. Infection of monocytes during measles. *J Infect Dis.* 1993 Jul;168(1):47-52.

Fayen JD, Tykocinski ML. The expansion of human gammadelta T cells in response to Daudi cells requires the participation of CD4+ T cells. *Immunology.* 1999 Jun;97(2):272-9.

- Fikri Y, Pastoret PP, Nyabenda J. Costimulatory molecule requirement for bovine WC1+gammadelta T cells proliferative response to bacterial superantigens. *Scand J Immunol.* 2002 Apr;55(4):373-81.
- Fisch P, Meuer E, Pende D, Rothenfusser S, Viale O, Kock S, Ferrone S, Fradelizi D, Klein G, Moretta L, Rammensee HG, Boon T, Coulie P, van der Bruggen P. Control of B cell lymphoma recognition via natural killer inhibitory receptors implies a role for human Vgamma9/Vdelta2 T cells in tumor immunity. *Eur J Immunol.* 1997 Dec;27(12):3368-79.
- Flament C, Bellagha K, Rosenthal-Allieri A, Chouaib S, Mami-Chouaib F. CD48 may serve as an accessory molecule for the activation of a subset of human gamma/delta T cells. *Hum Immunol.* 1996 Apr;46(2):82-92.
- Flo TH, Halaas O, Torp S, Ryan L, Lien E, Dybdahl B, Sundan A, Espevik T. Differential expression of Toll-like receptor 2 in human cells. *J Leukoc Biol.* 2001 Mar;69(3):474-81.
- Forthal DN, Aarnaes S, Blanding J, de la Maza L, Tilles JG. Degree and length of viremia in adults with measles. *J Infect Dis.* 1992 Aug;166(2):421-4.
- Fugier-Vivier I, Servet-Delprat C, Rivaille P, Rissoan MC, Liu YJ, Rabourdin-Combe C. Measles virus suppresses cell-mediated immunity by interfering with the survival and functions of dendritic and T cells. *J Exp Med.* 1997 Sep 15;186(6):813-23.
- Fujinami RS, Sun X, Howell JM, Jenkin JC, Burns JB. Modulation of immune system function by measles virus infection: role of soluble factor and direct infection. *J Virol.* 1998 Dec;72(12):9421-7.
- Furukawa S, Matsubara T, Yone K, Hirano Y, Okumura K, Yabuta K. Kawasaki disease differs from anaphylactoid purpura and measles with regard to tumour necrosis factor-alpha and interleukin 6 in serum. *Eur J Pediatr.* 1992 Jan;151(1):44-7.
- Gans HA, Maldonado Y, Yasukawa LL, Beeler J, Audet S, Rinki MM, DeHovitz R, Arvin AM. IL-12, IFN-gamma, and T cell proliferation to measles in immunized infants. *J Immunol.* 1999 May 1;162(9):5569-75.
- Garcia VE, Jullien D, Song M, Uyemura K, Shuai K, Morita CT, Modlin RL. IL-15 enhances the response of human gamma delta T cells to nonpeptide [correction of nonpetide] microbial antigens. *J Immunol.* 1998 May 1;160(9):4322-9.

Gonzalez-Amaro R, Portales-Perez DP, Baranda L, Moncada B, Toro C, Lopez-Briones S, Espitia C, Mancilla R. Co-stimulatory signals increase the reactivity of gammadelta T cells towards mycobacterial antigens. *Clin Exp Immunol.* 2000 Jun;120(3):468-75.

Gough MJ, Melcher AA, Ahmed A, Crittenden MR, Riddle DS, Linardakis E, Ruchatz AN, Emiliusen LM, Vile RG. Macrophages orchestrate the immune response to tumor cell death. *Cancer Res.* 2001 Oct 1;61(19):7240-7.

Griffin D.E. und Bellini W.J. Measles Virus. In: Fields BN, Knipe PM, Howley PM, et al. (eds), *Fields Virology.* Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996; p. 1267-311

Griffin DE, Moench TR, Johnson RT, Lindo de Soriano I, Vaisberg A. Peripheral blood mononuclear cells during natural measles virus infection: cell surface phenotypes and evidence for activation. *Clin Immunol Immunopathol.* 1986 Aug;40(2):305-12.

Griffin DE, Ward BJ, Esolen LM. Pathogenesis of measles virus infection: an hypothesis for altered immune responses. *J Infect Dis.* 1994 Nov;170 Suppl 1:S24-31.

Griffin DE, Ward BJ, Jauregui E, Johnson RT, Vaisberg A. Immune activation during measles: interferon-gamma and neopterin in plasma and cerebrospinal fluid in complicated and uncomplicated disease. *J Infect Dis.* 1990 Mar;161(3):449-53.

Griffin DE, Ward BJ, Jauregui E, Johnson RT, Vaisberg A. Immune activation in measles. *N Engl J Med.* 1989 Jun 22;320(25):1667-72.

Griffin DE, Ward BJ, Jauregui E, Johnson RT, Vaisberg A. Immune activation during measles: interferon-gamma and neopterin in plasma and cerebrospinal fluid in complicated and uncomplicated disease. *J Infect Dis.* 1990 Mar;161(3):449-53.

Griffin DE, Ward BJ, Jauregui E, Johnson RT, Vaisberg A. Natural killer cell activity during measles. *Clin Exp Immunol.* 1990 Aug;81(2):218-24.

Griffin DE, Ward BJ, Juaregui E, Johnson RT, Vaisberg A. Immune activation during measles: beta 2-microglobulin in plasma and cerebrospinal fluid in complicated and uncomplicated disease. *J Infect Dis.* 1992 Nov;166(5):1170-3.

Griffin DE, Ward BJ. Differential CD4 T cell activation in measles. *J Infect Dis.* 1993 Aug;168(2):275-81.

Griffin DE. Immune responses during measles virus infection In: Billeter M:A: und ter Meulen V. (eds): *Measles virus.* Springer Verlag KG, Berlin, 1995; p.117-35

Groh V, Steinle A, Bauer S, Spies T. Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gamma/delta T cells. *Science*. 1998 Mar 13;279(5357):1737-40.

Grosjean I, Caux C, Bella C, Berger I, Wild F, Banchereau J, Kaiserlian D. Measles virus infects human dendritic cells and blocks their allostimulatory properties for CD4+ T cells. *J Exp Med*. 1997 Sep 15;186(6):801-12.

Guha M, Mackman N. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal*. 2001 Feb;13(2):85-94.

Guha M, O'Connell MA, Pawlinski R, Hollis A, McGovern P, Yan SF, Stern D, Mackman N. Lipopolysaccharide activation of the MEK-ERK1/2 pathway in human monocytic cells mediates tissue factor and tumor necrosis factor alpha expression by inducing Elk-1 phosphorylation and Egr-1 expression. *Blood*. 2001 Sep 1;98(5):1429-39.

Haas W, Pereira P, Tonegawa S. Gamma/delta cells. *Annu Rev Immunol*. 1993;11:637-85.

Haecker G, Wagner H. Proliferative and cytolytic responses of human gamma delta T cells display a distinct specificity pattern. *Immunology*. 1994 Apr;81(4):564-8.

Hajjar AM, O'Mahony DS, Ozinsky A, Underhill DM, Aderem A, Klebanoff SJ, Wilson CB. Cutting edge: functional interactions between toll-like receptor (TLR) 2 and TLR1 or TLR6 in response to phenol-soluble modulin. *J Immunol*. 2001 Jan 1;166(1):15-9.

Haregewoin A, Soman G, Hom RC, Finberg RW. Human gamma delta+ T cells respond to mycobacterial heat-shock protein. *Nature*. 1989 Jul 27;340(6231):309-12.

Hayday AC. [gamma][delta] cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:975-1026.

Haynes LM, Moore DD, Kurt-Jones EA, Finberg RW, Anderson LJ, Tripp RA. Involvement of toll-like receptor 4 in innate immunity to respiratory syncytial virus. *J Virol*. 2001 Nov;75(22):10730-7.

Helin E, Salmi AA, Vanharanta R, Vainionpaa R. Measles virus replication in cells of myelomonocytic lineage is dependent on cellular differentiation stage. *Virology*. 1999 Jan 5;253(1):35-42.

Hernandez-Caselles T, Rubio G, Campanero MR, del Pozo MA, Muro M, Sanchez-Madrid F, Aparicio P. ICAM-3, the third LFA-1 counterreceptor, is a co-stimulatory molecule for both resting and activated T lymphocytes. *Eur J Immunol*. 1993 Nov;23(11):2799-806.

- Hirschfeld M, Weis JJ, Toshchakov V, Salkowski CA, Cody MJ, Ward DC, Qureshi N, Michalek SM, Vogel SN. Signaling by toll-like receptor 2 and 4 agonists results in differential gene expression in murine macrophages. *Infect Immun.* 2001 Mar;69(3):1477-82.
- Holoshitz J, Vila LM, Keroack BJ, McKinley DR, Bayne NK. Dual antigenic recognition by cloned human gamma delta T cells. *J Clin Invest.* 1992 Jan;89(1):308-14.
- Hornig T, Barton GM, Medzhitov R. TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat Immunol.* 2001 Sep;2(9):835-41.
- Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S, Krug A, Jahrsdorfer B, Giese T, Endres S, Hartmann G. Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol.* 2002 May 1;168(9):4531-7.
- Hou S, Katz JM, Doherty PC, Carding SR. Extent of gamma delta T cell involvement in the pneumonia caused by Sendai virus. *Cell Immunol.* 1992 Aug;143(1):183-93.
- Howie D, Simarro M, Sayos J, Guirado M, Sancho J, Terhorst C. Molecular dissection of the signaling and costimulatory functions of CD150 (SLAM): CD150/SAP binding and CD150-mediated costimulation. *Blood.* 2002 Feb 1;99(3):957-65.
- Hsu EC, Iorio C, Sarangi F, Khine AA, Richardson CD. CDw150(SLAM) is a receptor for a lymphotropic strain of measles virus and may account for the immunosuppressive properties of this virus. *Virology.* 2001 Jan 5;279(1):9-21.
- Hsu EC, Sarangi F, Iorio C, Sidhu MS, Udem SA, Dillehay DL, Xu W, Rota PA, Bellini WJ, Richardson CD. 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.* 1998 Apr;72(4):2905-16.
- Huber SA, Moraska A, Choate M. T cells expressing the gamma delta T-cell receptor potentiate coxsackievirus B3-induced myocarditis. *J Virol.* 1992 Nov;66(11):6541-6.
- Hussey GD, Goddard EA, Hughes J, Ryon JJ, Kerran M, Carelse E, Strebel PM, Markowitz LE, Moodie J, Barron P, Latief Z, Sayed R, Beatty D, Griffin DE. The effect of Edmonston-Zagreb and Schwarz measles vaccines on immune response in infants. *J Infect Dis.* 1996 Jun;173(6):1320-6.

Ilonen J, Salonen R, Marusyk R, Salmi A. Measles virus strain-dependent variation in outcome of infection of human blood mononuclear cells. *J Gen Virol.* 1988 Jan;69 (Pt 1):247-52.

Irie T, Muta T, Takeshige K. TAK1 mediates an activation signal from toll-like receptor(s) to nuclear factor-kappaB in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *FEBS Lett.* 2000 Feb 11;467(2-3):160-4.

Ishii KJ, Suzuki K, Coban C, Takeshita F, Itoh Y, Matoba H, Kohn LD, Klinman DM. Genomic DNA released by dying cells induces the maturation of APCs. *J Immunol.* 2001 Sep 1;167(5):2602-7.

Janeway CA Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:197-216.

Janis EM, Kaufmann SH, Schwartz RH, Pardoll DM. Activation of gamma delta T cells in the primary immune response to Mycobacterium tuberculosis. *Science.* 1989 May 12;244(4905):713-6.

Johnson RM, Lancki DW, Sperling AI, Dick RF, Spear PG, Fitch FW, Bluestone JA. A murine CD4-, CD8- T cell receptor-gamma delta T lymphocyte clone specific for herpes simplex virus glycoprotein I. *J Immunol.* 1992 Feb 15;148(4):983-8.

Johnston IC, ter Meulen V, Schneider-Schaulies J, Schneider-Schaulies S. A recombinant measles vaccine virus expressing wild-type glycoproteins: consequences for viral spread and cell tropism. *J Virol.* 1999 Aug;73(8):6903-15.

Jones BW, Means TK, Heldwein KA, Keen MA, Hill PJ, Belisle JT, Fenton MJ. Different Toll-like receptor agonists induce distinct macrophage responses. *J Leukoc Biol.* 2001 Jun;69(6):1036-44.

Joshi SB, Dutch RE, Lamb RA. A core trimer of the paramyxovirus fusion protein: parallels to influenza virus hemagglutinin and HIV-1 gp41. *Virology.* 1998 Aug 15;248(1):20-34.

Kabelitz D, Glatzel A, Wesch D. Antigen recognition by human gammadelta T lymphocytes. *Int Arch Allergy Immunol.* 2000 May;122(1):1-7.

Kabelitz D, Wesch D, Hinz T. gamma delta T cells, their T cell receptor usage and role in human diseases. *Springer Semin Immunopathol.* 1999;21(1):55-75.

Kabelitz D. Effector functions and control of human gammadelta T-cell activation. *Microbes Infect.* 1999 Mar;1(3):255-61.

Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, Malefyt RW, Kastelein RA, Bazan F, Liu YJ. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med.* 2001 Sep 17;194(6):863-9.

Kaisho T, Akira S. Dendritic-cell function in Toll-like receptor- and MyD88-knockout mice. *Trends Immunol.* 2001 Feb;22(2):78-83.

Kaisho T, Takeuchi O, Kawai T, Hoshino K, Akira S. Endotoxin-induced maturation of MyD88-deficient dendritic cells. *J Immunol.* 2001 May 1;166(9):5688-94.

Karp CL, Wills-Karp M. Complement and IL-12: yin and yang. *Microbes Infect.* 2001 Feb;3(2):109-19.

Karp CL, Wysocka M, Wahl LM, Ahearn JM, Cuomo PJ, Sherry B, Trinchieri G, Griffin DE. Mechanism of suppression of cell-mediated immunity by measles virus. *Science.* 1996 Jul 12;273(5272):228-31.

Karp CL, Wysocka M, Wahl LM, Ahearn JM, Cuomo PJ, Sherry B, Trinchieri G, Griffin DE. Mechanism of suppression of cell-mediated immunity by measles virus. *Science.* 1996 Jul 12;273(5272):228-31.

Karp CL. Measles: immunosuppression, interleukin-12, and complement receptors. *Immunol Rev.* 1999 Apr;168:91-101.

Katz M. Clinical spectrum of measles. In: Billeter M:A: und ter Meulen V. (eds): *Measles virus.* Springer Verlag KG, Berlin, 1995; p.1-12

Kaufmann SH. gamma/delta and other unconventional T lymphocytes: what do they see and what do they do? *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Mar 19;93(6):2272-9.

Klagge IM, ter Meulen V, Schneider-Schaulies S. 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.* 2000 Oct;30(10):2741-50.

Klagge IM. Interaktion von Masernviren mit humanen Dendritischen Zellen. Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg. 2001

Kopp E, Medzhitov R, Carothers J, Xiao C, Douglas I, Janeway CA, Ghosh S. ECSIT is an evolutionarily conserved intermediate in the Toll/IL-1 signal transduction pathway. *Genes Dev.* 1999 Aug 15;13(16):2059-71.

Krantic S, Gimenez C, Rabourdin-Combe C. Cell-to-cell contact via measles virus haemagglutinin-CD46 interaction triggers CD46 downregulation. *J Gen Virol.* 1995 Nov;76 (Pt 11):2793-800.

Kretschmar E, Kunzmann V, Eckstein S, Schneider-Schaulies S, Wilhelm M. Polyinosinic-polycytidylic acid (poly(I:C) mediated activation and proliferation of human gamma delta T cells. Noch nicht publiziert

Kruse M, Meinl E, Henning G, Kuhnt C, Berchtold S, Berger T, Schuler G, Steinkasserer A. Signaling lymphocytic activation molecule is expressed on mature CD83+ dendritic cells and is up-regulated by IL-1 beta. *J Immunol.* 2001 Aug 15;167(4):1989-95.

Kurita-Taniguchi M, Fukui A, Hazeki K, Hirano A, Tsuji S, Matsumoto M, Watanabe M, Ueda S, Seya T. Functional modulation of human macrophages through CD46 (measles virus receptor): production of IL-12 p40 and nitric oxide in association with recruitment of protein-tyrosine phosphatase SHP-1 to CD46. *J Immunol.* 2000 Nov 1;165(9):5143-52.

Kurt-Jones EA, Popova L, Kwinn L, Haynes LM, Jones LP, Tripp RA, Walsh EE, Freeman MW, Golenbock DT, Anderson LJ, Finberg RW. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat Immunol.* 2000 Nov;1(5):398-401.

Lafarge X, Merville P, Cazin MC, Berge F, Potaux L, Moreau JF, Dechanet-Merville J. Cytomegalovirus infection in transplant recipients resolves when circulating gammadelta T lymphocytes expand, suggesting a protective antiviral role. *J Infect Dis.* 2001 Sep 1;184(5):533-41

Lafont V, Liautard J, Sable-Teychene M, Sainte-Marie Y, Favero J. Isopentenyl pyrophosphate, a mycobacterial non-peptidic antigen, triggers delayed and highly sustained signaling in human gamma delta T lymphocytes without inducing down-modulation of T cell antigen receptor. *J Biol Chem.* 2001 May 11;276(19):15961-7.

Lahn M, Kalataradi H, Mittelstadt P, Pflum E, Vollmer M, Cady C, Mukasa A, Vella AT, Ikle D, Harbeck R, O'Brien R, Born W. Early preferential stimulation of gamma delta T cells by TNF-alpha. *J Immunol.* 1998 Jun 1;160(11):5221-30.

Lang F, Peyrat MA, Constant P, Davodeau F, David-Ameline J, Poquet Y, Vie H, Fournie JJ, Bonneville M. Early activation of human V gamma 9V delta 2 T cell broad cytotoxicity and TNF production by nonpeptidic mycobacterial ligands. *J Immunol.* 1995 Jun 1;154(11):5986-94.

Langedijk JP, Daus FJ, van Oirschot JT. Sequence and structure alignment of Paramyxoviridae attachment proteins and discovery of enzymatic activity for a morbillivirus hemagglutinin. *J Virol.* 1997 Aug;71(8):6155-67.

Lecouturier V, Fayolle J, Caballero M, Carabana J, Celma ML, Fernandez-Munoz R, Wild TF, Buckland R. 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.* 1996 Jul;70(7):4200-4.

Leopardi R, Ilonen J, Mattila L, Salmi AA. Effect of measles virus infection on MHC class II expression and antigen presentation in human monocytes. *Cell Immunol.* 1993 Apr 1;147(2):388-96.

Leopardi R, Vainionpaa R, Hurme M, Siljander P, Salmi AA. Measles virus infection enhances IL-1 beta but reduces tumor necrosis factor-alpha expression in human monocytes. *J Immunol.* 1992 Oct 1;149(7):2397-401.

Li L, Cousart S, Hu J, McCall CE. Characterization of interleukin-1 receptor-associated kinase in normal and endotoxin-tolerant cells. *J Biol Chem.* 2000 Jul 28;275(30):23340-5.

Li M, Carpio DF, Zheng Y, Bruzzo P, Singh V, Ouaz F, Medzhitov RM, Beg AA. An essential role of the NF-kappa B/Toll-like receptor pathway in induction of inflammatory and tissue-repair gene expression by necrotic cells. *J Immunol.* 2001 Jun 15;166(12):7128-35.

Lien E, Ingalls RR. Toll-like receptors. *Crit Care Med.* 2002 Jan;30(1 Suppl):S1-11.

Liston P, Briedis DJ. Ribosomal frameshifting during translation of measles virus P protein mRNA is capable of directing synthesis of a unique protein. *J Virol.* 1995 Nov;69(11):6742-50.

Liu T, Tang Q, Hendricks RL. Inflammatory infiltration of the trigeminal ganglion after herpes simplex virus type 1 corneal infection. *J Virol.* 1996 Jan;70(1):264-71.

Liu Y, Wang Y, Yamakuchi M, Isowaki S, Nagata E, Kanmura Y, Kitajima I, Maruyama I. Upregulation of toll-like receptor 2 gene expression in macrophage response to peptidoglycan and high concentration of lipopolysaccharide is involved in NF-kappa b activation. *Infect Immun.* 2001 May;69(5):2788-96.

Lopez RD, Xu S, Guo B, Negrin RS, Waller EK. CD2-mediated IL-12-dependent signals render human gamma delta-T cells resistant to mitogen-induced apoptosis, permitting the large-scale ex vivo expansion of functionally distinct lymphocytes: implications for the development of adoptive immunotherapy strategies. *Blood.* 2000 Dec 1;96(12):3827-37.

Maccario R, Revello MG, Comoli P, Montagna D, Locatelli F, Gerna G. HLA-unrestricted killing of HSV-1-infected mononuclear cells. Involvement of either gamma/delta+ or alpha/beta+ human cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol.* 1993 Feb 15;150(4):1437-45.

Maisner A, Klenk H, Herrler G. Polarized budding of measles virus is not determined by viral surface glycoproteins. *J Virol.* 1998 Jun;72(6):5276-8.

Maloy KJ, Odermatt B, Hengartner H, Zinkernagel RM. Interferon gamma-producing gammadelta T cell-dependent antibody isotype switching in the absence of germinal center formation during virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Feb 3;95(3):1160-5.

Mami-Chouaib F, Miossec C, Del Porto P, Flament C, Triebel F, Hercend T. T cell target 1 (TCT.1): a novel target molecule for human non-major histocompatibility complex-restricted T lymphocytes. *J Exp Med.* 1990 Oct 1;172(4):1071-82.

Manchester M, Eto DS, Valsamakis A, Liton PB, Fernandez-Munoz R, Rota PA, Bellini WJ, Forthal DN, Oldstone MB. Clinical isolates of measles virus use CD46 as a cellular receptor. *J Virol.* 2000 May;74(9):3967-74.

Martin M, Katz J, Vogel SN, Michalek SM. Differential induction of endotoxin tolerance by lipopolysaccharides derived from *Porphyromonas gingivalis* and *Escherichia coli*. *J Immunol.* 2001 Nov 1;167(9):5278-85.

Marttila J, Hinkkanen A, Ziegler T, Vainionpaa R, Salmi A, Ilonen J. Cell membrane-associated measles virus components inhibit antigen processing. *Virology.* 2001 Jan 20;279(2):422-8.

Marx S, Wesch D, Kabelitz D. Activation of human gamma delta T cells by *Mycobacterium tuberculosis* and Daudi lymphoma cells: differential regulatory effect of IL-10 and IL-12. *J Immunol.* 1997 Mar 15;158(6):2842-8.

Mathiesen T, Hammarstrom L, Fridell E, Linde A, Wirsen G, Smith CI, Norrby E, Wahren B. Aberrant IgG subclass distribution to measles in healthy seropositive individuals, in patients with SSPE and in immunoglobulin-deficient patients. *Clin Exp Immunol.* 1990 May;80(2):202-5.

Matis LA, Cron R, Bluestone JA. Major histocompatibility complex-linked specificity of gamma delta receptor-bearing T lymphocytes. *Nature.* 1987 Nov 19-25;330(6145):262-4.

McChesney MB, Altman A, Oldstone MB. Suppression of T lymphocyte function by measles virus is due to cell cycle arrest in G1. *J Immunol.* 1988 Feb 15;140(4):1269-73.

McChesney MB, Fujinami RS, Lampert PW, Oldstone MB. Viruses disrupt functions of human lymphocytes. II. Measles virus suppresses antibody production by acting on B lymphocytes. *J Exp Med.* 1986 May 1;163(5):1331-6.

McChesney MB, Fujinami RS, Lerche NW, Marx PA, Oldstone MB. Virus-induced immunosuppression: infection of peripheral blood mononuclear cells and suppression of immunoglobulin synthesis during natural measles virus infection of rhesus monkeys. *J Infect Dis.* 1989 Apr;159(4):757-60.

McChesney MB, Kehrl JH, Valsamakis A, Fauci AS, Oldstone MB. Measles virus infection of B lymphocytes permits cellular activation but blocks progression through the cell cycle. *J Virol.* 1987 Nov;61(11):3441-7.

McChesney MB, Miller CJ, Rota PA, Zhu YD, Antipa L, Lerche NW, Ahmed R, Bellini WJ. Experimental measles. I. Pathogenesis in the normal and the immunized host. *Virology.* 1997 Jun 23;233(1):74-84.

McChesney MB, Oldstone MB. Viruses perturb lymphocyte functions: selected principles characterizing virus-induced immunosuppression. *Annu Rev Immunol.* 1987;5:279-304.

Means TK, Golenbock DT, Fenton MJ. Structure and function of Toll-like receptor proteins. *Life Sci.* 2000 Dec 8;68(3):241-58.

Means TK, Golenbock DT, Fenton MJ. The biology of Toll-like receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2000 Sep;11(3):219-32.

Medvedev AE, Henneke P, Schromm A, Lien E, Ingalls R, Fenton MJ, Golenbock DT, Vogel SN. 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.* 2001 Aug 15;167(4):2257-67.

Medvedev AE, Kopydlowski KM, Vogel SN. Inhibition of lipopolysaccharide-induced signal transduction in endotoxin-tolerized mouse macrophages: dysregulation of cytokine, chemokine, and toll-like receptor 2 and 4 gene expression. *J Immunol.* 2000 Jun 1;164(11):5564-74.

Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nature Rev Immunol.* 2001 Nov;1(2):135-45.

Minagawa H, Tanaka K, Ono N, Tatsuo H, Yanagi Y. Induction of the measles virus receptor SLAM (CD150) on monocytes. *J Gen Virol.* 2001 Dec;82(Pt 12):2913-7.

Miyagawa F, Tanaka Y, Yamashita S, Minato N. Essential requirement of antigen presentation by monocyte lineage cells for the activation of primary human gamma delta T cells by aminobisphosphonate antigen. *J Immunol.* 2001 May 1;166(9):5508-14.

Morita CT, Beckman EM, Bukowski JF, Tanaka Y, Band H, Bloom BR, Golan DE, Brenner MB. Direct presentation of nonpeptide prenyl pyrophosphate antigens to human gamma delta T cells. *Immunity.* 1995 Oct;3(4):495-507.

Morita CT, Parker CM, Brenner MB, Band H. TCR usage and functional capabilities of human gamma delta T cells at birth. *J Immunol.* 1994 Nov 1;153(9):3979-88.

Muzio M, Natoli G, Saccani S, Levrero M, Mantovani A. The human toll signaling pathway: divergence of nuclear factor kappaB and JNK/SAPK activation upstream of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6). *J Exp Med.* 1998 Jun 15;187(12):2097-101.

Naim HY, Ehler E, Billeter MA. Measles virus matrix protein specifies apical virus release and glycoprotein sorting in epithelial cells. *EMBO J.* 2000 Jul 17;19(14):3576-85.

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

Nanan R, Chittka B, Hadam M, Kreth HW. Measles virus infection causes transient depletion of activated T cells from peripheral circulation. *J Clin Virol.* 1999 May;12(3):201-10.

Naniche D, Reed SI, Oldstone MB. Cell cycle arrest during measles virus infection: a G0-like block leads to suppression of retinoblastoma protein expression. *J Virol.* 1999 Mar;73(3):1894-901.

Naniche D, Varior-Krishnan G, Cervoni F, Wild TF, Rossi B, Roubardin-Combe C, Gerlier D. Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus. *J Virol.* 1993 Oct;67(10):6025-32.

Naniche D, Yeh A, Eto D, Manchester M, Friedman RM, Oldstone MB. Evasion of host defenses by measles virus: wild-type measles virus infection interferes with induction of Alpha/Beta interferon production. *J Virol.* 2000 Aug;74(16):7478-84.

Nau GJ, Richmond JF, Schlesinger A, Jennings EG, Lander ES, Young RA. Human macrophage activation programs induced by bacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Feb 5;99(3):1503-8.

O'Brien RL, Born WK. Direct evidence for an immunological role of lymphocytes bearing T cell receptor gamma delta. *Year Immunol.* 1989-90;6:51-68.

O'Brien RL, Happ MP, Dallas A, Palmer E, Kubo R, Born WK. Stimulation of a major subset of lymphocytes expressing T cell receptor gamma delta by an antigen derived from *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell.* 1989 May 19;57(4):667-74.

Ogasawara T, Emoto M, Kiyotani K, Shimokata K, Yoshida T, Nagai Y, Yoshikai Y. Sendai virus pneumonia: evidence for the early recruitment of gamma delta T cells during the disease course. *J Virol.* 1994 Jun;68(6):4022-7.

Ohgimoto S, Ohgimoto K, Niewiesk S, Klagge IM, Pfeuffer J, Johnston IC, Schneider-Schaulies J, Weidmann A, ter Meulen V, Schneider-Schaulies S. The haemagglutinin protein is an important determinant of measles virus tropism for dendritic cells in vitro. *J Gen Virol.* 2001 Aug;82(Pt 8):1835-44.

Okada H, Kobune F, Sato TA, Kohama T, Takeuchi Y, Abe T, Takayama N, Tsuchiya T, Tashiro M. Extensive lymphopenia due to apoptosis of uninfected lymphocytes in acute measles patients. *Arch Virol.* 2000;145(5):905-20.

Okada H, Sato TA, Katayama A, Higuchi K, Shichijo K, Tsuchiya T, Takayama N, Takeuchi Y, Abe T, Okabe N, Tashiro M. Comparative analysis of host responses related to immunosuppression between measles patients and vaccine recipients with live attenuated measles vaccines. *Arch Virol.* 2001;146(5):859-74.

- Okragly AJ, Hanby-Flarida M, Mann D, Baldwin CL. Bovine gamma/delta T-cell proliferation is associated with self-derived molecules constitutively expressed in vivo on mononuclear phagocytes. *Immunology*. 1996 Jan;87(1):71-9.
- O'Neill LA, Dinarello CA. The IL-1 receptor/toll-like receptor superfamily: crucial receptors for inflammation and host defense. *Immunol Today*. 2000 May;21(5):206-9.
- Ono N, Tatsuo H, Hidaka Y, Aoki T, Minagawa H, Yanagi Y. Measles viruses on throat swabs from measles patients use signaling lymphocytic activation molecule (CDw150) but not CD46 as a cellular receptor. *J Virol*. 2001 May;75(9):4399-401.
- Ono N, Tatsuo H, Tanaka K, Minagawa H, Yanagi Y. V domain of human SLAM (CDw150) is essential for its function as a measles virus receptor. *J Virol*. 2001 Feb;75(4):1594-600.
- Pabst HF, Spady DW, Carson MM, Stelfox HT, Beeler JA, Krezolek MP. Kinetics of immunologic responses after primary MMR vaccination. *Vaccine*. 1997 Jan;15(1):10-4.
- Panum P. Observations made during the epidemic of Measles on the Faroe islands in the year 1846. *Med. Classics* 1938; 3:829-86
- Park AY, Scott P. IL-12: keeping cell-mediated immunity alive. *Scand J Immunol*. 2001 Jun;53(6):529-32.
- Parks CL, Lerch RA, Walpita P, Sidhu MS, Udem SA. Enhanced measles virus cDNA rescue and gene expression after heat shock. *J Virol*. 1999 May;73(5):3560-6.
- Pechhold K, Wesch D, Schondelmaier S, Kabelitz D. Primary activation of V gamma 9-expressing gamma delta T cells by Mycobacterium tuberculosis. Requirement for Th1-type CD4 T cell help and inhibition by IL-10. *J Immunol*. 1994 May 15;152(10):4984-92.
- Pedron T, Girard R, Chaby R. Variation of LPS-binding capacity, epitope expression, and shedding of membrane-bound CD14 during differentiation of human monocytes. *J Immunol*. 1995 Aug 1;155(3):1460-71.
- Poccia F, Battistini L, Cipriani B, Mancino G, Martini F, Gougeon ML, Colizzi V. Phosphoantigen-reactive Vgamma9Vdelta2 T lymphocytes suppress in vitro human immunodeficiency virus type 1 replication by cell-released antiviral factors including CC chemokines. *J Infect Dis*. 1999 Sep;180(3):858-61.

- Poccia F, Cipriani B, Vendetti S, Colizzi V, Poquet Y, Battistini L, Lopez-Botet M, Fournie JJ, Gougeon ML. CD94/NKG2 inhibitory receptor complex modulates both anti-viral and anti-tumoral responses of polyclonal phosphoantigen-reactive V gamma 9V delta 2 T lymphocytes. *J Immunol.* 1997 Dec 15;159(12):6009-17.
- Poccia F, Malkovsky M, Pollak A, Colizzi V, Sireci G, Salerno A, Dieli F. In vivo gammadelta T cell priming to mycobacterial antigens by primary Mycobacterium tuberculosis infection and exposure to nonpeptidic ligands. *Mol Med.* 1999 Jul;5(7):471-6.
- Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Huffel CV, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science.* 1998 Dec 11;282(5396):2085-8.
- Porcelli S, Brenner MB, Greenstein JL, Balk SP, Terhorst C, Bleicher PA. Recognition of cluster of differentiation 1 antigens by human CD4-CD8-cytolytic T lymphocytes. *Nature.* 1989 Oct 5;341(6241):447-50.
- Pulendran B, Kumar P, Cutler CW, Mohamadzadeh M, Van Dyke T, Banchereau J. Lipopolysaccharides from distinct pathogens induce different classes of immune responses in vivo. *J Immunol.* 2001 Nov 1;167(9):5067-76.
- Pulendran B, Palucka K, Banchereau J. Sensing pathogens and tuning immune responses. *Science.* 2001 Jul 13;293(5528):253-6.
- Punnonen J, Cocks BG, Carballido JM, Bennett B, Peterson D, Aversa G, de Vries JE. Soluble and membrane-bound forms of signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) induce proliferation and Ig synthesis by activated human B lymphocytes. *J Exp Med.* 1997 Mar 17;185(6):993-1004.
- Qureshi ST, Lariviere L, Leveque G, Clermont S, Moore KJ, Gros P, Malo D. Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4) *J Exp Med.* 1999 Feb 15;189(4):615-25.
- Radecke F, Billeter MA. The nonstructural C protein is not essential for multiplication of Edmonston B strain measles virus in cultured cells. *Virology.* 1996 Mar 1;217(1):418-21.
- Ramsdell F, Seaman MS, Clifford KN, Fanslow WC. CD40 ligand acts as a costimulatory signal for neonatal thymic gamma delta T cells. *J Immunol.* 1994 Mar 1;152(5):2190-7.

- Rassa JC, Meyers JL, Zhang Y, Kudaravalli R, Ross SR. Murine retroviruses activate B cells via interaction with toll-like receptor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Feb 19;99(4):2281-6.
- Rawadi G, Roman-Roman S. Mycoplasma membrane lipoproteins induced proinflammatory cytokines by a mechanism distinct from that of lipopolysaccharide. *Infect Immun.* 1996 Feb;64(2):637-43.
- Re F, Strominger JL. Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 differentially activate human dendritic cells. *J Biol Chem.* 2001 Oct 5;276(40):37692-9.
- Riley EC, Murphy G, Riley RL. Airborne spread of measles in a suburban elementary school. *Am J Epidemiol.* 1978 May;107(5):421-32.
- Rima BK, Earle JA, Baczek K, ter Meulen V, Liebert UG, Carstens C, Carabana J, Caballero M, Celma ML, Fernandez-Munoz R. Sequence divergence of measles virus haemagglutinin during natural evolution and adaptation to cell culture. *J Gen Virol.* 1997 Jan;78 (Pt 1):97-106.
- Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, Bazan JF. A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Jan 20;95(2):588-93.
- Ruckle, G und Rogers, KD. Studies with Measles virus. II. Isolation of virus and immunologic studies in persons who have had the natural disease. *J Immunol.* 1957;78:341-355.
- Rust C, Pena S, Kluin P, Koning F. Gamma delta T cells in coeliac disease. *Res Immunol.* 1990 Sep;141(7):668-71.
- Rust CJ, Verreck F, Vietor H, Koning F. Specific recognition of staphylococcal enterotoxin A by human T cells bearing receptors with the V gamma 9 region. *Nature.* 1990 Aug 9;346(6284):572-4.
- Salonen R, Ilonen J, Salmi A. Measles virus infection of unstimulated blood mononuclear cells in vitro: antigen expression and virus production preferentially in monocytes. *Clin Exp Immunol.* 1988 Feb;71(2):224-8.
- Samuel O, Shai Y. Participation of two fusion peptides in measles virus-induced membrane fusion: emerging similarity with other paramyxoviruses. *Biochemistry.* 2001 Feb 6;40(5):1340-9.

- Sanchez-Lanier M, Guerin P, McLaren LC, Bankhurst AD. Measles virus-induced suppression of lymphocyte proliferation. *Cell Immunol.* 1988 Oct 15;116(2):367-81.
- Sathiyaseelan T, Naiman B, Welte S, Machugh N, Black SJ, Baldwin CL. Immunological characterization of a gammadelta T-cell stimulatory ligand on autologous monocytes. *Immunology.* 2002 Feb;105(2):181-9.
- Sato S, Nomura F, Kawai T, Takeuchi O, Muhlradt PF, Takeda K, Akira S. Synergy and cross-tolerance between toll-like receptor (TLR) 2- and TLR4-mediated signaling pathways. *J Immunol.* 2000 Dec 15;165(12):7096-101.
- Schlender J, Schnorr JJ, Spielhoffer P, Cathomen T, Cattaneo R, Billeter MA, ter Meulen V, Schneider-Schaulies S. Interaction of measles virus glycoproteins with the surface of uninfected peripheral blood lymphocytes induces immunosuppression in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Nov 12;93(23):13194-9.
- Schneider H, Kaelin K, Billeter MA. Recombinant measles viruses defective for RNA editing and V protein synthesis are viable in cultured cells. *Virology.* 1997 Jan 20;227(2):314-22.
- Schneider-Schaulies J, Dunster LM, Kobune F, Rima B, ter Meulen V. Differential downregulation of CD46 by measles virus strains. *J Virol.* 1995 Nov;69(11):7257-9.
- Schneider-Schaulies J, Dunster LM, Schwartz-Albiez R, Krohne G, ter Meulen V. Physical association of moesin and CD46 as a receptor complex for measles virus. *J Virol.* 1995 Apr;69(4):2248-56.
- Schneider-Schaulies J, Schnorr JJ, Brinckmann U, Dunster LM, Baczko K, Liebert UG, Schneider-Schaulies S, ter Meulen V. Receptor usage and differential downregulation of CD46 by measles virus wild-type and vaccine strains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Apr 25;92(9):3943-7.
- Schneider-Schaulies J, Schnorr JJ, Schlender J, Dunster LM, Schneider-Schaulies S, ter Meulen V. Receptor (CD46) modulation and complement-mediated lysis of uninfected cells after contact with measles virus-infected cells. *J Virol.* 1996 Jan;70(1):255-63.
- Schneider-Schaulies S, Kreth HW, Hofmann G, Billeter M, Ter Meulen V. Expression of measles virus RNA in peripheral blood mononuclear cells of patients with measles, SSPE, and autoimmune diseases. *Virology.* 1991 Jun;182(2):703-11.

Schneider-Schaulies S, Niewiesk S, Schneider-Schaulies J, ter Meulen V. Measles virus induced immunosuppression: targets and effector mechanisms. *Curr Mol Med.* 2001 May;1(2):163-81.

Schneider-Schaulies S, ter Meulen V. Pathogenic aspects of measles virus infections. *Arch Virol Suppl.* 1999;15:139-58.

Schnorr JJ, Cutts FT, Wheeler JG, Akramuzzaman SM, Alam MS, Azim T, Schneider-Schaulies S, ter-Meulen V. Immune modulation after measles vaccination of 6-9 months old Bangladeshi infants. *Vaccine.* 2001 Jan 8;19(11-12):1503-10.

Schnorr JJ, Seufert M, Schlender J, Borst J, Johnston IC, ter Meulen V, Schneider-Schaulies S. Cell cycle arrest rather than apoptosis is associated with measles virus contact-mediated immunosuppression in vitro. *J Gen Virol.* 1997 Dec;78 (Pt 12):3217-26.

Schnorr JJ, Xanthakos S, Keikavoussi P, Kampgen E, ter Meulen V, Schneider-Schaulies S. Induction of maturation of human blood dendritic cell precursors by measles virus is associated with immunosuppression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 May 13;94(10):5326-31.

Schromm AB, Lien E, Henneke P, Chow JC, Yoshimura A, Heine H, Latz E, Monks BG, Schwartz DA, Miyake K, Golenbock DT. Molecular genetic analysis of an endotoxin nonresponder mutant cell line: a point mutation in a conserved region of MD-2 abolishes endotoxin-induced signaling. *J Exp Med.* 2001 Jul 2;194(1):79-88.

Sciammas R, Bluestone JA. TCRgammadelta cells and viruses. *Microbes Infect.* 1999 Mar;1(3):203-12.

Servet-Delprat C, Vidalain PO, Azocar O, Le Deist F, Fischer A, Roubardin-Combe C. Consequences of Fas-mediated human dendritic cell apoptosis induced by measles virus. *J Virol.* 2000 May;74(9):4387-93.

Servet-Delprat C, Vidalain PO, Bausinger H, Manie S, Le Deist F, Azocar O, Hanau D, Fischer A, Roubardin-Combe C. Measles virus induces abnormal differentiation of CD40 ligand-activated human dendritic cells. *J Immunol.* 2000 Feb 15;164(4):1753-60.

Sheshberadaran H, Norrby E. Three monoclonal antibodies against measles virus F protein cross-react with cellular stress proteins. *J Virol.* 1984 Dec;52(3):995-9.

Shimazu R, Akashi S, Ogata H, Nagai Y, Fukudome K, Miyake K, Kimoto M. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med.* 1999 Jun 7;189(11):1777-82.

Shiozawa S, Yoshikawa N, Iijima K, Negishi K. A sensitive radioimmunoassay for circulating alpha-interferon in the plasma of healthy children and patients with measles virus infection. *Clin Exp Immunol.* 1988 Sep;73(3):366-9.

Shuto T, Xu H, Wang B, Han J, Kai H, Gu XX, Murphy TF, Lim DJ, Li JD. Activation of NF-kappa B by nontypeable Hemophilus influenzae is mediated by toll-like receptor 2-TAK1-dependent NIK-IKK alpha /beta-I kappa B alpha and MKK3/6-p38 MAP kinase signaling pathways in epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Jul 17;98(15):8774-9.

Sidorenko SP, Clark EA. Characterization of a cell surface glycoprotein IPO-3, expressed on activated human B and T lymphocytes. *J Immunol.* 1993 Nov 1;151(9):4614-24.

Sireci G, Champagne E, Fournie JJ, Dieli F, Salerno A. Patterns of phosphoantigen stimulation of human Vgamma9/Vdelta2 T cell clones include Th0 cytokines. *Hum Immunol.* 1997 Dec;58(2):70-82.

Spada FM, Grant EP, Peters PJ, Sugita M, Melian A, Leslie DS, Lee HK, van Donselaar E, Hanson DA, Krensky AM, Majdic O, Porcelli SA, Morita CT, Brenner MB. Self-recognition of CD1 by gamma/delta T cells: implications for innate immunity. *J Exp Med.* 2000 Mar 20;191(6):937-48.

Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD. How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem.* 1998;67:227-64.

Steineur MP, Grosjean I, Bella C, Kaiserlian D. Langerhans cells are susceptible to measles virus infection and actively suppress T cell proliferation. *Eur J Dermatol.* 1998 Sep;8(6):413-20.

Sun X, Burns JB, Howell JM, Fujinami RS. Suppression of antigen-specific T cell proliferation by measles virus infection: role of a soluble factor in suppression. *Virology.* 1998 Jun 20;246(1):24-33.

Sun X, Burns JB, Howell JM, Fujinami RS. Suppression of antigen-specific T cell proliferation by measles virus infection: role of a soluble factor in suppression. *Virology.* 1998 Jun 20;246(1):24-33.

- Szczepanik M, Nowak B, Askenase PW, Ptak W. Cross-talk between gammadelta T lymphocytes and immune cells in humoral response. *Immunology*. 1998 Dec;95(4):612-7.
- Takamizawa M, Fagnoni F, Mehta-Damani A, Rivas A, Engleman EG. Cellular and molecular basis of human gamma delta T cell activation. Role of accessory molecules in alloactivation. *J Clin Invest*. 1995 Jan;95(1):296-303.
- Tamashiro VG, Perez HH, Griffin DE. Prospective study of the magnitude and duration of changes in tuberculin reactivity during uncomplicated and complicated measles. *Pediatr Infect Dis J*. 1987 May;6(5):451-4.
- Tanaka K, Minagawa H, Xie MF, Yanagi Y. The measles virus hemagglutinin downregulates the cellular receptor SLAM (CD150). *Arch Virol*. 2002;147(1):195-203.
- Tanaka Y, Brenner MB, Bloom BR, Morita CT. Recognition of nonpeptide antigens by T cells. *J Mol Med*. 1996 May;74(5):223-31.
- Tatsuo H, Okuma K, Tanaka K, Ono N, Minagawa H, Takade A, Matsuura Y, Yanagi Y. Virus entry is a major determinant of cell tropism of Edmonston and wild-type strains of measles virus as revealed by vesicular stomatitis virus pseudotypes bearing their envelope proteins. *J Virol*. 2000 May;74(9):4139-45.
- Tatsuo H, Ono N, Tanaka K, Yanagi Y. SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature*. 2000 Aug 24;406(6798):893-7.
- Tatsuo H, Ono N, Yanagi Y. Morbilliviruses use signaling lymphocyte activation molecules (CD150) as cellular receptors. *J Virol*. 2001 Jul;75(13):5842-50.
- Tatsuo H, Yanagi Y. The morbillivirus receptor SLAM (CD150). *Microbiol Immunol*. 2002;46(3):135-42.
- Thoma-Uszynski S, Kiertscher SM, Ochoa MT, Bouis DA, Norgard MV, Miyake K, Godowski PJ, Roth MD, Modlin RL. Activation of toll-like receptor 2 on human dendritic cells triggers induction of IL-12, but not IL-10. *J Immunol*. 2000 Oct 1;165(7):3804-10.
- Tilles JG, Balkwill F, Davilla J. 2',5'-Oligoadenylate synthetase and interferon in peripheral blood after rubella, measles, or mumps live virus vaccine. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1987 Oct;186(1):70-4.

Tober C, Seufert M, Schneider H, Billeter MA, Johnston IC, Niewiesk S, ter Meulen V, Schneider-Schaulies S. Expression of measles virus V protein is associated with pathogenicity and control of viral RNA synthesis. *J Virol.* 1998 Oct;72(10):8124-32.

Tober C, Seufert M, Schneider H, Billeter MA, Johnston IC, Niewiesk S, ter Meulen V, Schneider-Schaulies S. Expression of measles virus V protein is associated with pathogenicity and control of viral RNA synthesis. *J Virol.* 1998 Oct;72(10):8124-32.,

Tsukaguchi K, Balaji KN, Boom WH. CD4+ alpha beta T cell and gamma delta T cell responses to Mycobacterium tuberculosis. Similarities and differences in Ag recognition, cytotoxic effector function, and cytokine production. *J Immunol.* 1995 Feb 15;154(4):1786-96.

Vabulas RM, Ahmad-Nejad P, da Costa C, Miethke T, Kirschning CJ, Hacker H, Wagner H. Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells. *J Biol Chem.* 2001 Aug 17;276(33):31332-9.

van Binnendijk RS, Poelen MC, Kuijpers KC, Osterhaus AD, Uytdehaag FG. The predominance of CD8+ T cells after infection with measles virus suggests a role for CD8+ class I MHC-restricted cytotoxic T lymphocytes (CTL) in recovery from measles. Clonal analyses of human CD8+ class I MHC-restricted CTL. *J Immunol.* 1990 Mar 15;144(6):2394-9.

Vidalain PO, Azocar O, Lamouille B, Astier A, Roubourdin-Combe C, Servet-Delprat C. Measles virus induces functional TRAIL production by human dendritic cells. *J Virol.* 2000 Jan;74(1):556-9.

Vincent MS, Roessner K, Lynch D, Wilson D, Cooper SM, Tschopp J, Sigal LH, Budd RC. Apoptosis of Fashigh CD4+ synovial T cells by borrelia-reactive Fas-ligand(high) gamma delta T cells in Lyme arthritis. *J Exp Med.* 1996 Dec 1;184(6):2109-17.

Vincent MS, Roessner K, Sellati T, Huston CD, Sigal LH, Behar SM, Radolf JD, Budd RC. Lyme arthritis synovial gamma delta T cells respond to Borrelia burgdorferi lipoproteins and lipidated hexapeptides. *J Immunol.* 1998 Nov 15;161(10):5762-71.

Visintin A, Mazzoni A, Spitzer JH, Wyllie DH, Dower SK, Segal DM. Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells. *J Immunol.* 2001 Jan 1;166(1):249-55.

von Pirquet C. Das Verhalten der kutanen Tuberkulinreaktion während der Masern. Dtsch Med Wochenschr. 1908;30:1297-300

Wang P, Malkovsky M. Different roles of the CD2 and LFA-1 T-cell co-receptors for regulating cytotoxic, proliferative, and cytokine responses of human V gamma 9/V delta 2 T cells. Mol Med. 2000 Mar;6(3):196-207.

Ward BJ, Johnson RT, Vaisberg A, Jauregui E, Griffin DE. Cytokine production in vitro and the lymphoproliferative defect of natural measles virus infection. Clin Immunol Immunopathol. 1991 Nov;61(2 Pt 1):236-48.

Ward BJ, Johnson RT, Vaisberg A, Jauregui E, Griffin DE. Spontaneous proliferation of peripheral mononuclear cells in natural measles virus infection: identification of dividing cells and correlation with mitogen responsiveness. Clin Immunol Immunopathol. 1990 May;55(2):315-26.

Weidmann A, Fischer C, Ohgimoto S, Ruth C, ter Meulen V, Schneider-Schaulies S. Measles virus-induced immunosuppression in vitro is independent of complex glycosylation of viral glycoproteins and of hemifusion. J Virol. 2000 Aug;74(16):7548-53.

Weidmann A, Maisner A, Garten W, Seufert M, ter Meulen V, Schneider-Schaulies S. Proteolytic cleavage of the fusion protein but not membrane fusion is required for measles virus-induced immunosuppression in vitro. J Virol. 2000 Feb;74(4):1985-93.

Welsh RM, Lin MY, Lohman BL, Varga SM, Zarozinski CC, Selin LK. Alpha beta and gamma delta T-cell networks and their roles in natural resistance to viral infections. Immunol Rev. 1997 Oct;159:79-93.

Wesch D, Marx S, Kabelitz D. Comparative analysis of alpha beta and gamma delta T cell activation by Mycobacterium tuberculosis and isopentenyl pyrophosphate. Eur J Immunol. 1997 Apr;27(4):952-6.

Wesselborg S, Janssen O, Pechhold K, Kabelitz D. Selective activation of gamma/delta + T cell clones by single anti-CD2 antibodies. J Exp Med. 1991 Feb 1;173(2):297-304.

Wittmann M, Larsson VA, Schmidt P, Begemann G, Kapp A, Werfel T. Suppression of interleukin-12 production by human monocytes after preincubation with lipopolysaccharide. Blood. 1999 Sep 1;94(5):1717-26.

Wyllie DH, Kiss-Toth E, Visintin A, Smith SC, Boussouf S, Segal DM, Duff GW, Dower SK. Evidence for an accessory protein function for Toll-like receptor 1 in anti-bacterial responses. *J Immunol.* 2000 Dec 15;165(12):7125-32.

Yanagi Y, Cubitt BA, Oldstone MB. Measles virus inhibits mitogen-induced T cell proliferation but does not directly perturb the T cell activation process inside the cell. *Virology.* 1992 Mar;187(1):280-9.

Yang S, Sugawara S, Monodane T, Nishijima M, Adachi Y, Akashi S, Miyake K, Hase S, Takada H. *Micrococcus luteus* teichuronic acids activate human and murine monocytic cells in a CD14- and toll-like receptor 4-dependent manner. *Infect Immun.* 2001 Apr;69(4):2025-30.

Zaffran Y, Destaing O, Roux A, Ory S, Nheu T, Jurdic P, Rabourdin-Combe C, Astier AL. CD46/CD3 costimulation induces morphological changes of human T cells and activation of Vav, Rac, and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase. *J Immunol.* 2001 Dec 15;167(12):6780-5.

Zhang G, Ghosh S. Negative regulation of toll-like receptor-mediated signaling by Tollip. *J Biol Chem.* 2002 Mar 1;277(9):7059-65.

9 Abkürzungen

Ak	Antikörper
APC	antigenpräsentierende Zelle
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD	<i>cluster of differentiation</i>
Ci	Curie
CPE	zytopathischer Effekt
cpm	<i>counts per minute</i>
d	Tag/e
DC	Dendritische Zellen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds RNA	doppelsträngige Ribonukleinsäure
ED	Edmonston- MV-Vakzinestamm
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
Env	Hüllprotein (<i>envelope</i>)
F Protein	Fusionsprotein
FACS	<i>fluorescence activated cell scan</i>
FCS	Fötales Kälberserum
FIP	fusionsinhibitorisches Peptid: Z-D-Phe-L-Phe-Gly-OH
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
GM-CSF	<i>granulocyte/macrophage-colony stimulating factor</i>
H Protein	Hämagglutininprotein

h	Stunde
H	Wasserstoff
HSP	Hitzeshockproteine
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IPP	Isopentenyl-Pyrophosphat
L Protein	große Untereinheit der Polymerase
l	Liter
log	logarithmisch
LPS	Lipopolysaccharid
M Protein	Matrixprotein
m	milli-/Meter
M	Molar
m.o.i.	<i>multiplicity of infection</i>
MACS	magnetische Zellsortierung
mAK	monoklonaler Antikörper
MALP	Mykobakterien-assoziiertes Lipopeptid
mfi	mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
μ	mikro
min	Minute
MLR	<i>Mixed Leukocyte Reaction</i>
MMR	Mumps/Masern/Röteln
MMTV	<i>mouse mammary tumor virus</i>
MoDC	<i>monocyte-derived dendritic cells</i>
mRNA	<i>messenger-RNA</i>

MV	Masernvirus
N Protein	Nukleokapsidprotein
NFκB	Nukleärer Faktor κB
NK Zelle	natürliche Killerzelle
NTE	Natriumchlorid/Tris/EDTA
P Protein	Phosphoprotein
p	Fehlerwahrscheinlichkeit
p.i.	<i>post infectionem</i>
pAk	polyklonaler Antikörper
Pam ₃ CSK ₄	Pam ₃ CysSer(Lys) ₄
PAMP	pathogen-assoziierte molekulare Muster (<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>)
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PC	<i>presenter cell</i>
PE	Phycoerythrin
pED	persistierend ED-infiziert
PFA	Paraformaldehyd
PHA	Phytohämagglutinin
PI3K	Phosphatidylinositol-3 Kinase
pWTF	persistierend WTF-infiziert
R	Rezeptor
Ra	Rezeptor-Antagonist
RC	<i>responder cell</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RPA	<i>RNase Protection Assay</i>

RSV	respiratorisches Syncytialvirus
RT	Raumtemperatur
SAC	Staphylococcus aureus- <i>Cowan strain</i>
Sek	Sekunde
TCID ₅₀	<i>tissue culture infectious dose 50</i>
TCR	T Zellrezeptor
Th	T Helferzelle
TLR	Toll-ähnlicher Rezeptor
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TUBag	Tuberkulose-Antigen
U	<i>units</i>
UV	Ultraviolett-Licht
Wt	Wildtyp
WTF	Wildtyp Fleckenstein (MV-Wildtypstamm)
ZNS	zentrales Nervensystem

10 Lebenslauf

Karen Bieback

Geboren am 13.03.1972 in Bremen

Schulausbildung:

1978 - 1982	Grundschule in Bremen, Carl Schurtz Schule
1982 - 1991	Gymnasium in Bremen, Kippenberg Gymnasium, Abitur 1991

Studium:

10/1991-5/98	Studium der Biologie an der Universität Bremen
19.05. 1994	Diplomvorprüfung
17.12.1997	Diplomprüfung

Die Diplomarbeit im Fachbereich Biologie/Chemie der Universität Bremen wurde von Frau Prof. Dr. A. Vallbracht betreut:

Untersuchungen zur Aufnahme des Hepatitis A Virus im Komplex mit HAV-spezifischen IgA Antikörpern von nichtpermissiven NCTC Zellen, die einen IgA-Rezeptor exprimieren

Berufstätigkeit:

4/1998 -6/99 wissenschaftlicher Mitarbeiter im Institut für Medizinische Mikrobiologie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Seit 7/99 Promotionsstudium am Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg bei Prof. Dr. S. Schneider-Schaulies:

Die Rolle definierter Subpopulationen humaner peripherer Blutzellen für die Masernvirus-induzierte Immunsuppression und Immunaktivierung

Würzburg, den 03. Juni 2002

11 Veröffentlichungen

11.1 Publikationen

Sibylle Schneider-Schaulies, **Karen Bieback**, Elita Avota, Ingo Klagge, Volker terMeulen: Regulation of gene expression in lymphocytes and antigen-presenting cells by measles virus: consequences for immunomodulation. *Journal of Molecular Medicine*, 2002, 80: Seite 73-85

Karen Bieback, Egil Lien, Ingo M. Klagge, Elita Avota, J. Schneider-Schaulies, W. Paul Duprex, Herrmann Wagner, Carsten J. Kirschning, Volker ter Meulen und Sibylle Schneider-Schaulies: The hemagglutinin protein of wildtype measles activates Toll-like receptor 2 signaling. *Journal of Virology*, accepted

11.2 Vorträge

Elita Avota, **Karen Bieback**, Oliver Engelking, Volker ter Meulen, Sibylle Schneider-Schaulies: Mechanisms of measles-virus induced immunosuppression: effector structures and targets. Meeting: Cell Cycle in Immunology and Pathology, 19.-21. 07. 2000, University of Warwick, Großbritannien

Ingo M. Klagge, **Karen Bieback**, Volker ter Meulen, Sibylle Schneider-Schaulies: Infektion von Dendritischen Zellen mit Masernvirus- Einfluß von MV-Wildtyp- und Vakzinestämmen auf Ausreifung und Funktion von DC in vitro. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, 14.-17.03. 2001 in Dresden

Karen Bieback, Egil Lien, Ingo M. Klagge, Elita Avota, J. Schneider-Schaulies, W. Paul Duprex, Herrmann Wagner, Carsten J. Kirschning, Volker ter Meulen und Sibylle Schneider-Schaulies: The hemagglutinin protein of wildtype measles activates Toll-like receptor 2 signaling. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, 08.-11.04. 2002 in Erlangen

K. Bieback, E. Lien, I.M. Klagge, E. Avota, J. Schneider-Schaulies, W.P. Duprex, H. Wagner, C. J. Kirschning, V. ter Meulen, S. Schneider-Schaulies: The hemagglutinin protein of wildtype measles activates Toll-like receptor 2 signaling. XIIth International Congress of Virology, 27.07-01.08. 2002 in Paris

J. Schneider-Schaulies, Christian Erlenhöfer, **K. Bieback**, S. Schneider-Schaulies, W.P. Duprex, B.K. Rima, V. ter Meulen: Measles virus: Receptor (CD46, CD150) usage and modulation. XIIth International Congress of Virology, 27.07-01.08. 2002 in Paris

11.3 Posterpräsentationen

Karen Bieback, Volker ter Meulen, Sibylle Schneider-Schaulies: Können $\gamma\delta$ T-Zellen mit der Masernvirus induzierten Immunsuppression interferieren? Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, 14.-17. 03. 2001 in Dresden