

**Hitzeschockproteine als Indikatoren
der Wundheilung
und
Koordination von Reifung und
Antigenpräsentation bei
Dendritischen Zellen der Maus**

der Fakultät für Biologie
an der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Naturwissenschaften

Sylvia Herter

aus Stuttgart

vorgelegte

Dissertation

2005

Tag der mündlichen Prüfung: 13. Dezember 2005

Dekan: Prof. Dr. F. Schöffl

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H.G. Rammensee

2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Schild

Inhaltsverzeichnis:

1. Einleitung	1
1.1. Das Immunsystem	1
1.2. Die Antigenprozessierung	3
1.3. Die Antigenerkennung durch T-Lymphozyten	6
1.4. Aktivierung naiver T-Lymphozyten	7
1.5. Die Aktivierung und Reifung von Dendritischen Zellen	8
1.6. Wundheilung	13
1.7. Bakterielle und virale Pathogene	15
1.8. Das Influenzavirus	18
1.9. Das Zytomegalievirus	19
1.10. Listerien	22
1.11. Zielsetzung	24
2. Material und Methoden	26
2.1. Materialien	26
2.1.1. Mäuse	26
2.1.2. Primärzellen und Zelllinien	26
2.1.3. Viren und Bakterien	27
2.1.4. Zellkulturmedien und Zusätze	27
Grundmedien	
Medienzusätze	
Fertige Zellkulturmedien	
2.1.5. Wundflüssigkeiten	28
2.1.6. Primäre Antikörper	28
2.1.7. Sekundäre Antikörper	29
2.1.8. ELISA-Standards und ELISA-Kits	29
2.1.9. Standard-Chemikalien	30
2.1.10. Inhibitoren	30
2.1.11. Weitere Materialien	30

2.1.12. Puffer	31
2.1.13. Geräte und Hilfsmittel	32
2.1.14. Plastik- und Glaswaren	32
2.2. Methoden	33
<hr/>	
2.2.1. Zellkultur	33
2.2.1.1. Kultur von Zelllinien	33
2.2.1.2. Bestimmung von Lebendzellzahlen	33
2.2.1.3. Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	34
2.2.1.4. Präparation und Aktivierung von BMDCs	34
2.2.1.5. Herstellung und Aktivierung von humanen DCs	36
2.2.1.6. Isolation humaner Granulozyten	37
2.2.1.7. Restimulation von T-Zellen	38
2.2.1.8. T-Zell-Assays	39
2.2.1.9. Infektion mit humanem Influenza-Virus PR/8/34	41
2.2.1.10. Infektion mit murinem Zytomegalievirus	41
2.2.1.11. Infektion mit Listerien	42
2.2.2. Aufarbeitung von humanen Wundflüssigkeiten und Blutseren	43
2.2.3. Konzentrationsbestimmung von Proteinen	43
2.2.4. Biotinylierung von Proteinen	43
2.2.5. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	44
2.2.6. FACS-Färbung	44
2.2.7. Fluoreszenzmikroskopie	45
2.2.8. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	47
2.2.9. Western Blot	47
2.2.10. Detektion von Gp96 in humanen Wundflüssigkeiten	48
2.2.11. Immunpräzipitation	49
3. Ergebnisse	51
<hr/>	
3.1. Hitzeschockproteine in humanen Wundflüssigkeiten (WF)	51
3.1.1. Entwicklung eines Nachweisverfahrens für Hsp70	51
3.1.2. Entwicklung eines Nachweisverfahrens für Gp96	54

3.1.3. Detektion von Hsp70 und Gp96 in humanen Wundflüssigkeiten	56
3.1.4. Wirkung von Hsp70 und WF auf humane Granulozyten	58
3.1.5. Wirkung von WF auf humane Dendritische Zellen	60
3.1.6. Zytokinprofile von humanen WF	61
<u>3.2. DC-Reifung, Antigenpräsentation und DALIS-Bildung</u>	<u>63</u>
<u>3.2.1. DC-Reifung, DALIS-Bildung, und Antigenpräsentation nach Influenza Infektion</u>	<u>63</u>
3.2.1.1. PR/8/34 Infektion von BMDCs und EL-4 Zellen	63
3.2.1.2. PR/8/34 Infektion von BMDCs induziert die Zellreifung	64
3.2.1.3. Die PR/8/34-induzierte DC-Reifung ist unabhängig von TLR2 und TLR4	65
3.2.1.4. PR/8/34-infizierte BMDCs bilden DALIS	68
3.2.1.5. DALIS enthalten Influenza Nukleoprotein	72
3.2.1.6. Verzögerte Antigenpräsentation bei BMDCs nach PR/8/34 Infektion	73
3.2.1.7. Influenza Nukleoprotein-Expressionskinetik	77
3.2.1.8. DALIS-Bildung und Reifung verlaufen synchron bei BMDCs	79
<u>3.2.2. DALIS-Bildung und Antigenpräsentation nach Infektion mit L. monocytogenes</u>	<u>80</u>
3.2.2.1. Infektion von BMDCs mit Listeria monocytogenes	80
3.2.2.2. Sensitivitätstest des H-2 K ^b /SIINFEKL spezifischen Antikörpers	81
3.2.2.3. Kinetik der Präsentation des SIINFEKL-Epitops	82
<u>3.2.3. DC-Reifung, DALIS-Bildung, und Antigenpräsentation nach mCMV Infektion</u>	<u>83</u>
3.2.3.1. Zytomegalievirus Infektion von BMDCs und MEFs	83
3.2.3.2. Kinetik der Antigenpräsentation nach Infektion mit Δm152 im C57BL/6 und BALB/c System	86
3.2.3.3. Einfluss der Immunevasionsgene auf die DC-Reifung und DALIS-Bildung	89
3.2.3.4. Einfluss der Immunevasionsgene auf die Antigenpräsentation	94
3.2.3.5. Aktivierung von CR103 ⁻ BMDCs nach mCMV Infektion	96

<u>3.2.4. Mechanismen der DALIS-Bildung</u>	<u>104</u>
3.2.4.1. Verschiedene TLR-Liganden induzieren die DC-Reifung und DALIS-Bildung	104
3.2.4.2. DC-Reifung und DALIS-Bildung sind unabhängig von MyD88	106
3.2.4.3. Wirkung verschiedener TLR-Signalkaskaden Inhibitoren auf die Reifung und DALIS-Bildung von BMDCs	108
3.2.4.4. Antigenpräsentation bei BMDCs nach Inhibition verschiedener Komponenten der TLR-Signalkaskaden	
3.2.4.5. Einfluss von Inhibitorkombinationen auf DC-Reifung und DALIS-Bildung	116
<u>4. Diskussion</u>	<u>126</u>
<u>4.1. Hitzeschockproteine in humanen Wundflüssigkeiten (WF)</u>	<u>126</u>
4.1.1. Detektion von Hsps in humanen WF und Seren	126
4.1.2. Einfluss von WF und Seren auf humane Granulozyten	128
4.1.3. Einfluss von WF und Seren auf humane Dendritische Zellen	128
4.1.4. Zytokinprofile humaner WF	131
<u>4.2. DC-Reifung, Antigenpräsentation und DALIS-Bildung</u>	<u>132</u>
4.2.1. DC-Reifung, DALIS-Bildung und Antigenpräsentation nach Influenza Infektion	132
4.2.2. DALIS-Bildung und Antigenpräsentation nach Infektion mit L. monocytogenes	135
4.2.3. DC-Reifung, DALIS-Bildung und Antigenpräsentation nach mCMV Infektion	136
4.2.4. Mechanismen der DALIS-Bildung	138
<u>5. Zusammenfassung</u>	<u>142</u>
<u>6. Referenzen</u>	<u>144</u>
<u>7. Quellenverzeichnis</u>	<u>154</u>
<u>8. Publikationsverzeichnis</u>	<u>155</u>
<u>9. Verzeichnis akademischer Lehrer</u>	<u>155</u>
<u>10. Danksagung</u>	<u>156</u>
<u>11. Lebenslauf</u>	<u>157</u>

Abkürzungen

Abb	Abbildung
ABTS	2,2'-Azino-bis-(3-ethybenzthiazoline-6-sulfonic acid)
AK	Antikörper
APCs	Antigen presenting cells
BAC	Bacterial artificial chromosome
BMDCs	Bone marrow derived dendritic cells
BSA	Bovine Serum Albumin
CD	Cluster of Differentiation
CMV	Cytomegalovirus
CTLA-4	CTL activation associated protein 4
CTLs	Cytotoxic T Lymphocytes
DALIS	Dendritic cell aggresome-like induced structures
DCs	Dendritic cells
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid
dsRNA	doppelsträngige RNA
EGF	Epidermal growth factor
eIF4E	eukaryotic translation initiation factor 4E
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FACS	Fluorescent Activated Cell Sorting
FCS	Fetal Calf Serum
FGF	Fibroblast growth factor
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
GM-CSF	Granulocyte/Makrophage colony stimulating factor
h	hour/Stunde
HA	Hämagglutinin
HAU	Haemagglutinating units
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HLA	Human Leucocyte Antigens
HRP	Horseradish Peroxidase
Hsp	Hitzeschockprotein
HSV	Herpes Simplex Virus
huDCs	human monocyte-derived dendritic cells
IGF	Insulin-like growth factor
IL	Interleukin
JNK	c-Jun NH ₂ -terminal Kinase
kDA	Kilodalton
LBP	LPS Binding Protein
LPS	Lipopolysaccharide
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
mCMV	murine Cytomegalovirus
MEF	mouse embryonic fibroblast
MHC	Major Histocompatibility Complex
MK	MAPK-activated protein kinases
ml	Milliliter
MMP	Matrix Metalloproteinasen
MNK	MAPK-interacting kinases

MSK	Mitogen- and stress-activated kinases
MTOC	Microtubule organizing center
mTOR	mammalian target of rapamycin
MyD88	Myeloid differentiation factor 88
NA	Neuraminidase
NP	Nukleoprotein
OD	Optische Dichte
ORF	Open Reading Frame
Ova	Ovalbumin
Pam ₃ Cys	(S)-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2RS)-propyl]-N-palmitoyl-(R)-cysteine
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PBS	Phosphate-buffered saline
PDGF	Platelet-derived growth factor
PFU	Plaque-Forming Units
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase (phosphoinositide 3-Kinase)
PMN	Polymorphonuclear Neutrophils
POD	Promyelocytic leukemia oncogenic domain
poly(I:C)	Polyinosine-polycytidylic acid
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfate
ssRNA	einzelsträngige RNA
TAP	Transporter associated with antigen processing
TCR	T-cell receptor
TGF	Transforming growth factor
TF	Transkriptionsfaktor
TIR	Toll/IL-1 receptor
TIRAP	TIR domain containing adaptor protein
TLF	Translationsfaktor
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
TNF- α	Tumor necrosis factor α
TRAF	TNF receptor activated factor
TRIF	TIR domain-containing adaptor inducing IFN- β
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WF	Wundflüssigkeit

1. Einleitung

1.1. Das Immunsystem

Unter dem Begriff Immunsystem werden Organe, Zellen und Moleküle zusammengefasst, die in einem komplexen Zusammenspiel der Abwehr von körperfremden Substanzen und Krankheitserregern wie Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten dienen. Eine Voraussetzung dafür ist, dass das Immunsystem zwischen körpereigenen und körperfremden Strukturen unterscheiden kann, so dass im Normalfall keine Reaktion gegen Bestandteile des eigenen, gesunden Organismus erfolgt. Dies bezeichnet man als immunologische Toleranz. Trotzdem kann das Immunsystem auch gegen körpereigene Zellen vorgehen, z.B. wenn diese krankhaft verändert sind.

Haut und Schleimhäute stellen die erste Barriere gegen das Eindringen von Pathogenen dar. Diese rein mechanischen Barrieren werden durch chemische und mikrobielle Abwehrschranken ergänzt (Tabelle 1.1). Zu ersteren gehören z.B. Schweiß, Verdauungssäfte und Schleim sowie darin enthaltene, antimikrobiell wirksame Substanzen, zu letzteren zählt man die körpereigene Flora, die mit den Pathogenen um Nährstoffe und Anheftungsstellen kompetitiert.

Mechanismus	Organ	Abwehrmechanismus
Physikalische Abwehr	Haut	Fettschicht, verhornt
	Atemwege	Transport durch Flimmerhärchen, Husten, Niesen, schleimige Sekrete
	Auge	Spülung, Wischeffekt durch das Lid
	Darm	Schleimhäute, Abgang von Bakterien mit dem Stuhl
	Urogenitalsystem	Spülung durch Harn
Chemische Abwehr	Haut	pH3-5; Milchsäure im Schweiß und Fettsäuren im Talg
	Magen	pH 1-2
	Scheide	pH 4-4,5
	Tränenflüssigkeit	Lysozym
	Nasensekret	Lysozym und Proteasen
	Speichel	Lysozym
Biologische Abwehr	Haut	insgesamt ca. 10^{14} nicht-pathogene Bakterien
	Darm, Vagina	
	Mund und Rachen	

Tabelle 1.1: Abwehrmechanismen

Das im Laufe der Evolution entwickelte Abwehrsystem von Wirbeltieren kann in zwei Hauptsysteme unterteilt werden, die man als angeborene und erworbene (adaptive), Immunität bezeichnet (Tabelle 1.2).

Das phylogenetisch ältere, angeborene Immunsystem zeichnet sich dadurch aus, dass seine Komponenten schon vor dem ersten Kontakt mit einem Pathogen vorhanden und voll einsatzfähig sind. Die Fähigkeit, einzelne Erreger voneinander zu unterscheiden ist jedoch nicht stark ausgeprägt, auch ein wiederholter Kontakt mit den gleichen Pathogenen führt nicht zu einer effizienteren Antwort. Das angeborene Immunsystem bildet die erste Abwehrlinie gegen eine Vielzahl von Pathogenen und hält diese bis zu dem Eingreifen des adaptiven Immunsystems in Schach. Ferner spielt es eine wichtige Rolle bei der Aktivierung und Steuerung der adaptiven Immunantwort.

Das adaptive Immunsystem zeichnet sich im Gegensatz zu dem angeborenen Immunsystem durch Spezifität, Diversität, Gedächtnis, Selbstbeschränkung sowie Selbst-Fremd-Erkennung aus. Die Zellen der adaptiven Immunantwort, die Lymphozyten, besitzen jeweils nur eine Art von spezifischem Rezeptor auf ihrer Oberfläche, wobei sich die einzelnen Lymphozyten in ihren Spezifitäten unterscheiden. Die Erkennung eines Antigens durch den entsprechenden

Rezeptor führt zu einer selektiven klonalen Expansion des Rezeptortyps. In der Regel durchlaufen die so entstandenen Lymphozyten nach dem Verschwinden des entsprechenden Antigens den programmierten Zelltod (Apoptose), dennoch kann durch den Erhalt des Rezeptortyps für einen gewissen Zeitraum ein immunologisches Gedächtnis entstehen.

	Angeborenes Immunsystem	Adaptives Immunsystem
Zelluläre Bestandteile	Monozyten Makrophagen Granulozyten Mastzellen NK-Zellen Dendritische Zellen	T-Zellen B-Zellen APCs
Humorale Bestandteile	Komplementsystem Interferone Lysozym	Antikörper Zytokine

Tabelle 1.2: Bestandteile des angeborenen und adaptiven Immunsystems

1.2. Die Antigenprozessierung

Die adaptive Immunantwort ist in ihrer Funktion von membranständigen Glykoproteinen abhängig, deren Aufgabe es ist, Peptide von zytosolischen und extrazellulären Proteinen zu binden und an den Zelloberflächen zu präsentieren. Diese Glykoproteine bezeichnet man generell als Major Histocompatibility Complex (MHC)-Moleküle. Beim Menschen werden sie auch als *Human Leucocyte Antigens* (HLA), bei der Maus als H-2 bezeichnet. Die entsprechenden Genloci findet man im humanen Genom auf Chromosom 6, in der Maus auf Chromosom 17.

Die MHC-Moleküle lassen sich nach Struktur und Funktion in zwei Klassen aufteilen, die als MHC-Klasse I und MHC-Klasse II bezeichnet werden.

MHC-Klasse I-Moleküle findet man auf jeder kernhaltigen Zelle des Körpers. Sie bestehen aus einer ca. 45 kDa großen schweren α -Kette sowie einer ca. 12 kDa großen leichten Kette, dem β_2 -Mikroglobulin. Diese ist mit der α -Kette nicht-kovalent assoziiert und vollständig extrazellulär gelegen. Über ein hydrophobes Transmembransegment ist die α -Kette in der

Zellmembran verankert, zusätzlich besitzt sie drei extrazelluläre Domänen (α_1 , α_2 , α_3), die jeweils ca. 90 Aminosäuren umfassen (Abb. 1.3. links)

Die α_1 - und α_2 -Domänen bilden zusammen eine Ebene aus acht antiparallelen β -Faltblattsträngen, die zusammen mit zwei langen α -helikalen Regionen die Peptidbindungstasche an der Oberseite des Moleküls bilden. Diese Bindungstasche kann Peptide mit einer Größe von 8 bis 12 Aminosäuren aufnehmen.

Antigene, die von MHC-Klasse I-Molekülen präsentiert werden, werden von $CD8^+$ zytotoxischen T-Zellen erkannt.

MHC-Klasse II-Moleküle werden im Gegensatz zu MHC-Klasse I-Molekülen nur von Zellen des Thymusstroma und den so genannten Antigenpräsentierenden Zellen (APCs) exprimiert. Sie bestehen aus zwei nahezu gleichschweren, nichtkovalent verknüpften Ketten, der α -Kette (34 kDa) und der β -Kette (29 kDa), die jeweils eine Transmembranregion, einen kurzen zytoplasmatischen Abschnitt und zwei extrazelluläre Domänen enthalten (Abb. 1.3. rechts).

Der Peptid-bindende Spalt, der Peptide mit einer Größe von 12-25 Aminosäuren aufnehmen kann, wird durch die α_1 - und β_1 -Domänen gebildet.

$CD4^+$ T-Zellen erkennen die MHC-Klasse II-gebundenen Antigene.

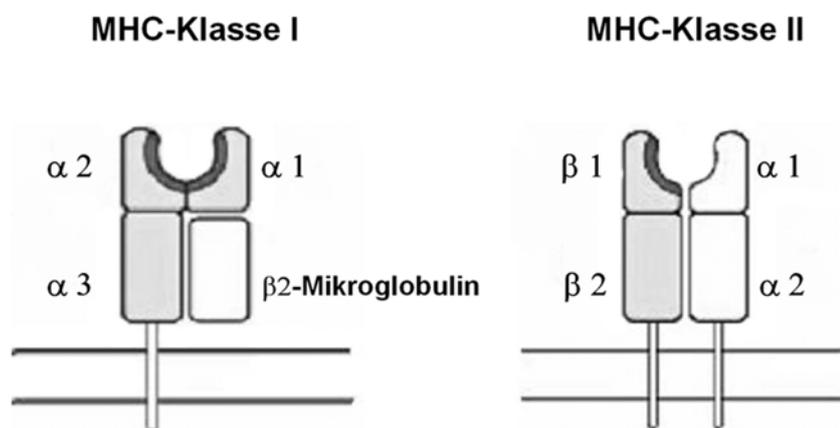


Abb. 1.3.: Schematischer Aufbau von MHC-Molekülen

Die Beladung der MHC-Klasse I- und II-Moleküle erfolgt auf unterschiedlichen Wegen, die sich durch die unterschiedliche Herkunft der Peptidliganden ergeben.

Während MHC-Klasse I-Moleküle hauptsächlich Peptide zytosolischen Ursprungs präsentieren, sind die MHC-Klasse II-gebundenen Peptide entweder intrazellulären Ursprungs

oder stammen von aufgenommenen und endosomal-lysosomal prozessierten, extrazellulären Proteinen.

Im Zytosol jeder Zelle werden kontinuierlich nicht mehr benötigte oder falsch gefaltete Proteine (*Defective Ribosomal Products*, DRiPS) zur Degradation durch das Proteasom und Aminopeptidasen freigegeben. Nach Polyubiquitinylierung der Proteine durch das Ubiquitinsystem werden diese durch das Proteasom in Fragmente von 4 bis 25 Aminosäuren zerlegt, die dann größtenteils durch Aminopeptidasen bis hin zu einzelnen Aminosäuren abgebaut werden. Ein Teil der proteasomal generierten Proteine wird in einem ATP-abhängigen Prozess über das Transporterprotein TAP (*Transporter Associated with Antigen Processing*) in das Endoplasmatische Retikulum (ER) transportiert, in dem die Beladung der dort synthetisierten MHC-Klasse I-Moleküle stattfindet. Hierfür werden die Chaperone Calnexin und Calretikulin benötigt, ferner sind die ER-residenten Proteine ERp57 und Tapasin beteiligt. Die fertigen MHC-Klasse I-Peptid-Komplexe werden schließlich durch den Golgi-Apparat, wo die Glykosylierung stattfindet, an die Zelloberfläche transportiert.

Die von MHC-Klasse II präsentierte Peptide stammen wie bereits erwähnt hauptsächlich von extrazellulären Antigenen. Die exogenen Proteine werden dabei in intrazelluläre Vesikel des endosomal-lysosomalen Abbauweges aufgenommen und von den dortigen Proteasen zerlegt.

Die MHC-Klasse II-Moleküle werden genau wie alle anderen Glykoproteine im ER synthetisiert. Die Beladung der Moleküle im ER wird jedoch durch ein Protein verhindert, das als MHC II-assoziierte invariante Kette (*Invariant Chain*; Ii) bezeichnet wird und den Peptidbindungsspalt besetzt. Der Klasse II-Ii-Komplex wird über das trans-Golgi-Netzwerk in den endosomal-lysosomalen Weg eingeschleust, wo in speziellen MHC-II-Kompartimenten die Abspaltung der Ii und die Beladung mit endosomal abgebauten Peptid erfolgen. Von dort aus gelangen die fertigen MHC-II-Peptid-Komplexe an die Zelloberfläche.

Da die Antigenprozessierung und nachfolgende Antigenpräsentation bei infizierten Zellen in der Regel zu einer Immunantwort und der Zerstörung der betroffenen Zellen führt, besteht ein hoher selektiver Druck, der Pathogene begünstigt, die störend in die Antigenprozessierung eingreifen können oder ihre Strukturgene in einer Art und Weise mutieren, dass sie der Präsentation durch MHC-Moleküle entgehen.

Letzterem stehen zwei Mechanismen entgegen. Zum einen ist der MHC polygen, d.h., es stehen mehrere MHC-Klasse I und II Gene zur Verfügung, die Proteine mit unterschiedlichen Proteinbindungsspezifitäten kodieren, zum anderen ist er hochpolymorph, d.h., jedes Gen besitzt multiple Allele.

1.3. Antigenerkennung durch T-Lymphozyten

Die Erkennung von körpereigenen MHC-Molekülen erfolgt über T-Zellrezeptoren (TCR) auf der Oberfläche von T-Lymphozyten, wobei jede T-Zelle einen Rezeptortyp bestimmter Spezifität besitzt.

T-Zellrezeptoren sind Heterodimere aus zwei verschiedenen Polypeptidketten, die man als α - und β -Kette bezeichnet. Eine Ausnahme bildet eine kleine Population von T-Zellen, die TCRs aus γ - und δ -Ketten exprimieren.

Jede Kette des TCR besitzt zwei Domänen, von denen die aminoternale eine hohe Sequenzvariabilität besitzt, die durch somatische Rekombination von V-D-J- und C-Elementen während der T-Zellreifung generiert werden. Durch genetische Umlagerungen kann ein geschätztes Repertoire von bis zu 10^{16} TCR unterschiedlicher Spezifitäten entstehen. Da keine der Ketten des TCR eine zytoplasmatische Domäne besitzt, ist für die Signalübertragung in das Zellinnere ein weiterer Proteinkomplex erforderlich, den man als CD3-Komplex bezeichnet (Abb. 1.4.).

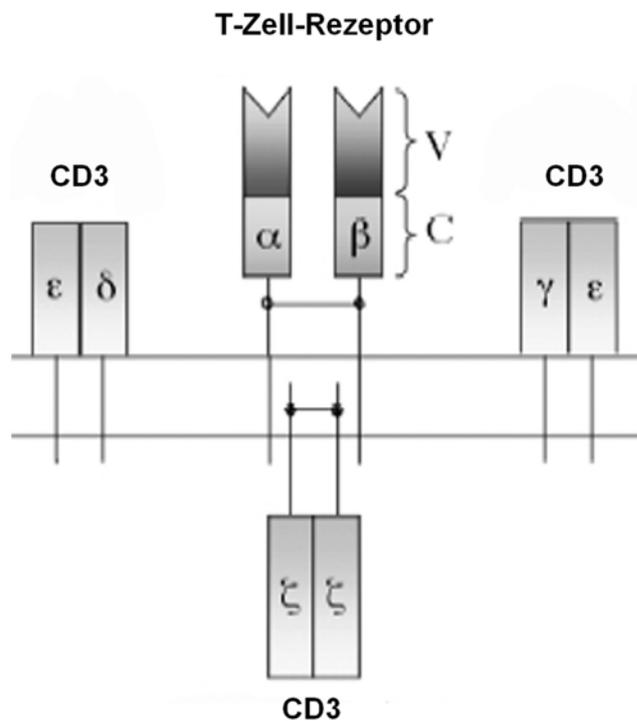


Abb. 1.4.: T-Zell-Rezeptor und CD3-Komplex

Zudem kooperieren die Korezeptormoleküle CD4 und CD8 bei der Antigenerkennung mit dem T-Zellrezeptor. Dabei binden CD4-Moleküle an unveränderliche Teile des MHC-II-Moleküls und CD8 an unveränderliche Teile des MHC-I-Moleküls und erhöhen die Empfindlichkeit der Antigenerkennung ca. um das 100fache.

Um ihre Funktionalität zu gewährleisten und Autoimmunreaktionen zu unterbinden, durchlaufen alle T-Zellen während ihrer Reifungsphase im Thymus zwei Selektionsprozesse. Die positive Selektion erlaubt nur T-Zellen weiter zu reifen, deren TCR Peptide auf Selbst-MHC-Molekülen erkennen. Die negative Selektion führt zur Apoptose von potentiell autoreaktiven T-Zellen, die Peptide erkennen, die von gesunden, körpereigenen Zellen präsentiert werden.

1.4. Aktivierung naiver T-Zellen

Die Erkennung eines Selbst-MHC-Antigen-Komplexes durch eine naive T-Zelle alleine reicht nicht aus, um die T-Zelle zu aktivieren. Für diesen als Priming bezeichneten Vorgang wird gleichzeitig ein kostimulatorisches Signal von einer professionellen antigenpräsentierenden Zelle (APC) benötigt. Dabei interagiert das Oberflächenmolekül CD28 auf der T-Zelle mit den kostimulatorischen Molekülen CD80 und CD86 auf der Oberfläche von APCs ¹. Antigenerkennung ohne kostimulatorisches Signal kann die T-Zellproliferation inhibieren und zu Anergie führen.

Nach erfolgreicher Stimulation mit beiden Signalen beginnt die Proliferation und Differenzierung der naiven T-Zellen, die mit der Produktion und Sekretion des Zytokins IL-2 sowie der Expression von hochaffinen IL-2-Rezeptoren einhergeht ^{2,3}. Eine Verstärkung des Proliferationssignals durch die Stabilisation der IL-2 mRNA erfolgt durch die Ligation von CD40L mit CD40 auf der Zelloberfläche von APCs.

Mit der Differenzierung der naiven T-Zellen zu Effektor-T-Zellen ändert sich auch das Expressionsmuster der Oberflächenmoleküle. Die Zellen exprimieren nun CTLA-4 (CTL activation associated protein 4), das eine ca. 20-fach höhere Affinität zu CD80 und CD86 aufweist als CD28. Gleichzeitig wird jedoch durch die Bindung von CTLA-4 an die kostimulatorischen Moleküle kein aktivierendes Signal in die T-Zelle weitergeleitet und somit die Aktivierung begrenzt. Zusätzlich zeigen aktivierte Effektor-T-Zellen Zelladhäsionsmoleküle wie z.B. CD2, CD11a, CD44 und CD49d auf ihrer Oberfläche.

Anhand der Effektorfunktion unterscheidet man im wesentlichen drei Subtypen von T-Zellen: CD8⁺ zytotoxische T-Zellen (CTL), die durch die Freisetzung porenbildender Substanzen

(Perforin)⁴ oder die Expression von Fas-Ligand, der auf Zielzellen bindet und eine Apoptose induziert⁵, entartete oder virusinfizierte Zielzellen abtöten und CD4⁺ T-Helferzellen, die man in zwei Untergruppen unterteilt (T_H1- und T_H2-Zellen). T_H1-Zellen bezeichnet man auch als inflammatorische T-Zellen, deren Hauptaufgabe in der Aktivierung von Makrophagen und CTL liegt. T_H2-Zellen, die eigentlichen „T-Helferzellen“ aktivieren B-Zellen und zytotoxische T-Zellen u. a. durch Sekretion der dafür notwendigen Zytokine (IL-4, IL-5, IL-6). Zusätzlich existieren CD4⁺CD25⁺ T-Zellen, die in der Lage sind, die Aktivierung und Proliferation von T-Zellen zu inhibieren. Diese Suppressorzellen bezeichnet man daher auch als regulatorische T-Zellen. Ihre Hauptfunktion liegt vermutlich in der Erhaltung der Selbst-Toleranz des Immunsystems.

1.5. Die Aktivierung und Reifung von Dendritischen Zellen

Dendritische Zellen (DCs) gehören zu den professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APCs) und sind essentiell für die Induktion der adaptiven Immunantwort durch die Aktivierung von T-Zellen.

Sie wurden erstmals 1973 von Steinman und Cohn in der Milz von Mäusen beschrieben⁶ und nach ihrem charakteristischen verzweigten Aussehen benannt (*dendros* = Baum). Diese zytoplasmatischen Zellfortsätze gewähren den Dendritischen Zellen eine effiziente Antigenaufnahme und Interaktion mit den T-Lymphozyten (Abb. 1.5.).

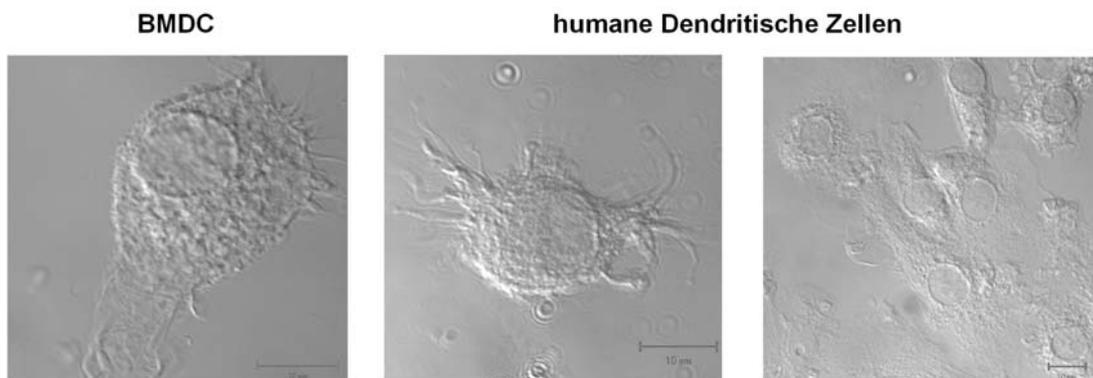


Abb. 1.5. Dendritische Zellen

BMDCs (bone marrow-derived dendritic cells) wurden aus dem Knochenmark von Mäusen differenziert. Bei den abgebildeten humanen Dendritischen Zellen handelt es sich um DCs, die aus Vorläuferzellen im Blut generiert wurden.

Deutlich sind die runden Zellkerne im Zellinneren und die zytoplasmatischen Fortsätze zu erkennen.

Maßstab: 10 µm.

Mittlerweile sind verschiedene Subpopulationen bekannt, im humanen System unterscheidet man myeloide und plasmazytoide Dendritische Zellen und die Langerhanszellen.

DCs entwickeln sich im Knochenmark aus CD34⁺ pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen und gelangen über die Blutbahn in fast alle lymphatischen und nicht-lymphatischen Gewebe. Diese DCs bezeichnet man als unreife (immature) DCs.

Unreife DCs sind spezialisiert auf Endozytose und Prozessierung von Antigenen, allerdings fehlen ihnen die für das T-Zell-Priming notwendigen kostimulatorischen Oberflächenmoleküle. Die Aufnahme von Antigen bei gleichzeitiger Aktivierung der DC führt zu ihrer Reifung und Migration in lymphatische Gewebe, wo es zu einer Aktivierung der dortigen T-Lymphozyten kommt⁷.

Mit der Reifung der DCs gehen einige grundlegende Veränderungen einher⁸. Die Zellen beginnen mit einer Reorganisation ihres Aktin-Zytoskeletts und entwickeln lange, als Dendriten bezeichnete, Ausläufer. Diese Dendriten, die im Durchschnitt eine Länge von 7 µm aufweisen, erhöhen die Reichweite der Zelle und somit die Wahrscheinlichkeit, Kontakt mit einer T-Zelle herzustellen^{9,10}.

Ferner kommt es zu einer Hochregulation von MHC-Molekülen, der kostimulatorischen Oberflächenmoleküle B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86) sowie von Rezeptoren für konstitutive Chemokine, z.B. CXCR4 und CCR7¹¹. Mit Hilfe dieser Rezeptoren wandern die reifenden DCs zu den T-Zell-Bereichen der Lymphknoten, wo die Konzentration der CCR7-Liganden (SLC, ELC) am höchsten ist¹². Zudem produzieren und sekretieren DCs während ihrer Reifung verschiedene konstitutive und inflammatorische Chemokine, mit denen weitere DCs angelockt werden können sowie Zytokine mit unterschiedlichen Kinetiken. Einige Zytokine wie z.B. TNF-α und IL-6 werden bereits 3 bis 4 Stunden nach Stimulation synthetisiert, während IL-12 erst nach etwa 10 Stunden sezerniert wird¹³.

Während des Reifungsprozess kommt es bei Dendritischen Zellen zu einem Phänomen, das man als DALIS-Bildung bezeichnet (DALIS = Dendritic Cell Aggresome-Like Induced Structures)¹⁴. Es handelt sich hierbei um eine transiente Anhäufung von neu synthetisierten, mono- und polyubiquitinylierten Proteinen im Zytosol der DCs. Die ersten DALIS treten ca. 4 Stunden nach Aktivierung der Zellen auf und erreichen ihre maximale Größe von bis zu 5 µm nach 8 bis 12 Stunden, danach werden sie zunehmend kleiner bis sie nach 24 bis 36 Stunden vollständig verschwunden sind. Der Abbau erfolgt über das Proteasom¹⁴.

Exogene, endozytierte Proteine werden nicht in DALIS aufgenommen, vielmehr ist die Formierung der DALIS von kontinuierlicher Proteinsynthese in den Zellen abhängig. Es ist also naheliegend, dass neu synthetisierte Proteine in DALIS eingelagert werden. Bei diesen

Proteinen handelt es sich hauptsächlich um nicht-funktionelle Proteine, die so genannten DRiPs, die 30 % bis 80 % aller neu synthetisierten Proteine ausmachen¹⁵⁻¹⁷. In der Regel werden DRiPs sofort ubiquitinyliert und durch das Proteasom abgebaut¹⁸, so beträgt ihre Halbwertszeit z.B. in Fibroblasten nur 10 Minuten. Durch ihre Integration in DALIS werden DRiPs vor dem proteasomalen Abbau geschützt, ihre Halbwertszeit verlängert sich in DCs auf ca. 4 Stunden¹⁹.

Die genaue Zusammensetzung von DALIS ist bislang unbekannt, jedoch konnten Enzyme des Ubiquitinsystems nachgewiesen werden. Die Anwesenheit des Ubiquitin-aktivierendem Enzyms E1, des Ubiquitin-konjugierenden Enzym E2 sowie des Substraterkennungsproteins E3 in DALIS weist darauf hin, dass dort Ubiquitinylierungen stattfinden¹⁹.

Im Gegensatz zu unreifen DCs haben mature DCs ihre Fähigkeit zur Antigenaufnahme und -prozessierung weitestgehend verloren, können dafür aber naive T-Lymphozyten äußerst effizient aktivieren²⁰. Um nicht selbst von den aktivierten zytotoxischen T-Zellen abgetötet zu werden, schützen sich DCs z.B. durch die Hochregulation des Serin-Protease-Inhibitors SPI-6 vor der CTL-induzierten Apoptose²¹.

Eine erhöhte Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Oberfläche reifer DCs ermöglicht ihnen die Clusterbildung mit den T-Lymphozyten und erleichtert die Interaktion der beiden Zelltypen.

Die Aktivierung von Dendritischen Zellen kann durch eine Vielzahl unterschiedlicher Stimuli erfolgen. So sind z.B. CD4⁺ T-Zellen in der Lage, die Reifung durch die Interaktion von CD40/CD40L zu induzieren, weitere Reifungsstimuli sind Zytokine und Antigene. Eine wichtige Gruppe bilden hierbei die Liganden der Toll-like Rezeptoren (TLR).

Bei den Säugetieren sind inzwischen 11 verschiedene Typen von TLRs bekannt, die von verschiedenen Zellen des Immunsystems exprimiert werden. Diese Rezeptoren erkennen konservierte molekulare Strukturen von Pathogenen, die so genannten „pathogen-associated molecular patterns“ (PAMPs), zu denen z.B. Lipopolysaccharide (LPS), doppelsträngige RNA, CpG-DNA, Flagellin und Zymosan gehören (Tabelle 1.6.). Des Weiteren gehören kleine synthetische Moleküle und wahrscheinlich Hitzeschockproteine zu den Liganden²²⁻²⁴.

Rezeptor	TLR-Liganden
TLR1	agiert mit TLR2 zusammen
TLR2	Peptidoglykan, Lipopeptide, Lipoarabinomannan, Zymosan
TLR3	dsRNA, poly(I:C)
TLR4	Lipopolysaccharide gramnegativer Bakterien, Hitzeschockproteine (?)
TLR5	Flagellin
TLR6	agiert mit TLR2 zusammen
TLR7	ssRNA, Imidazoquinoline und Loxoribin als synthetische Liganden
TLR8	ssRNA, Imidazoquinoline als synthetische Liganden
TLR9	unmethylierte CpG DNA
TLR10	unbekannt
TLR11	uropathogene Bakterien, Profilin (<i>Toxoplasma gondii</i>)

Tabelle 1.6.: TLRs und ihre Liganden

TLRs sind hochkonservierte Proteine, deren extra- und intrazellulären Domänen Leucin-reiche Wiederholungssequenzen beinhalten, die sowohl an der Erkennung des Liganden als auch an der Signaltransduktion in das Zellinnere beteiligt sind.

Bei der Stimulation von TLRs kommt es zu einer Rekrutierung von Adaptermolekülen, die über ihre Toll-IL-1-Rezeptor-Domäne (TIR-Domäne) an die TIR-Domäne der TLRs binden. Bislang sind vier dieser Adaptermoleküle bekannt: MyD88²⁵⁻²⁷, TIRAP, TRIF²⁸ und TRAM, die teilweise an den selben TLRs interagieren.

Zwar weisen die verschiedenen TLRs alternative Signaltransduktionswege auf, letztlich führen sie aber alle über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren zu einer Expression proinflammatorischer Zytokine und kostimulatorischer Moleküle.

Wichtige Transkriptionsfaktoren sind NF- κ B, AP-1 und IRF3. Die beiden ersten induzieren sowohl proinflammatorische Zytokine wie IL-1, IL-12, IL-6 und TNF- α wie auch die kostimulatorischen Proteine CD80 und CD86, GM-CSF und MIP-1 β ²⁹. IRF3 führt zu der Expression von IFN- α und - β , MCP-5 und IP-10.

IL-1 triggert als Kofaktor die IL-2 Produktion während der T-Zell-Aktivierung. IL-12 steigert u. a. die Proliferation mononukleärer Zellen während IL-6 sowohl für die T-Zellaktivierung

wie auch die B-Zell-Differenzierung eine wichtige Rolle spielt. TNF- α unterstützt die Proliferation von T-Zellen, die Phagozytose und die Zytotoxizität von neutrophilen Granulozyten. CD80 und CD86 sind, wie bereits erwähnt, essentielle Kostimulatoren für die T-Zell-Aktivierung. Bei GM-CSF handelt es sich um einen wichtigen Makrophagen-Differenzierungsfaktor, bei MIP-1 β um ein entzündungsförderndes Chemokin. Typ I Interferone aktivieren ihrerseits Transkriptionsfaktoren (STAT 1 + 2), welche die Transkription weiterer IFN-induzierter Gene regulieren^{30,31}.

Somit führt die Aktivierung einer oder mehrere TLR zu einer Immunantwort, an der sowohl das angeborene wie das adaptive Immunsystem beteiligt sind.

Toll-like Rezeptoren sind nicht nur in der Lage, konservierte Strukturen von Pathogenen zu erkennen, zu ihren Liganden gehören vermutlich auch Mitglieder der Familie der Hitzeschockproteine (Hsps).

Hitzeschockproteine sind hochkonservierte Moleküle, die zu den Chaperonen zählen. Ihre Hauptaufgabe besteht darin, die korrekte Proteinfaltung zu unterstützen und missgefaltete Proteine dem proteolytischen Abbau zuzuführen^{32,33}. Zusätzlich können Hsps immunologische Funktionen ausüben, in dem sie eine adaptive Immunantwort gegen gebundene Peptide initiieren^{34,35}. In diesem Zusammenhang könnten Hsps auch an dem Phänomen der „Cross-Präsentation“ und des „Cross-Primings“ von T-Zellen beteiligt sein³⁶⁻³⁸. Die Rezeptor-vermittelte Aufnahme von Hsps mit gebundenen Peptiden von z.B. lysierten virusinfizierten Zellen oder Tumorzellen durch APCs führt zu der Einschleusung der Peptide in den endogenen MHC-Klasse I-Prozessierungsweg und zu ihrer Präsentation auf der Zelloberfläche³⁹⁻⁴¹. Kommt es gleichzeitig mit der Aufnahme der Hsp-Peptid-Komplexe zu einer Aktivierung der APCs und somit zu der Expression von Zytokinen und kostimulatorischen Molekülen, führt eine Wechselwirkung mit naiven T-Zellen zum Cross-Priming.

Die Aktivierung von BMDCs durch Hsps konnte mittlerweile für verschiedene Mitglieder der Familie nachgewiesen werden, z.B. Gp96, Hsp70, Hsp90 und Hsp60⁴²⁻⁴⁴.

Obwohl die Rezeptor-vermittelte Aufnahme der Hsp-Peptid-Komplexe in erster Linie über CD91^{45,46}, CD36 und LOX-1^{47,48} erfolgt, scheint die Aktivierung der DCs von der Expression von TLR4 und in geringerem Maße TLR2 abzuhängen⁴⁹⁻⁵¹. Dabei hat sich inzwischen herausgestellt, dass die Aktivierung wahrscheinlich durch an Hsps gebundene TLR-Liganden wie LPS und Pam₃Cys erfolgt (Warger et al.; Manuskript eingereicht).

Die Anreicherung von Endotoxinen durch Hsps wie z.B. Gp96 verstärkt ihre biologische Aktivität. So können geringe Mengen an LPS, die normalerweise nicht ausreichend sind, um DCs zu aktivieren, durch die Bindung an Gp96 zu einer Reifung der Zellen führen und dadurch eine CTL-Antwort induzieren (Warger et al; Manuskript eingereicht).

Andere Hsps wie Hsp70 und Hsp90 sind, wenn sie auf der Zelloberfläche exprimiert werden, Teile eines LPS-Rezeptor-Clusters und an der LPS-induzierten Signalkaskade beteiligt⁵².

Da es sich bei Gp96 um ein ER-lokalisiertes Glykoprotein handelt, erfolgt seine Freisetzung in den extrazellulären Raum in erster Linie durch nekrotischen Zelltod. Durch seine vielfältigen Eigenschaften wird es zu einem potentiellen nekrotischen Messenger, der das Immunsystem auf mögliche Gefahren hinweisen und in einen Alarmzustand versetzen kann

53,54

1.6. Wundheilung

Eine Wunde wird medizinisch als die Unterbrechung des Zusammenhangs von Körpergewebe definiert. Ursachen für die Entstehung einer Wunde können mechanische, chemische, thermische und so genannte aktinische (Strahlenschäden) Einwirkungen auf das Gewebe sein. Ferner kann das Absterben von Gewebe (Nekrose) die Bildung einer Wunde verursachen.

Oberflächliche Verletzungen der Haut bezeichnet man als offene Wunden während es sich bei entstandenen Verletzungen unter intakter Haut um geschlossene Wunden handelt.

Ziel der Wundheilung sind der Ersatz von zerstörtem Gewebe bei gleichzeitiger Wiederherstellung der Gewebeintegrität. Wird auf diese Weise der Normalzustand des Gewebes wiederhergestellt, spricht man von vollständiger Regeneration. Kommt es jedoch zur Zerstörung des gefäßreichen Bindegewebes, das bei der Wundheilung für den spezifischen Zellersatz zuständig ist, oder sind so genannte Ruhewebe (Herzmuskulatur, bestimmte Nervengewebe) betroffen, die sich nicht mehr erneuern können, so wird der Defekt durch Ersatzgewebe (Bindegewebe) ausgeglichen und man spricht von unvollständiger Regeneration.

Der Ablauf der Wundheilung wird klassisch in drei Phasen unterteilt: die inflammatorische (exsudative) Phase, die proliferative (Granulationsphase) und die regenerative Phase (Abb. 1.7.).

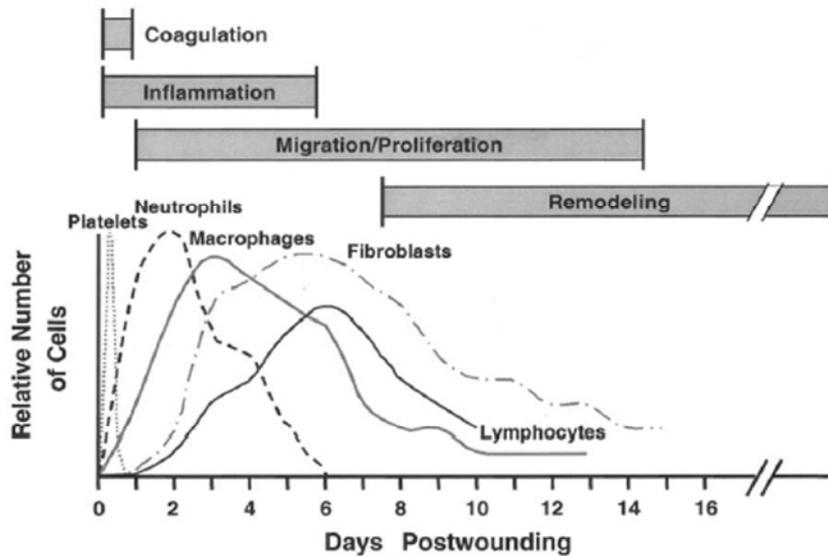


Abb. 1.7.: Phasen der Wundheilung

In der inflammatorischen Phase kommt es zu einer Aktivierung der Gerinnungs-, Komplement- und Kininkaskade, dadurch entsteht ein Netzwerk aus Fibrinfasern, Plasmabestandteilen und Thrombozyten. Die aktivierten Thrombozyten setzen Zytokine (TGF- β) und Wachstumsfaktoren (PDGF, EGF, FGF, IGF) frei.

Neutrophile wandern bereits in den ersten 24 Stunden in die Wunde ein, wo sie zerstörtes Zellmaterial und im Falle einer entzündeten Wunde Bakterien phagozytieren⁵⁵ und proinflammatorische Zytokine freisetzen, die zu einer Aktivierung der Fibroblasten und Keratinozyten führen.

Makrophagen wandern 48 bis 96 Stunden nach Verletzung in die Wunde ein und phagozytieren dort Fibronectin, Kollagen, Bakterien und Zelltrümmer, ferner sezernieren sie weitere Zytokine (z.B. TGF- α und - β) und Wachstumsfaktoren und leiten somit in die Proliferationsphase über^{56,57}. Ferner drainieren sie in die nächstgelegenen Lymphknoten, wo sie vermutlich den dort vorhandenen T-Zellen Antigene präsentieren⁵⁸.

Die Funktion der T-Zellen während der Wundheilung ist bislang nicht eindeutig geklärt. Dass sie eine Rolle spielen konnte jedoch in Experimenten gezeigt werden, in denen die Entfernung aller T-Lymphozyten zu einer Störung der Kollagensynthese und der Wundreißfestigkeit führten^{59,60}. Da jedoch die Elimination der CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen eine Verbesserung der Kollagensynthese und eine erhöhte Reißfestigkeit zur Folge hatten, scheinen vor allem CD8⁻/CD4⁻ T-Lymphozyten (vermutlich NK-Zellen oder γ/δ -T-Zellen) einen positiven Einfluss auf die Wundheilung auszuüben⁵⁹.

Die u. a. von Makrophagen sezernierten Wachstumsfaktoren stimulieren die Wundheilung durch Steigerung der Kollagensynthese, der Angiogenese sowie der Epithelneubildung. Ferner regen sie Fibroblasten zur Proliferation und Synthese einer kollagenreichen Matrix an. Dieses Gerüst aus Fibronectin, Fibrin und Hyaluronsäure bildet die Grundlage für neugebildetes Granulationsgewebe. Von Fibroblasten und Keratinozyten sezernierte Wachstumsfaktoren (FGF, VEGF) bewirken eine Gefäßneubildung aus den Kapillaren der Umgebung.

In der Regenerationsphase schließlich nehmen Zelldichte und Vaskularisierung ab. Fibroblasten wandeln sich in Myofibroblasten um und Keratinozyten wandern zur Wundoberfläche, wo sie ausdifferenzieren. Im letzten Schritt der Reepithelialisierung kommt es zur Zellreifung und Ausbildung stabiler Zell-Zell-Kontakte, sie endet mit der Kontraktion der Dermis.

Bei der Wundheilung ist ein genau kontrolliertes Gleichgewicht von Reparaturprozessen, die zu der Bildung von neuem Gewebe und destruktiven Prozessen, die zu der Entfernung des geschädigten Gewebes führen, notwendig. Kommt es z.B. durch mehrere Entzündungsreize zu einer verstärkten Expression von proinflammatorischen Zytokinen (TNF- α , IL-1- β) und Freisetzung reaktiver Sauerstoffmoleküle durch neutrophile Granulozyten, wird dadurch die Produktion von Matrix-abbauenden MMPs (Matrix Metalloproteinasen) verstärkt bei gleichzeitiger Verminderung der MMP-inhibierenden Enzyme. Dies hat eine Verschiebung des Wundgleichgewichts in Richtung destruktiver Prozesse zur Folge und es kommt zur Ausbildung von chronischen Wunden⁶¹.

1.7. Bakterielle und virale Pathogene

Bakterien sind mikroskopisch kleine (<1 bis 5 μm), einzellige Organismen, die zu den Prokaryonten gehören und quasi ubiquitär vorhanden sind. Sie sind unbeweglich oder können sich mit Hilfe von Geißeln fortbewegen und sind von kugeliger (Kokken), stäbchenförmiger (Bazillen), kommaförmiger (Vibrionen) oder spiraliger (Spirillen) Form.

Viele Bakterien sind in der Lage, unter ungünstigen Lebensbedingungen widerstandsfähige Dauerformen wie Sporen oder Kapseln zu bilden, und in dieser Form Jahre zu überdauern.

Typisch für Prokaryonten ist das Fehlen eines membranumgebenen Zellkerns, das Bakterienchromosom liegt ringförmig geschlossen im Zytoplasma vor. Die Vermehrung erfolgt über Spaltung oder Sprossung.

Anhand der bakteriellen Zellwand lassen sich drei Typen von Bakterien unterscheiden: die gram-positiven, die gram-negativen (Abb. 1.8.) und die Archaeobakterien.

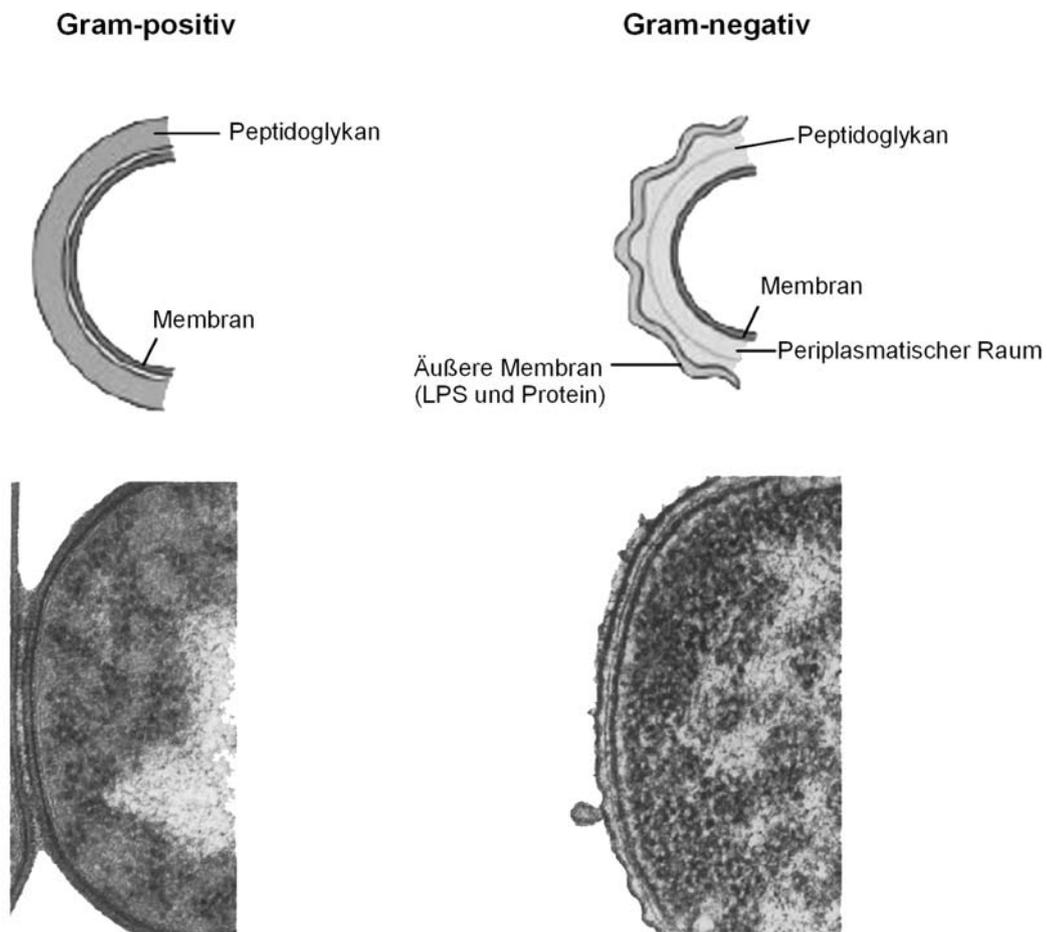


Abb. 1.8.: Aufbau bakterieller Zellwände

Gram-positive Bakterien besitzen eine weitestgehend homogene Zellwand aus quervernetzten Mureinschichten an denen zusätzlich Teichonsäuren angeheftet sein können. Die Zellwand der gram-negativen Bakterien ist komplexer aufgebaut. Die Mureinschicht ist wesentlich dünner und von einer äußeren Membran umgeben. Dadurch entsteht zwischen den beiden Membranen ein für gram-negative Zellen sehr wichtiges Kompartiment, der periplasmatische Raum. Dort befinden sich neben Bindeproteinen, die die Aufnahme von Substanzen in das Zytoplasma unterstützen auch Enzyme, die unerwünschte Substanzen entgiften oder am Aufbau der Mureinschicht beteiligt sind. In die äußere Membran sind Proteine, Lipide und Lipopolysaccharide (LPS) eingelagert.

Viele Bakterien sind zusätzlich zu ihrer Zellwand von Kapseln oder Schleimhüllen umgeben, die gerade für pathogene Bakterien oft eine wichtige Rolle spielen und zu den bakteriellen Virulenzfaktoren zählen.

Wichtige Gruppen von bakteriellen Virulenzfaktoren sind die Adhäsine, die Invasine und die Toxine, hinzu kommen noch Evasionsstrategien der Pathogene.

Während Adhäsine die Anheftung an Wirtszellen über Adhäsions-Rezeptor-Interaktion unterstützen, erleichtern die Invasine sowohl das Eindringen in Wirtszellen wie auch die Ausbreitung im Wirtsorgansimus durch so genannte Spreading-Faktoren. Endotoxine (LPS, Teichonsäuren, Peptidoglykane) und Exotoxine (z.B. Zyto-, Neuro- und Enterotoxine) schließlich schädigen die Wirtszellen direkt. Zu den Evasionsstrategien gehören z.B. eine Vielzahl von Antiphagozytose-Faktoren (Kapseln, Koagulase, Hämolysine, Leukocidine usw.) sowie Antikörper-Zerstörungsfaktoren (IgA1-Proteasen).

Gelingt es den pathogenen Bakterien, sich in einem Wirt stark zu vermehren und dadurch Gewebe zu schädigen oder Funktionen zu beeinträchtigen spricht man von einer Infektion.

Neben Bakterien können auch Viren Verursacher von Infektionen sein.

Bei Viren handelt es sich um hochmolekulare Partikel, die aus Nukleinsäuren, Proteinen und in einigen Fällen Membranteilen ihrer Wirtszellen bestehen.

Im Gegensatz zu Bakterien verfügen sie über keinen eigenen Metabolismus und sind in ihrer Vermehrung auf den Proteinsyntheseapparat der Wirtszelle angewiesen.

Ihr Genom kann aus DNA oder RNA bestehen, die einzel- oder doppelsträngig vorliegen und häufig an Kernproteine (core) gebunden sind.

Viren weisen eine ausgeprägte Speziesspezifität auf bei in der Regel sehr ausgeprägtem Organo- bzw. Zytotropismus.

Nach Adsorption eines Virus über spezifische Membranmoleküle der Wirtszelle, erfolgt dessen Aufnahme. In der Wirtszelle kommt es zur Freilegung des viralen Genoms gefolgt von der Expression der viralen Proteine und der Vermehrung des Virusgenoms. Schließlich werden im Zytoplasma neue virale Partikel zusammengesetzt, die die Zelle durch Lyse, Ausschleusung oder Knospung verlassen.

Im Laufe der Evolution haben Viren zahlreiche unterschiedliche Strategien entwickelt, um der Immunantwort des Wirtes zu entgehen, z.B. durch Eingriffe in die MHC-Klasse I-abhängige Antigenprozessierung und -präsentation. Dazu gehören u. a. die Hemmung der proteasomalen Degradation von Virusproteinen (hCMV, Epstein Barr), Inhibition des TAP-Transporters vom Zytosol (HSV-1 und -2) oder dem ER (hCMV) aus, sowie die Retention von

MHC-I-Molekülen (Adenovirus, hCMV und mCMV) oder deren ER-assoziierte Degradation (hCMV, HIV-1) bzw. lysosomale Degradation (mCMV, HIV-1).

Da die Reduktion der MHC-Klasse I-Moleküle auf der Zelloberfläche nicht ohne Nachteile für Pathogene ist, da dies zu einer NK-Zellantwort gegen die betroffenen Zellen führt, haben viele Viren auch indirekte Mechanismen gegen NK-Zellen entwickelt, in dem z.B. nur bestimmte MHC-Moleküle ausgeschaltet werden (HIV-1) oder MHC-Homologe auf der Zelloberfläche exprimiert werden (CMV).

Im Folgenden sollen die in dieser Arbeit verwendeten Pathogene näher vorgestellt werden.

1.8. Das Influenzavirus

Das Influenzavirus gehört zu der Familie der Orthomyxoviridae. Bei den Vertretern dieser Familie handelt es sich um negative Einzelstrang RNA Viren mit kugeliger, pleomorpher Gestalt und einem Durchmesser von 80 bis 120 nm (Abb. 1.9.).

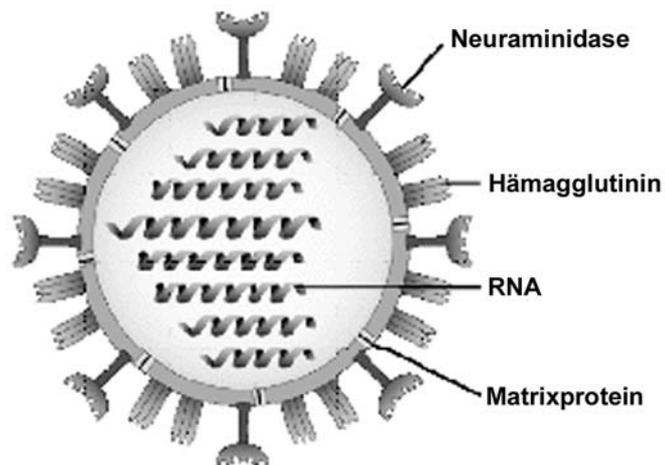
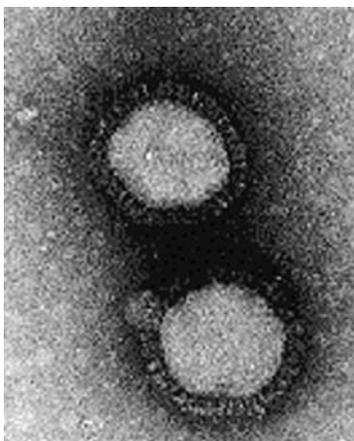


Abb. 1.9.: Morphologie und schematischer Aufbau von Influenza Viren

Bei den Influenzaviren werden drei Gruppen unterschieden: Influenza A, B und C. Dabei ist das Influenza A Virus der häufigste Verursacher von Pandemien und Epidemien. Geringfügige genetische Veränderungen des Erregers (Antigen-Drift) führen alle 2 bis 3 Jahre zu Grippeepidemien, größere genetische Veränderungen z.B. durch den Austausch kompletter

Gensegmente zwischen humanen und tierischen Influenzaviren (Antigen-Shift) haben gefährliche Grippe-Pandemien zur Folge, da in der Bevölkerung keine Immunität gegen das stark veränderte Virus besteht.

Die Unterteilung nach Subtypen erfolgt aufgrund verschiedener Nukleoproteine und Membranproteine. Die Benennung richtet sich nach der Spezies (entfällt beim Menschen) und dem Typ, dem Ort und dem Jahr der Erstisolation. So wurde das humane Influenza Virus A/PR/8/34 im Jahr 1934 in Puerto Rico isoliert.

Die Übertragung der Viren von Mensch zu Mensch erfolgt über Aerosole. Einmal im Respirationstrakt angelangt, kann das Virus die gesamte Mukos infizieren.

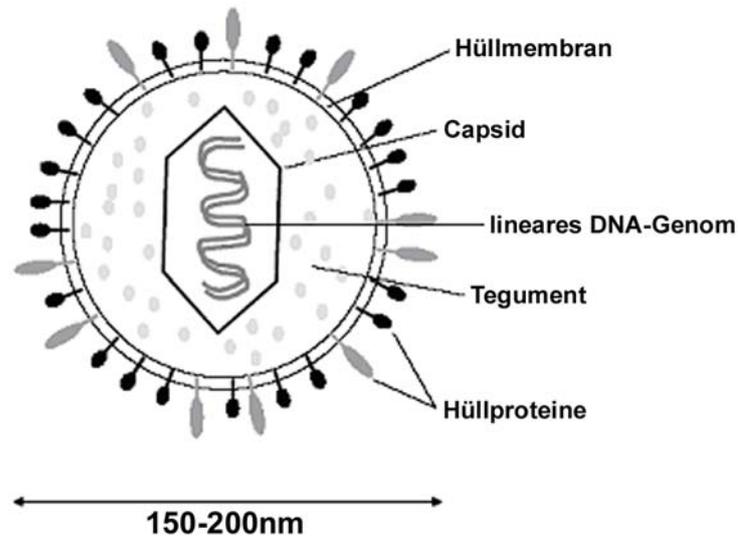
Die Infektion erfolgt nach Adsorption an der Wirtszellmembran und anschließender rezeptorvermittelter Endozytose. Zunächst gelangt das Virus in ein Endolysosom. Die Freisetzung des Nukleocapsids in das Zytoplasma der Wirtszelle erfolgt nach Ansäuerung des Endolysosoms, die eine Verschmelzung viraler und zellulärer Membranen zur Folge hat. Im Zytoplasma wird die RNA durch Abtrennung der Nukleoproteine freigesetzt und gelangt in den Zellkern, wo mit Hilfe des viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase-Komplexes mit der Transkription viraler mRNA begonnen wird. Die fertige virale mRNA wird in das Zytoplasma transportiert, wo an den Ribosomen die Translation erfolgt. Ausnahme ist die mRNA der viralen Glykoproteine HA und NA, deren Translation im ER stattfindet. Im Lumen des ER und nachfolgend im Golgi-Komplex erfolgt die Glykosylierung der Proteine, die Virushülle entsteht vermutlich durch Integration der Golgivesikel in die Zellmembran. Das NP wandert in den Zellkern, wo das Nukleocapsid zusammengebaut wird, das anschließend den Zellkern verlässt und an der Plasmamembran unter Mithilfe von viralen M-Proteinen mit den sich dort befindlichen Glykoproteinen zu neuen Virionen zusammengesetzt wird. Es folgt die Abknospung der fertigen Viruspartikel.

Die Oberflächenmoleküle HA und NA sind geeignet, eine effiziente Antikörperantwort auszulösen, die Lyse der infizierten Zellen wird durch CD8⁺ CTL vermittelt.

1.9. Das Zytomegalievirus (CMV)

Das Zytomegalievirus ist einer der ca. 100 Vertreter der Familie der Herpesviridae.

Schematische Darstellung eines Herpesvirions (Roizman, 1996):



Die Herpesviren können in drei Unterfamilien unterteilt werden, die Alpha-, Beta-, und Gamma-Herpesviren. Das Zytomegalievirus gehört in die Gruppe der Beta-Herpesviren. Diese sind durch ein enges Wirtsspektrum und eine langsame Vermehrung gekennzeichnet. Zudem weisen infizierte Zellen häufig eine stark vergrößerte Morphologie auf (Zytomegalie).

Das Wirtsspektrum des Zytomegalievirus ist auf eine Spezies beschränkt, im Falle des Maus-Zytomegalievirus (mCMV) auf Mäuse. Wie bei allen Herpesviren besteht die Infektion ein Leben lang, da die Viren in Form von zirkulärer DNA in den Wirtszellen persistieren. In diesem als Latenz bezeichneten Zustand werden keine Virusproteine hergestellt, daher sind die Viren für das Immunsystem des Wirtes kaum zu erkennen bis eine Reaktivierung erfolgt.

Zytomegalieviren können eine Vielzahl von Zellen infizieren: Makrophagen, Monozyten, Endothel- und Epithelzellen u. a., ebenso wie verschiedene Organe (Leber, Milz, Lunge, Speicheldrüsen).

Die produktive Infektion beginnt mit dem Eindringen der Viren in die Wirtszelle über Oberflächenrezeptoren. Nach dem Verschmelzen der Virus- und Wirtszellmembran gelangen Capsid und Tegument in das Zytoplasma der Wirtszelle, wobei das Capsid entlang der Mikrotubuli zum Zellkern weitertransportiert wird. Durch Kernporen gelangt das Virusgenom in das Nukleoplasma, wo die Genexpression gestartet wird.

Das mCMV Genom besteht aus einer ca. 240 kb großen, doppelsträngigen DNA mit 170 ORFs. Der Replikationszyklus ist streng reguliert und in drei Phasen unterteilt. Gemäß der zeitlichen Reihenfolge der Genexpression unterscheidet man *immediate early* (IE), *early* (E) und *late* (L)-Gene.

Die IE-Phase beginnt unmittelbar nach der Infektion. Für die Transkription der IE-Gene ist keine *de novo* Synthese viraler Proteine notwendig. Bei den IE-Proteinen handelt es sich hauptsächlich um regulatorische Proteine, die u. a. für die Initiation der E-Phase notwendig sind⁶². Während der E-Phase werden Proteine, die für die Replikation des viralen Genoms notwendig sind, synthetisiert. Der Beginn der DNA-Replikation leitet schließlich die L-Phase ein, in der hauptsächlich Strukturproteine hergestellt werden.

Eine besonders wichtige Rolle spielen die so genannten Immunevasionsgene *m04*, *m06* und *m152*, deren Genprodukte die MHC-Klasse I-abhängige Antigenpräsentation auf unterschiedliche Arten inhibieren⁶³.

Das Genprodukt von *m04*, gp34, bindet im ER an MHC-I-Moleküle und wird mit ihnen an die Zelloberfläche transportiert^{64,65}. Gp48, das von *m06* kodiert wird, leitet MHC-I-Moleküle zur Degradation in die Lysosomen um⁶⁶ und *m152*/gp40, hält MHC-I-Peptid-Komplexe im ER-Golgi *intermediate compartment* (ERGIC)/cis-Golgi zurück^{67,68}.

Dennoch können virale Peptide auf der Zelloberfläche präsentiert und von CD8⁺ T-Zellen erkannt werden, auch wenn ihre Zahl gemessen an der Vielzahl der viralen Proteine verhältnismäßig gering ist⁶⁹⁻⁷¹. Bekannte antigene Peptide stammen von den mCMV Proteinen pp89, gp34, M84⁷⁰, M83⁷² und M45.

Während NK-Zellen wichtig sind, um eine mCMV-Infektion in den ersten Tagen zu kontrollieren⁷³⁻⁷⁶, sind CD8⁺ zytotoxische T-Zellen für die Eindämmung der Infektion unverzichtbar⁷⁷. Antikörper spielen bei der primären mCMV-Infektion keine Rolle, verhindern jedoch die Virusausbreitung nach Reaktivierung aus der Latenz⁷⁸. CD4⁺ T-Lymphozyten sind an der Beseitigung einer akuten mCMV-Infektion der Epithelzellen der Speicheldrüse beteiligt⁷⁷ und haben vermutlich durch die Produktion von IFN- γ ^{79,80} und TNF- α ⁸¹ hemmenden Einfluss auf die Virusreplikation in der späten Phase.

Obwohl die antivirale Antwort eines immunkompetenten Wirts eine mCMV-Infektion kontrollieren kann, wird eine vollständige Viruselimination nicht erreicht und eine Latenz kann nicht verhindert werden. CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen sowie NK-Zellen verhindern in dieser Phase die Virusreplikation und eine Ausbreitung nach Reaktivierung⁸².

1.10. Listerien

Listerien sind grampositive stäbchenförmige Bakterien, die ubiquitär vorkommen. Innerhalb der Gattung lassen sich sieben verschiedene Arten unterscheiden, wobei nur *Listeria monocytogenes* (Abb. 1.10.) humanpathogen ist.



Abb.1.10.: *Listeria monocytogenes*

Listerien werden häufig durch die Nahrung aufgenommen, stellen aber für immunkompetente Personen in der Regel keine Gefahr dar⁸³. Bei immunsupprimierten Personen sowie beim ungeborenen Kind in der Schwangerschaft kann der Erreger jedoch eine Listeriose hervorrufen. Diese kann durch Sepsis, Enzephalitis und Meningitis gekennzeichnet sein und zum Abort des ungeborenen Kindes führen.

Nach dem Durchdringen der Darmbarriere gelangen die Bakterien innerhalb kurzer Zeit über Blut und Lymphe in die Leber und die Milz. Dort erfolgt die Aufnahme der Bakterien meist durch Makrophagen⁸⁴, es können aber auch nicht-phagozytische Zellen mit Hilfe der Listerien-Proteine Internalin A bzw. B infiziert werden. Internalin A bindet an das Protein E-Cadherin, Internalin B bindet an den Rezeptor für die globuläre Domäne des Komplementfaktors C1q und bei Säugetieren an den Rezeptor Met, der Rezeptor für HGF (hepatocyte growth factor)⁸⁵. Die Aufnahme der Listerien durch Makrophagen erfolgt über verschiedene Mechanismen, an denen vermutlich Komplement-Komponenten und Oberflächenrezeptoren der Makrophagen für Lipoteichonsäuren beteiligt sind.

Ca. 30 Minuten nach der Aufnahme in die Zelle verlassen die Bakterien das Phagosom durch Einsatz von Listeriolysin (LLO), einem Poren-bildenden Protein. Danach erfolgt die Replikation der Listerien im Zytosol. Da die Bakterien bei 37 °C unbegeißelt sind, rekrutieren sie mittels ActA das Aktin der Wirtszelle, mit dessen Hilfe sie sich fortbewegen⁸⁶. Ferner erlaubt es die Bildung von Zell-Ausstülpungen, mit denen benachbarte Zellen infiziert werden können. In diesen sind die Bakterien zunächst von einer Doppelmembran umgeben, die mit Hilfe von LLO und einer Phospholipase lysiert wird⁸⁷. Dann beginnt der Infektionszyklus von neuem^{88,89}.

Die meisten Listerien werden bereits durch Granulozyten und nicht-aktivierte Makrophagen abgetötet, zur vollständigen Elimination der Bakterien werden jedoch aktivierte Makrophagen und andere Zellen des angeborenen Immunsystems benötigt.

Infizierte Makrophagen produzieren IL-12 und TNF- α ⁹⁰. Dadurch werden NK-Zellen zu der Synthese von IFN- γ angeregt⁹¹⁻⁹³, welches wiederum die Makrophagen aktiviert, so dass phagozytierte Listerien effektiver abgetötet und die IL-12 Produktion und Expression von MHC-Klasse II- und kostimulatorischen Molekülen verstärkt werden. Ferner kommt es zu einer Aktivierung der CD8⁺ zytotoxischen T-Lymphozyten⁹⁴ durch IFN- γ . Diese spielen jedoch bei der Abwehr einer Primärinfektion mit Listerien nur eine untergeordnete Rolle und sind hauptsächlich bei sekundären Infektionen von Bedeutung. Dabei scheinen interessanterweise hauptsächlich sekretierte Proteine wie LLO⁹⁵, p60⁹⁶ und IrpA Quellen für protektive Antigenepitope darzustellen, während nicht-sekretive Proteine wie z.B. ActA zwar von CTLs erkannt werden können, jedoch nicht protektiv sind⁹⁷.

Neben der Aktivierung von NK-Zellen bewirkt das sezernierte IL-12 eine Differenzierung von CD4⁺ T-Lymphozyten in T_H1-Zellen⁹⁸, die für die Bildung von Granulomen, die große Mengen an Makrophagen und Granulozyten enthalten, verantwortlich sind und IFN- γ sowie IL-2 ausschütten⁹⁹. Die Depletion von CD4⁺ T-Zellen zeigt in Infektionsexperimenten jedoch kaum einen Effekt.

Die Infektion mit Listerien führt bei Hepatozyten zur Induktion von Apoptose¹⁰⁰, wodurch Neutrophile angelockt werden. Ferner konnte gezeigt werden, dass Listerien Dendritische Zellen und Lymphozyten infizieren und Apoptose induzieren können^{101,102}.

1.11. Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit sollen zwei Projekte aus verschiedenen Themengebieten behandelt werden.

Im ersten Teil geht es um die Detektion der Hitzeschockproteine Gp96 und Hsp70 in humanen Wundflüssigkeiten.

Hitzeschockproteine werden hauptsächlich durch nekrotischen Zelltod freigesetzt und sind in der Lage mit Epithelzellen sowie Zellen lymphoiden und monozytären Ursprungs zu interagieren. Es ist daher nahe liegend, dass sie einen Einfluss auf die Wundheilung haben könnten.

Frische Operationswunden, traumatische und chronische Wunden sollen mit der Fragestellung verglichen werden, ob die Anwesenheit und Konzentration von Hitzeschockproteinen in den Wundflüssigkeiten mit dem Prozess der Wundheilung korreliert.

Hierzu soll zunächst ein System entwickelt werden, dass die Detektion von Gp96 in Wundflüssigkeiten erlaubt. Wundflüssigkeiten von verschiedenen Verletzungen sollen über einen Zeitraum von mehreren Tagen gesammelt und auf die Anwesenheit von Gp96 und Hsp70 sowie verschiedene Zytokine untersucht werden.

Ferner soll die Wirkung von unterschiedlichen Wundflüssigkeiten und Patientenserum auf humane Dendritische Zellen sowie Granulozyten überprüft werden.

In einem zweiten Projekt soll das Phänomen der DALIS-Bildung während der Reifung von BMDCs untersucht werden. Hierfür werden Zellen mit unterschiedlichen TLR-Stimuli behandelt oder mit humanem Influenzavirus bzw. murinem Zytomegalievirus oder Ovalbumin-transgenen Listerien infiziert, und die DALIS-Bildung sowie Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und die Hochregulation von kostimulatorischen Oberflächenmolekülen untersucht werden.

Weiteres Ziel der Arbeit ist die Überprüfung der Hypothese, dass neusynthetisierte, fehlerhafte Proteine (DRiPs) als Substrate für die Produktion von MHC-Klasse I-Epitopen verwendet werden. Als Antigene dienen das Influenza Nukleoprotein und das M45-Protein von mCMV. Von Interesse ist neben Untersuchungen zur DRiPs/DALIS-Bildung und deren Kolokalisationen mit den viralen Proteinen nach Infektion, die Kinetik der Entstehung von viralen CTL-Epitopen in BMDCs und Nicht-APCs. Der Vergleich von BMDCs mit nicht-professionellen APCs ist aus folgendem Grund von Interesse: DRiPs erlauben die

Herstellung von CTL Epitopen gleichzeitig zur Produktion von viralen Proteinen, also zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Infektion (< 1 h). Dieser Vorgang sollte daher bei allen Zellen stattfinden, jedoch benötigen DCs Zeit, heranzureifen und in die sekundären Lymphknoten zu wandern. Die Hochregulation der kostimulatorischen Oberflächenmoleküle CD80 und CD86 benötigt 12 bis 24 h, die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen erfolgt 6 bis 8 h nach Aktivierung der DCs. Dementsprechend wäre eine Verzögerung der Antigenpräsentation in diesen Zellen von Vorteil, um eine optimale CTL-Aktivierung zu gewährleisten.

LeLouard et al konnten zeigen, dass während LPS-induzierter DC-Reifung DRiPs in DALIS eingelagert wurden und sich dadurch ihr Abbau durch das Proteasom verzögerte. Dementsprechend könnten DALIS ein Reservoir für Proteine darstellen, von denen mit zeitlicher Verzögerung CTL-Epitope hergestellt werden – eine Hypothese, die im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht werden soll.

Der Vergleich von Influenza und mCMV Infektion ist dabei besonders interessant, da letztere durch Immunevasionsstrategien die Fähigkeiten von DCs, T-Zellen zu aktivieren, beeinträchtigen.

Im Gegensatz zu den beiden viralen Systemen wird das untersuchte Antigen von den Ova-transgenen Listerien selbst produziert. Da aber nach den Beobachtungen von LeLouard et al lediglich von der Zelle selbst produzierte, aber keine exogenen Proteine in DALIS eingelagert werden, soll die Kinetik, mit welcher das SIINFEKL-Epitop präsentiert wird, mit der Kinetik der Präsentation des Influenza NP verglichen werden.

Neben der ungeklärten Bedeutung von DALIS bei der Antigenpräsentation sind auch die Mechanismen, die zur DALIS-Bildung in DCs führen, unbekannt. Bisherige Versuchsergebnisse weisen auf einen eindeutigen Zusammenhang zwischen DC-Reifung und DALIS-Bildung hin, wobei die Reifung durch virale Infektionen, CD40-Ligation sowie verschiedene TLR-Liganden induziert werden kann. In diesem Zusammenhang soll durch den Einsatz verschiedener Inhibitoren der Signaltransduktion die Entstehung von DALIS näher untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Mäuse

Es wurden Tiere folgender Mäusestämme verwendet: C57BL/6, BALB/c, C3H/HEN, C3H/HEJ/TLR2^{-/-} und MyD88^{-/-}.

2.1.2. Primärzellen und Zelllinien

Folgende Primärzellen wurden in dieser Arbeit verwendet: huDCs (human monocyte-derived dendritic cells), humane Granulozyten, murine BMDCs (bone marrow-derived dendritic cells) und MEFs (Mouse Embryonic Fibroblasts).

Ferner wurden diese Zelllinien eingesetzt: EL-4 (Maus-Thymomzelllinie), MC57 (Maus-Fibroblastenzelllinie), Influenza NP₃₆₆₋₃₄₇-spezifische, CD8⁺ T-Zelllinie sowie mCMV M45-spezifische T-Zellen (Institut für Virologie der Universität Mainz; Prof. Reddehase).

2.1.3. Viren und Bakterien

In dieser Arbeit wurde mit dem humanen Influenza-Virus A (H1N1) PR/8/34, *Listeria monocytogenes* (Ova-transgen) sowie murinem Zytomegalievirus (mCMV) gearbeitet. Die Zytomegalieviren wurden hauptsächlich mit dem BAC-System hergestellt und wurden freundlicherweise von dem Institut für Virologie der Universität Mainz zur Verfügung gestellt.

Neben dem Wildtyp (mCMV wt BAC) kamen folgende Mutanten zum Einsatz: *Δm152* BAC, *Δm04* BAC, *Δm06* BAC, *Δm04 + Δm06* BAC, *Δm04 + Δm152* BAC, *Δm06 + Δm152* BAC, *Δm04 + Δm06 + Δm152* BAC, *m164* BAC, *Δm157* BAC sowie *mCMV-IE1 L>A* BAC.

Ferner wurden die nachfolgenden Revertanten verwendet:

Δm152 BAC Revertante, *m164* BAC Revertante, Δ IE1 A176L* (Wobble) BAC Revertante, Δ IE1 A176F (Phe-Revertante). Die Herstellung der Immunevasionsgen-Mutanten wird bei Wagner et al.¹⁰³ beschrieben. Die Peptidmutanten und Revertanten wurden am Institut für Virologie der Universität Mainz hergestellt.

2.1.4. Zellkulturmedien und Zusätze

Grundmedien

IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium ; eigene Herstellung: Institut für Immunologie, Mainz oder BioWhittaker, BE12-722F
α -MEM	eigene Herstellung, Institut für Immunologie, Mainz
RPMI	BioWhittaker, BE12-115F
X-Vivo 15	BioWhittaker/Cambrex

Medienzusätze

FCS	Fötales Kälberserum; SeraPlus 3702-P232502 oder Vitromex, 9070011; hitzeinaktiviert und abzentrifugiert
Glutamin	Seromed K 0282 oder Roth, 3772
Natriumpyruvat	Serva, 15220
Penicillin	Serva, 31749
Streptomycin	Serva, 35500
humanes Serum	Pel-Freez AB
murines GM-CSF	GM-CSF-haltiger Kulturüberstand der Myelomzelllinie X63/0 (Universität Mainz) oder PeproTech Inc. 315-03 (0,5 Mio U/ml = 3330x)
humanes GM-CSF	Leukomax, Sandoz, 50 μ g/ml Stocklösung in ddH ₂ O
IL-4	R&DSYSTEMS (10 μ g/ml Stocklösung in X-Vivo 15)
Con-A-Überstand	Institut für Immunologie Mainz; aus der Ratte
α -Methylmannosid	Sigma
Gentamycin	Sigma, G1272

Fertige Zellkulturmedien

BMDC-Medium	IMDM + 5 % FCS + 1 % Glutamin + 1 % Natriumpyruvat + 1 % Penicillin + 1 % Streptomycin
BMDC-Diff-Medium	BMDC-Medium + 1 % GM-CSF-haltigen Kulturüberstand der Myelomzelllinie X63/0 oder BMDC-Medium + 30 ng/ml (Endkonzentration) GM-CSF
Einfriermedium	10 % DMSO + 90 % FCS
Granulozyten-Medium	RPMI + 3 % FCS

huDC-Medium	X-Vivo 15 + 2 % Glutamin + 1% Penicillin + 1 % Streptomycin + 1 % humanes Serum
huDC-Diff-Medium	huDC-Medium + 40 ng/ml IL-4 + 100 ng/ml hu GM-CSF
T-Zell-Medium	α -MEM + 10% FCS + 1 % Glutamin + 1 % Natriumpyruvat
Killermedium	T-Zell-Medium + 5 % Con-A-Überstand + 5 % α -Methylmannosid
Listerien-Medium o.P/S	IMDM ohne Penicillin/Streptomycin + 2% L-Glu + 10 % FCS
Listerien-Medium + Gent	IMDM + 2% L-Glu + 10 % FCS + 50 μ g/ml Gentamycin
MEF-Medium	MEM + 10 % FCS + 1 % Glutamin + 1 % Natriumpyruvat + 1 % Penicillin + 1 % Streptomycin

2.1.5. Humane Wundflüssigkeiten

Die humanen Wundflüssigkeiten und dazugehörigen Blutseren stammen von Patienten der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik Tübingen (Ansprechpartner Dr. V. Dürr) sowie der Chirurgischen Klinik der Universität Tübingen, Abteilung für Allgemeine Chirurgie und Poliklinik (Ansprechpartner Dr. C. Wicke).

Es handelt sich hierbei um WF-Proben von elektiven Eingriffen, sowie von traumatischen und chronisch/septischen Wunden.

2.1.6. Primäre Antikörper

rabbit p.c. anti-human Influenza Nukleoprotein	J.W. Yewdell
anti-BAG-1	J. Hoehfeld
anti-mCMV CR101 und anti-mCMV CR103	R. Holtappels-Geginat
mouse m.c. antibody to ubiquitinated proteins (clone FK2)	Affiniti (PW8810)
rabbit p.c. antibody to 20S proteasome α/β subunits	BioTrend (PW8155)
anti-mouse LAMP-2-FITC	BD Biosciences Pharmingen (558758)
anti-Hsc70	StressGen (SPA-815)
anti-Grp94	StressGen (SPA-850)
anti-chicken Ovalbumin-Biotin	USBiological (08075-20)
anti-actin (C-2)-HRP	Santa Cruz Biotechnology Inc (sc-8432)
anti-mouse CD86 (B7-2)-PE	BD Biosciences Pharmingen (553692)
anti-mouse CD80 (B7-1)-FITC	BD Biosciences Pharmingen (553768)
anti-mouse CD11c-PE	BD Biosciences Pharmingen (553802)
anti-mouse CD14-FITC	BD Biosciences Pharmingen (553739)

anti-mouse IL-6 capture	BD Biosciences Pharmingen (554400)
anti-mouse IL-6 detection	BD Biosciences Pharmingen (554402)
anti-mouse IL-10 capture	BD Biosciences Pharmingen (551215)
anti-mouse IL-10 detection	BD Biosciences Pharmingen (554465)
anti-mouse IL-12 p40 capture	BD Biosciences Pharmingen (551219)
anti-mouse IL-12 p70 capture	BD Biosciences Pharmingen (554658)
anti-mouse IL-12 p40/p70 detection	BD Biosciences Pharmingen (554476)
anti-mouse IFN- γ capture	Universität Mainz (Klon R46A2)
anti-mouse IFN- γ detection	Universität Mainz (Klon AN18.17.24)
anti-human IL-6 capture	BD Biosciences Pharmingen (554543)
anti-human IL-6 detection	BD Biosciences Pharmingen (554546)
anti-human IL-10 capture	BD Biosciences Pharmingen (554705)
anti-human IL-10 detection	BD Biosciences Pharmingen (554499)
anti-human TNF- α capture	BD Biosciences Pharmingen (551220)
anti-human TNF- α detection	BD Biosciences Pharmingen (554511)
anti-human TGF- β capture	BD Biosciences Pharmingen (555052)
anti-human TGF- β detection	BD Biosciences Pharmingen (555053)
anti-human CD80-FITC	BD Biosciences Pharmingen (557226)
anti-human CD86-PE	BD Biosciences Pharmingen (555665)

2.1.7. Sekundäre Antikörper

anti-rabbit IgG-HRP	Cell Signaling Technology (7074)
anti-rabbit IgG-Alexa 594	Molecular Probes (A11072)
anti-mouse IgG-Alexa 594	Molecular Probes (A11020)
anti-rat IgG-Alexa 594	Molecular Probes (A11007)
anti-rabbit IgG-Alexa 546	Molecular Probes
anti-mouse IgG-FITC	Jackson Immunoresearch
anti-mouse IgG-APC	Dianova

2.1.8. ELISA-Standards und ELISA-Kits

Folgende ELISA-Standards von BD Biosciences Pharmingen wurden verwendet: mouse IL-6, mouse IL-10, mouse IL-12 p40, mouse IL-12 p70, mouse IFN- γ , human IL-6,

human IL-10, human TNF- α und human TGF- β . Ferner wurde der anti-Hsp70 ELISA Kit von StressGen (EKS-700) verwendet.

2.1.9. Standard-Chemikalien

Die Standard-Chemikalien wurden in der Regel von Fluka, Merck, Roth und Sigma bezogen. Dazu gehören: Acrylamid:Bis-Acrylamid 29:1, Ammoniumperoxodisulfat, β -Mercaptoethanol, Dimethylsulfoxid, EDTA, Essigsäure, Ethanol, Formaldehyd, Glutaraldehyd, Glycerol, Glycin, HCl, IGEPAL (Nonidet P-40), KHCO_3 , Methanol, Natriumazid, Natriumborat, NaCl, NaH_4Cl , NaHCO_3 , Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , NaOH, Tris, Triton X100, Tween20.

2.1.10. Inhibitoren

Die in dieser Arbeit verwendeten Inhibitoren wurden fast ausschließlich von Calbiochem/Merck Biosciences bezogen, mit Ausnahme des MNK1-Inhibitors CGP57380, der freundlicherweise von der Firma Novartis (Dr. H. Gram) zur Verfügung gestellt wurde, sowie PD98059 und U0126, die von Cell Signaling bezogen wurden.

Folgende Inhibitoren fanden in dieser Arbeit Verwendung: Akt IV Inhibitor, CGP57380, HA-1077, H-89, JNK I-Inhibitor, Ly294002, NF- κ B-Activation Inhibitor, PD98059, SB203580, U0126.

2.1.11. Weitere Materialien

ABTS (2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid))	Sigma
Alcian Blue	Sigma
Bromphenolblau	Fluka
BSA (Bovines Serum Albumin)	Roth
Complete Protease-Inhibitoren-Cocktail	Roche
Coomassie Brilliant Blue	
Cycloheximide Ready Made	Sigma
Cytofix/Cytoperm	BD Biosciences Pharmingen
DAPI	Molecular Probes
D-Biotinoyl- ϵ -Aminocapronsäure-N-Hydroxysuccinimidester	Boehringer Mannheim
ECL-Substrat	PerkinElmer oder Pierce
Epoxomicin	Affinity
FITC	Sigma

Gentamycin	Sigma
Glutaraldehyd	Sigma
Immersionsöl	
LAL-Assay	BioWhittaker
LPS (Lipopolysaccharid; Salmonella Typhimurium)	Sigma
Lymphoprep	Nycomed
Nagelklarlack	
Nitrozellulose Membran	Amersham Pharmacia Biotech
PBS (phosphate buffered saline)	Immunologie Mainz
Polymorphprep	AxisShield
Polymyxin B Agarose	Sigma
Roti-Nanoquant	Roth
Saponin	Sigma
SDS	Roth
Sephadex G-25	Pharmacia
Streptavidin-HRP	BD Biosciences Pharmingen
TEMED (N,N,N,N-Tetramethylethyldiamin)	Serva
TMB	Sigma
Trypanblau	
Trypsin/EDTA	BioWhittaker/Cambrex
VectaShield	
Whatman-Papier	Whatman

2.1.12. Puffer

ACK-Puffer	150 mM NH ₄ Cl; 1 mM KHCO ₃ ; 0,1 mM EDTA
Anodenpuffer	50 mM Natriumborat; 20 % Methanol in ddH ₂ O
ELISA-Bindepuffer	0,1 M Na ₂ HPO ₄ in ddH ₂ O
ELISA-Blockinglösung	0,05 % Tween 20; 1 % BSA in PBS
ELISA-Waschlösung	0,05 % Tween 20 in PBS
FACS-Puffer	1 % BSA; 0,02 % Natriumazid in PBS
Kathodenpuffer	50 mM Natriumborat; 0,05 % SDS in ddH ₂ O
PWash	0,5 % BSA; 0,1 % Saponin in PBS
SDS-PAGE-Laufpuffer	0,25 M Tris Base; 1,9 M Glycin; 1 % SDS in ddH ₂ O

SDS-PAGE-Ladepuffer	125 mM Tris pH6,8; 3,5 % SDS; 20 % Glycerol; 10 % β -Mercaptoethanol; 0,2 % Bromphenolblau in ddH ₂ O
TBS	50 mM Tris Base; 150 mM NaCl; pH 8,0 in ddH ₂ O
TWB	0,1 % (w/v) Nonidet P-40 in TBS
TBB	0,1 % (w/v) Nonidet P-40; 3 % BSA; 5 mM EDTA in TBS

2.1.13. Geräte und Hilfsmittel

ELISA-Reader (Spectramax 340; Molecular Devices)

FACS-Gerät (FACS-Calibur; FACScan; BD Biosciences Pharmingen)

Fluoreszenzmikroskop (Cell^R System; Olympus)

Image Reader (LAS 1000; Fujifilm bzw. ChemiDoc XRS System; Biorad)

Konfokales Mikroskop (LSM510; Zeiss)

Ferner wurden folgende Geräte und Hilfsmittel eingesetzt:

Magnetrührer, pH-Meter, Pipetten, Pipettierhilfe (Pipetboy), Präzisionswaagen, SDS-Gel-Kammern, Sterilbank, Tecanfluorimeter, Thermomixer, Vortexer, Wasserbad (temperaturstabilisiert), Western Blot Apparatur, Zellinkubator, diverse Zentrifugen

2.1.14. Plastik- und Glaswaren

Deckgläschen und Objektträger	Roth
ELISA-Platten	Nunc
FACS-Röhrchen	Greiner
Petrischalen (diverse Größen)	Greiner
Reaktionsgefäße (0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml)	Eppendorf
14 ml und 50 ml Röhrchen	Falcon; Greiner
250 ml Zellkulturflaschen	Greiner
6-Well, 12-Well, 24-Well und 96-Well Zellkulturplatten	Greiner

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkultur

2.2.1.1. Kultur von Zelllinien

Sämtliche Arbeiten in der Zellkultur wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Die Kultur aller Zelllinien erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂ in Zellinkubatoren/Brutschränken bei feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre.

EL-4 Zellen wurden in 6-Well-Platten in 5 ml pro Well BMDC-Medium kultiviert, die Kultivierung von MC57 Zellen erfolgte in 20 ml BMDC-Medium mit 10 % FCS in 250 ml Gewebekulturflaschen.

Bei beiden Zelllinien wurden zweimal wöchentlich Medienwechsel bei gleichzeitiger Zellzahlreduzierung oder Ernte durchgeführt. Bei den EL-4 Zellen wurden hierzu nach mehrmaligem Auf- und Abpipettieren 4 ml pro Well der Zellsuspension entfernt und durch 5 ml frisches, steriles Medium ersetzt. Da es sich bei MC57 Zellen um eine adhärente Zelllinie handelt, ist ein Ablösen der Zellen mit Trypsin/EDTA notwendig. Hierfür wurde zunächst das Medium vollständig entfernt und in ein 50 ml Röhrchen transferiert und danach mit 5 ml PBS nachgespült. Dann erfolgte die Zugabe von 1,5 ml Trypsin/EDTA mit anschließender Inkubation für 2 Minuten bei 37 °C. Durch Schütteln und Klopfen wurden die Zellen danach vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst und in das 50 ml Röhrchen mit altem Medium transferiert. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert [1500 rpm; 3 Minuten; RT], die Überstände abgekippt und das Zellpellet in 10 ml neuem Medium resuspendiert. Davon wurden 2 ml in 18 ml frisches Medium in eine neue 250 ml Zellkulturflasche gegeben.

2.2.1.2. Bestimmung von Lebendzellzahlen

Um die Lebendzellzahlen einer Zellsuspension zu bestimmen, wurde ein 1:1 Gemisch der homogenen Zellsuspension und Trypanblau hergestellt und unter dem Mikroskop untersucht. Trypanblau dringt durch die Zellmembran toter Zellen in das Zytoplasma ein und bindet dort an Zellproteine, wodurch tote Zellen tiefblau erscheinen. Lebende Zellen dagegen erscheinen leuchten hell im Mikroskop und werden mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt.

Es wurden 16 Kleinquadrate ausgezählt und die Zellzahl wie folgt errechnet:

Zellzahl [Zellen/ml] = Anzahl der gezählten Zellen * Verdünnungsfaktor * 10⁴

2.2.1.3. Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden 2 bis 5 Mio Zellen in einem Röhrchen abzentrifugiert [1500 rpm; 3 Minuten; RT], das Pellet in 1 ml Einfriermedium (10 % DMSO; 90 % FCS) aufgenommen und die Zellen in Kryoröhrchen (Merck) überführt. Die Röhrchen kamen zunächst in das auf 4 °C vorgekühlte, isopropanolgepufferte Einfriergefäß (Nalgene) und wurden kurzzeitig bei -80 °C gelagert bevor sie in den Stickstofftank überführt wurden.

Das Auftauen der Zellen sollte möglichst schnell geschehen. Hierfür taute man das Kryoröhrchen mit den Zellen im 37 °C Wasserbad an und transferierte den Inhalt in ein bereitgestelltes 14 ml Röhrchen mit 10 ml Medium. Nach dem Zentrifugieren [1500 rpm; 3 Minuten; RT] wurden die Zellen in 5 ml Medium aufgenommen und in eine 6-Well-Platte titriert.

2.2.1.4. Präparation und Aktivierung von BMDCs

Präparation:

Sämtliche Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Das Fell einer frisch getöteten Maus wurde mit 70 % Ethanol abgespritzt und anschließend die Hinterbeine durch gezieltes Reißen entfernt. Die Ober- und Unterschenkel beider Hinterbeine wurden frei präpariert und in 70 % Ethanol in eine Petrischale gelegt. Danach wurden die Knochen oben und unten aufgeschnitten und das Knochenmark mit BMDC-Medium in ein bereitgestelltes 50 ml Röhrchen gespült. Hierfür füllte man vorher das Medium in eine 10 ml Spritze mit einer Kanüle (BBraun 100 Sterican Größe 18; 465 7683) der Größe 18. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert [1500 rpm; 3 Minuten; RT], der Überstand abgeschüttet und die Zellen in 10 ml frischem Medium durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Nach erneutem Zentrifugieren und Abschütten des Überstandes wurden die Zellen in 10 ml BMDC-Diff-Medium aufgenommen und die Lebendzellzahl bestimmt. Beim Zählen unter dem Mikroskop wurden nur die mittelgroßen bis großen Zellen berücksichtigt und die kleinen (Erythrozyten) ignoriert. Es wurden stets 5 Mio. Zellen pro Well in eine 6-Well-Platte gegeben und mit BMDC-Diff-Medium auf ein Gesamtvolumen von 5 ml aufgefüllt. Im Durchschnitt ist mit 1-2 Platten pro Maus zu rechnen. Die Differenzierung der Zellen erfolgte über 6-7 Tagen mit Mediumwechseln an Tag 2 und 4. Dabei wurden die Zellen an Tag 2 gespült, um nicht-adhärenente Zellen zu entfernen.

Dazu wurden 4 ml Medium mit einer 5 ml Glaspipette aus dem jeweiligen Well aufgesogen und dieses zum vorsichtigen zweimaligen Spülen entlang des Randes verwendet. Danach wurden 4 ml Medium entnommen und durch 5 ml frisches BMDC-Diff-Medium ersetzt. An Tag 4 wurde nur das Medium ohne zu spülen ersetzt, da sich zu diesem Zeitpunkt bereits semiadhärente Zellen in den Wells befanden.

Nach 6 Tagen erhielt man ausdifferenzierte, unreife, CD11c positive und CD14 negative Dendritische Zellen, die je nach Präparation 75 % bis 90 % der Gesamtzellzahl ausmachten. Des Weiteren wiesen diese Zellen in einer FACS-Analyse folgenden Phänotyp auf: CD40^{low}, CD80^{low}, CD86^{low} and H-2 Kb^{medium}.

Aktivierung von BMDCs:

Die Aktivierung der unreifen BMDCs erfolgte in der Regel an Tag 6 nach der Präparation. Hierfür wurden die Zellen zunächst durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren in den Wells geerntet. Die Zellsuspensionen wurden in 50 ml Röhrchen gepoolt, abzentrifugiert [1500rpm; 3 Minuten; RT] und nach dem Abschütten der Überstände in jeweils 10 ml BMDC-Medium resuspendiert um die Lebendzellzahlen zu bestimmen.

Die Aktivierung erfolgte je nach Versuch in 96-, 12-, oder 6-Well-Platten:

Art der Platte	Zellzahl/Well	Gesamtvolumen/Well
96-Well-Platte	0,25 Mio	200 µl
12-Well-Platte	2 Mio	2 ml
6-Well-Platte	5 Mio	4 ml

Für die Stimulation der BMDCs wurden verschiedene TLR-Liganden oder Viren bzw. Bakterien verwendet. Die Infektion mit Viren und Bakterien wird separat beschrieben.

Folgende TLR-Stimuli fanden Verwendung:

TLR-Ligand	Endkonzentration	Bezugsquelle
LPS (Salmonella Typhimurium)	1 µg/ml bis 5 ng/ml	Sigma
poly(I:C) (Poly(I)•Poly(C))	50 µg/ml; 100 µg/ml	Amersham Biosciences
CpG 1668	0,1 µM	TIB Molbiol Hamburg
Pam ₃ Cys	2,5 µg/ml	EMC microcollections
R848	1 µg/ml	Invivogen

Hierbei wurden die Stimuli nach Bedarf in BMDC-Medium verdünnt und unter Einhaltung des Gesamtvolumens zu den Zellen pipettiert und mit diesen durch Auf- und Abpipettieren gemischt bevor die Zellen für die gewünschte Zeitdauer bei 37 °C im Zellinkubator inkubiert wurden.

Für die Behandlung mit dem Proteasominhibitor Epoxomicin wurden die BMDCs 10 bis 30 Minuten vor der Zugabe der jeweiligen Stimuli mit einer Endkonzentration von 1 µM Epoxomicin behandelt.

2.2.1.5. Herstellung und Aktivierung von humanen Dendritischen Zellen

Herstellung von humanen Dendritischen Zellen aus Monozyten:

Humane Dendritische Zellen wurden unter sterilen Bedingungen aus Monozyten differenziert, die aus frischen Buffy Coats gewonnen wurden.

Das Blut wurde unter der Sterilbank in eine 250 ml Gewebekulturflasche umgefüllt, 1:1 mit PBS verdünnt, gleichmäßig auf 50 ml Greiner-Röhrchen aufgeteilt und mit jeweils 12.5 ml Lymphoprep vorsichtig unterschichtet. Dann wurden die Röhrchen mit dem Blut in einer Tischzentrifuge zentrifugiert [1800 rpm; ohne Bremse; 25 Minuten; RT], anschließend wurde die Zellschicht vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und auf zwei frische 50 ml Röhrchen aufgeteilt. Die Röhrchen wurden danach bis zur 45 ml-Marke mit PBS aufgefüllt und erneut zentrifugiert [1800 rpm; mit Bremse, 10 Minuten, RT]. Die Überstände wurden verworfen und die Zellpellets resuspendiert. Es folgte ein Waschschrift, in dem die beiden Röhrchen erneut mit PBS aufgefüllt und anschließend zentrifugiert [1500 rpm; 10 Minuten; RT] wurden. Nach dem Abschütten der Überstände und der Resuspension der Zellpellets wurden 10 ml X-Vivo 15 verwendet, um die Zellsuspensionen in einem Röhrchen zu vereinigen. Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurden anschließend 25 µl der Zellsuspension mit 125 µl Trypanblau gemischt und die Konzentration der Zellsuspension in einer Neubauer Zählkammer ermittelt. Ca. $100 \cdot 10^6$ Zellen wurden danach in je eine 250 ml Nunc-Flasche pipettiert und das Volumen mit huDC-Medium auf 15 ml aufgefüllt. Zur Gewinnung der adhärenen Zellfraktion wurden die Zellen 1 Stunde liegend im Zellinkubator (37 °C, 7.5 % CO₂) inkubiert.

Während der Inkubationszeit erfolgte die Vorbereitung des huDC-Diff-Mediums, wobei man 15 ml Medium pro Flasche benötigte.

Nach einer Stunde wurden die nicht-adhärenenten Zellen abgeschüttet und die adhärenenten Zellfraktionen in den Flaschen zweimal mit je 20 ml PBS gewaschen. Nach Zugabe von 15 ml DC-Diff-Medium pro Flasche wurden die Zellen für 6-7 Tage liegend im Zellinkubator inkubiert.

An Tag 6 konnten bereits FACS-Kontrollen der Zellen durchgeführt werden. Unreife huDCs sollten CD14 negativ sowie CD83 negativ sein. Das Vorhandensein von CD1a dagegen schwankte, meistens waren Zellen, deren Differenzierungsmedium wie angegeben humanes Serum enthielten, CD1a negativ oder schwach positiv, während Zellen, die ohne Serum herangezogen wurden, CD1a positiv waren.

Aktivierung von humanen Dendritischen Zellen:

Die Aktivierung der unreifen DCs erfolgte an Tag 6 oder 7 nach der Präparation. Hierfür wurden die Zellen zunächst durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren in den Zellkulturflaschen geerntet. Die Zellsuspensionen wurden in 50 ml Röhren gepoolt, abzentrifugiert [1500rpm; 3 Minuten; RT] und nach dem Abschütten der Überstände in jeweils 10 ml DC-Medium resuspendiert um die Lebendzellzahlen zu bestimmen.

Die Aktivierung erfolgte je nach Versuch in 96-Well-Platten mit 200.000 Zellen pro Well und einem Gesamtvolumen von 200 μ l. Als Stimuli wurden u. a. LPS [1 μ g/ml], humane Wundflüssigkeiten (5 μ l bis 50 μ l), humanes Serum (5 μ l bis 50 μ l) oder Gp96 [50 μ g/ml bis 100 μ g/ml] oder fraktionierte Wundflüssigkeiten [10 μ l bzw. 30 μ l] verwendet.

Nicht hier aufgeführte Stimuli werden im Ergebnisteil separat genannt.

Die Aktivierung erfolgte in der Regel über Nacht für 12-18 Stunden.

2.2.1.6. Isolation humaner Granulozyten

Bei der Isolierung musste nicht steril gearbeitet werden, da die Zellen in der Regel sofort verwendet wurden.

Zunächst wurden 10-20 ml Polymorphprep in ein 50 ml Röhren gegeben und ein gleiches Volumen an heparinisierendem venösem Blut von gesunden freiwilligen Spendern vorsichtig darauf pipettiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt [1700 rpm; 35 Minuten; RT; ohne Bremse].

Anschließend wurden die beiden entstandenen Zellschichten getrennt abgesaugt, wobei in der oberen Schicht hauptsächlich Lymphozyten und in der unteren PMN (Granulozyten) zu

finden waren. Das Röhrchen mit den PMN wurde zum Waschen mit PBS aufgefüllt und zentrifugiert [1700 rpm; 7 Minuten; RT]. Anschließend wurde der Überstand verworfen (nicht abschütten!). Die in der Zellpräparation noch vorhandenen Erythrozyten wurden mit 5 ml ACK-Puffer (150 mM NH₄Cl + 1 mM KHCO₃ + 0,1 mM EDTA) lysiert und die Zellen nach 5 Minuten Inkubation zentrifugiert [1500 rpm; 5 Minuten; RT]. Der Überstand wurde erneut verworfen, das Zellpellet in Granulozyten-Medium aufgenommen und die Lebendzellzahl bestimmt.

Aus 20 ml frischem humanen Blut erhielt man ca. 24 bis 34 Mio PMN, die zu 95 % bis 98 % CD66⁺ positiv waren.

Für die Aktivierung wurden 200.000 Zellen/Well in eine 96-U-Platte pipettiert, wobei das Gesamtvolumen nach Zugabe der Stimuli 100 µl/well nicht überschreiten sollte.

Phagozytose-Assay:

Die Zellen wurden nach Zugabe der Stimuli für 2 Stunden im Zellinkubator mit je 2 µl/Well PE-markierten Polystyrenbeads (Fluoresbrite Polychromatic Red 1.0 micron microspheres; Polyscience Inc. 18660) inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit 200 µl FACS-Puffer/Well wurden die Zellen in 180 µl/Well 1 % Formaldehyd in PBS aufgenommen und im FACS-Gerät gemessen.

2.2.1.7. Restimulation von T-Zellen

Die Gewinnung der Feederzellen und die Restimulation erfolgte unter sterilen Bedingungen.

Um die Feederzellen zu gewinnen, wurden 2 bis 3 C57BL/6 Mäusen die Milzen entnommen. Die Milzen wurden mit Hilfe eines Spritzenstempel durch ein Zellsieb zerdrückt und in einem 50 ml Röhrchen aufgefangen. Danach wurde zweimal mit je 5 ml T-Zell-Medium nachgespült bevor die Milzsuspension zentrifugiert wurde [1700 rpm; 3 Minuten]. Der Überstand wurde abgeschüttet und die Zellen resuspendiert bevor eine ACK-Lyse mit sterilem, kaltem ACK-Puffer (150 mM NH₄Cl, 1 mM KHCO₃, 0,1 mM EDTA, pH 7,3) folgte. Hierfür wurden 5 ml ACK-Puffer zum Pellet gegeben, 5 Minuten bei RT inkubiert und dann 10 ml Medium dazugegeben. Vor dem nachfolgenden Zentrifugieren wurden Zellen zum Zählen entnommen und diese 1:20 mit Trypanblau verdünnt. Bei 2 großen Milzen konnte man ca. 240 Mio Zellen erwarten, drei kleine Milzen lieferten dagegen ca. 270 Mio Zellen.

Nach erneutem Zentrifugieren [1700rpm; 3 Minuten], Abschütten des Überstandes und Resuspension des Zellpellets wurden 10 ml T-Zell-Medium und 50 µl Peptid (für NP₃₆₆₋₃₇₄-

spezifische T-Zellen wurde das Peptid ASNENMETM (= 50 nmol) [*Stock 10 µg/ml=10 µM*] benötigt) zu den Milzzellen gegeben bevor diese für 30 Minuten bis 1 Stunde im Wasserbad bei 37 °C inkubiert wurden.

Während dieser Zeit wurden die T-Zellen für die Restimulation vorbereitet. Dazu wurden sie durch kräftiges Auf- und Abpipettieren mit einer 1 ml Pipette geerntet und in 50 ml Röhrchen transferiert. Zum Zählen wurden 20 µl der Zellsuspension entnommen und 1:1 mit Trypanblau gemischt. Im Mikroskop erschienen die Zellen hell leuchtend, mittelgroß und rund bis bananenförmig z. T. mit Ausläufern.

Die T-Zellen wurden nach der Bestimmung der Zellzahl abzentrifugiert [1700 rpm; 3 Minuten], der Überstand abgeschüttet und das Pellet resuspendiert. Anschließend wurden 300.000 T-Zellen/ml in Killermedium aufgenommen und 1 ml pro Well in eine 24-Well-Platte gegeben. Bis zur Fertigstellung der Feederzellen kamen die Zellen zurück in den Zellinkubator.

Nach der Inkubation im Wasserbad wurden die Milzzellen (Feederzellen) mit 3000 rad bestrahlt. Nach der Bestrahlung wurden die Zellen abzentrifugiert [1700 rpm; 3 Minuten], der Überstand abgeschüttet und das Pellet in Killermedium mit 5 Mio Feederzellen/ml aufgenommen. 1 ml Feederzellen/Well wurden zu den T-Zellen pipettiert bevor diese weiter im Zellinkubator inkubiert wurden.

5 Tage nach der letzten Restimulation waren die Zellen ideal für einen ⁵¹Cr-Freisetzungstest, für IFN-γ-Assays sollte man 7 Tage warten. Eine erneute Restimulation war nach 7 Tagen erforderlich.

2.2.1.8. T-Zell-Assays

Bei den T-Zellen in den durchgeführten ⁵¹Cr-Freisetzungstests und den IFN-γ-Assay handelte es sich um PR/8/34-spezifische CD8⁺ CTL, deren Epitop aus dem Influenza Nukleoprotein (NP₃₆₆₋₃₇₄) stammt.

Für die ELISPOTs wurden M45-spezifische T-Zellen verwendet, die entweder das P141 (HGIRNASFI) oder das P28 Epitop (VGPALGRGL) aus dem mCMV-Protein M45 erkannten.

⁵¹Cr-Freisetzungstest und IFN-γ-Assay:

Als Targets dienten BMDCs, EL-4 und MC57 Zellen. Diese wurden geerntet, gewaschen und gezählt, bevor sie für die Infektion mit PR/8/34 in 12- bzw. 24-Well-Platten gegeben wurden.

Es wurden jeweils 2 Mio Zellen/2 ml/Well (12-Well-Platte) oder 1 Mio Zellen/1 ml/Well (24-Well-Platte) mit 0,8 bis 1 PFU PR/8/34 infiziert. Bei der Zugabe des Virus betrug das Volumen pro Well nur 500 µl, nach 30 Minuten im Zellinkubator erfolgte eine Medienzugabe zum endgültigen Gesamtvolumen. Die Dauer der Infektionen war ja nach Versuch variabel.

Danach wurden die Zellen geerntet, zweimal mit je 5 ml BMDC-Medium gewaschen und erneut die Lebendzellzahlen bestimmt. Anschließend wurden 1 Mio Zellen in neue 15 ml Röhren transferiert, abzentrifugiert [1500 rpm; 3 Minuten; RT] und zu den Positivkontrollen 10 µg/ml ASNENMETM auf die Pellets gegeben.

Es folgte das Labeln mit 20 µl [⁵¹Cr] Na₂CrO₄ in Anwesenheit von 5 µl FCS pro Ansatz für 20 Minuten im 37 °C Wasserbad. Nach dem Waschen mit 5 ml/Röhren T-Zell-Medium wurden die Zellen in je 3 ml desselben Mediums aufgenommen und weitere 15 Minuten im Wasserbad inkubiert. Anschließend folgte ein weiterer Waschschrift.

In einigen Versuchen wurden die Targets nun mit 500 µl Glutaraldehyd/Ansatz fixiert. Nach 1 Minute wurde die Reaktion mit 5 ml 0,1 M Glycin in PBS abgestoppt, die Proben erneut gewaschen und die Zellen in T-Zell-Medium aufgenommen (20.000 Zellen/ 100 µl). Anschließend wurden die fertigen Targets zu den vorbereiteten T-Zellen gegeben. Die Effektor/Target-Ratios betrugen 40:1, 4:1 und 1:1 in einem Gesamtvolumen von 200 µl. Nach 4 Stunden Inkubation im Zellinkubator wurden 50 µl Überstand/Probe abgenommen und auf eine Luma-Platte überführt. Diese wurde über Nacht getrocknet und am nächsten Tag im TopCounter vermessen.

Um den Einfluss der Proteinneusynthese auf die Präsentation des NP-Peptids zu überprüfen, wurden BMDCs mit 40 µM des Proteinsynthese-Inhibitors Cycloheximide (CHX) während einer Infektionsdauer von 6 Stunden behandelt. Alternativ wurde Influenza Virus mit kurzwelligem UV-Licht inaktiviert. Die UV-Inaktivierung erfolgte für 5 Minuten bei 254 nm in einer offenen Petrischale mit einer 8 Watt UV-Handlampe. Der Abstand zur Probe betrug 10 cm.

ELISPOT (*enzyme linked immunospot*):

Die Infektion der Targets (BMDCs und MEFs) erfolgte in 10 cm Petrischalen. Dabei wurden 4 bis 5 Mio Zellen in einem Gesamtvolumen von 8 ml BMDC-Medium mit 0,4 PFU/Zelle wt oder Δm152 mCMV infiziert. Nach Zugabe des Virus wurden die Platten für 3 Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert, die Platten in der Zentrifuge um 180° gedreht und weitere 7 Minuten zentrifugiert. Zu den Positivkontrollen wurde 10⁻⁸ M Peptid aus dem M45-Protein (P141: HGIRNASFI oder P28: VGPALGRGL) zu 3 Mio. Zellen gegeben.

Danach folgte die Inkubation im Brutschrank für unterschiedliche Zeitintervalle.

Anschließend wurden die Zellen geerntet, gewaschen und die Lebendzellzahlen ermittelt. Es folgte ein Fixierungs- (siehe ^{51}Cr -Freisetzungstest und IFN- γ -Assay) und ein Waschschrift bevor die Targets zu den mCMV M45-spezifischen T-Zellen gegeben wurden. Die T-Zellen wurden titriert und 50 bis 800 Zellen zu 0,1 Mio Targets bei einem Gesamtvolumen von 100 μl /Well in eine mit anti-IFN- γ Antikörper gecoatete ELISPOT-Platte gegeben. Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C erfolgte die Entwicklung mit einem Enzym-gekoppelten Zweitantikörper und Auszählung der Spots auf der Membran nach Zugabe des Substrats.

2.2.1.9. Infektion mit humanem Influenza-Virus PR/8/34

Das verwendete Virus (humanes Influenza A Virus PR/8/34) stammte von Dr. S. Pleschka (Institut für Medizinische Virologie, Universität Gießen).

Für die Infektionen von BMDCs mit humanem Influenzavirus, die in Zellkulturplatten mit unterschiedlicher Well-Zahl durchgeführt wurden, wurden 1 PFU/Zelle PR/8/34 verwendet. Die Zugabe des Virus zu den Zellen erfolgte nach der Abnahme von Mediumüberständen, um das Infektionsvolumen so gering wie möglich zu halten. 45 Minuten nach Zugabe des Virus zu den Zellen wurde das Volumen wieder auf das ursprüngliche Gesamtvolumen erhöht und die Zellen weiter im Zellinkubator bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert.

2.2.1.10. Infektion mit murinem Zytomegalievirus

Es wurden murines Zytomegalievirus (mCMV wt) und verschiedene Mutanten des Virus verwendet, die von Dr. R. Holtappels-Geginat (Institut für Virologie, Universität Mainz) stammten.

Für die Infektion wurden BMDCs an Tag 6 entweder in 12-Well Platten (3 Mio/Well in 0,5 ml) oder in 96-U-Platten (250.000/well in 50 μl) oder in 6-Well-Platten (1,5 Mio/Well) bzw. in 10 cm Petrischalen (4 Mio/Schale; 8 ml) transferiert. Die Infektion erfolgte mit 0,4 PFU/Zelle oder 1 PFU/Zelle. Nach der Viruszugabe wurden die Platten zentrifugiert [1500rpm; 3 Minuten; RT], dann die Platten in der Zentrifuge um 180° gedreht und weiter zentrifugiert [1500rpm; 7 Minuten oder 17 Minuten; RT]. Nach der Zentrifugation wurden die Wells mit BMDC-Medium aufgefüllt (auf 2 ml/well bei 12-well und auf 200 μl /well bei 96-well) und die Platten im Zellinkubator inkubiert.

Die Infektion der MEFs erfolgte in 6-Well-Platten (1,3 Mio Zellen/Well) oder 10 cm Petrischalen.

2.2.1.11. Infektion mit Listerien

Die verwendeten Ovalbumin-transgenen Listerien stammten vom Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der TU München aus der Arbeitsgruppe von Dr. D. Busch und wurden ursprünglich von H. Shen, University of Pennsylvania Medical School, Philadelphia, PA hergestellt (136).

Die Listerien wurden abends von einer Blutplatte in Hirn-Herz-Medium transferiert und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln wachsen gelassen. Am nächsten Morgen wurde die OD_{600nm} bestimmt. Dabei gilt: OD * 9 * 10⁸ Bakterien/ml. Je nach Dichte wurde ein Teil der Listerien in neues Medium transferiert und für 1 bis 2 Stunden weiter inkubiert.

Die Targets (BMDCs, EL-4) wurden geerntet, gezählt und in Listerien-Medium ohne P/S aufgenommen.

Für Zeitreihen wurden danach 200.000 Zellen/Well in eine 96-U-Platte verteilt und mit 8-fach Listerien (1,6 Mio) in einem Gesamtvolumen von 200 µl infiziert. Als Positivkontrolle wurde 30 ng/ml SIINFEKL verwendet.

Nach 30 Minuten bis 2 h Inkubation im Zellinkubator wurde das Medium abgenommen, 200 µl/Well Listerien-Medium + Gent zugegeben und weitere 45 Minuten bei 37 °C inkubiert. Danach wurde erneut Medium abgenommen und 200 µl/Well BMDC-Medium für 30 Minuten zugegeben.

Die Färbung mit dem H-2 K^b/SIINFEKL spezifischen Antikörper 25.D1-16 erfolgte wie bei einer normalen FACS-Färbung. Als Sekundärantikörper wurde anti-mouse IgG-PE 1:100 in FACS-Puffer verwendet.

Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden die BMDCs entweder direkt auf den Deckgläschen adhärirt (3 Mio Zellen/2ml/12-Well-Platte) und infiziert oder nach Infektion auf Alcian-Blue gecoatete Deckgläschen gegeben (s. Fluoreszenzmikroskopie). Die Infektion erfolgte wie beschrieben, das Gesamtvolumen betrug in den 12-Well-Platten 750 µl.

Die Färbungen erfolgten nach einer der beiden beschriebenen Färbemethoden. Als Antikörper wurden FK2 und biotinylierter rabbit anti-Chicken Ovalbumin verwendet. Als Sekundärantikörper dienten Streptavidin-FITC und anti-mouse IgG Alexa594.

2.2.2. Aufarbeitung von humanen Wundflüssigkeiten und Blutseren

Die Patienten wurden vorab mündlich und schriftlich über die Studie aufgeklärt und haben ihr Einverständnis zur Teilnahme an dem Projekt und zur Weitergabe anonymisierter Daten gegeben.

Die Blutentnahme bei den Patienten erfolgte venös bei der prä- und postoperativen Routineentnahme. Die Drainageflaschen und -beutel, in denen die Wundflüssigkeiten aufgefangen wurden, wurden routinemäßig gewechselt und daraus die Wundflüssigkeiten entnommen, in 50 oder 15 ml Röhrchen aliquotiert und 20 Minuten bei 1800 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden die Wundflüssigkeiten und Seren bis zur Verwendung bei -80 °C eingefroren.

2.2.3. Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Konzentrationsbestimmungen von Proteinlösungen erfolgten mittels Roti-Nanoquant (Roth). Hierfür wurden jeweils 50 µl einer BSA-Standardreihe (0 µg/ml bis 100 µg/ml in ddH₂O) und 50 µl der zu bestimmenden Proben in eine 96-U-Form Platte pipettiert und 200 µl der 1x Roti-Nanoquant-Lösung zugegeben. Nach 5 Minuten Inkubation bei RT wurden die Absorptionen bei 450 nm und 590 nm im ELISA-Reader gemessen und die 590/450-Quotienten der unbekanntenen Proben mit den Werten der Standardreihe korreliert.

2.2.4. Biotinylierung von Proteinen

Vor der Biotinylierung sollte der pH-Wert der zu markierenden Proteinlösung überprüft und bei Bedarf mit 1 M NaHCO₃ auf pH 9 eingestellt werden.

Danach wurde zu dem Protein der 10fache molare Überschuss von frisch in DMSO gelöstem D-Biotinoyl-ε-Aminocaprinsäure-N-Hydroxysuccinimidester (Biotin-7-NHS) gegeben. Dabei sollte das Volumenverhältnis von Biotin-7-NHS zu der Proteinlösung 1:20 sein. Anschließend wurde die Lösung 3 Stunden bei RT im Rotator rotiert. Es folgte eine Dialyse über Nacht bei 4 °C gegen 1 l PBS, wobei das PBS einmal ausgetauscht wurde.

Die fertige Proteinlösung wurde aliquotiert und bei -80 °C gelagert, handelt es sich um einen Antikörper wurde dieser im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt.

2.2.5. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Es wurden 50 µl/Well Capture-Antikörper in ELISA-Bindpuffer (1:500 bzw. 1µg/ml) in eine Maxisorb-Platte (Nunc Maxisorb 442404) pipettiert, diese mit Parafilm versiegelt und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Vor der Zugabe von 200 µl ELISA-Blockinglösung/Well wurde die Antikörperlösung abgekippt. Danach wurde die Platte 1 h bei RT mit der ELISA-Blockinglösung inkubiert. Anschließend wurde die Platte 3x mit je 200 µl/Well ELISA-Waschlösung gewaschen, dann folgte die Zugabe von 100 µl/Well des Standards bzw. der Proben (passend verdünnt in ELISA-Blockinglösung), die für 1,5 Stunden bei RT in der Platte inkubiert wurden. Danach wurde der Überstand abgeschüttet und die Platte 3x mit ELISA-Waschlösung gewaschen, bevor 100 µl/Well des biotinylierten Nachweis-Antikörpers (1:1000 in Blocking Buffer) zugegeben wurden. Es folgte eine Inkubation für 1 Stunde bei RT. Der Überstand wurde abermals verworfen, die Platte 3x mit ELISA-Waschlösung gewaschen, 100 µl/Well HRP-Streptavidin (1:1000 in Blocking Buffer) pipettiert und 30 Minuten bei RT inkubiert. Während dieser Zeit sollte man das ABTS-Substrat (150mg ABTS + 500ml 0.1 M Zitronensäure, pH-Wert mit NaOH auf 4.35 einstellen) bei RT auftauen lassen bzw. TMB auf RT bringen.

Nach 30 Minuten wird die HRP-Streptavidin-Lösung abgeschüttet und die ELISA-Platte 5x mit ELISA-Waschlösung gewaschen.

Zu 11 ml ABTS-Substrat wurden 10 µl 30 % H₂O₂ pipettiert und 100 µl des fertigen Substrats in jedes Well gegeben. Die Farbreaktion zeigte sich in der Regel innerhalb von wenigen Minuten.

Bei Verwendung von TMB wurden 80-100 µl TMB/Well pipettiert und die Reaktion nach ausreichender Farbentwicklung mit gleichem Volumen 2 M H₂SO₄ abstoppt.

Die Messung der OD_{405 nm} für ABTS bzw. OD_{450nm} für TMB erfolgte am Spectra Max 340.

2.2.6. FACS-Färbung

Zuerst wurden 200 µl Zellsuspension pro Well in eine 96-well-Platte mit V-Boden pipettiert. Die Platte wurde in einer Tischzentrifuge zentrifugiert [1500 rpm; 3 Minuten; RT], der Überstand abgeschüttet und die Platte vorsichtig gevortext. Nach Zugabe von 180 µl

FACS-Puffer/Well, wurde die Platte erneut zentrifugiert [1500 rpm, 3 Minuten], der Überstand verworfen und die Platte gevortext.

Für die Färbung wurden die entsprechenden Antikörper und ihre Isotypen (meist 1:200) in FACS-Puffer verdünnt und 50 µl der verdünnten Antikörperlösung pro Well pipettiert. Die Inkubation erfolgte für 30 Minuten im Dunkeln auf Eis. Bei Mehrfachfärbungen sollten für die Kompensation auch Einfachfärbungen gemacht werden.

Nach Zugabe von 150 µl FACS-Puffer/Well, wurde die Platte zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Platte gevortext. Die Zellen wurden noch einmal mit 180 µl FACS-Puffer/Well gewaschen, bevor sie danach in 180 µl FACS-Puffer oder 180 µl 1 % Formaldehyd in PBS resuspendiert und in 0,6 ml FACS-Röhrchen transferiert wurden.

Es folgte die Messung am FACS-Gerät (BD FACScan oder FACSCalibur).

Intrazelluläre Zytokinfärbung:

Für die intrazelluläre Färbung von IL-6 wurden BMDCs 7 h nach Infektion mit mCMV oder Zugabe von TLR-Liganden mit 1 µg/ml Brefeldin A behandelt und weitere 9 h im Zellinkubator inkubiert. Die Assays fanden stets in 96-U-Form-Platten statt mit einem Gesamtvolumen von 200 µl pro Well.

Anschließend wurden die Zellen 3 mal mit je 180 µl/Well PBS gewaschen und die Oberflächenfärbung von CD11c mit anti-Maus CD11c-FITC wie bei einer FACS-Färbung durchgeführt. Nach erneutem Waschen wurden die BMDCs mit Cytofix/Cytoperm (100 µl/Well) permeabilisiert und anschließend intrazellulär mit anti-Maus IL-6-PE und CR103 sowie in einem weiteren Schritt mit anti-Maus IgG-APC gefärbt. Die Verdünnung der Antikörper erfolgte in PWash-Lösung, die Inkubation fand für 30 Minuten bei 4 °C statt.

Nach dem Färben wurden die Zellen 2 mal mit PWash gewaschen bevor sie in 140 µl PBS zur Analyse im FACSCanto aufgenommen wurden.

2.2.7. Fluoreszenzmikroskopie

Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden huDCs und BMDCs entweder direkt auf Glasdeckgläschen (15 mm) in 12-Well-Platten adhärirt und anschließend aktiviert (3 Mio Zellen/ 3 ml), oder sie wurden genau wie nicht-adhärenente Zelllinien in 12- oder 6-Well Platten mit den gewünschten Stimuli behandelt und danach auf frisch mit Alcian-Blue-beschichtete Deckgläschen gegeben (1 Mio Zellen/ 150 µl; 5 Minuten bei 37 °C).

Um die Deckgläschen mit Alcian-Blue zu beschichten, wurde eine 1 % Alcian-Blue Lösung in ddH₂O angesetzt und die Deckgläschen in einer 12-Well-Platte mit 1 ml der Lösung für 10 Minuten bei RT stehen gelassen. Anschließend wurden die Deckgläser zweimal mit ddH₂O gewaschen, in neue Wells umgesetzt und mit der Zellsuspension überschichtet.

Für die Färbungen wurden nach Bedarf zwei verschiedene Permeabilisierungs- und Fixierungsmethoden verwendet:

1. Cytofix/Cytoperm-Methode

Die Zellüberstände wurden nach dem Adhärenzschritt abpipettiert und die Deckgläschen in der 12-Well-Platte zweimal mit je 1 ml PWash (PBS + 0,5 % BSA + 0,1 % Saponin) gewaschen. Nach dem Transfer in neue Wells wurden 100 µl Cytofix/Cytoperm (BD Pharmingen) pro Deckglas aufgetragen und 20 Minuten bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Gläser zweimal mit je 1 ml PWash gewaschen. Die Zugabe von 50 µl der in PWash verdünnten Antikörper erfolgte nach dem Umsetzen in neue Wells. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 4 °C wurde erneut gewaschen bevor die ebenfalls in PWash verdünnten Sekundärantikörper zugegeben wurden. Nach einer weiteren Inkubation von 30 Minuten bei 4 °C im Dunkeln wurden die Präparate dreimal gewaschen bevor sie mit einem Tropfen Vectashield auf vorbereitete Objektträger gebracht wurden. In einigen Fällen folgte vorher eine Inkubation mit DAPI (1:40.000 in PBS) zur Färbung des Zellkerns. Zur Fixierung und Versiegelung der Deckgläschen auf den Objektträgern wurde Nagelklarlack verwendet.

2. Triton-Methode

Diese Methode funktionierte nur bei Verwendung von Alcian-Blue beschichtete Deckgläschen. Ließ man die Zellen auf unbehandelten Deckgläschen adhären, gingen sie bei der Behandlung verloren.

Bei dieser Methode wurden die Zellen auf den Deckgläschen für 5 Minuten bei 4 °C mit 100 µl 1 % Triton X100 in PBS behandelt bevor sie mit 100 µl 3 % Paraformaldehyd in PBS fixiert wurden. Die Fixierung erfolgte für 10 Minuten bei RT.

Anschließend folgten die Färbungen. Das Prozedere gleicht dem der Cytofix-Methode, allerdings wurden die Antikörper in FACS-Puffer verdünnt und für die Waschschrte wurde PBS verwendet.

Die Auswertung der Präparate erfolgte entweder an einem Konfokalen Mikroskop (Zeiss LSM 510) oder an einem Fluoreszenzmikroskop (Olympus Cell^R System).

2.2.8. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE ist ein Verfahren zum Auftrennen von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Die Proteine werden durch Hitzebehandlung und das anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) entfaltet, zusätzlich spaltet β -Mercaptoethanol die in den Proteinen vorhandenen Disulfidbrücken und denaturiert sie vollständig. Die Anzahl der an die Proteine gebundenen SDS-Moleküle ist proportional zu deren Molekulargewichten und die negative Ladung der SDS-Moleküle überlagert ihre Eigenladung, wodurch im elektrischen Feld eine Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht möglich wird.

Bei den in dieser Arbeit verwendeten SDS-PAGE-Gelen handelte es sich um zweischichtige Minigele bestehend aus einem oben liegenden Sammel- und einem darunter liegenden Trenngel.

Sammelgel: 0,12 M Tris (pH 6,8), 0,1 % SDS, 4 % Acrylamid/Bisacrylamid 29:1, 0,05 % Ammoniumpersulfat, 0,1 % TEMED

Trenngel: 0,38 M Tris (pH 8,6), 0,1 % SDS, 10 % Acrylamid/Bisacrylamid 29:1, 0,05 % Ammoniumpersulfat, 0,1 % TEMED

Die aufzutrennenden Proteinlösungen wurden 1:1 mit 2-fach SDS-Ladepuffer gemischt und 5 Minuten bei 95 °C erhitzt bevor sie in die Geltaschen geladen wurden. Die Gelelektrophorese fand in SDS-Laufpuffer bei einer Spannung von 120 V statt und wurde abgestoppt, wenn die blaugefärbte Lauffront das Gelende erreicht hatte.

2.2.9. Western Blot

Es gibt verschiedene Varianten des Western-Blotting. Das in dieser Arbeit angewandte Verfahren ist das so genannte Semi-Dry-Blotting, bei dem die im SDS-PAGE aufgetrennten und zu Banden fokussierten Proteine über eine senkrecht zum Gel angelegte Spannung auf eine Nitrozellulosemembran übertragen werden. Anschließend erfolgt die Detektion über proteinspezifische Antikörper und Enzym-gekoppelte Sekundärantikörper.

Zunächst wurde die Nitrocellulose-Membran (Amersham Pharmacia Biotech; Hybond ECL RPN303D) in ddH₂O gelegt und von den 8 zugeschnittenen Whatman-Papieren (Whatman 3030 917) vier in Anodenpuffer und die anderen vier in Kathodenpuffer kurz einweicht. Von unten nach oben wurden auf die Graphitelektrode der Blot-Apparatur geschichtet: Whatman-Papiere in Anodenpuffer, Nitrocellulose-Membran, das Polyacrylamidgel, Whatman-Papiere in Kathodenpuffer.

Die Apparatur wurde anschließend mit 1-2 kg beschwert. Der Transfer erfolgte 3 h bei 1 mA/cm² Gel oder über Nacht bei 20-25 mA pro Gel.

Um unspezifische Bindungsstellen in der Membran zu blockieren, wurde diese nach dem Transfer für 1 Stunde in 50 ml TBB geschwenkt. Dann folgte eine zweistündige Inkubation in 50 ml Primärantikörper-Lösung (1 µg/ml AK (ca. 1:1000) in TBB; mehrfach verwendbar). Anschließend wurde die Membran 3x 5 Minuten in je 50 ml TWB gewaschen bevor sie für 1 h in 50 ml Sekundärantikörper-Lösung (HRP-konjugiert; 1:5000 in TBB; ca. 0,1 µg/ml) geschwenkt wurde. Es folgten mehrere Waschschrte: 1x 5 Minuten in 50 ml TBS, dann 3x je 10 Minuten in 50 ml TWB und 1 x 5 Minuten in 50 ml TBS.

Zur Detektion wurde die Membran mit 1,5 ml ECL-Substrat für 3 Minuten im Dunkeln inkubiert und dann sofort am Image Reader (Fujifilm LAS1000 oder BioRad ChemiDoc XRS) gemessen.

2.2.10. Detektion von Gp96 in humanen Wundflüssigkeiten

Um das Hitzeschockprotein Gp96 in Wundflüssigkeiten nachzuweisen wurde eine Gp96-Immunpräzipitation (Gp96-IP) etabliert. Die Detektion erfolgte über SDS-PAGE und Western Blot.

Zunächst wurden die WF vorgereinigt. Hierzu wurden 500 µl BSA-Sepharose in ein 1,5 ml Eppendorf-Cup pipettiert und 3 mal mit je 1 ml PBS gewaschen. Bei der BSA-Sepharose handelte es sich um CNBr-aktivierte Sepharose 4B (Pharmacia Biotech 17-0430-01), die nach Anleitung des Herstellers mit BSA (Sigma A3059) abgesättigt wurde (2g Sepharose, 60 mg BSA; Aufbewahrung in 50 ml PBS + 0.02% Azid im Kühlschrank).

Zu der gewaschenen BSA-Sepharose wurden 500 µl WF bzw. Serum + 500 µl PBS gegeben und die Ansätze 2 h bei RT im Rotator rotiert. Danach wurden die Proben kurz in der Mikrofuge abzentrifugiert, die Überstände zu 250 µl/Ansatz gewaschener (s. o.) B10C-Sepharose gegeben und 2,5 h bei RT rotiert.

Die B10C-Sepharose wurde wie folgt hergestellt: 5 mg B10C-Antikörper (P.Terness; Heidelberg; 2,5mg/ml) wurden nach Anleitung des Herstellers an 1,5 g CNBr-aktivierte Sepharose 4B gebunden. Die Aufbewahrung erfolgte in 50 ml PBS + 0.02 % Azid im Kühlschrank.

Nach erneutem Abzentrifugieren wurden die Pellets 3 mal mit je 1 ml PBS gewaschen bevor für die SDS-PAGE 50 µl 2fach SDS-Ladepuffer zu den Sepharose-Pellets gegeben wurde. Vor dem Auftrag auf das SDS-Gel wurden sämtliche Proben ebenso wie vorbereiteter Gp96-Standard (Immatics) 5 Minuten bei 95 °C im Thermomixer unter leichtem Schütteln erhitzt. Die nachfolgende Gelelektrophorese wurde wie unter 2.7. SDS-PAGE beschrieben durchgeführt. Der anschließende Gp96-Western Blot (Methode siehe 2.2.9. Western Blot) wurde mit 50 ml pro Membran anti-GP96 Antikörper SPA-850 (Stressgen; 1 µg/ml in TBB) als Primär- und HRP-konjugiertem goat anti-rat IgG (sc2006; Santa Cruz Biotechnology; 0,08 µg/ml in TBB) als Sekundärintikörper durchgeführt.

2.2.11. Immunpräzipitation

Für Influenza-Immunpräzipitationen (NP-IP) wurden 3×10^6 BMDCs mit 1 PFU/Zelle infiziert oder mit 1 µg/ml LPS aktiviert. Nach 11 h wurden die Zellen geerntet und zweimal mit PBS gewaschen bevor sie in PBS + 1 Tablette „Complete Protease Inhibitors“ (Roche) für die Lyse aufgenommen wurden. Die Zell-Lyse wurde mittels Einfrieren und Auftauen durchgeführt. Nach fünfmaligem Wechsel zwischen flüssigem Stickstoff und 37 °C wurden die lysierten Zellen abzentrifugiert (12000 x g; 5 Minuten), anschließend die Überstände in neue 1,5 ml Eppendorfcups überführt und 8 µg anti-Influenza Antikörper (Klon N3F3; Oliver Planz) zugegeben. Nach 2 Stunden rotieren wurden zusätzlich 100 µl Protein A Sepharose zugegeben und eine weitere Stunde inkubiert. Danach wurde die Sepharose dreimal mit PBS gewaschen bevor sie in SDS-Ladepuffer aufgenommen und einer Gelelektrophorese unterzogen wurde. Es folgte ein Western Blot entweder mit anti-Influenza NP Antikörper (Klon N1A4, Oliver Planz) oder mit FK2 als Primärintikörper.

Für die FK2-Immunpräzipitation (FK2-IP) wurden 10×10^6 BMDCs wie oben beschrieben behandelt. Nach 11 Stunden Inkubation und zweimaligem Waschen mit PBS wurde die Zell-Lyse mit Triton-Lysepuffer (20 mM Tris/HCL (pH 7,4), 1 % Triton X-100, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM NaCl) durchgeführt. Nach 20 Minuten bei 4 °C wurden die lysierten Zellen abzentrifugiert (12000 x g; 10 Minuten) und die Pellets in PBS + 1 Tablette „Complete Protease Inhibitors“ (Roche) aufgenommen vor Zugabe von 5 µg biotinyliertem FK2

Antikörper. Nach 1,5 Stunden Inkubation bei 4 °C wurden 10 µl MACS Streptavidin-Microbeads (Miltenyi Biotec GmbH) zugegeben und die Immunpräzipitation nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Nach Aufnahme der Pellets in SDS-Ladepuffer folgte eine SDS-PAGE und ein Western Blot mit anti-Influenza NP Antikörper (J. Yewdell).

**"In bunten Bildern wenig Klarheit,
Viel Irrtum und ein Fünkchen Wahrheit,..."**

Aus Goethes "Faust", Vers 171 und 172

3. Ergebnisse

3.1. Hitzeschockproteine in humanen Wundflüssigkeiten (WF)

3.1.1. Entwicklung eines Nachweisverfahrens für Hsp70

Für die Detektion von Hsp70 in Wundflüssigkeiten stand zwar ein käuflicher ELISA-Kit der Firma StressGen zur Verfügung, dennoch sollte aus Kostengründen versucht werden, einen funktionsfähigen Hsp70 ELISA aus käuflichen Antikörpern zu etablieren. Hierfür wurden die ELISA-geeigneten Antikörper SPA-810 und SPA-812 von StressGen verwendet. Beide Antikörper waren spezifisch für humanes Hsp70 und erkannten kein Hsc70. Während es sich bei SPA-810 um einen monoklonalen Antikörper handelte, dessen Epitop die Aminosäuren 436 bis 503 des Proteins umfassten, handelte es sich bei SPA-812 um ein polyklonales Kaninchenserum.

SPA-810 wurde immer als Binde-(Capture)-Antikörper eingesetzt, SPA-812 stets als Detektionsantikörper.

Zunächst wurde der Antikörper SPA-810 in einer Konzentration von 2 µg/ml in Carbonatbindepuffer (0,1 M NaHCO₃) oder Phosphatbindepuffer (0,1 M Na₂HPO₄) mit einem pH-Wert von pH 9,1-9,5 auf eine Maxisorb-ELISA-Platte (Nunc) über Nacht bei 4 °C gecoatet. Der folgende ELISA wurde, wie unter Methoden beschrieben, durchgeführt. Als Standard wurde aufgereinigtes Hsp70 (StressGen NSP-555) verwendet und in Blockinglösung (PBS, 0,05 % Tween-20, 1 % BSA) mit oder ohne 0,02 % Azid bzw. in dem als „Sample Diluent“ bezeichneten Puffer des Hsp70 ELISA-Kits (StressGen; EKS-700) verdünnt. Als Kontrolle wurde zudem Hsp70-Standard aus dem Kit in Blockinglösung ohne Azid verwendet. Als Zweitantikörper wurde das polyklonale Antikörperserum SPA-812 in einer Verdünnung von 1:1000 in Blockinglösung +/- Azid eingesetzt. Die Detektion erfolgte über einen monoklonalen anti-Kaninchen Ig-HRP (Klon RG-16; Sigma A2074), der 1:2000 in Blockinglösung +/- Azid verdünnt wurde. Als Substrate dienten ABTS und TMB.

Dementsprechend erfolgte die Messung der Optischen Dichte (OD) bei 405 nm für ABTS bzw. 450 nm für TMB (Abb. 3.1.).

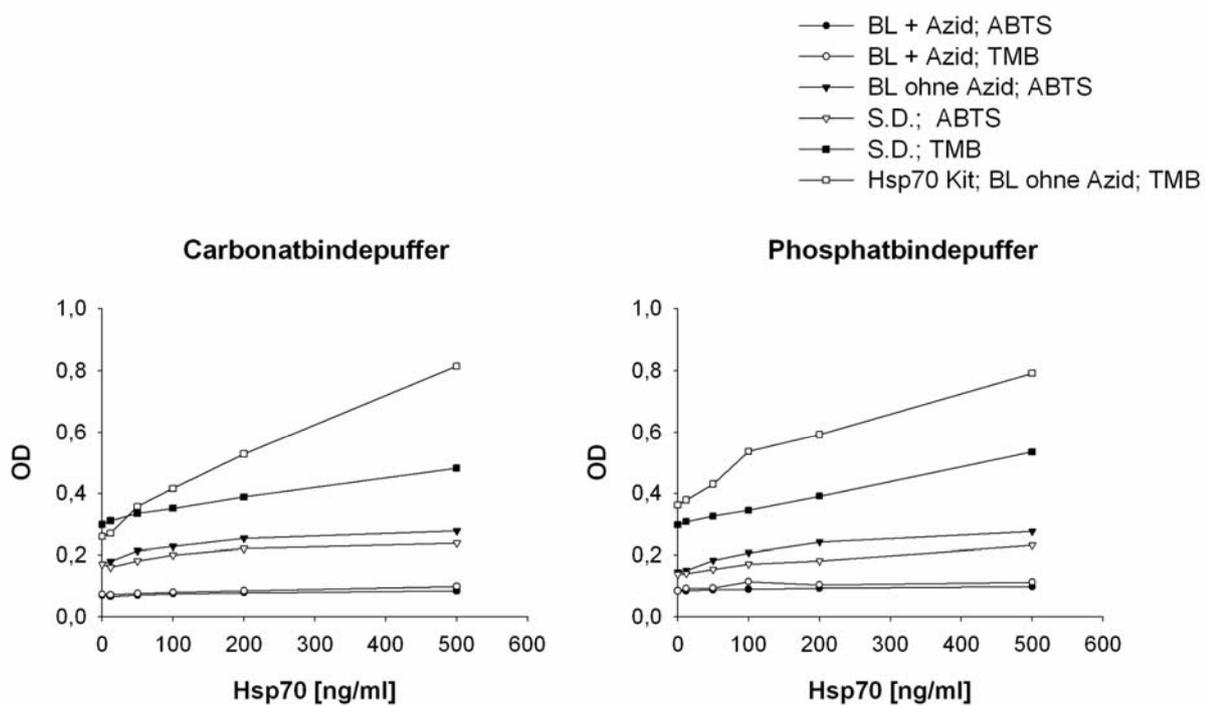


Abb. 3.1.: Test verschiedener Hsp70 ELISA-Bedingungen

Mit dem Antikörper SPA-810 als Binde- und SPA-812 als Detektionsantikörper wurden verschiedene ELISA-Bedingungen ausgetestet. Als Standard wurde aufgereinigtes Hsp70 Nsp-555 oder aus dem Hsp70 ELISA-Kit EKS-700 verwendet.

Es zeigte sich, dass Azid in der Blockinglösung (BL) in jedem Fall die Sensitivität des ELISAs negativ beeinträchtigte (Abb. 3.1.). Die Steigungen der Hsp70-Standards waren mit TMB als Substrat höher als mit ABTS (Abb. 3.1.). Daher ist trotz höherer Hintergrundwerte der Einsatz von TMB dem von ABTS vorzuziehen. Interessanterweise war das Hsp70 aus dem ELISA-Kit als Standard besser geeignet als das separat gekaufte Hsp70 NSP-555. Zwischen der Verwendung von Carbonat- und Phosphatpuffer gab es keine großen Unterschiede (Abb. 3.1.).

In einem weiteren Versuch wurde SPA-812 biotinyliert, um wie in einem Standard-ELISA HRP-Streptavidin statt eines Sekundärantikörpers verwenden zu können. Hier war der Hintergrund jedoch so stark, dass weiterhin unbiotinylierter Antikörper eingesetzt wurde (Daten nicht gezeigt).

Der Einsatz eines alternativen Sekundärantikörpers (F(ab)₂ Fragment eines anti-Kaninchen IgG-HRP von Amersham (NA9340)) statt des Sigma Antikörpers (A2074) zeigte eine

wesentlich stärkere Steigung für NA9340 (Abb. 3.2.), daher wurde der neue Sekundärantikörper für die folgenden Versuche verwendet. Der gesamte Assay wurde mit Blockinglösung ohne Azid, NSP-555 als Hsp70-Standard und TMB als Substrat durchgeführt. SPA-810 wurde mit Carbonatpuffer auf die ELISA-Platte gebunden.

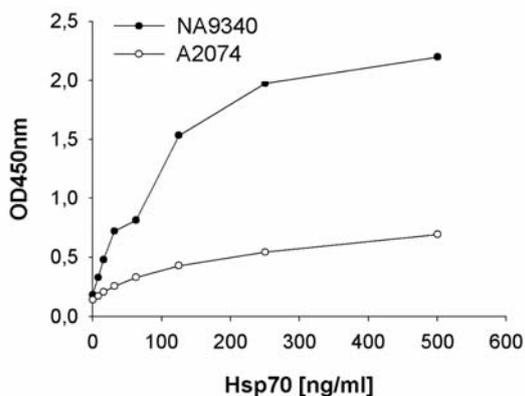


Abb. 3.2.: Test zweier Sekundär-AKs im Hsp70 ELISA
Der Hsp70 ELISA wurde mit SPA-810 als Binde- und SPA-812 als Detektionsantikörper durchgeführt. Als Standard wurde Hsp70 NSP-555 in Blockinglösung ohne Azid verwendet. Als Substrat diente TMB.

Im nächsten Schritt wurden Wundflüssigkeiten auf Hsp70 untersucht. Hierbei wurden die Proben von Patient P4 und Patient P6 sowohl im Hsp70 ELISA-Kit wie auch zweimal im neu etablierten Hsp70 ELISA mit SPA-810 und SPA-812 untersucht (Abb. 3.3.). Als Sekundärantikörper wurde NA9340 (1:1000 in Blockinglösung ohne Azid) verwendet, als Substrat diente TMB. Für die Proben wurden verschiedene Verdünnungen zwischen 1:5 und 1:30 ausprobiert. Bei dem Hsp70 ELISA-Kit wurde den Anweisungen des Herstellers gefolgt, dabei wurden die Proben 1:30 im mitgelieferten Sample Diluent verdünnt.

Es stellte sich heraus, dass der Hintergrund im ELISA-Kit wesentlich niedriger ist als im SPA-810/SPA-812 ELISA, die Steigungen der Standardgeraden waren jedoch vergleichbar (Abb. 3.3. a). Bei den Untersuchungen der Wundflüssigkeiten zeigte sich der ELISA-Kit wesentlich sensitiver in den Ergebnissen. Die ermittelten Hsp70-Konzentrationen in den Wundflüssigkeiten der Patienten P4 und P6 lagen im ELISA-Kit um den Faktor 40 bis 60 höher als im SPA-810/SPA-812 ELISA (Abb. 3.3. b).

Da die erzielten Ergebnisse mit dem Hsp70 ELISA-Kit wesentlich besser und reproduzierbarer waren, wurden die folgenden Untersuchungen der Wundflüssigkeiten und Patientenseren mit dem ELISA-Kit durchgeführt.

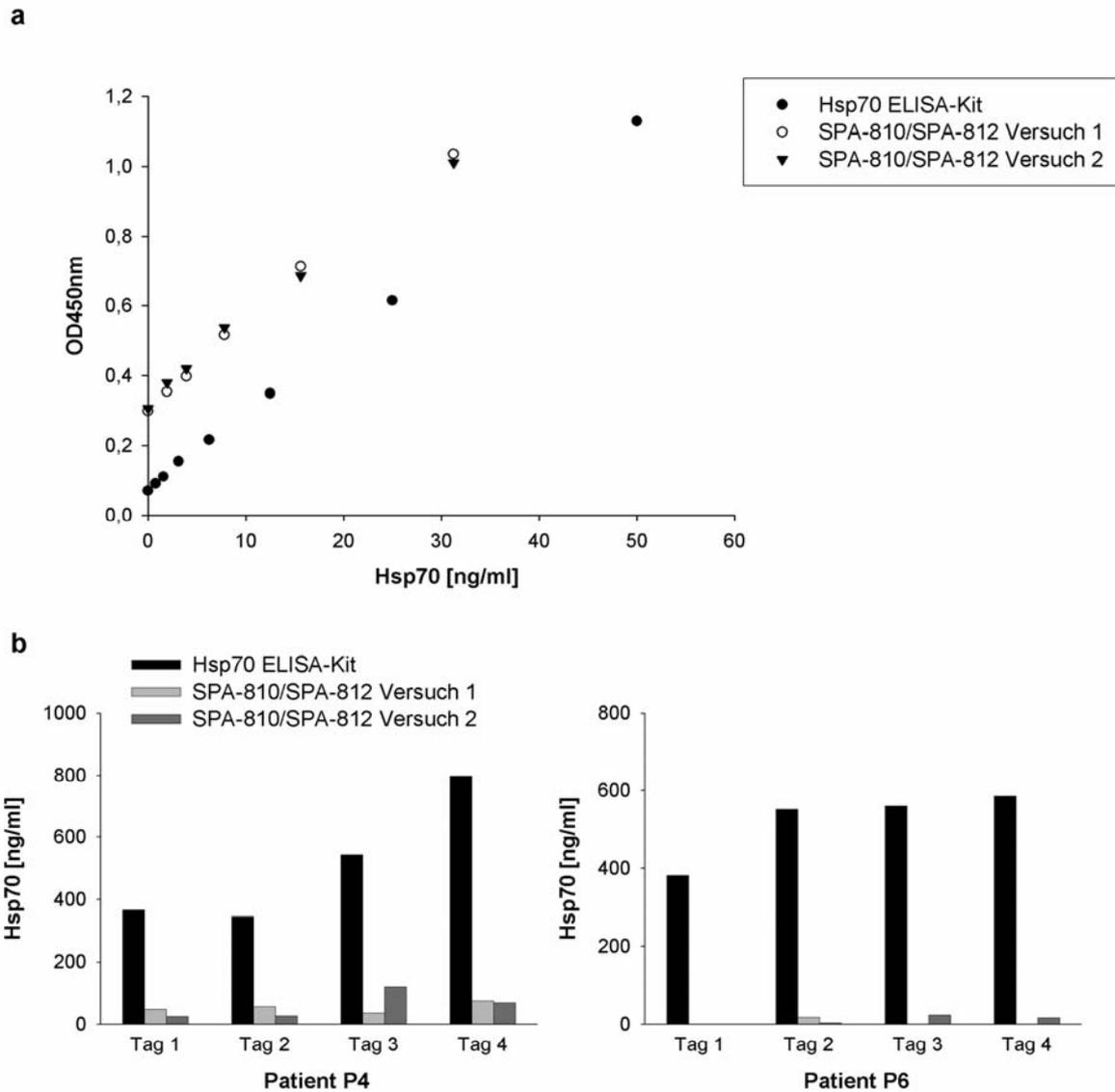


Abb. 3.3.: Hsp70 ELISA mit Wundflüssigkeiten

Im Vergleich wurden der optimierte Hsp70 ELISA und der ELISA-Kit getestet.

a) zeigt die Hsp70 Standardkurven der abgebildeten Versuche,

b) zeigt die Hsp70 Konzentrationen in den Wundflüssigkeiten zweier Patienten, die mit dem fertigen ELISA-Kit oder dem selbst zusammengestellten Hsp70 ELISA ermittelt wurden.

3.1.2. Entwicklung eines Nachweisverfahrens für Gp96

Im ersten Themenblock ging es um die Detektion von Gp96 und Hsp70 in humanen Wundflüssigkeiten. Während für die Erkennung von Hsp70 der käufliche ELISA-Kit verwendet werden konnte, musste für die Detektion von Gp96 erst ein geeignetes Verfahren entwickelt werden.

Schon während meiner Diplomarbeit zeigte sich, dass es mit den momentan erhältlichen Antikörpern nicht möglich war, einen entsprechenden Sandwich-ELISA zu etablieren. Daher wurde ein Verfahren bestehend aus Immunpräzipitation mit anschließendem anti-Gp96 Western Blot für die Detektion des Glykoproteins entwickelt.

Hierfür wurden 5 µg aufgereinigtes Gp96, 500 µl Wundflüssigkeit (WF), PBS, oder Wundflüssigkeit mit 5 µg zugegeben Gp96-Protein nach Verdünnung mit 500 µl PBS einer zweistündigen Vorreinigung mit BSA-Sepharose unterzogen, bevor eine spezifische Gp96-Immunpräzipitation folgte.

Dazu wurden zu jedem vorgereinigten Überstand 250 µl so genannte B10C-Sepharose gegeben. Hierbei handelte es sich um CNBr-aktivierte Sepharose an die der anti-Gp96 Antikörper B10C gekoppelt wurde. Nach 2,5 Stunden Koinkubation bei RT wurden die Überstände, die kein Gp96 mehr enthalten sollten, verworfen und die Pellets dreimal gründlich mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Proben in 50 µl SDS-Ladepuffer auf 95 °C erhitzt bevor sie auf ein 10 % SDS-Gel aufgetragen wurden. Es folgte eine Gelelektrophorese mit anschließendem Western Blot gegen Gp96. Als Primärantikörper dienten der anti-Gp96-Antikörper SPA-850 (Abb. 3.4. links) sowie ein Kontroll-Ratten-IgG (Abb. 3.4. rechts), als Sekundärantikörper wurde ein anti-rat IgG-HRP verwendet.

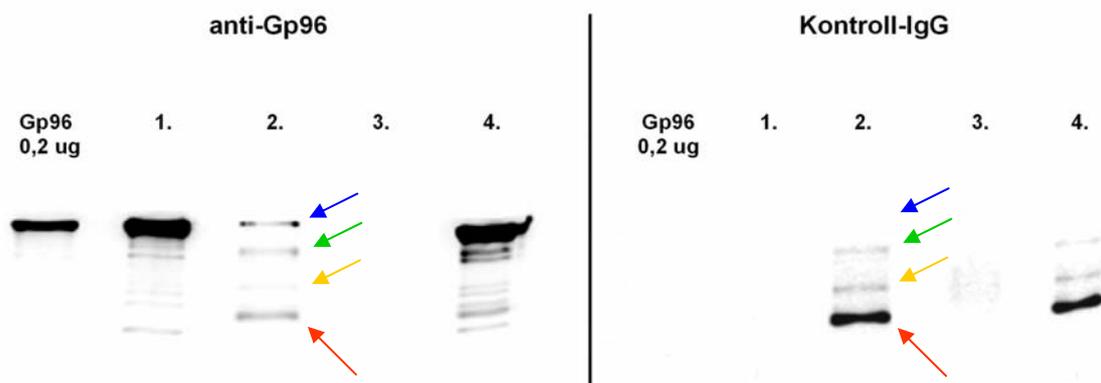


Abb. 3.4.: Detektion von Gp96

Als Positivkontrolle wurden 0,2 µg Gp96 aufgetragen. Bei den Proben handelte es sich um Gp96 (1.), WF (2.), PBS (3.) sowie WF + Gp96 (4.).

Der blaue Pfeil markiert detektiertes Gp96 in der WF-Probe, die anderen drei Pfeile zeigen unspezifische Banden, die auch im Kontroll-Blot aufgetreten sind.

Wie Abb. 3.4. zeigt, eignet sich das Verfahren zur spezifischen Detektion von Gp96 in Wundflüssigkeiten und wurde daher für alle weiteren Analysen angewandt.

3.1.3. Detektion von Hsp70 und Gp96 in humanen Wundflüssigkeiten

Ziel des Projektes war es herauszufinden, ob die Anwesenheit und Konzentration von Gp96 und Hsp70 in Wundflüssigkeiten mit dem Wundheilungsprozess korrelieren.

Hierzu wurden zunächst Wundflüssigkeiten und Blutseren von Patienten über einen Zeitraum von mehreren Tagen gesammelt. Es handelte sich hierbei um Proben von elektiven Eingriffen sowie traumatischen und chronisch/septischen Wunden.

Die Detektion von Hsp70 erfolgte mittels eines käuflichen Hsp70-ELISA-Kits der Firma StressGen und wurde nach Anleitung des Herstellers durchgeführt, die WF-Proben wurden hierzu 1:25, die Seren 1:2 in mitgeliefertem Probenpuffer verdünnt.

Die Konzentration des Hitzeschockprotein Gp96 wurde mit Hilfe des selbst entwickelten Detektionsverfahrens über Gp96-IP und Western Blot ermittelt. Als Standard wurden Gp96-Verdünnungsreihen verwendet mit 25 ng, 50 ng, 100 ng und 250 ng Protein.

Die Wundflüssigkeiten wurden bei den Patienten über Drainagen abgeleitet und einmal täglich eingesammelt. Die Proben wurden bei 1800 rpm für 20 Minuten abzentrifugiert und anschließend die Überstände bis zur Verwendung bei -80 °C eingefroren.

Insgesamt wurden 26 Proben von Elektivpatienten (Endo), 10 Proben von Patienten mit traumatischen Wunden (Trauma) sowie 7 Proben von Patienten mit chronischen/septischen Wunden (Chronisch) untersucht. Sowohl für Gp96 als auch Hsp70 ließen sich für die drei Patientenkollektive unterschiedliche Konzentrationsverläufe feststellen.

Während die Konzentration von Hsp70 in den Wundflüssigkeiten frischer Operationswunden von Tag 1 bis 4 nach der Operation stetig zunahm, fiel sie in den Wundflüssigkeiten der meisten traumatisierten Patienten bzw. zeigte sich unverändert in den Wundflüssigkeiten septischer Wunden. Anders verhielt es sich für Gp96. Sowohl in den Wundflüssigkeiten, die von Operationswunden stammten, als auch in den Wundflüssigkeiten von Trauma-Patienten, konnte man in den meisten Fällen eine Abnahme der Gp96-Konzentration über drei bis fünf Tage feststellen. Wundflüssigkeiten von septischen Wunden dagegen wiesen genau wie für Hsp70 über einen Zeitraum bis zu 14 Tagen keine Veränderung der Gp96-Konzentration, die unverändert 3-10 fach über der Gp96-Serumkonzentration lag, auf.

In den Seren aller Patientenkategorien konnten Hsp70 und Gp96 nachgewiesen werden, allerdings in wesentlich niedrigeren Konzentrationen als in Wundflüssigkeiten und ohne erkennbare Konzentrationsverläufe während der Wundheilung. Abb. 3.5. zeigt exemplarisch typische Konzentrationsverläufe anhand von drei repräsentativen Patienten aus jeder der drei Kategorien.

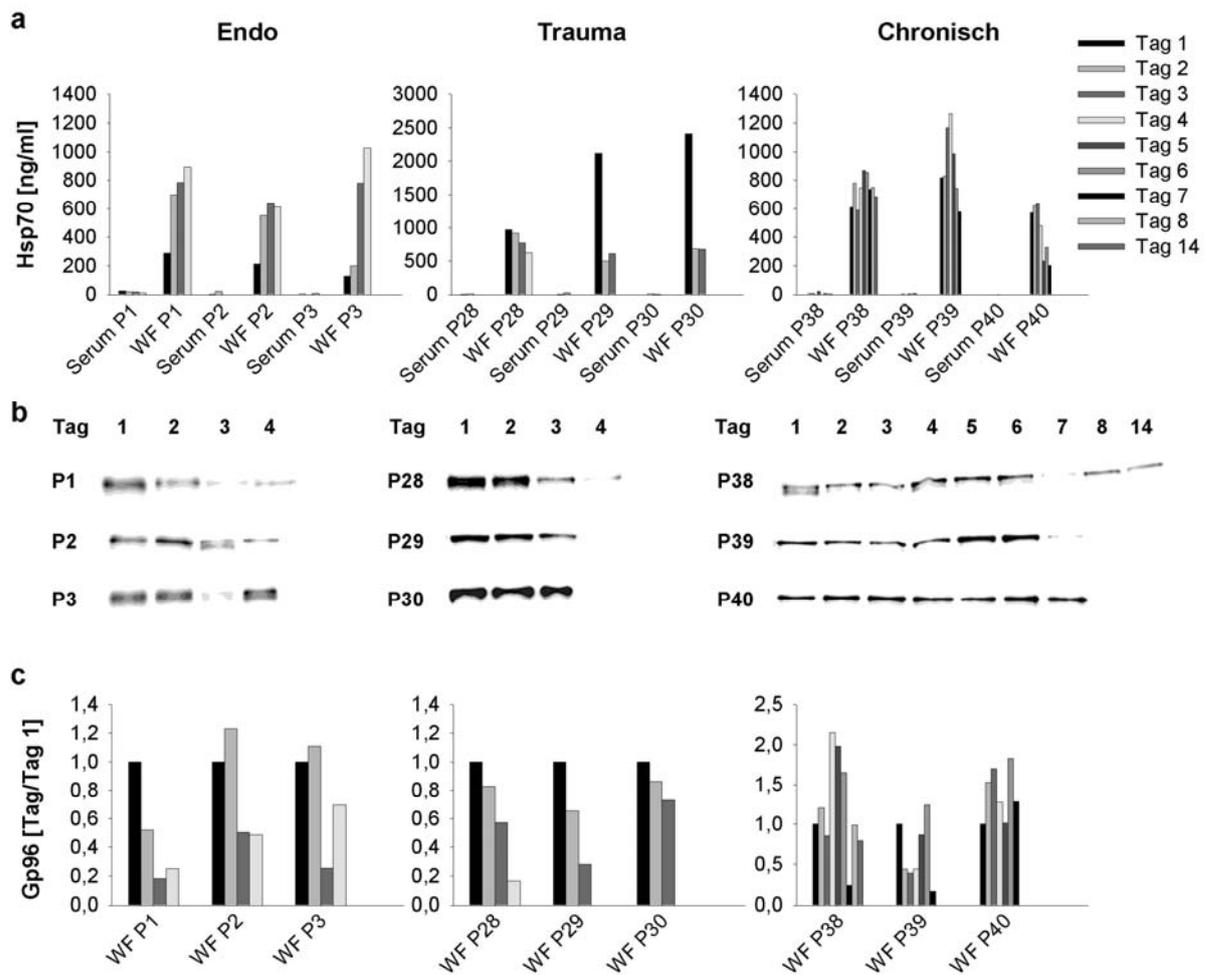


Abb. 3.5.: Hsp70 und Gp96 in humanen Wundflüssigkeiten

Wundflüssigkeiten und Seren aus den drei Patientenkategorien wurden mittels Hsp70-ELISA untersucht und die Hsp70-Konzentrationsverläufe dargestellt (a). Gp96-Western Blots mit den Wundflüssigkeiten der selben Patienten (b) ergeben nach Quantifizierung der Signalstärken und Normierung nach Tag 1 die abgebildeten Gp96-Konzentrationsverläufe (c).

Zusätzlich wurden die Gesamtproteinkonzentrationen der einzelnen Wundflüssigkeiten mit Hilfe des Proteinbestimmungsassays Roti-Nanoquant ermittelt. Die erhaltenen Werte lagen zwischen 23 mg/ml und 36 mg/ml.

Verlaufskurven, die sich aus dem Verhältnis von Hsp70 zu der Gesamtproteinkonzentration ergeben, entsprechen in der Regel dem Konzentrationsverlauf des Hitzeschockproteins (Abb. 3.6.).

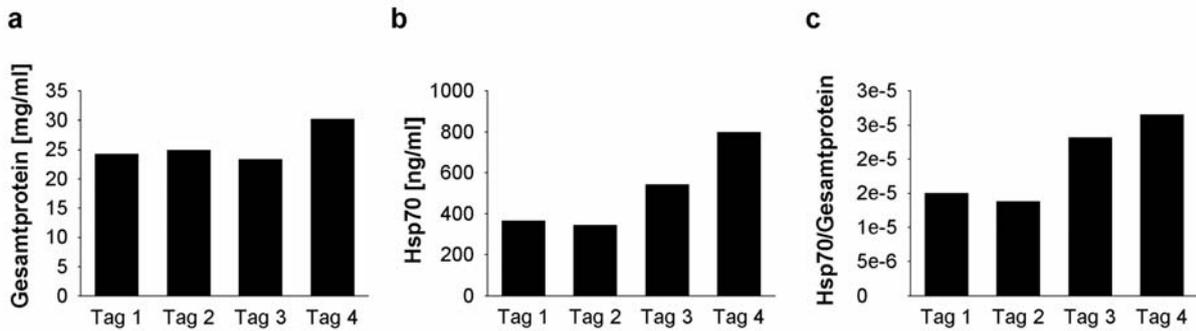


Abb. 3.6.: Vergleich der Verlaufskurven von Hsp70

Dargestellt sind der Gesamtproteingehalt (a), die Hsp70-Konzentration (b) sowie das Verhältnis der Hsp70 Konzentration zum Gesamtproteingehalt (c) für die Wundflüssigkeiten von Patient P4.

3.1.4. Wirkung von Hsp70 und WF auf humane Granulozyten

Es konnte bereits gezeigt werden, dass das Hitzeschockprotein Gp96 spezifisch an PMN (polymorphonuclear neutrophiles) und Monozyten bindet und die IL-8 Produktion sowie die Phagozytose-Funktion dieser Zellen aktiviert¹⁰⁴.

Nachdem außer Gp96 auch Hsp70 in den Wundflüssigkeiten gefunden wurde, wurde zunächst die Wirkung von gereinigtem Hsp70 auf die Phagozytose-Aktivität humaner Granulozyten untersucht.

Die Zellen wurden aus frischem, heparinisiertem Blut von gesunden freiwilligen Spendern mittels einer Dichtezentrifugation mit Polymorphprep isoliert, wie unter Methoden beschrieben.

Die erhaltenen Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen von Hsp70 (StressGen) sowie als Positivkontrolle mit 0,5 µg/ml LPS behandelt und die Phagozytose von PE-markierten Mikrosphären im FACS-Gerät gemessen. Dabei zeigte sich, dass Hsp70 zu einer Stimulation der Phagozytose-Aktivität der Zellen führt (Abb. 3.7.).

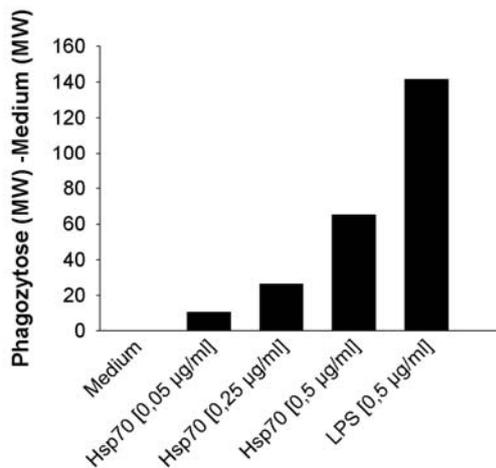


Abb. 3.7.: Phagozytose von PE-markierten Polystyrene Beads durch humane PMN

2×10^5 PMN wurden mit den angegebenen Stimuli behandelt und nach 2 Stunden Inkubationszeit die Phagozytose von Polystyrene Beads im FACS analysiert.

Um auszuschließen, dass es sich bei diesem Effekt um die Wirkung von kontaminierenden Lipopolysacchariden in den verwendeten Hsp70-Präparationen handelte, wurde der Endotoxingehalt der Proben mit Hilfe eines Limulus Amöbozyten Assays (LAL Assay) ermittelt. Dabei erwiesen sich die Proben als Endotoxin-frei.

Die Wirkung von Wundflüssigkeiten und Seren wurden daraufhin im gleichen System untersucht und die isolierten PMN mit 5 µl Wundflüssigkeit oder Serum verschiedener Patienten behandelt.

In allen Fällen stimulierte die Zugabe der Proben die Phagozytoseaktivität der Zellen, ein Unterschied zwischen den Wundflüssigkeiten und den Seren konnte nicht festgestellt werden (Abb. 3.8.).

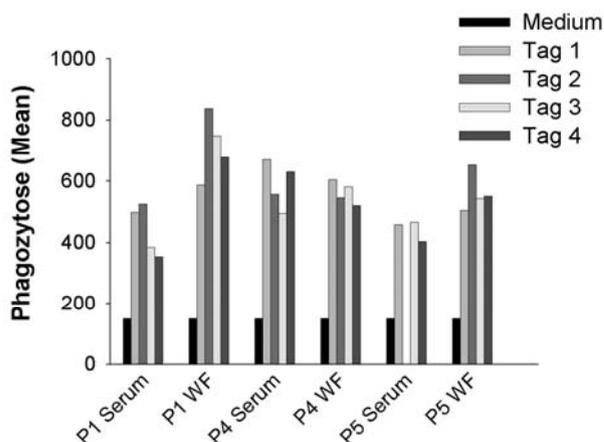


Abb. 3.8.: Phagozytoseassay mit WF- oder Serum-behandelten PMN

2×10^5 PMN wurden mit je 5 µl WF oder Serum wie angegeben behandelt, 2 Stunden im Beisein von PE-markierten Polystyrene Beads inkubiert und anschließend im FACS die Fluoreszenz gemessen. Medium diente als Negativkontrolle, diese Zellen blieben unstimuliert.

3.1.5. Wirkung von WF auf humane Dendritische Zellen

Nachdem die Hitzeschockproteine Gp96 und Hsp70 in Wundflüssigkeiten nachgewiesen werden konnten, sollte als nächstes die Wirkung der WF auf humane Dendritische Zellen untersucht werden. Hierfür wurden DCs aus Monozyten, wie unter Methoden beschrieben, differenziert. Die resultierenden unreifen DCs wurden an Tag 6 nach der Präparation für die Aktivierungen verwendet und waren zu diesem Zeitpunkt CD14 und CD83 negativ. Zellen, deren Differenzierungsmedium humanes Serum enthielt waren zudem CD1a negativ, Zellen, die ohne Serum herangezogen wurden, exprimierten den Oberflächenmarker CD1a.

Da diese beiden Zellsubtypen unterschiedliches Verhalten beim Aktivieren zeigten, wurden in den folgenden Versuchen beide Subtypen verwendet. Prinzipiell ließen sich CD1a⁺ huDCs schlecht mit LPS, Gp96 oder anderen TLR-Stimuli (Abb. 3.9. a; c) aktivieren. Im Gegensatz dazu reagierten CD1a⁻ huDCs auf die Zugabe der genannten Stimuli mit Hochregulation ihrer kostimulatorischen Oberflächenmoleküle (CD80 und CD86) und Expression von Zytokinen (z.B. TNF- α). Die Zugabe von Wundflüssigkeiten induzierte dagegen bei keiner der beiden Subpopulationen eine Zellreifung.

Gleichzeitige Stimulation der Zellen mit LPS und WF führte bei CD1a⁻ huDCs mit steigender WF-Konzentration zu einer Inhibierung der Aktivierung gemessen an der Expression von CD80 und CD86 (Abb. 3.9. b) sowie TNF- α (Abb. 3.9. c), während die Aktivierung von CD1a⁺ huDCs durch Zugabe von WF verstärkt wurde (Abb. 3.9. a; c). Es zeigte sich jedoch, dass diese Verstärkung ebenfalls durch Zugabe von humanem Serum sowohl von den Patienten als auch von gesunden Spendern erreicht werden konnte (Abb. 3.9. d) und sie somit nicht unbedingt auf spezielle Inhaltsstoffe der WF zurückgeführt werden kann.

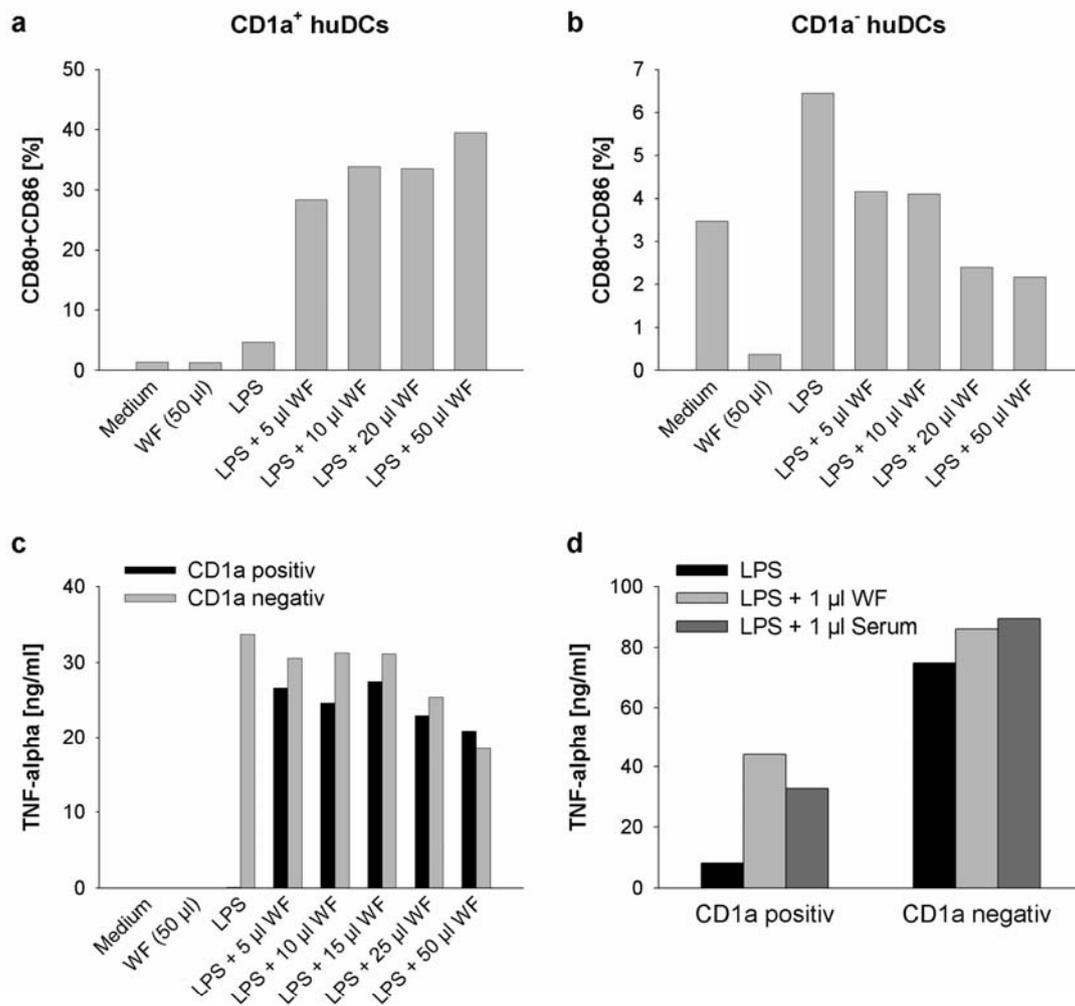


Abb. 3.9.: Wirkung von WF und Serum auf CD1a positive und negative Subpopulationen humaner DCs

2×10^5 huDCs wurden mit $2,5 \mu\text{g/ml}$ LPS und chronischer WF (P41) bzw. Serum eines gesunden Spenders wie angegeben stimuliert und die Oberflächenexpression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 3 Tage nach Behandlung im FACS gemessen sowie die Produktion von TNF- α im Überstand 18 h nach Zugabe der Stimuli mittels ELISA bestimmt.

3.1.6. Zytokinprofile von humanen WF

Zytokine üben als pro- oder anti-inflammatorische Mediatoren einen großen Einfluss auf die Reaktionen von Immunzellen aus.

Daher wurden die Wundflüssigkeiten verschiedener Patienten auf die Anwesenheit von IL-6, IL-8, IL-10, TGF- β und IL-4 mittels Sandwich-ELISAs untersucht.

Es wurden in allen untersuchten Proben größere Mengen an IL-6 und vor allem IL-8 mit unterschiedlichen Konzentrationsverläufen gefunden. Während IL-6 im Laufe der

Wundheilung abnahm, stieg die IL-8 Konzentration in den ersten Tagen in fast allen Proben an (Abb. 3.10.). IL-10 konnte nur in sehr geringen Konzentrationen detektiert werden, der Verlauf dabei meist tendenziell abnehmend (Abb. 3.10.). TGF- β und IL-4 wurden in den untersuchten Proben nicht gefunden.

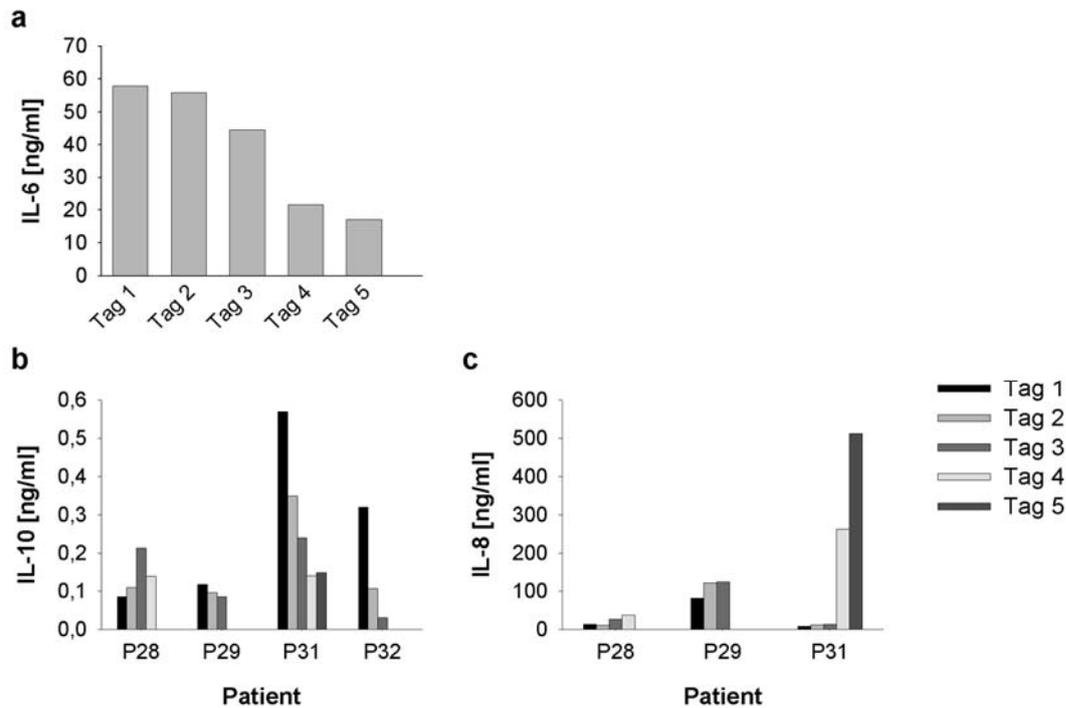


Abb. 3.10.: Zytokinprofile humaner Wundflüssigkeiten

Mittels Sandwich-ELISA wurden Wundflüssigkeiten von heilenden Wunden auf die Anwesenheit von Zytokinen untersucht.

- a) IL-6-Konzentrationen in den WF von Patient P31
- b) IL-10-Konzentrationen in den WF verschiedener Patienten
- c) IL-8-Konzentrationen in den WF verschiedener Patienten

Teil 2: DC-Reifung, Antigenpräsentation und DALIS-Bildung

3.2.1. DC-Reifung, DALIS-Bildung, und Antigenpräsentation nach Influenza Infektion

3.2.1.1. Infektion von BMDCs und EL-4 Zellen mit PR/8/34

In ihrer Publikation konnten LeLouard et al zeigen, dass während LPS-induzierter DC-Reifung DRiPs in DALIS eingelagert wurden, wodurch sich ihr Abbau durch das Proteasom verzögerte¹⁹. Dementsprechend könnten DALIS ein Reservoir für Proteine darstellen, von denen mit zeitlicher Verzögerung CTL-Epitope hergestellt werden. Um diese Hypothese zu überprüfen, ist es notwendig, die DC-Reifung durch physiologisch relevantere Stimuli als LPS zu induzieren. Im Rahmen dieses Projektes sollten daher die DALIS- und DRiPs-Bildung sowie die Generation von MHC-Klasse I Epitopen anhand von Virusinfektionen untersucht werden. Als Antigen sollte u. a. das Influenza Nukleoprotein dienen.

Zunächst musste jedoch untersucht werden, ob das humane Influenza A Virus PR/8/34 in der Lage ist, BMDCs und Nicht-APCs wie EL-4 Zellen zu infizieren.

Hierfür wurden BMDCs aus dem Knochenmark von C57BL/6 Mäusen wie unter Methoden beschrieben differenziert. An Tag 6 nach der Präparation wurden die BMDCs ebenso wie EL-4 Zellen mit je 1 PFU/Zelle PR/8/34 infiziert. Die Infektion erfolgte in einer 96-U-Form-Platte mit 0,25 Mio Zellen pro Well in einem Gesamtvolumen von 200 µl. 2 bzw. 4 h nach der Infektion wurden die Zellen geerntet und mit anti-Influenza NP Serum als Primär- und Alexa546-markiertem Ziege anti-Kaninchen IgG als Sekundärantikörper gefärbt. Die Analyse erfolgte mittels konfokaler Mikroskopie.

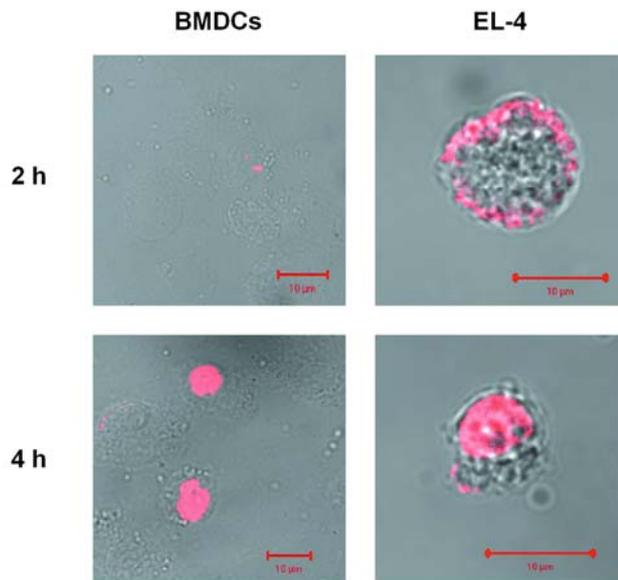


Abb. 3.11.: Infektion von BMDCs und EL-4 Zellen mit humanem Influenza A Virus PR/8/34
 $2,5 \times 10^5$ BMDCs oder EL-4 Zellen wurden mit 1 PFU/Zelle mit PR/8/34 infiziert. Nach 2 h bzw. 4 h Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen mit anti-Influenza Nukleoprotein Antikörper gefärbt und im Konfokalen Mikroskop untersucht. Die Influenza NP-Färbung ist rot dargestellt. Maßstab: 10 µm.

Abbildung 3.11. zeigt eine deutliche Anlagerung der Influenzaviren an die Oberfläche der EL-4 Zellen 2 Stunden nach Infektionsbeginn. Nach 4 Stunden war der Hauptanteil der Viren im Zellkern lokalisiert. Bei BMDCs war 2 Stunden nach Infektionsbeginn keine deutliche Oberflächenfärbung zu erkennen, nach 4 Stunden fand man die Viren jedoch wie bei EL-4 Zellen im Nukleus.

3.2.1.2. PR/8/34 Infektion von BMDCs induziert die Zellreifung

Unreife Dendritische Zellen können durch eine Vielzahl verschiedener Stimuli zur Reifung gebracht werden. Zu diesen Stimuli gehören z.B. diverse TLR-Liganden, Zytokine oder CD40 Ligation. Auch Viren können eine DC-Reifung induzieren.

Nachdem LeLouard et al ¹⁴ zeigen konnten, dass DCs während LPS-induzierter Reifung mono- und polyubiquitinylierte Proteine in so genannten DALIS (dendritic cell aggresome-like induced structures) anreichern, sollte zunächst überprüft werden, ob humanes Influenza A Virus PR/8/34 nach Infektion die Reifung von BMDCs induziert und die Zellen während dieses Prozesses mono- und polyubiquitinylierte Proteine anhäufen.

Hierfür wurden BMDCs aus dem Knochenmark von C57BL/6 Mäusen wie unter Methoden beschrieben differenziert und an Tag 6 nach der Präparation mit 1 PFU/Zelle PR/8/34 infiziert oder mit 1 µg/ml LPS oder 50 µg/ml poly(I:C) aktiviert. Zur Überprüfung der Reifung wurden die Hochregulation der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 im FACS gemessen und die Konzentration von IL-6 im Zellüberstand mittels ELISA bestimmt. Die Anhäufung von ubiquitinylierten Proteinen wurde nach intrazellulärer Färbung der Zellen mit dem Antikörper FK2 im Konfokalen Mikroskop überprüft. Der Antikörper bindet spezifisch an mono- und polyubiquitinylierte Proteine, freies Ubiquitin wird nicht erkannt.

Es zeigte sich, dass PR/8/34 wie LPS und poly(I:C) die Sekretion von IL-6 induzierte (Abb. 3.12. a) und zur Hochregulation von CD80 und CD86 führte (Abb. 3.12. b). Zudem konnten FK2-positive Anhäufungen ubiquitinylierter Proteine im Zytoplasma aller stimulierten BMDCs nachgewiesen werden (Abb. 3.12. c).

3.2.1.3. Die PR/8 induzierte Reifung ist unabhängig von TLR2 und TLR4

Im nächsten Schritt musste überprüft werden, ob die im vorherigen Versuch beobachtete Reifung der Dendritischen Zellen tatsächlich durch PR/8/34 selbst und nicht durch kontaminierendes LPS in der Viruspräparation verursacht wurde.

Die LPS-vermittelte Signaltransduktion erfolgt nach Bindung an die Toll-like Rezeptoren TLR2 bzw. TLR4. Daher wurden die vorherigen Versuche mit BMDCs aus TLR2 und TLR4 defizienten Mäusen (C3H/HeJ/TLR2^{-/-}) wiederholt. C3H/HeJ/TLR2^{-/-} besitzen aufgrund einer Punktmutation in der intrazellulären Toll/IL-1-Rezeptor Domäne (TIR-Domäne) des TLR4 keine funktionsfähigen TLR4 Moleküle und sind zudem TLR2 knock-out. Als Kontrolle dienten BMDCs von C3H/HeN Mäusen, die beide Rezeptortypen besitzen.

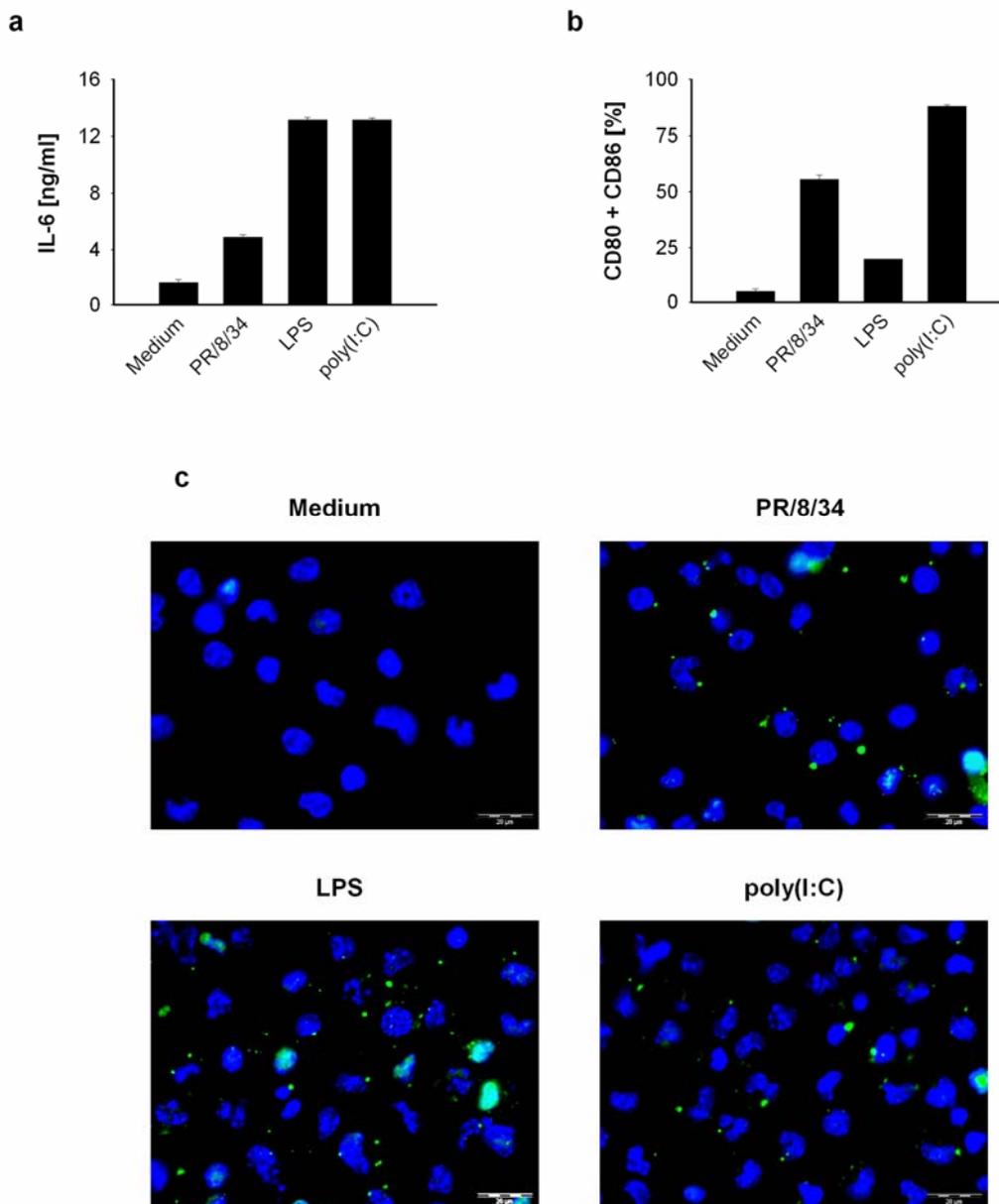


Abb. 3.12.: Influenza Infektion von BMDCs führt zu Zellreifung und Anhäufung von ubiquitinylierten Proteinen

BMDCs wurden mit 1PFU/Zelle PR/8/34, 1 µg/ml LPS bzw. 50 µg/ml poly(I:C) stimuliert.

a) 18 h nach Stimulation wurden die IL-6 Konzentrationen in den Zellüberständen mittels ELISA bestimmt.

b) Die Analyse der Oberflächenexpression von CD80 und CD86 erfolgte zwei Tage nach Stimulation im FACS.

c) 14 h nach Zugabe der Stimuli wurden die Zellen mit FK2 Antikörper und DAPI (blau) gefärbt und die Anhäufung von ubiquitinylierten Proteinen (grün dargestellt) im Konfokalen Mikroskop untersucht. Maßstab 20 µm.

Wie in dem vorherigen Versuch wurden die BMDCs an Tag 6 nach der Präparation mit 1 PFU/Zelle PR/8/34 infiziert oder mit 1 µg/ml LPS bzw. 50 µg/ml poly(I:C) aktiviert. 18 h nach Zugabe der Stimuli wurden die Zellüberstände im ELISA auf IL-6 untersucht und zwei Tage nach der Aktivierung erfolgte die Analyse der Expression von CD80 und CD86 im FACS. Die Anhäufung von ubiquitinylierten Proteinen im Zytoplasma der Zellen wurde durch Färbung mit FK2-Antikörper 14 h nach Zugabe der Stimuli im Konfokalen Mikroskop überprüft.

Es zeigte sich, dass BMDCs von C3H/HeJ/TLR2^{-/-} Mäusen (TLR2/4^{-/-}) sowohl nach poly(I:C) wie auch nach Virusgabe IL-6 produzieren, während keine IL-6 Sekretion durch LPS induziert werden konnte (Abb. 3.13. a). Ähnliches gilt für die Hochregulation von CD80 und CD86 auf der Zelloberfläche, die nur nach Zugabe von poly(I:C) und PR/8/34, nicht jedoch nach LPS-Zugabe erfolgte (Abb. 3.13. b). Zudem wiesen PR/8/34-infizierte TLR2/4^{-/-} BMDCs Anhäufungen von FK2-positiven Proteinen auf, die nach LPS-Zugabe nicht auftraten (Abb. 3.13. c). BMDCs von C3H/HeN Mäusen verhielten sich genau wie die im vorherigen Versuch eingesetzten C57BL/6 BMDCs und exprimierten nach Zugabe aller drei Stimuli sowohl IL-6 als auch CD80 und CD86 (Abb. 3.13. a; b). Anhäufungen ubiquitinylierter Proteine konnten sowohl nach PR/8/34 als auch nach LPS Zugabe beobachtet werden (Abb. 3.13. c).

Die Ergebnisse zeigten, dass die PR/8/34-induzierte Reifung von BMDCs unabhängig von TLR2 und TLR4 ist und somit nicht auf LPS-Verunreinigungen in der Viruspräparation zurückzuführen war. Ferner weisen die Versuchsergebnisse auf einen möglichen Zusammenhang zwischen TLR-vermittelter Zellaktivierung und Bildung von FK2-positiven Anhäufungen ubiquitinylierter Proteine in BMDCs hin.

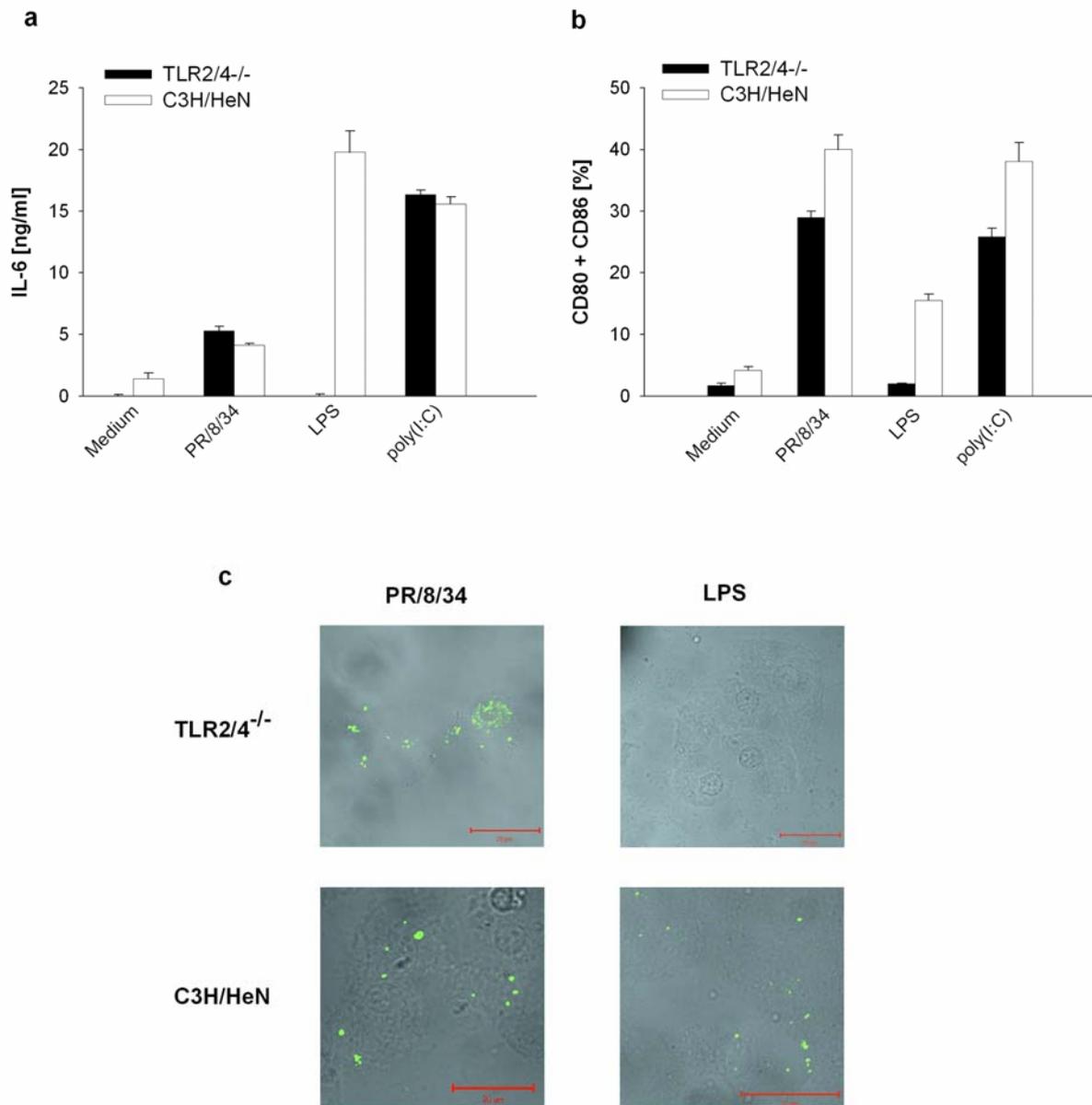


Abb. 3.13.: PR/8/34-induzierte BMDC-Reifung ist unabhängig von TLR2 und TLR4

BMDCs wurden mit 1PFU/Zelle PR/8/34, 1 µg/ml LPS bzw. 50 µg/ml poly(I:C) stimuliert.

- 18 h nach Stimulation wurden die IL-6 Konzentrationen in den Zellüberständen mittels ELISA bestimmt.
- Die Analyse der Oberflächenexpression von CD80 und CD86 erfolgte zwei Tage nach Stimulation im FACS.
- 14 h nach Zugabe der Stimuli wurden die Zellen mit FK2 Antikörper gefärbt und die Anhäufung von ubiquitinylierten Proteinen (grün dargestellt) im Konfokalen Mikroskop untersucht. Maßstab 20 µm.

3.2.1.4. PR/8-infizierte BMDCs bilden DALIS

Eine charakteristische Eigenschaft der DALIS ist ihre transiente Natur. Die ersten DALIS kann man ca. 4 h nach LPS-Aktivierung der DCs beobachten, nach etwas 8 h erreichen sie ihre maximale Größe von bis zu 5 µm, danach werden sie zunehmend kleiner bis sie nach 24 bis 36 h vollständig verschwunden sind¹⁴. Um die Vermutung zu stützen, dass es sich bei den

beobachteten Anhäufungen ubiquitinylierter Proteine nach PR/8/34-Infektion von BMDCs um DALIS handelt, wurden BMDCs zu verschiedenen Zeitpunkten mit 1 PFU/Zelle PR/8/34 infiziert und anschließend gleichzeitig mit FK2 gefärbt und im Konfokalen Mikroskop untersucht. Dabei wiesen die FK2-positiven Proteinanhäufungen eine ähnliche Kinetik auf, wie sie für LPS-induzierte DALIS beschrieben wurde. Die ersten FK2-positiven Aggregate zeigten sich ca. 4 h nach Infektionsbeginn im Zytosol der BMDCs, erreichten ihr Maximum zwischen 8 h und 15 h. Danach wurden sie zunehmend kleiner bis nach 43 h keine Anhäufungen mehr nachzuweisen waren (Abb. 3.14. a).

Anhäufungen von ubiquitinylierten Proteinen können in Zellen nicht nur in Form von DALIS, sondern auch in PODs (promyelocytic leukemia oncogenic domain) und im MTOC (microtubule organizing center) vorkommen¹⁰⁵. Bei PODs handelt es sich um Proteinkomplexe von 0,3 bis 1 µm Durchmesser, die mit dem Zellkern assoziiert sind. Sie bestehen aus 20 bis 30 Proteinen mit variabler Zusammensetzung, von denen einige nur transient in PODs lokalisiert sind. Es finden sich meist 10 bis 30 PODs pro Zellkern, ihre Anzahl variiert während des Zellzykluses¹⁰⁶. Für die Organisation der Mikrotubuli in der Zelle ist das MTOC zuständig.

Um zu überprüfen, ob bei den bisherigen Färbungen mit FK2 Antikörper DALIS oder PODs und das MTOC angefärbt wurden, wurden PR/8/34-infizierte BMDCs mit FK2 und DAPI gefärbt. Durch die Bindung von DAPI an die DNA wurden die Zellkerne angefärbt. Die Doppelfärbung mit FK2 (grün) und DAPI (blau) zeigte deutlich verschiedene, nicht mit dem Zellkern assoziierte Aggregate ubiquitinylierter Proteine, bei denen es sich höchstwahrscheinlich um DALIS handelte (Abb. 3.14. b).

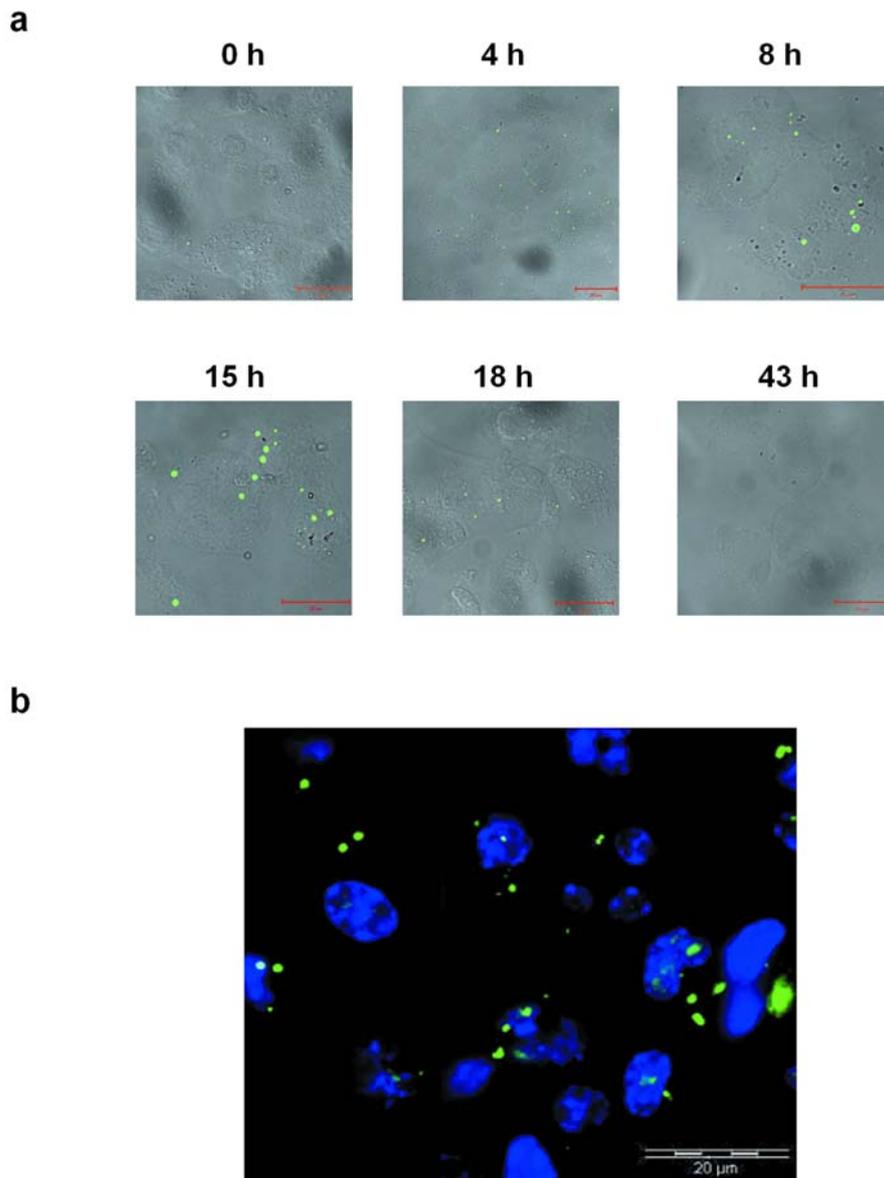


Abb. 3.14.: Kinetik der DALIS Entstehung

a) BMDCs wurden zu verschiedenen Zeitpunkten mit 1 PFU/Zelle PR/8/34 infiziert, nach den angegebenen Zeiten mit FK2 Antikörper (grün dargestellt) gefärbt und im Konfokalen Mikroskop analysiert. Maßstab 20 μm .

b) 12 h nach PR/8/34-Infektion wurden BMDCs mit FK2 (grün) und DAPI (blau) gefärbt und im Fluoreszenzmikroskop untersucht. Maßstab 20 μm .

Eine weitere Eigenschaft von DALIS ist ihre Resistenz gegen Triton X-100. Nach Lyse der Zellen mit diesem Detergent tauchen sie in der Detergenz-unlöslichen Fraktion auf¹⁴.

Dementsprechend wurden BMDCs und EL-4 Zellen, die keine DALIS-Bildung zeigen, zu verschiedenen Zeitpunkten mit 1 PFU/Zelle PR/8/34 infiziert, gefolgt von einer Triton X-100 Extraktion, SDS-PAGE und Western Blot mit FK2-Antikörper. Für die Triton X-100 Lyse der

Zellen wurden diese nach der Ernte dreimal mit PBS gewaschen bevor sie mit Triton-Lysepuffer (20 mM Tris/HCL (pH 7,4), 1 % Triton X-100, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM NaCl) für 20 Minuten bei 4 °C behandelt wurden. Nach 10 Minuten Zentrifugation bei 12000 x g wurden die Überstände (= Detergenz-lösliche Fraktion) und die Pellets (= Detergenz-unlösliche Fraktion) separat in SDS-Ladepuffer aufgenommen und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Hybond ECL Membran wurde ein Western Blot mit FK2 als Primärantikörper durchgeführt.

Wie bei LeLouard et al beschrieben konnte man bei den BMDCs eine Zunahme der ubiquitinylierten Proteine in der Detergenz-unlöslichen Fraktion beobachten, die in der Detergenz-löslichen Fraktion nicht auftrat (Abb. 3.15.). Dieses Experiment bestätigte die Annahme, dass Influenza Infektion von BMDCs zur Bildung von DALIS führt.

EL-4 Zellen, die keine DALIS bilden können (Daten nicht gezeigt), zeigten in keiner Fraktion einen Anstieg der ubiquitinylierten Proteine (Abb. 3.15.).

Behandlung der Zellen mit dem Protasom-Inhibitor Epoxomicin (1 µM) während der Infektion führte in allen Fällen zu einer starken Anreicherung ubiquitinylierter Proteine (Abb. 3.15.).

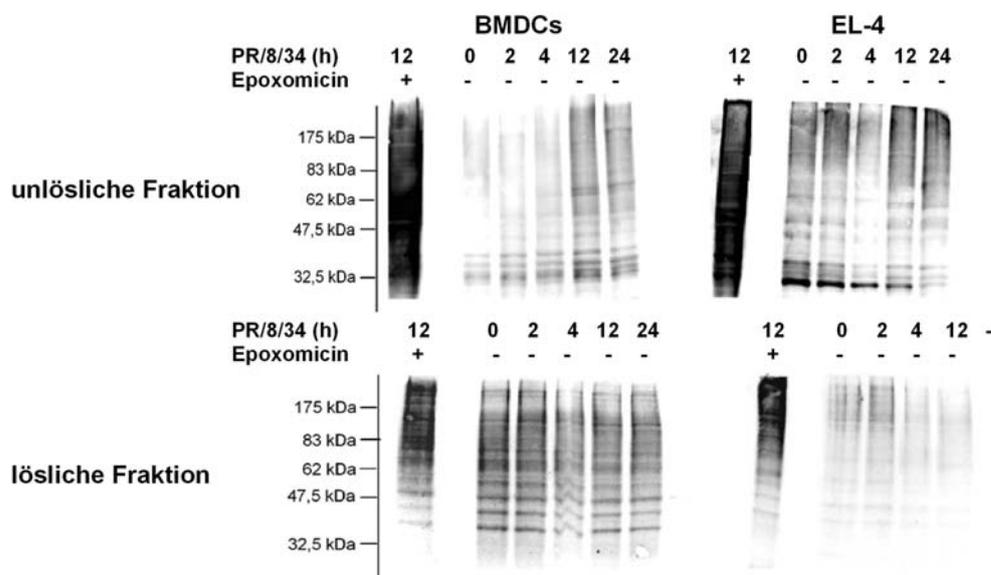


Abb. 3.15.: FK2-Western Blot mit Triton X-100 löslichen und unlöslichen Fraktionen
 BMDCs und EL-4 Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten mit 1 PFU/Zelle PR/8/34 infiziert. Nach Lyse der Zellen mit Triton-Lysepuffer wurden Überstände (= lösliche Fraktion) und Pellets (= unlösliche) Fraktion separat mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend im FK2-Western Blot die Mengen ubiquitinylierter Proteine bestimmt.

3.2.1.5. DALIS enthalten Influenza Nukleoprotein

Die genaue Zusammensetzung von DALIS auf Proteinebene ist bislang unbekannt. Es konnten Kolokalisationen von Enzymen des Ubiquitinsystems und DALIS gezeigt werden¹⁹. Zudem befinden sich Ribosomen verstärkt in der Umgebung um DALIS¹⁴, während das Proteasom weder in DALIS noch verstärkt um sie herum gefunden wurde.

Sollte die Hypothese richtig sein, dass DALIS als Antigen-speicher fungieren, aus denen CTL-Epitope generiert werden, sollten Proteine wie das Influenza Nukleoprotein in ihnen zu finden sein.

Um dies zu überprüfen, wurden nach Influenza Infektion von BMDCs Kolokalisationsstudien durchgeführt. Hierfür wurden BMDCs 12 h nach PR/8/34-Infektion mit anti-Influenza NP und FK2 oder mit anti-20S Proteasom und FK2 Antikörper gefärbt. Dabei wurde nach dem Protokoll wie unter Methoden, Fluoreszenzmikroskopie, Triton-Methode beschrieben, vorgegangen. Die Färbung mit anti-20S Proteasom-Antikörper diente dabei als Kontrolle, um ausschließen zu können, dass es bedingt durch die Färbemethode zu unspezifischen Kolokalisationen kommt.

Dabei zeigte sich, dass viele DALIS (grün) mit Influenza NP (rot) kolokalisierten (gelb) (Abb. 3.16. rechts), während es zu keinen Kolokalisationen von 20S Proteasom (rot) und DALIS kam (Abb. 3.16. links). Nicht infizierte Zellen zeigten weder DALIS noch NP-Färbungen (Daten nicht gezeigt).

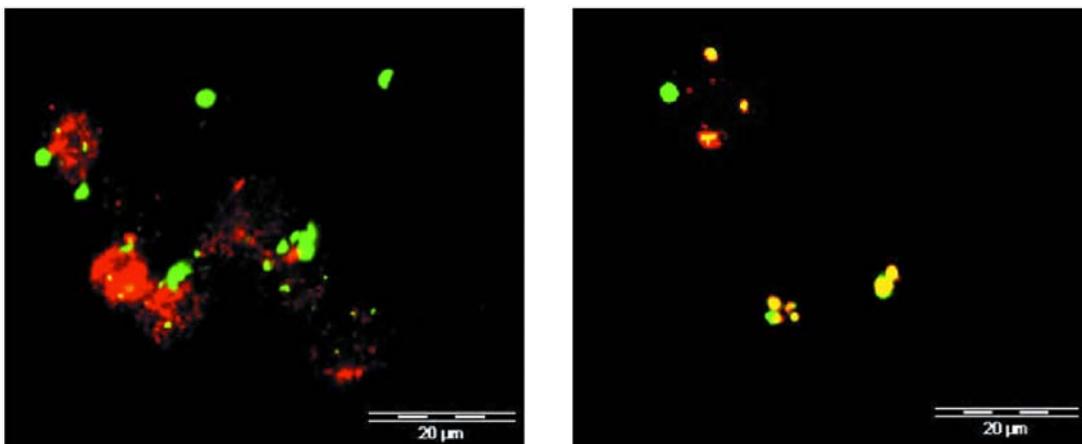


Abb. 3.16.: Influenza NP kolokalisiert mit DALIS

PR/8/34 infizierte BMDCs wurden 12 h nach Zugabe des Virus mit FK2 und anti-20S Proteasom Antikörper (links) bzw. mit FK2 und anti-Influenza NP (rechts) gefärbt und im Fluoreszenzmikroskop analysiert.

Die FK2-Färbung ist grün dargestellt, proteasomale Färbung bzw. Influenza NP rot. Kolokalisationen erscheinen gelb. Maßstab: 20 µm.

Zusätzlich zu den Koloalisationsstudien im Fluoreszenzmikroskop konnte Influenza NP in DALIS-angereicherten Fraktionen mittels NP-Western Blot nachgewiesen werden (Abb. 3.17. links). Die Anreicherung erfolgte über Triton-Lyse der Zellen und Zentrifugation bei 12000 x g.

Zudem wurden Immunpräzipitationen mit FK2 oder anti-Influenza NP nach Virusinfektion oder LPS-Stimulation von BMDCs durchgeführt. NP-spezifische Immunpräzipitation (NP-IP) mit anschließendem Western Blot mit anti-Influenza NP (NP-WB) oder FK2 (FK2-WB) zeigten ubiquitinyliertes NP (Abb. 3.17. Mitte). Auch die Umkehrung, also Immunpräzipitation mit FK2 (FK2-IP) und anschließender Western Blot gegen Influenza NP (NP-WB) wies auf ubiquitinyliertes NP hin (Abb. 3.17. rechts). In allen Fällen wurden LPS-aktivierte BMDCs als Negativkontrolle verwendet. Diese Versuchsergebnisse deuten auf das Vorhandensein von ubiquitinyliertem NP in DALIS hin.

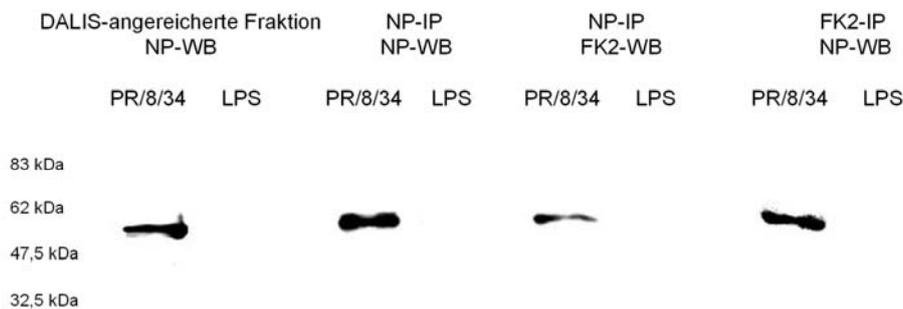


Abb. 3.17.: DALIS enthalten ubiquitinyliertes Nukleoprotein

DALIS-angereicherte Fraktionen enthalten Influenza NP (links). FK2-Immünpräzipitation (FK2-IP) gefolgt von Influenza Western Blot (NP-WB) (rechts) zeigt ebenso wie Nukleoprotein-Immünpräzipitation (NP-IP) mit anschließendem FK2 Western Blot (FK2-WB) (Mitte) ubiquitinyliertes Nukleoprotein. LPS-aktivierte BMDCs wurden in allen Fällen als Negativkontrolle verwendet.

3.2.1.6. Verzögerte Antigenpräsentation bei BMDCs nach PR/8/34 Infektion

Nachdem nun gezeigt werden konnte, dass DALIS Influenza Nukleoprotein enthalten und somit als Antigen-speicher dienen könnten, sollte als nächstes die Kinetik der Antigenpräsentation bei BMDCs und Nicht-APCs untersucht werden. Als Nicht-APCs wurden EL-4 und MC57 Zellen verwendet. Beide Zelllinien bilden nach Influenza Infektion keine DALIS (Daten nicht gezeigt).

Die Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten mit PR/8/34 infiziert, um sie anschließend in einem Chrom-Freisetzungstest als Zielzellen für CD8⁺ zytotoxische T-Zellen (CTLs) zu verwenden. Diese CTLs waren spezifisch für das immunodominante Epitop NP₃₆₆₋₃₇₄ aus dem Influenza Nukleoprotein. Alternativ zum Chromfreisetzungstest wurde der Überstand der Kokultur im ELISA auf IFN- γ untersucht.

Für den IFN- γ Assay wurden BMDCs und EL-4 Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten mit 1 PFU/Zelle PR/8/34 infiziert. Zu einem Teil der Zellen wurde in der letzten halben Stunde der Inkubation 50 ng/ml NP₃₆₆₋₃₇₄ Peptid (ASNENMETM) als Positivkontrolle zugegeben. Nach zweimaligem Waschen mit T-Zellmedium und Bestimmung der Lebendzellzahl wurden die Zellen mit 0,05 % Glutaraldehyd fixiert und die Fixierungsreaktion nach 1 Minute mit 0,1 M Glycin abgestoppt. Anschließend wurden 50000 Zellen pro Well mit 100000 NP₃₆₆₋₃₇₄-spezifischen T-Zellen in einem Gesamtvolumen von 200 μ l über Nacht inkubiert. Nach 20 Stunden wurden die Überstände für den IFN- γ ELISA abgenommen und analysiert (Abb. 3.18. a).

Für den Chrom-Freisetzungstest wurden BMDCs, EL-4 und MC57 Zellen wie beschrieben infiziert. Diese Zellen wurden jedoch nicht fixiert, statt dessen folgte die Chrommarkierung mit [⁵¹Cr] Na₂CrO₄ + 5 % FCS. Um die generelle Empfindlichkeit der Targets gegenüber der CTL-induzierten Lyse zu überprüfen, wurde die Hälfte der Zellen gleichzeitig mit 500 pmol ASNENMETM inkubiert. Nach 20 Minuten bei 37 °C wurden die Zellen intensiv gewaschen und 20000 Zielzellen mit 80000 bzw. 400000 CTL für 4 Stunden inkubiert bevor 50 μ l Überstand/Probe abgenommen und auf eine Luma-Platte überführt wurde. Die Auswertung erfolgte am nächsten Tag im TopCounter (Abb. 3.18. b).

Sowohl im IFN- γ Assay wie auch im Chrom-Freisetzungstest zeigten BMDCs im Vergleich zu EL-4 und MC57 Zellen eine verzögerte Antigenpräsentation.

Während EL-4 Zellen bereits 4 Stunden nach Influenza Infektion bei CTLs die Produktion von IFN- γ induzierten, war die BMDC-induzierte IFN- γ Synthese erst nach 12 Stunden nachzuweisen (Abb. 3.18. a).

Im Chrom-Freisetzungstest reichten 4 Stunden Infektion aus, um maximale Lyse von EL-4 und MC57 Zellen zu erreichen. Im Gegensatz dazu stieg die spezifische Lyse der infizierten BMDCs bis zu einer Infektionsdauer von 10 Stunden an (Abb. 3.18. b). Längere Infektionszeiten wurden aus den Experimenten ausgeschlossen, da die spontane Freisetzung von Chrom durch die BMDCs über 50 % betrug.

Die Oberflächenbeladung von BMDCs mit ASNENMETM bei nicht-infizierten und PR/8/34-infizierten Zellen zeigte keine Unterschiede in Bezug auf die Empfindlichkeit der BMDCs gegenüber der CTL-induzierten Lyse (Daten nicht gezeigt).

Um den Einfluss der Proteinneusynthese auf die Präsentation des NP-Peptids zu überprüfen, wurden BMDCs mit 40 μ M des Proteinsynthese-Inhibitors Cycloheximide (CHX) während einer Infektionsdauer von 6 Stunden behandelt. Um die Lebensfähigkeit der CHX-behandelten BMDCs zu überprüfen, wurde ein Teil der Zellen zusätzlich mit ASNENMETM inkubiert.

Alternativ zur CHX-Behandlung der BMDCs wurde Influenza Virus mit kurzzeitigem UV-Licht inaktiviert. Die UV-Inaktivierung erfolgte für 5 Minuten bei 254 nm in einer offenen Petrischale bevor das Virus zu den BMDCs gegeben wurde.

Anschließend wurde mit allen Zellen ein Chromfreisetzungstest (wie oben beschrieben) durchgeführt (Abb. 3.18. c).

Hierbei zeigte sich, dass die CHX-Behandlung zu einem signifikanten Rückgang der Zell-Lyse bei infizierten BMDCs führte (Abb. 3.18. c). Da dieser Effekt nicht auf eine erhöhte Sensibilität der CHX-behandelten Zellen gegenüber der CTL-induzierten Lyse zurückzuführen war, zeigte die unverändert hohe Lyse der Peptid-beladenen und CHX-behandelten Zellen.

Diese Versuchsergebnisse legten nahe, dass Proteinneusynthese für die Präsentation des NP-Peptids notwendig ist. Unterstützt wurde diese Feststellung durch ähnliche Ergebnisse mit UV-behandeltem Virus (Abb. 3.18. c).

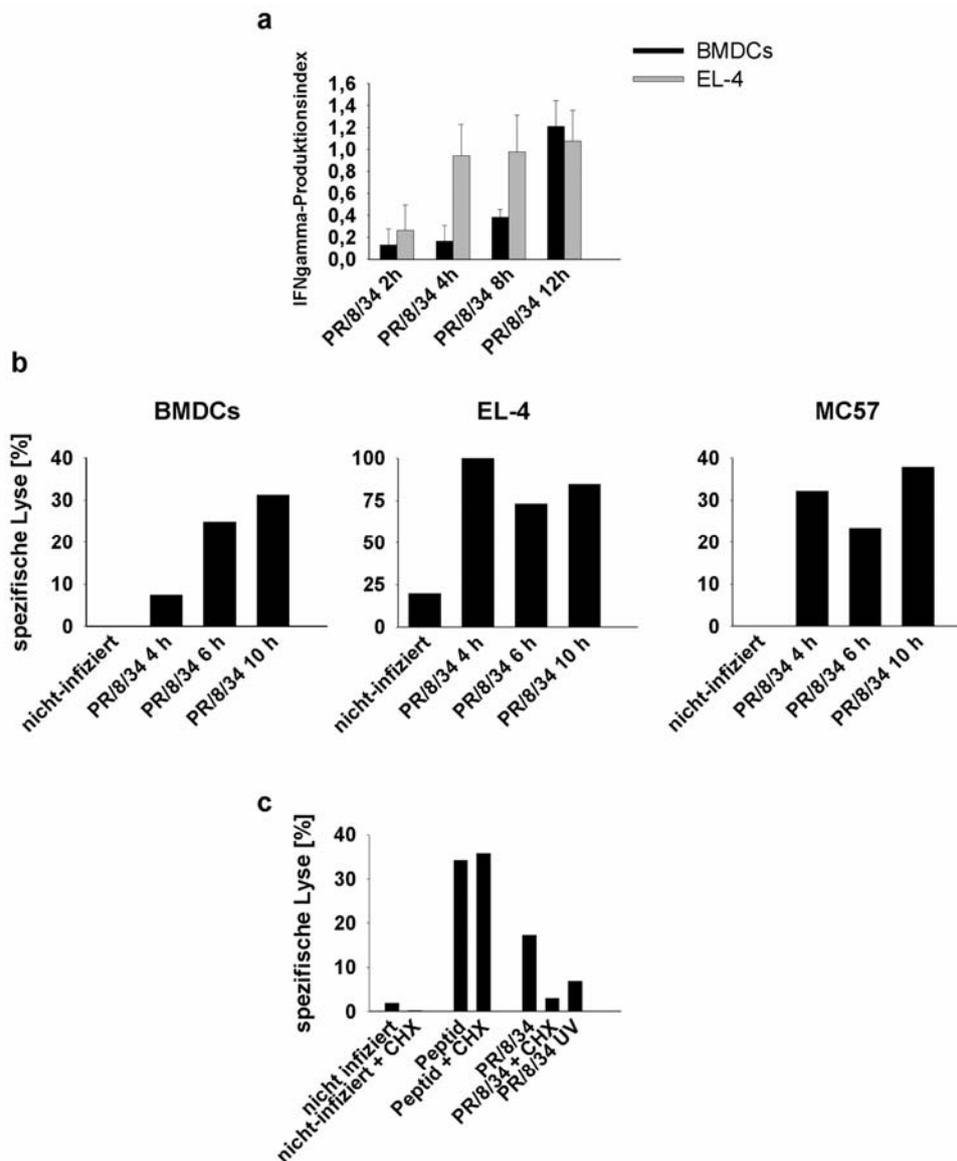


Abb. 3.18.: Kinetik der Antigenpräsentation bei BMDCs und Nicht-APCs

BMDCs, EL-4 und MC57 Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten mit 1 PFU/Zelle PR/8/34 infiziert und als Zielzellen für NP₃₆₆₋₃₇₄-spezifische CTL verwendet.

- BMDCs und EL-4 Zellen wurden vor der Zugabe zu den T-Zellen fixiert und nach 20 h Ko-Inkubation die Überstände im IFN- γ ELISA untersucht. Die Abbildung zeigt den IFN- γ -Produktionsindex, gebildet aus dem Mittelwert der IFN- γ Konzentration zu jedem Zeitpunkt und der nicht-infizierten Kontrollen von drei unabhängigen Versuchen. Die IFN- γ -Konzentrationen der nicht-infizierten Proben betragen 2, 6 und 10 ng/ml.
- BMDCs, EL-4 und MC57 Zellen wurden als Zielzellen im Chrom-Freisetzungstest verwendet. Die Zeiten auf den X-Achsen entsprechen den Zeitspannen von der Infektion bis zur Zugabe zu den T-Zellen.
- Chromfreisetzungstest mit PR/8-infizierten BMDCs, die zum Teil während der 6 stündigen Infektion mit dem Proteinsynthese-Inhibitor CHX behandelt oder mit UV-inaktiviertem Virus inkubiert wurden.

3.2.1.7. Influenza Nukleoprotein-Expressionskinetik

Um auszuschließen, dass die in den vorherigen Versuchen beobachtete Verzögerung der Antigenpräsentation bei BMDCs auf eine verzögerte oder verminderte Expression des Nukleoproteins in diesen Zellen zurückzuführen war, wurde die NP Expressionskinetik der verschiedenen Zelltypen verglichen.

Hierzu wurden die Zellen erneut mit 1 PFU/Zelle Influenza behandelt und nach dreimaligem Waschen mit PBS durch die Zugabe von Triton-Lysepuffer (wie bereits beschrieben) lysiert. Nach Zentrifugation bei 12000 x g wurden die Zellpellets in SDS-Ladepuffer aufgenommen und einer Gelelektrophorese unterzogen. Es folgte ein Western Blot mit anti-Influenza NP (von J. Yewdell) als Primärantikörper und anti-Kaninchen IgG-HRP (Amersham Life Science) als Sekundärantikörper (Abb. 3.19. a oben), der bei allen drei Zelltypen steigende Mengen von NP über die Zeit zeigte. Mit denselben Proben wurde ein anti-Aktin Western Blot mit anti-Aktin (C2)-HRP Antikörper (Santa Cruz Biotechnology) durchgeführt (Abb. 3.19. a unten), der zur Normalisierung der Proben herangezogen wurde. Die Verhältnisse der Bandenintensitäten von NP und Aktin sind in Abbildung 3.19. b dargestellt und zeigten für alle drei Zelltypen vergleichbare und über die Zeit ansteigende Werte.

D.h., die Ursache für die verzögerte Antigenpräsentation bei Influenza infizierten BMDCs liegt nicht in einer verminderten oder verzögerten Nukleoproteinexpression zu frühen Zeitpunkten der Infektion.

Behandlung der Zellen mit dem Proteinsynthese-Inhibitor CHX während 6 stündiger Infektion mit PR/8/34 führte in allen Fällen zu verminderten NP-Expressionen (Abb. 3.19. c). Dies zeigt, dass Proteinneusynthese für die Expression des Influenza NPs notwendig ist und ergänzt die in Abbildung 3.18. c dargestellten Ergebnisse.

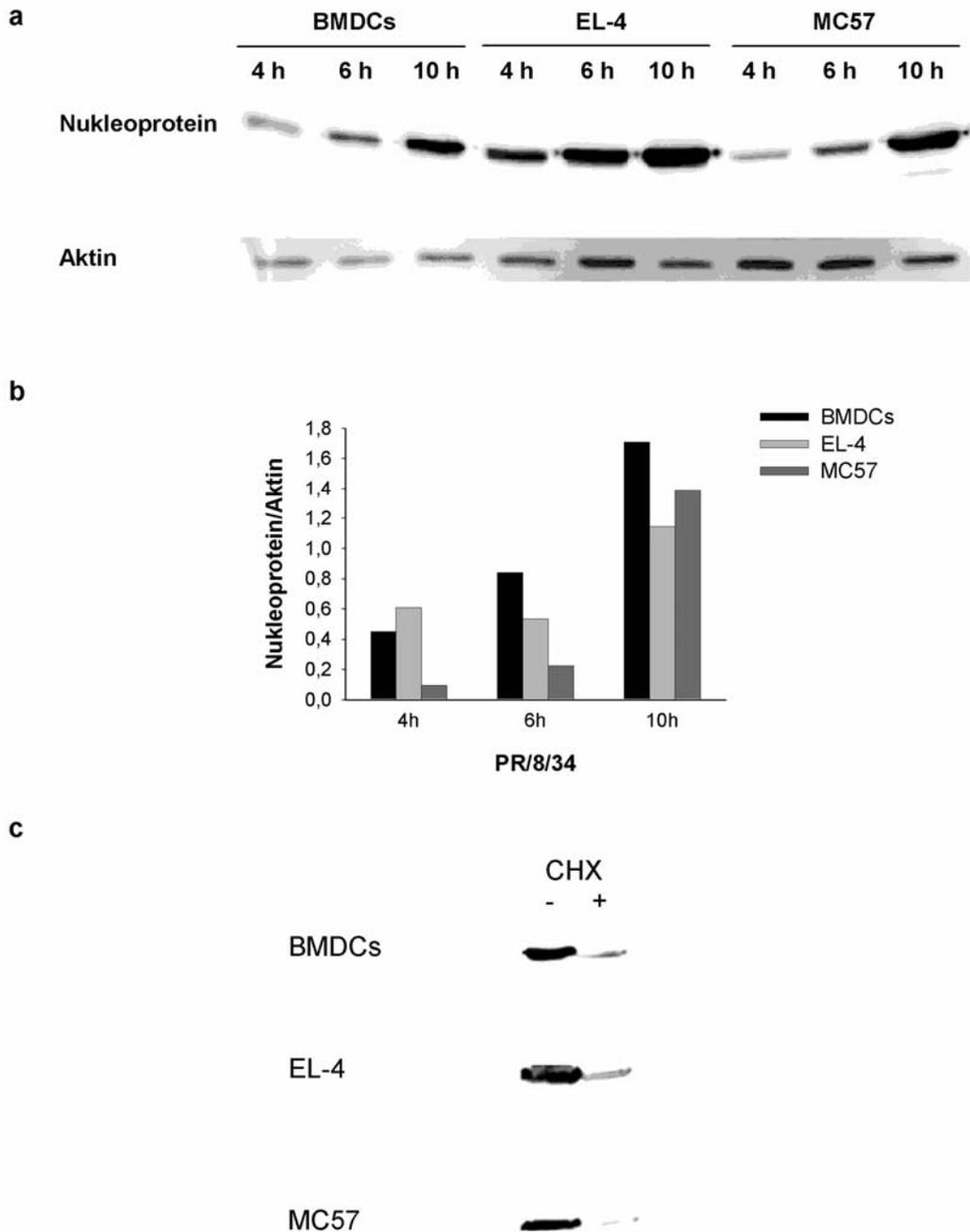


Abb. 3.19.: Nukleoprotein Expressionskinetik

- a) BMDCs, EL-4 und MC57 Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten mit 1 PFU/Zelle PR/8/34 infiziert. Anti-Influenza NP Western Blot zeigt vergleichbare Anstiege der NP-Expression über die Zeit in allen drei Zelltypen.
- b) Dargestellt sind die Verhältnisse der in Teil a) ermittelten NP-Bandenintensitäten zu den Aktin-Bandenintensitäten.
- c) Behandlung der Zellen mit CHX während Influenza Infektion führt zu einem Rückgang der NP Expression.

3.2.1.8. DALIS-Bildung und Reifung verlaufen synchron bei BMDCs

Die bisherigen Versuchsergebnisse wiesen darauf hin, dass es einen zeitlichen Zusammenhang zwischen der Reifung, der DALIS-Bildung und der Antigenprozessierung bzw. Antigenpräsentation bei BMDCs gibt.

Um genauere Aussagen zu ermöglichen, wurde die Hochregulation von reifungsrelevanten Oberflächenmolekülen auf BMDCs während einer Influenza Infektion untersucht.

Die Zellen wurden mit 1 PFU/Zelle PR/8/34 zu verschiedenen Zeitpunkten infiziert und die Expression von MHC-Klasse I (mit anti-H-2 K^b/H-2 D^b) sowie CD80 und CD86 mittels Durchflusszytometrie untersucht (Abb. 3.20).

Während EL-4 Zellen nicht durch PR/8/34 aktiviert wurden und keine Veränderungen der Expression von MHC-I-Molekülen auf der Oberfläche zeigten, begann die MHC-I-Expression bei BMDCs 8 Stunden nach der Infektion zuzunehmen (Abb. 3.20. b). Die Hochregulation der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 begann bei diesen Zellen ca. 12 Stunden nach Infektion, das Maximum der Expression wurde 18 Stunden nach Infektionsbeginn erreicht (Abb. 3.20. a).

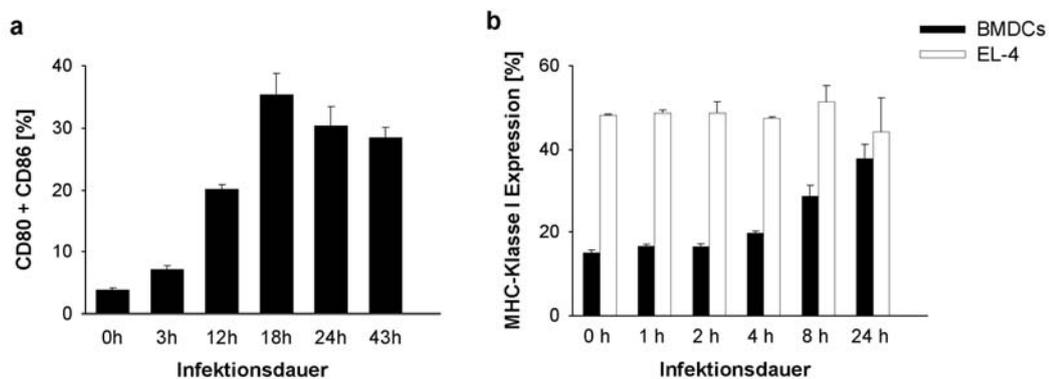


Abb. 3.20.: Oberflächenexpression von MHC-Klasse I und kostimulatorischen Molekülen nach Virusinfektion

- a) BMDCs wurden zu verschiedenen Zeitpunkten mit 1 PFU/Zelle PR/8/34 infiziert und anschließend die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 auf der Zelloberfläche im FACS untersucht.
- b) BMDCs und EL-4 Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten mit 1 PFU/Zelle PR/8/34 infiziert, es folgte die Analyse der MHC-Klasse I Expression im FACS.

Somit scheint sich die Kinetik der DALIS-Bildung mit der Kinetik der Expression reifungsrelevanter Oberflächenmolekülen bei BMDCs zu decken, zudem fällt die maximale Expression der kostimulatorischen Moleküle bei BMDCs zeitlich mit dem Maximum der gebildeten DALIS zusammen und passt zu der beobachteten Verzögerung der Antigenpräsentation.

3.2.2. DC-Reifung und DALIS-Bildung nach *L. monocytogenes* Infektion

3.2.2.1. Infektion von BMDCs mit *Listeria monocytogenes*

In dieser Arbeit wurde bereits gezeigt, dass die Infektion von BMDCs mit Influenza Viren zu einer Aktivierung der Zellen bei gleichzeitiger Bildung von DALIS führte und mit einer verzögerten Antigenpräsentation einherging. In diesem Fall stammte das CTL-Epitop aus dem von den Zellen selbst synthetisierten Nukleoprotein des Influenza Virus.

Um die Bedeutung von DALIS für die Antigenpräsentation genauer zu untersuchen, sollte in einem weiteren Infektionsmodell die Bildung von DALIS und die Antigenpräsentation analysiert werden. In diesem Fall sollte das Antigen jedoch nicht von den DCs selbst gebildet, sondern als Protein in die Zellen mit eingebracht werden, da bekannt ist, dass nur von den Zellen neu synthetisierte, nicht jedoch exogene Proteine in DALIS eingelagert werden ¹⁴.

Als Modell wurden Ovalbumin-transgene Listerien gewählt und die DALIS-Bildung, sowie die Kinetik der Präsentation des Ovalbumin-abstammenden CTL-Epitops SIINFEKL nach Infektion von BMDCs untersucht.

Hierfür wurden BMDCs mit Ovalbumin-transgenen Listerien (Ova-Listerien) infiziert und zunächst die Aktivierung und DALIS-Bildung überprüft (Abb. 3.21.). Die Infektion erfolgte wie in Methoden beschrieben, das Verhältnis von BMDCs zu Listerien war 1:8.

Die Infektion mit Ova-Listerien führte zu einer starken Aktivierung der BMDCs, zu erkennen an der starken Expression der kostimulatorischen Moleküle sowie hoher IL-6 Produktion (Abb. 3.21. a, b). Auch in diesem Fall ging die Reifung der DCs mit der Bildung von DALIS einher (Abb. 3.21. c).

Als nächstes sollte überprüft werden, ob das von den Listerien gebildete Ovalbumin in die DALIS integriert wird. Hierfür wurden die BMDCs wie beschrieben mit Ova-Listerien infiziert und intrazellulär mit FK2 und einem Ovalbumin-spezifischen Antikörper gefärbt. Als Negativkontrollen wurden nicht infizierte und Influenza infizierte BMDCs verwendet. Die Analyse der Präparate im Fluoreszenzmikroskop ergab jedoch keine erkennbare, spezifische Anfärbung von Ovalbumin in den Listerien behandelten Zellen (Daten nicht gezeigt).

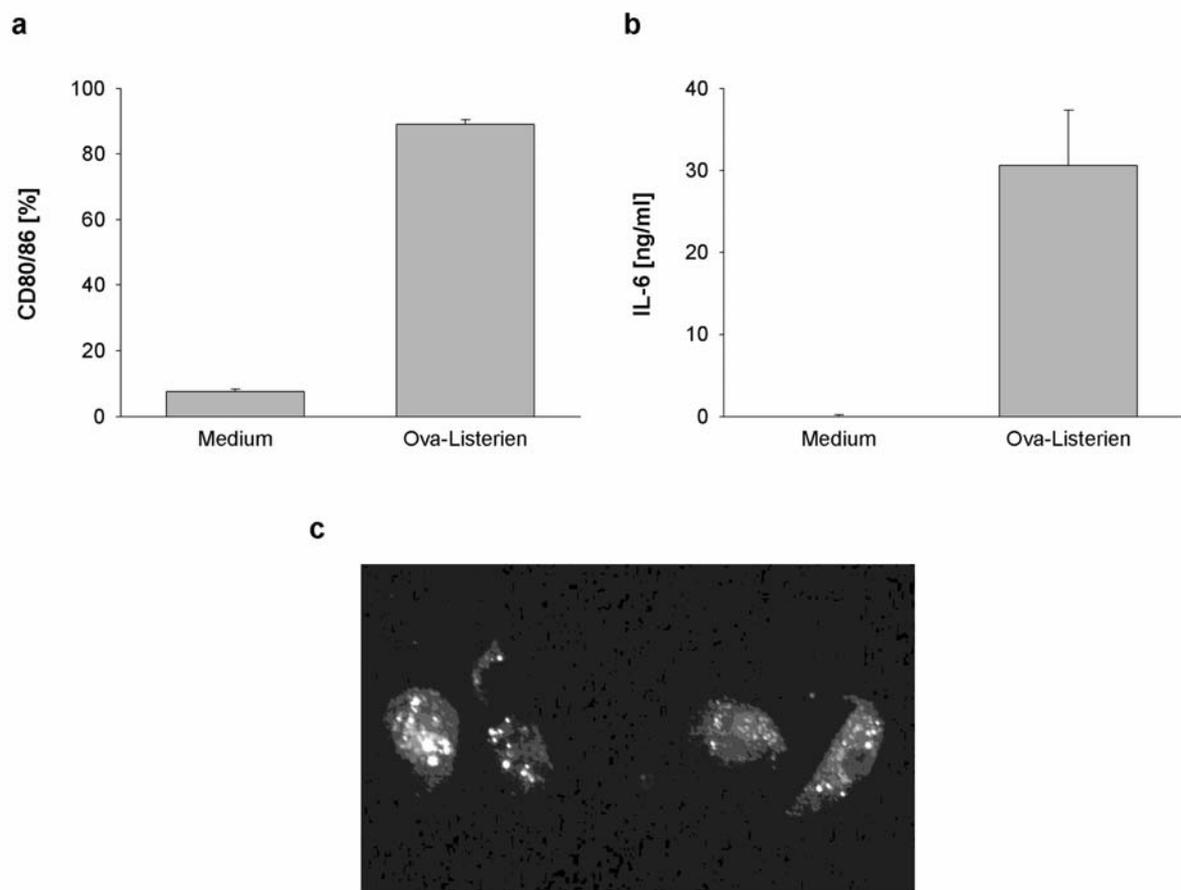


Abb. 3.21.: Reifung und DALIS-Bildung nach Infektion von BMDCs mit *L. monocytogenes*
 BMDCs wurden mit 8-fach Ova-Listerien infiziert und nach 24 h die Oberflächenexpression von CD80 und CD86 (a) sowie die Konzentration von IL-6 im Kulturüberstand (b) ermittelt.
 Die Färbung der BMDCs mit FK2 Antikörper zeigt DALIS-Bildung nach Listerien-Infektion (c).

3.2.2.2. Sensitivitätstest des H-2 K^b/SIINFEKL spezifischen Antikörpers

Um die Kinetik der Präsentation des Ovalbuminpeptids SIINFEKL infizierter BMDCs zu untersuchen, wurde zunächst die Sensitivität des Antikörpers 25.D1-16, der spezifisch für H-2 K^b/SIINFEKL ist, im FACS überprüft.

BMDCs, die mit steigenden Konzentrationen des Peptids SIINFEKL für 2 h bei 37 °C im Zellinkubator vorinkubiert wurden, wurden anschließend mit dem Zellkulturüberstand 25.D1-16 und anti-Maus IgG-PE in FACS-Puffer gefärbt. Das Ergebnis der Analyse im FACScan zeigt Abbildung 3.22.. Ein Minimum von 1 ng/ml Peptid ist für eine spezifische Erkennung durch den Antikörper notwendig. Dies entspricht 150 pg/well/0,25 Mio BMDCs.

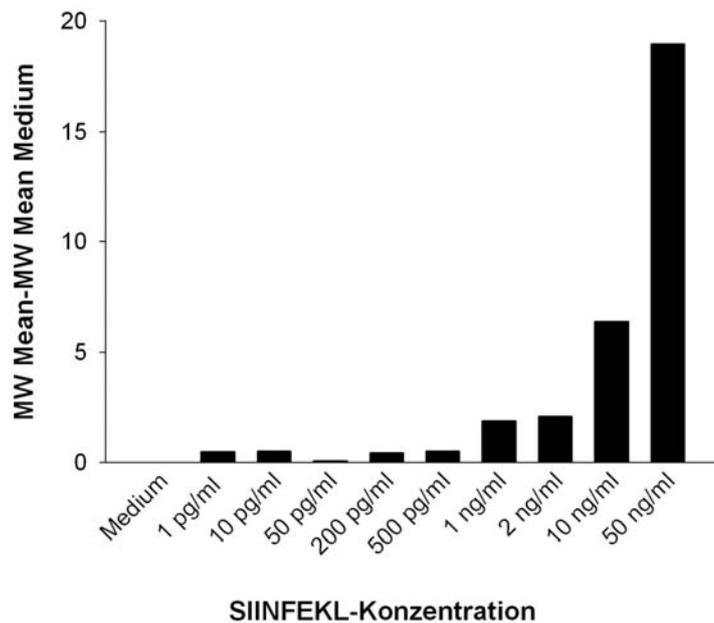


Abb. 3.22.: Sensitivitätstest des H-2 K^b/SIINFEKL spezifischen Antikörpers 25.D1-16
BMDCs wurden mit steigenden Konzentrationen des Peptids SIINFEKL vorinkubiert, anschließend mit 25.D1-16 Zellkulturüberstand und anti-Maus IgG-PE gefärbt und im FACS analysiert. Dargestellt sind die durchschnittlichen Mittelwerte (MW Mean) abzüglich des Mittelwertes der Negativkontrolle (MW Mean Medium).

3.2.2.3. Kinetik der Präsentation des SIINFEKL-Epitops

Um die Kinetik der Präsentation des SIINFEKL-Epitops nach Infektion mit Ova-Listerien zu untersuchen, wurden BMDCs und EL-4 Zellen wie in Methoden beschrieben mit unterschiedlichen Listerien-Konzentrationen infiziert (6-fach, 24-fach und 48-fach Listerien zu Zellen) und nach verschiedenen Zeitpunkten (1,5 h; 3 h; 4 h; 6 h; 8 h; 24 h) mit 25.D1-16 und anti-Maus IgG-PE gefärbt. Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit 30 ng/ml SIINFEKL inkubiert.

In den anschließenden FACS-Analysen waren jedoch keine Färbungen Listerien-infizierter Zellen sichtbar, unabhängig von der Listerien-Konzentration und der Infektionsdauer (Daten nicht gezeigt).

3.2.3. DC-Reifung, DALIS-Bildung, und Antigenpräsentation nach mCMV Infektion

3.2.3.1. Zytomegalievirus Infektion von BMDCs und MEFs

In diesem Teil der Arbeit soll der Einfluss von mCMV (murine Cytomegalovirus) auf die Reifung und Antigenpräsentation von BMDCs untersucht werden.

Der Vergleich von Influenza und mCMV Infektion ist von besonderem Interesse, da Zytomegalieviren die Reifung von DCs und somit ihre Fähigkeit, T-Zellen zu aktivieren, beeinträchtigen¹⁰⁷.

Da sich EL-4 Zellen nicht mit mCMV infizieren ließen (Daten nicht gezeigt und Abb. 3.26.), wurde in den folgenden Experimenten eine embryonale Fibroblasten-Zelllinie der Maus (MEFs) als Kontrolle für das Verhalten von nicht-professionellen antigenpräsentierenden Zellen nach mCMV Infektion verwendet.

Zunächst wurden BMDCs und MEFs mit dem mCMV Wildtyp infiziert und die Infektion anhand der Expression des viralen Proteins IE1 (pp89) im Fluoreszenzmikroskop untersucht (Abb. 3.23.).

Hierfür wurden 1,5 Mio. MEFs oder BMDCs pro Well in einer 6-Well-Platte mit 0,4 PFU/Zelle mit mCMV wt BAC in einem Gesamtvolumen von 2 ml Medium zentrifugal infiziert (siehe Material und Methoden). Nach Zugabe von 1 ml Medium erfolgte die Inkubation bei 37 °C im Zellinkubator über Nacht.

Die Färbung erfolgte auf Alcian Blue beschichteten Deckgläsern (siehe Material und Methoden). Nach Fixierung der Zellen mit Cytofix/Cytoperm folgte die Färbung mit dem IE1(pp89)-spezifischen Antikörper CR101 und anti-Maus IgG-Alexa594 als Sekundärantikörper. Die Zellkerne der Zellen wurden mit DAPI sichtbar gemacht (Abb. 3.23.).

Es zeigte sich, dass sich MEFs entweder besser infizieren ließen oder mehr Virusprotein produzierten, jedenfalls war der Prozentsatz der CR101-positiven Zellen bei den MEFs wesentlich höher als bei den BMDCs. Um unspezifische Färbung auszuschließen, wurden in beiden Fällen nicht infizierte Kontrollen verwendet.

In den folgenden Experimenten wurde versucht, die Infektionseffizienz bei den BMDCs zu verbessern. Hierfür wurden verschiedene Zellkulturplatten, verschiedene Viruskonzentrationen sowie Zellzahlen ausprobiert und die Zentrifugationsdauer verändert.

Dabei brachte eine Verlängerung der Zentrifugationsdauer um 10 Min. eine Verbesserung um ca. 15 % auf 30 bis 35 % CR101⁺ Zellen. Mit einer zusätzlichen Erhöhung der Viruskonzentration von 0,4 PFU/Zelle auf 12,5 PFU/Zelle wurden 55 – 62 % der Zellen infiziert. Ein höherer Prozentsatz CR101⁺ Zellen konnte auch durch eine weitere Steigerung der Viruskonzentration auf 25 PFU/Zelle nicht erreicht werden und die Lebendzellzahlen gingen zurück (Daten nicht gezeigt).

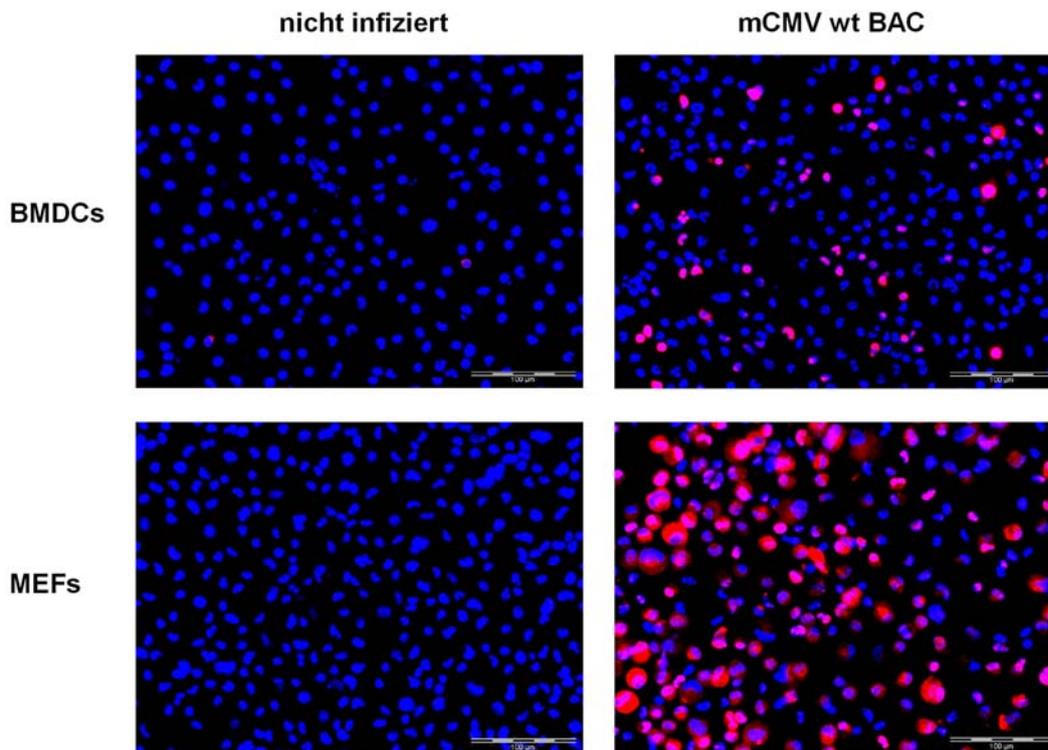


Abb. 3.23.: Infektion von BMDCs und MEFs mit mCMV

$1,5 \cdot 10^6$ BMDCs und MEFs wurden mit je 0,4 PFU/Zelle zentrifugal mit mCMV wt BAC infiziert und nach 17 h Inkubation mit anti-IE1 (pp89) CR101 (rot dargestellt) und DAPI (blau) gefärbt.

Maßstab: 100 μ m.

Die in allen Versuchen verwendeten BMDCs wurden aus dem Knochenmark von Mäusen aus den adhären Zellen ausdifferenziert. FACS-Analysen der unreifen BMDC-Präparationen zeigten stets einen Anteil von ca. 85 % bis 95 % CD11c⁺ Zellen.

Um den Anteil der CR101⁺ unter den CD11c⁺ Zellen zu bestimmen, wurden BMDC-Präparationen mit 0,4 PFU/Zelle oder 25 PFU/Zelle mCMV wt zentrifugal (20 Minuten) infiziert und nach 17 h für eine FACS-Analyse gefärbt. Hierfür wurden die Zellen zunächst auf der Oberfläche mit anti-CD11c-FITC gefärbt, anschließend mit Cytofix/Cytoperm fixiert

und permeabilisiert und danach intrazellulär mit anti-mCMV CR103 (dieser Antikörper färbt ein mCMV E-Protein) und anti-Maus IgG-PE inkubiert.

Dabei zeigte sich, dass unabhängig von der Viruskonzentration ca. 50 % bis 75 % der CD11c positiven Zellen auch CR103⁺ waren (Daten nicht gezeigt).

Im nächsten Schritt wurden BMDCs und MEFs mit dem mCMV Wildtyp infiziert und die DALIS-Bildung untersucht (Abb. 3.24.). Um unspezifische CR101-Färbung auszuschließen und die DALIS-Bildung zu überprüfen wurden zusätzlich nicht infizierte (Medium) und LPS [0,5 µg/ml] stimulierte BMDCs verwendet. Während LPS aktivierte BMDCs ausgeprägte DALIS-Bildung aufwiesen, verhielten sich mCMV wt infizierte BMDCs wie die Mediumkontrolle und bildeten so gut wie keine DALIS. Auch MEFs zeigten keinerlei DALIS-Bildung (Abb. 3.24.).

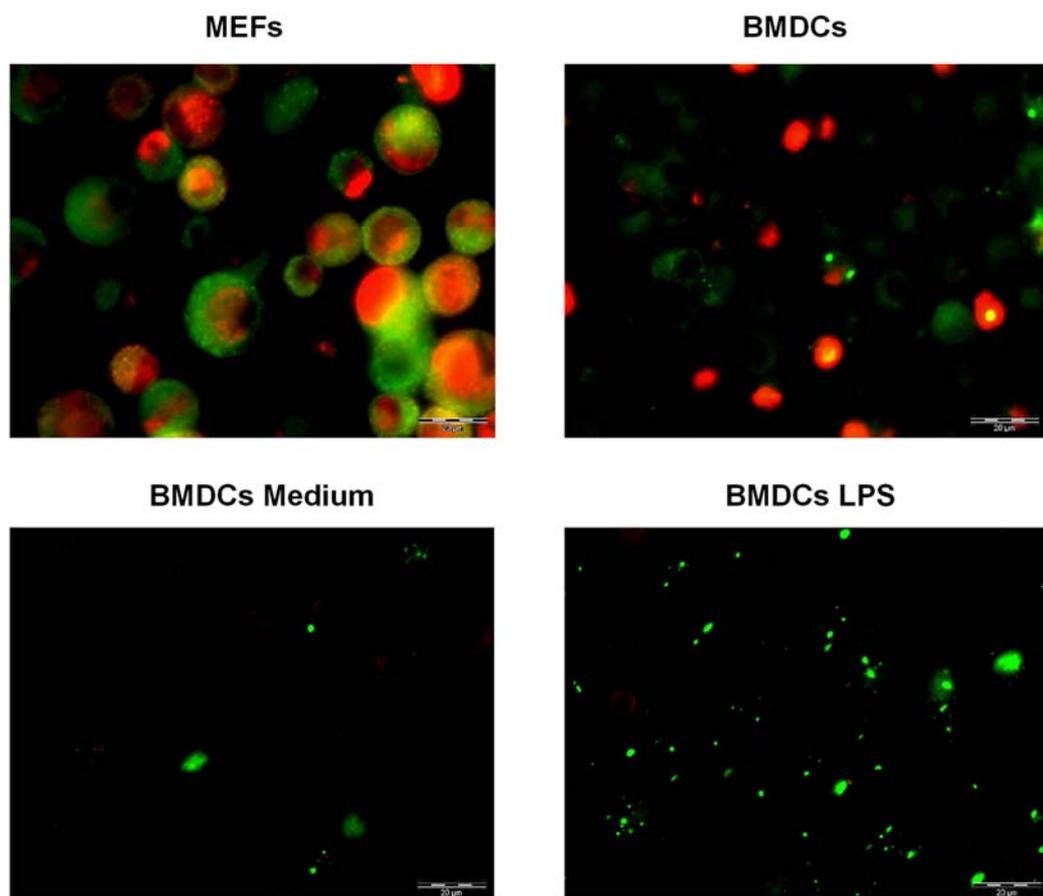


Abb. 3.24.: DALIS-Bildung nach mCMV Infektion

BMDCs und MEFs wurden mit 0,4 PFU/Zelle mit mCMV wt BAC infiziert (obere Reihe), nach 17 h mit anti-mCMV IE1(pp89) CR101 (rot) sowie FK2 (grün) gefärbt und im Fluoreszenzmikroskop analysiert. Als Kontrollen wurden nicht infizierte (Medium) und mit 0,5 µg/ml LPS aktivierte BMDCs verwendet. Maßstab: 20 µm.

Im Fall von den BMDCs wurden zusätzlich zu der DALIS-Bildung auch die Hochregulation der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 sowie die Sekretion von IL-6 untersucht (Abb. 3.25.). Um dabei die Kinetik der DC-Reifung nach mCMV-Infektion mit den Influenza-Daten vergleichen zu können, wurden die BMDCs entweder mit 0,4 PFU/Zelle mCMV wt BAC oder 1 PFU/Zelle PR/8/34 zu verschiedenen Zeitpunkten infiziert.

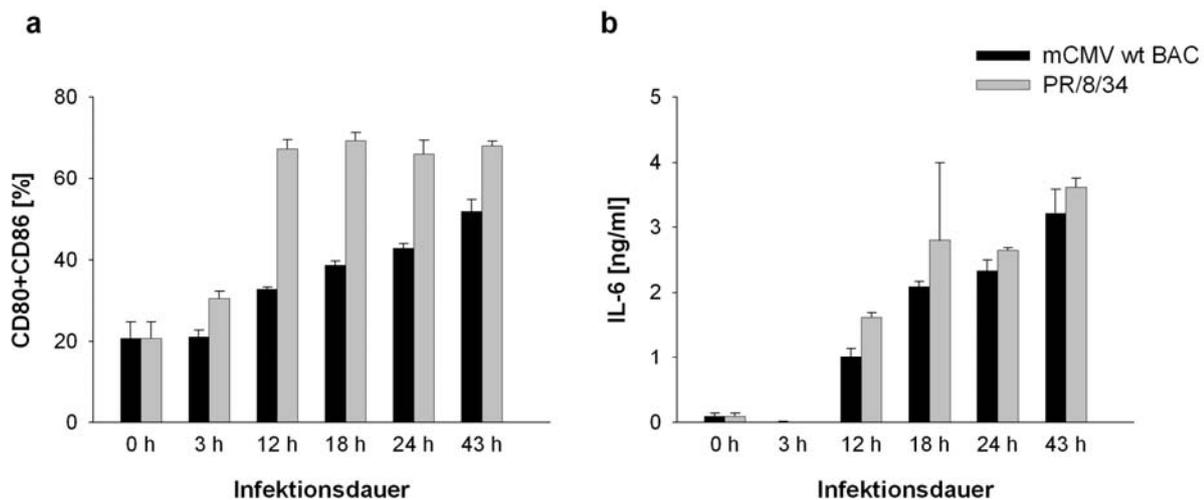


Abb. 3.25.: Kinetiken der DC-Reifung nach mCMV und Influenza Infektion

BMDCs wurden mit 0,4 PFU/Zelle mCMV wt BAC oder 1 PFU/Zelle PR/8/34 zu verschiedenen Zeitpunkten infiziert.

a) Oberflächenexpression von CD80 und CD86 im FACS.

b) IL-6 Konzentrationen in den Überständen.

Es stellte sich heraus, dass PR/8/34 eine stärkere und schnellere Hochregulation der kostimulatorischen Moleküle induzierte als mCMV wt (Abb. 3.25. a), während die Kinetik und Konzentrationen der durch die Viren bedingten IL-6 Produktion bei beiden Virustypen vergleichbar und für BMDCs relativ gering waren (Abb. 3.25. b).

3.2.3.2. Kinetik der Antigenpräsentation nach Infektion mit $\Delta m152$ im C57BL/6 und BALB/c System

Nachdem es durch die Infektion mit mCMV wt zu keiner Induktion der DALIS-Bildung bei BMDCs und MEFs kam, sollte im nächsten Schritt die Kinetik der Antigenpräsentation bei beiden Zellarten verglichen werden.

Sollten DALIS eine Rolle als Antigen-speicher bei der Antigenpräsentation spielen, wäre zu erwarten, dass es hier im Gegensatz zu den Influenza-Daten zu keiner Verzögerung der Präsentation kommt und sich die Kinetiken von BMDCs und MEFs gleichen.

Die Kinetiken der Antigenpräsentation nach mCMV-Infektion wurden im IFN- γ ELISPOT untersucht.

In einem Vorversuch wurden BMDCs und EL-4 Zellen mit 0,4 PFU/Zelle zentrifugal mit mCMV wt BAC oder der mCMV Mutante Δ m152 BAC (wie in Material und Methoden beschrieben) infiziert. Als Positivkontrolle wurden einige nicht infizierte Zellen mit Peptid (HGIRNASFI) beladen. Nach einer Stunde Inkubation im Zellinkubator wurden die Zellen zweimal mit Medium gewaschen und zusammen mit einer M45-spezifischen T-Zelllinie in eine anti-IFN- γ Antikörper gecoatete ELISPOT-Platte gegeben (0,1 Mio Targets + 50 oder 100 Effektoren). Nach Inkubation über Nacht im Zellinkubator wurde der Assay entwickelt und die Anzahl der Punkte (IFN- γ Spots) auf der Membran bestimmt, die ein Maß für die Anzahl der aktivierten T-Zellen darstellen (Abb. 3.26.).

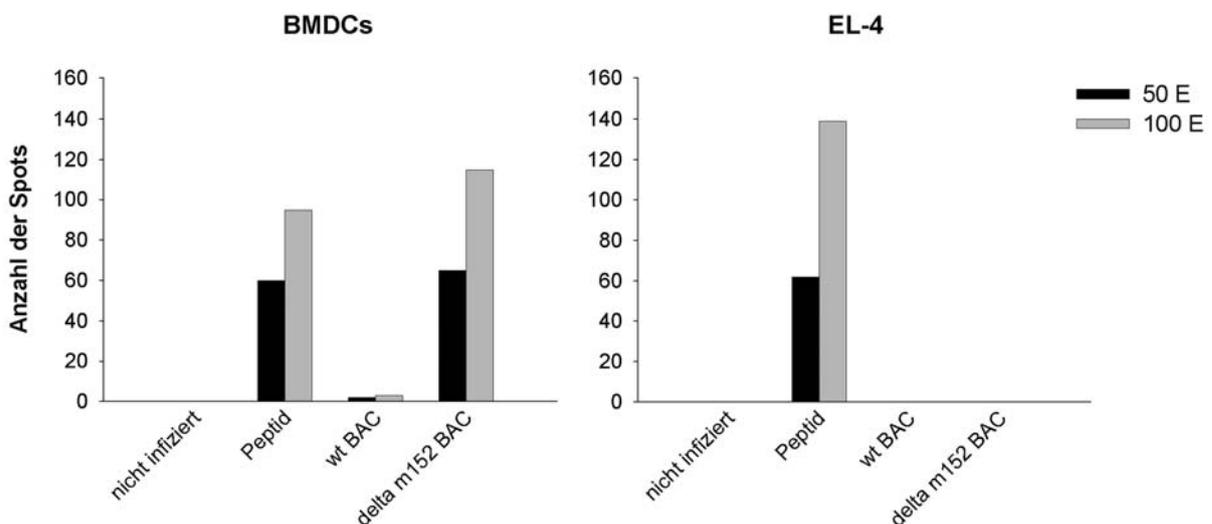


Abb. 3.26.: IFN- γ ELISPOT nach Infektion mit murinem Zytomegalovirus

BMDCs und EL-4 Zellen wurden nach Infektion mit 0,4 PFU/Zelle mCMV wt oder delta m152 zusammen mit einer M45-spezifischen T-Zelllinie in einer mit anti-IFN- γ Antikörper gecoateten ELISPOT-Platte über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Dabei wurden zu 0,1 Mio Targets jeweils 50 bzw. 100 Effektoren (E) pro Well gegeben.

Während in beiden Fällen die Peptidkontrollen positiv waren, zeigte sich, dass sich EL-4 Zellen nicht mit mCMV infizieren ließen (Abb. 3.26. rechts).

In den BMDCs erfolgte nach Infektion mit dem wt keine IFN- γ Produktion. Dies könnte auf eine fehlende bzw. stark verminderte Antigenpräsentation zurück zu führen sein.

Im mCMV wt vermindern drei Immunevasionsgene (m04, m06 und m152) die Präsentation antigener Peptide auf MHC-Klasse I-Molekülen^{64,66,67}. Durch das Ausschalten des Immunevasionsgens m152 in der mCMV Mutante Δ m152 BAC, das im wt für die Retention der MHC-Klasse I-Moleküle im (ERGIC)/cis-Golgi Kompartement verantwortlich ist, wurde eine stärkere Antigenpräsentation des M45 Epitops und damit eine T-Zell-Antwort ermöglicht (Abb. 3.26. links; 140).

Da sich EL-4 Zellen nicht infizieren ließen, wurden sie in den folgenden Experimenten durch MEFs ersetzt. Ferner wurden die mCMV Mutante Δ m152 BAC für die nachfolgenden ELISPOTs verwendet.

Um die jeweilige Infektionsdauer exakt bestimmen zu können, wurden die Zellen in den Kinetiken nach definierten Infektionszeiten mit Glutaraldehyd fixiert, bevor sie zu den T-Zellen gegeben wurden. Dabei stellte sich heraus, dass bei den MEFs durch die Fixierung die Antigenpräsentation inhibiert wurde (Daten nicht gezeigt). Bei den BMDCs wurde die Antigenpräsentation vermindert. Auch eine alternative Fixierungsmethode, die auf UV-induzierter Quervernetzung der DNA durch Psoralen basierte, zeigte keine Verbesserung (Daten nicht gezeigt).

Neben dem D^b restringierten Epitop⁹⁸⁵HGIRNASFI⁹⁹³ aus dem anti-apoptotischen mCMV Protein M45 ist auch ein D^d restringiertes Peptid desselben Proteins bekannt (⁵⁰⁷VGPALGRGL⁵¹⁵).

Um einen Vergleich zu erhalten, wurden die Kinetiken sowohl mit Δ m152 BAC infizierten BMDCs von C57BL/6 (D^b) als auch BALB/c (D^d) Mäusen durchgeführt (Abb. 3.27. a). In beiden Fällen erfolgte eine Antigenerkennung bereits nach 6 Stunden Infektion, das Maximum wurde zwischen 6 und 10 Stunden erreicht. Insgesamt fiel die Antwort im BALB/c System stärker aus als im C57BL/6 System.

Daher war es im Gegensatz zu dem C57BL/6 System auch möglich, eine Antwort bei dem Einsatz von fixierten BALB/c MEFs als Targets zu erhalten. Es stellte sich heraus, dass es keinen Unterschied in den Kinetiken der Präsentation von CTL-Epitopen zwischen BMDCs und MEFs gab (Abb. 3.27. b).

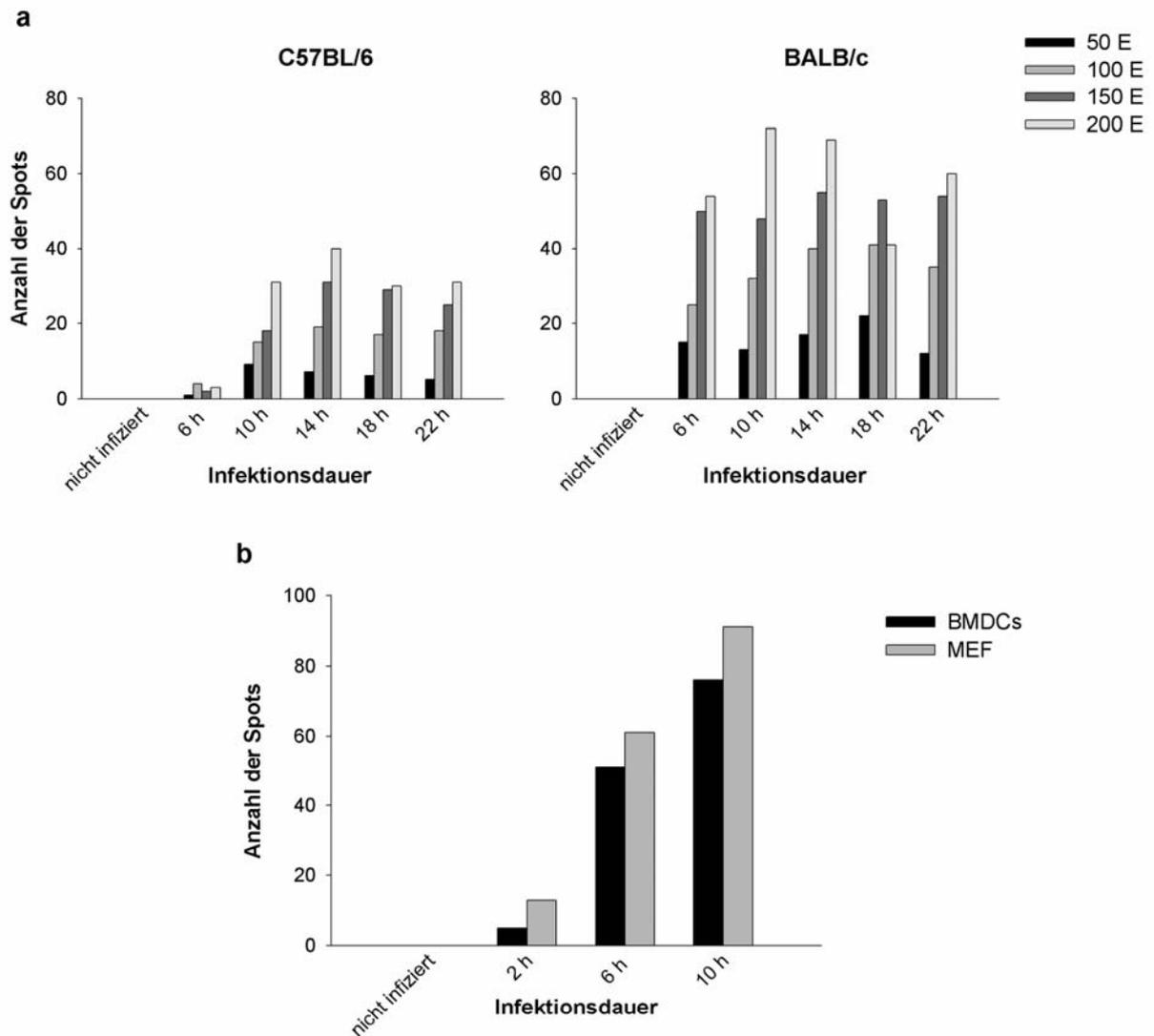


Abb. 3.27.: Kinetiken der Antigenpräsentation nach mCMV Infektion

a) BMDCs von C57BL/6 oder BALB/c Mäusen wurden mit je 0,4 PFU/Zelle delta m152 BAC zentrifugal infiziert, nach definierten Zeitpunkten fixiert und mit verschiedenen Konzentrationen der beiden M45-spezifischen T-Zelllinien im IFN- γ ELISPOT inkubiert.

b) BMDCs und MEFs von BALB/c Mäusen wurden wie oben beschrieben infiziert und mit M45 (VG PALGRGL)-spezifischen T-Zellen im IFN- γ ELISPOT inkubiert.

3.2.3.3. Einfluss der Immunevasionsgene auf die DC-Reifung und DALIS-Bildung

Nachdem die DC-Reifung und DALIS-Bildung bislang nur nach Infektion mit dem mCMV wt überprüft worden sind, sollten diese als nächstes nach Infektion mit mCMV Δ m152 BAC untersucht werden.

Hierfür wurden BMDCs, wie bereits beschrieben, mit 0,4 PFU/Zelle wt BAC oder Δ m152 BAC infiziert und die IL-6 Produktion, die Hochregulation kostimulatorischer Moleküle sowie die DALIS-Bildung miteinander verglichen (Abb. 3.28.).

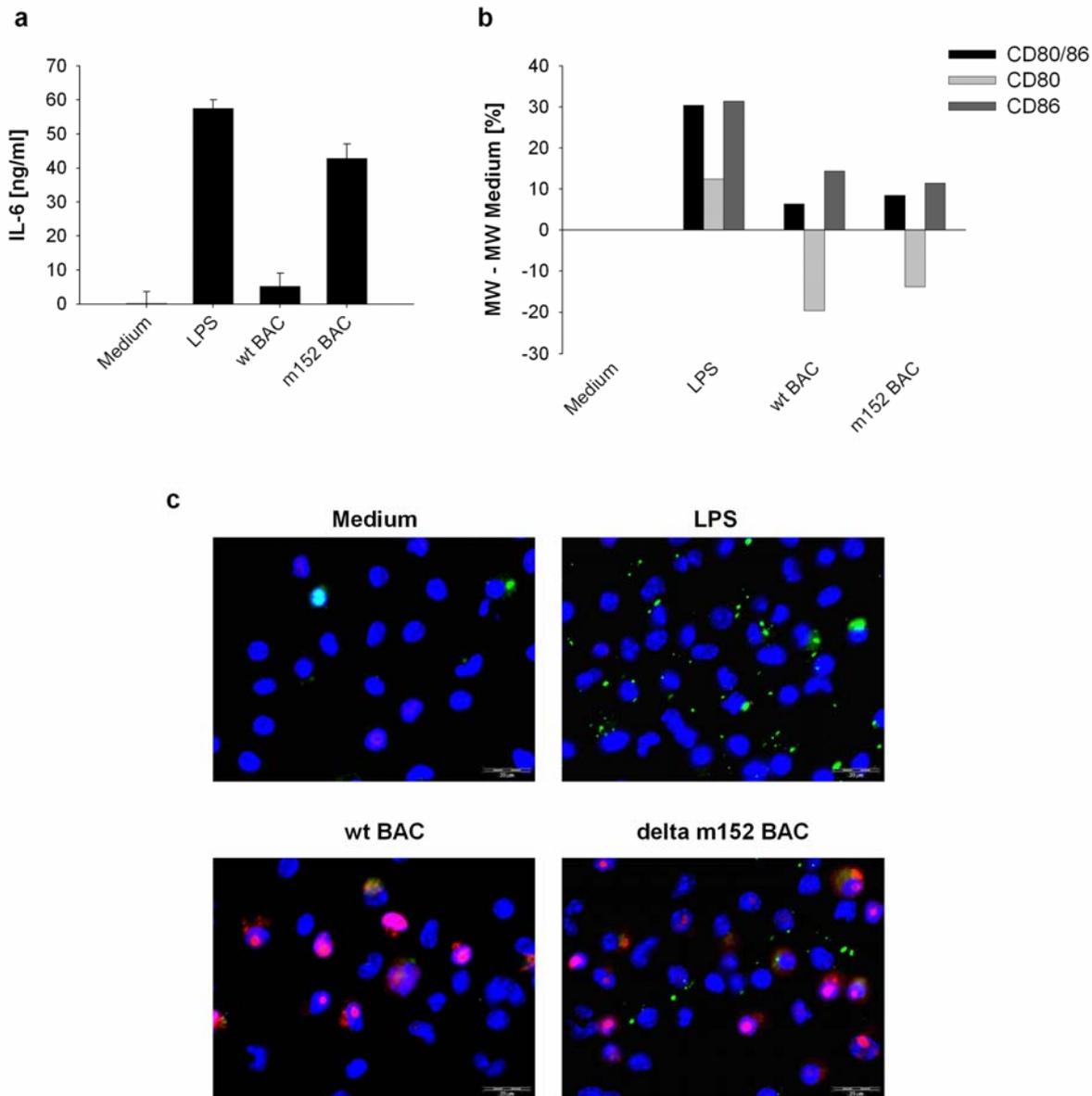


Abb. 3.28.: Einfluss des Immunevasionsgens m152 auf die DC-Reifung und DALIS-Bildung

BMDCs wurden mit 0,4 PFU/Zelle mCMV wt BAC oder delta m152 BAC zentrifugal infiziert.

a) Nach ca. 20 Stunden wurden mittels Sandwich-ELISA die IL-6 Konzentrationen in den Überständen ermittelt.

b) Nach ca. 20 Stunden wurden die Oberflächenmoleküle CD80 und CD86 gefärbt und im FACS analysiert.

c) Nach 17 Stunden wurden die Zellen mit FK2 (grün), CR103 (rot) und DAPI (blau) gefärbt und im Fluoreszenzmikroskop untersucht. Maßstab: 20 μ m.

Dabei stellte sich heraus, dass Δ m152 BAC im Gegensatz zum wt BAC eine starke IL-6 Produktion (Abb. 3.28. a) hervorrief und die DALIS-Bildung induzierte. Jedoch befanden

sich die DALIS fast ausschließlich in CR103 negativen, d. h. nicht infizierten, Zellen (Abb. 3.28. c).

Bei der Oberflächenexpression von CD80 und CD86 gab es keinen Unterschied zwischen dem Wildtyp und der Virusmutante. In beiden Fällen gab es einen leichten Anstieg doppelt positiver Zellen (CD80/86), der jedoch hauptsächlich auf eine Hochregulation von CD86 zurückzuführen war, während die CD80 Expression zurück ging (Abb. 3.28. b).

Das diese Effekte auf die Viren selbst und nicht auf kontaminierendes LPS zurückzuführen war, zeigten negative Testergebnisse der Viruspräparationen im LAL-Assay (Daten nicht gezeigt).

Ferner wurden die Versuche mit Viren, die nicht mit dem BAC-System hergestellt worden sind, wiederholt, um systembedingte Artefakte ausschließen zu können. Abb. 3.29. zeigt die Ergebnisse eines IL-6 ELISAs sowie die FACS-Analyse der infizierten Zellen. Unabhängig von der Herstellungsmethode induzierten die beiden Virusmutanten IL-6 sowie CD80 und CD86.

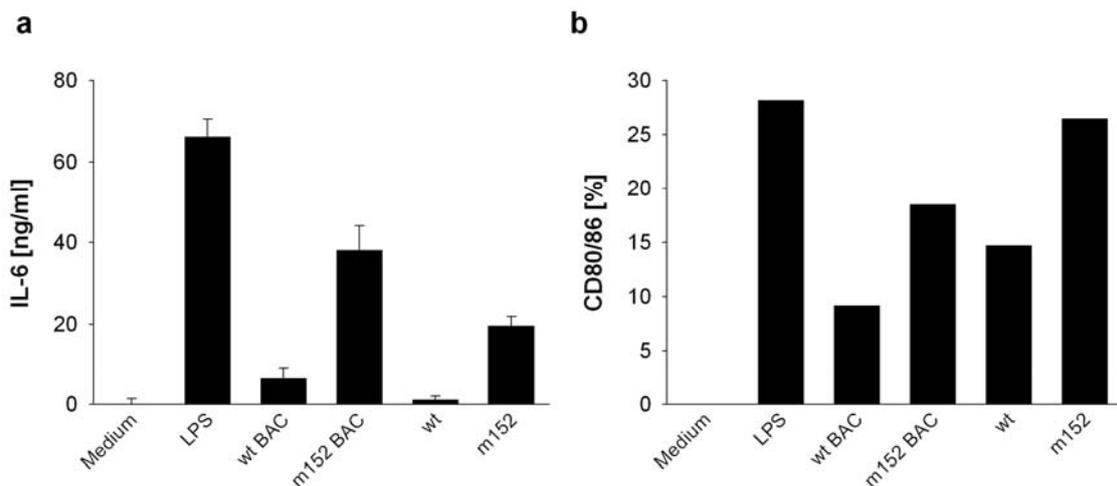


Abb. 3.29.: Vergleich zweier viraler Herstellungsmethoden

BMDCs wurden mit 0,4 PFU/Zelle zentrifugal infiziert oder mit 0,5 µg/ml LPS stimuliert. Dabei wurden Viren verwendet, die entweder mit dem BAC-System oder einer anderen Herstellungsmethode produziert worden sind.

a) IL-6 ELISA mit BMDC-Überständen nach 18 Stunden Infektion.

b) FACS-Färbung von CD80 und CD86 nach 18 Stunden Infektion.

Im nächsten Schritt wurden nun weitere Immunevasionsgenmutanten und im Vergleich dazu auch Peptidmutanten auf ihre Fähigkeit hin untersucht, die DC-Reifung auszulösen und DALIS-Bildung zu induzieren.

Bei den Immunevasionsgenmutanten wurden Einzelmutanten (nur ein Immunevasionsgen wurde ausgeschaltet), Doppelmutanten (zwei Immunevasionsgene wurden ausgeschaltet) und

eine Dreifachmutante (alle Immunevasionsgene nicht funktionsfähig) verwendet. Sämtliche dieser Mutanten stammen vom Institut der Virologie Mainz (Arbeitsgruppe Prof. Reddehase) und wurden ursprünglich von der Arbeitsgruppe Prof. Koszinowski (Institut für Virologie der LMU München) hergestellt ¹⁰³.

Die folgende Tabelle liefert eine Übersicht über sämtliche Immunevasionsgenmutanten:

m04/gp34	-		+	-	-		+	-	+		+
m06/gp48	-		-	+	-		+	+	-		+
m152/gp40	-		-	-	+		-	+	+		+
	Δ m04 + 06+152 (BAC)		Δ m06 + 152 (BAC)	Δ m04 + 152 (BAC)	Δ m04 + 06 (BAC)		Δ m152 (BAC)	Δ m04 (BAC)	Δ m06 (BAC)		WT (BAC)
- Gen ausgeschaltet + Gen funktionsfähig											

Im Vergleich zu den Immunevasionsgenmutanten wurden neben dem Wildtyp auch einige Peptidmutanten der Arbeitsgruppe Prof. Reddehase herangezogen. Hierbei handelte es sich um folgende Funktionsverlustmutanten: Δ m157, m164 (m164 I265A) und Δ IE1 (L176A).

Während m157 ein Genprodukt kodiert, das als Ligand für den aktivierenden NK-Zellen Rezeptor Ly29H fungiert, handelt es sich bei dem Genprodukt von m164, p38, um ein glykosyliertes, membranassoziiertes Protein, dessen immundominantes Peptid ²⁵⁷AGPPRYSRI²⁶⁵ auch in Anwesenheit aller drei Immunevasionsgene über H-2D^d präsentiert wird. IE1 schließlich gehört zu den *Major Immediate Early* (MIE) Genen, die an der Genregulation beteiligt sind.

Neben den Mutanten standen auch einige so genannte Revertanten zur Verfügung, bei denen ausgehend von der Mutante der Funktionsverlust rückgängig gemacht wurde. Für die Immunevasionsgenmutanten existierte nur eine Revertante, Δ m152 BAC Revertante, ferner wurden folgende Revertanten getestet: m164 Revertante, Δ IE1 A176L* (Wobble-Leu-Revertante) und Δ IE1 A176F (Phenylalanin-Revertante).

Die Infektion der BMDCs erfolgte stets mit 0,4 PFU/Zelle zentrifugal. Als Positivkontrollen dienten Stimulationen mit LPS [0,5 μ g/ml] oder poly(I:C) [50 μ g/ml]. Nach 18-20 h wurden die Überstände geerntet und die IL-6-Konzentrationen gemessen, die Zellen wurden mit anti-CD80 und anti-CD86 gefärbt und im FACS analysiert (Abb. 3.30.). Zusätzlich wurde ein

Teil der Zellen nach 16 bis 17 h Infektionszeit intrazellulär mit FK2 + CR103 sowie DAPI angefärbt und im Fluoreszenzmikroskop untersucht (Daten nicht gezeigt).

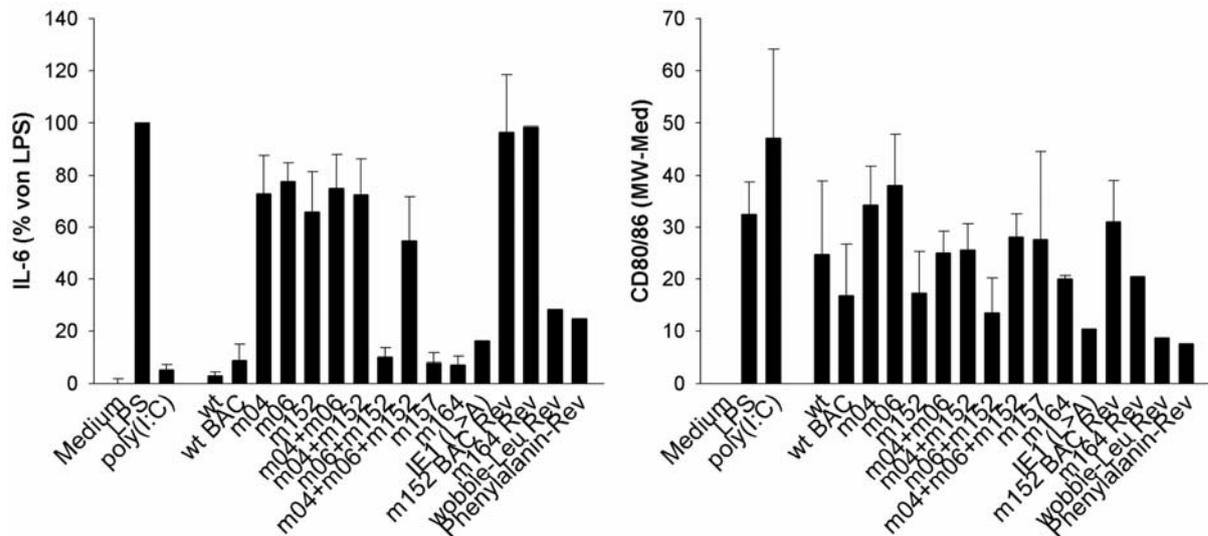


Abb. 3.30.: Einfluss von mCMV Mutanten und Revertanten auf die Reifung von BMDCs

BMDCs wurden mit den angegebenen mCMV Mutanten und Revertanten infiziert (0,4 PFU/Zelle; zentrifugal), nach 18 bis 20 Stunden die IL-6 Konzentrationen in den Überständen ermittelt (links) und die Zellen mit CD80 und CD86 für die Analyse im FACS gefärbt (rechts).

Die Bezeichnungen der Viren geben an, welche Immunevasionsgene ausgeschaltet worden sind.

Es zeigte sich, dass sämtliche Immunevasionsgenmutanten mit Ausnahme der Doppelmutante $\Delta m06+\Delta m152$ die Produktion von IL-6 induzierten, während die Peptidmutanten sich in dieser Beziehung alle wie der Wildtyp verhielten. Da die Gesamtmenge an sekretiertem IL-6 in den einzelnen Versuchen stark schwankte (für LPS zwischen ca. 35 ng/ml und 300 ng/ml), die Verhältnisse jedoch dieselben blieben, wurden die Daten jedes Einzelversuchs anhand des LPS-Wertes für die obige Abbildung normiert (LPS = 100 %) und die Mittelwerte dargestellt. Auffällig war, dass sich zwei der Revertanten nicht wie der Wildtyp verhielten, obwohl sie formal diesem entsprechen sollten. Besonders deutlich ist der Unterschied zwischen der Peptidmutante m164, die kein IL-6 induzierte, und ihrer Revertante m164 Rev, die starke IL-6 Produktion auslöste.

Im Gegensatz zur Produktion von IL-6 gab es keine signifikanten Unterschiede in der Induktion der kostimulatorischen Moleküle (Abb. 3.30. rechts).

Ferner induzierten alle Mutanten und Revertanten, die die IL-6 Produktion auslösten, die Bildung von DALIS (Daten nicht gezeigt). Auch hier fiel auf, dass sich die DALIS primär in den CR103 negativen Zellen befanden.

Neben IL-6 wurde in einem Teil der Zellüberstände auch die Konzentrationen von IL-12 (p40 + p70) sowie IL-10 ermittelt (Abb. 3.31.). Während sämtliche getesteten Viren unabhängig

von Mutationen die IL-12 Sekretion auslösten (Abb. 3.31. links), induzierten nur die Viren IL-10, die auch die IL-6 Produktion anregten (Abb. 3.31. rechts).

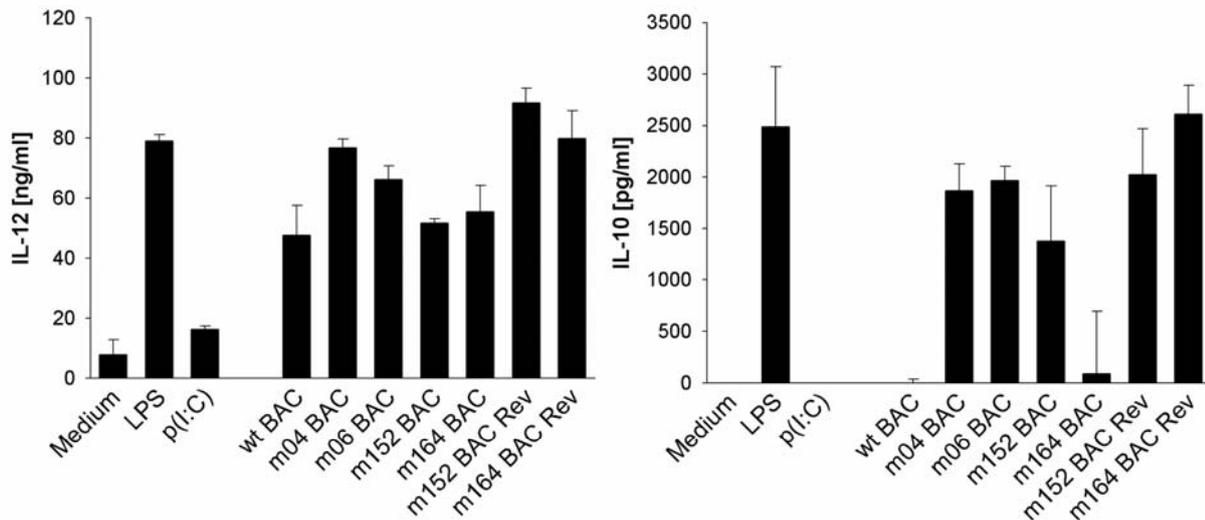


Abb. 3.31.: Einfluss von mCMV Mutanten und Revertanten auf die Bildung von IL-12 und IL-10
In einem Teil der bereits in Abb. 3.30 analysierten Zellüberstände wurde zusätzlich zu den IL-6-Konzentrationen auch auf die Konzentrationen von IL-12 (p40+p70) sowie IL-10 überprüft.

3.2.3.4. Einfluss der Immunevasionsgene auf die Antigenpräsentation

Die Hauptfunktion der Immunevasionsgene liegt, wie bereits beschrieben, in einer Einschränkung der MHC Klasse-I restringierten Antigenpräsentation. Ein möglicher Einfluss auf die DC-Aktivierung wurde bislang nicht beschrieben.

Um zu überprüfen, ob die DC-Aktivierung und Antigenpräsentation nach mCMV Infektion in einem Zusammenhang stehen, wurde letztere im IFN- γ ELISPOT für alle Immunevasionsgenmutanten untersucht.

Hierfür wurden 5 Mio BMDCs in einer 10 cm Petrischale in einem Gesamtvolumen von 8 ml Medium mit 0,4 PFU/Zelle zentrifugal (3 Minuten + 17 Minuten) infiziert. Nach 1,5 h Inkubation wurden die Zellen gerettet, 3 mal mit je 4 ml Medium gewaschen und die Lebendzellzahlen bestimmt. Danach wurden 0,1 Mio BMDCs als Targets in eine vorbereitete ELISPOT-Platte gegeben und M45-spezifische CTL dazu titriert. Abbildung 3.32. zeigt die Anzahl der IFN- γ Spots bei Einsatz von 300 T-Zellen pro Well (links).

Um einen direkten Vergleich von Antigenpräsentation und IL-6 Produktion zu erhalten, wurde ein Teil der BMDCs ohne T-Zellen in einer 96-U-Formplatte in einem Gesamtvolumen von 200 μ l für 23 h inkubiert und anschließend die IL-6 Konzentrationen in den Überständen mittels IL-6 ELISA untersucht (Abb. 3.32. rechts).

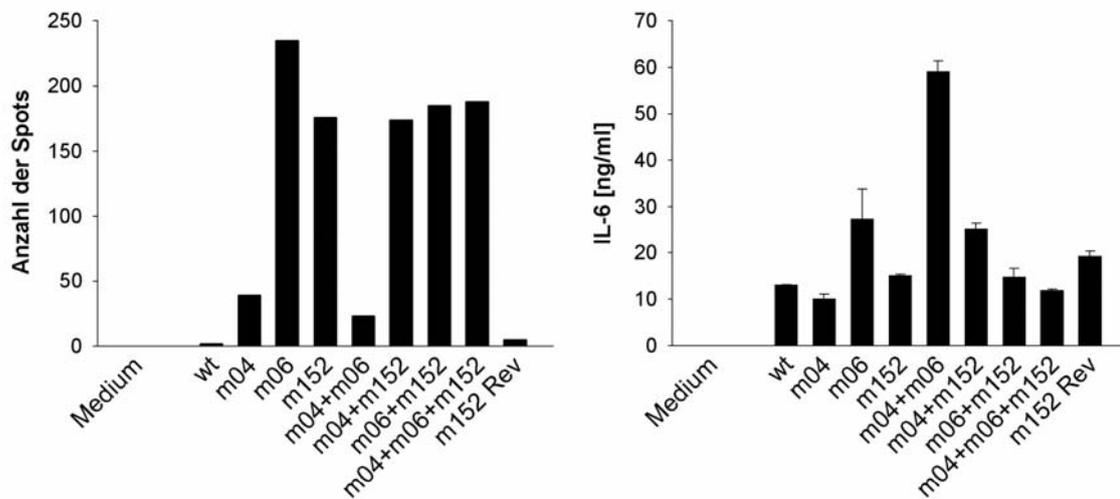


Abb. 3.32.: Antigenpräsentation und IL-6 Produktion nach mCMV-Infektion von BMDCs

5 Mio BMDCs wurden mit 0,4 PFU/Zelle mCMV zentrifugal infiziert. Nach 1,5 h Inkubation wurden die Zellen geerntet und gewaschen bevor 0,1 Mio Targets zu 300 M45-spezifischen CTL gegeben wurden (links) Für die Messung von IL-6 wurden die Targets ohne Zugabe von T-Zellen weiter inkubiert, nach 23 h die Überstände abgenommen und diese im IL-6 ELISA untersucht (rechts).

Die Bezeichnung der Viren geben an, welche Immunevasionsgene ausgeschaltet wurden.

Der Vergleich des Einflusses der Immunevasionsgene auf die Antigenpräsentation und die IL-6 Produktion zeigte deutlich unterschiedliche Muster. Während beim wt und der $\Delta m152$ Revertante die Antigenpräsentation durch die Immunevasionsgene wie erwartet unterbunden wurde, präsentierten sämtliche Mutanten, in denen m152 alleine oder in Kombination mit m04 und oder m06 ausgeschaltet worden ist, das M45 Peptid auf der Oberfläche. Dagegen induzierte die Mutante $\Delta m04+\Delta m06$, bei der m152 als einziges Immunevasionsgen erhalten geblieben ist, keine T-Zell-Antwort. Die IL-6 Antwort fiel jedoch nach Infektion der BMDCs mit dieser Mutante mit Abstand am stärksten aus.

Interessant war auch das Verhalten der Mutanten $\Delta m04$ und $\Delta m06$. Während letztere die IFN- γ Produktion auslöste, erfolgte nach Infektion mit $\Delta m04$ nur eine schwache T-Zell-Antwort.

Diese Beobachtungen deckten sich mit noch unpublizierten Versuchsergebnissen von Dr. Holtappels-Geginat vom Institut für Virologie der Universität Mainz, die dasselbe Experiment mit MEFs als Targetzellen durchgeführt hat.

Die IL-6 Daten widersprachen in einigen Punkten den bisher erhaltenen und in Abbildung 3.30. dargestellten Ergebnissen. Während die Mutanten $\Delta m04$, $\Delta m152$, $\Delta m04+\Delta m06+\Delta m152$ und die Revertante $\Delta m152$ normalerweise eine deutlich stärkere IL-6 Produktion induzierten als der wt, waren in diesem Versuch keine signifikanten Unterschiede zum wt zu erkennen. Auch die IL-6 Sekretion nach Infektion mit $\Delta m06$ oder $\Delta m04+\Delta m152$ fiel in den vorherigen Experimenten deutlich stärker aus.

3.2.3.5. Aktivierung von CR103⁻ BMDCs nach mCMV-Infektion

Nachdem nun gezeigt werden konnte, dass alle Immunevasionsgenmutanten außer $\Delta m06+\Delta m152$ in den meisten Fällen die IL-6 Produktion und DALIS-Bildung induzierten, sollte als nächstes geklärt werden, ob die infizierten Zellen selbst, die nicht infizierten oder beide durch die Viren aktiviert worden sind.

Hierzu wurden BMDCs mit 1 PFU/Zelle zentrifugal (3 Minuten + 17 Minuten) infiziert, nach 17 h fixiert, intrazellulär mit FK2, CR103 und DAPI gefärbt und im Fluoreszenzmikroskop analysiert (Abb. 3.33.). Dabei stellte sich heraus, dass FK2 positive Zellen (grün) in der Regel CR103 negativ (rot) waren. DALIS-Bildung in Virusprotein positiven BMDCs traten nur in Ausnahmefällen auf.

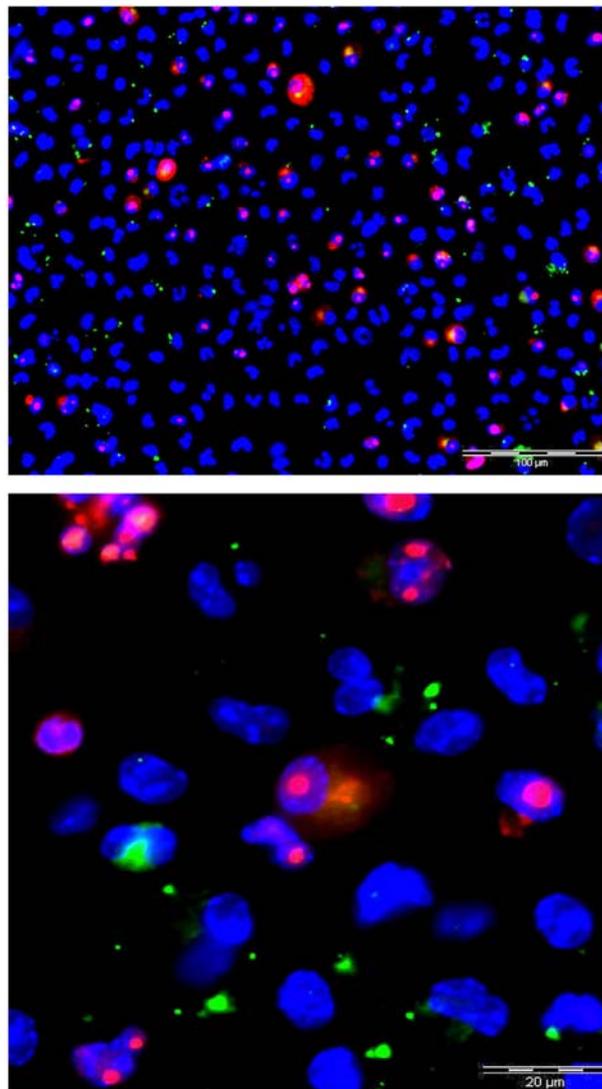


Abb. 3.33.: DALIS-Bildung nach mCMV-Infektion
BMDCs wurden mit 1 PFU/Zelle einer aktivierenden Virusmutante zentrifugal infiziert, nach 17 h fixiert und intrazellulär mit FK2 (grün) + CR103 (rot) sowie DAPI (blau) gefärbt.
Maßstab: oben 100 µm; unten 20 µm.

Des Weiteren wurde überprüft, ob sich mCMV wt infizierte Zellen durch LPS zur DALIS-Bildung anregen lassen, oder ob die Infektion mit dem wt bzw. einer nicht aktivierenden Peptidmutante die Stimulation der BMDCs verhindert.

BMDCs wurden wie oben beschrieben mit mCMV wt BAC infiziert. Die Zugabe von 50 ng/ml LPS erfolgte entweder 1 h oder 4 h nach Infektion. Nach weiteren 15,5 h wurden die Überstände zur Analyse im IL-6 ELISA abgenommen (Abb. 3.34. a). Während die Infektion mit wt, wie bereits in vorherigen Experimenten beobachtet, zu einer schwachen IL-6 Produktion führte, induzierte LPS eine starke IL-6 Sekretion. Die Behandlung von infizierten BMDCs führte zu einer um ca. 45 % verminderten IL-6 Konzentration in den Überständen gegenüber LPS alleine (Abb. 3.34. a). Dabei spielte der Zeitpunkt der LPS-Zugabe keine Rolle.

Des Weiteren wurden Δ m157-infizierte BMDCs mit unterschiedlichen Mengen LPS behandelt. Als Kontrolle dienten nicht infizierte Zellen (Abb. 3.34. b). Die Analyse der Überstände ergab keine signifikanten Unterschiede der IL-6 Produktion zwischen LPS-behandelten infizierten und nicht infizierten Zellen. Lediglich durch die Zugabe von 0,5 ng/ml LPS zu infizierten BMDCs wurde eine leicht erhöhte IL-6 Konzentration gegenüber infizierten, nicht LPS-behandelten Zellen beobachtet. Diese Menge LPS alleine reichte nicht aus, die IL-6 Produktion zu induzieren (Abb. 3.34. b).

Die gleichen Zellen wurden nach Abnahme der Überstände fixiert und intrazellulär mit FK2 sowie CR103 und DAPI gefärbt. Exemplarisch sind infizierte und nicht infizierte Zellen, die mit 50 ng/ml LPS behandelt wurden, dargestellt (Abb. 3.34. c). Während LPS stimulierte BMDCs deutliche DALIS-Bildung aufwiesen, induzierte das Virus keine DALIS. Behandelte man dagegen infizierte BMDCs mit LPS, kam es zu einer deutlichen DALIS-Entstehung. Dabei zeigte die DAPI-Färbung, dass sich die DALIS fast ausschließlich in CR103⁻ Zellen befanden (Abb. 3.34. c rechts unten).

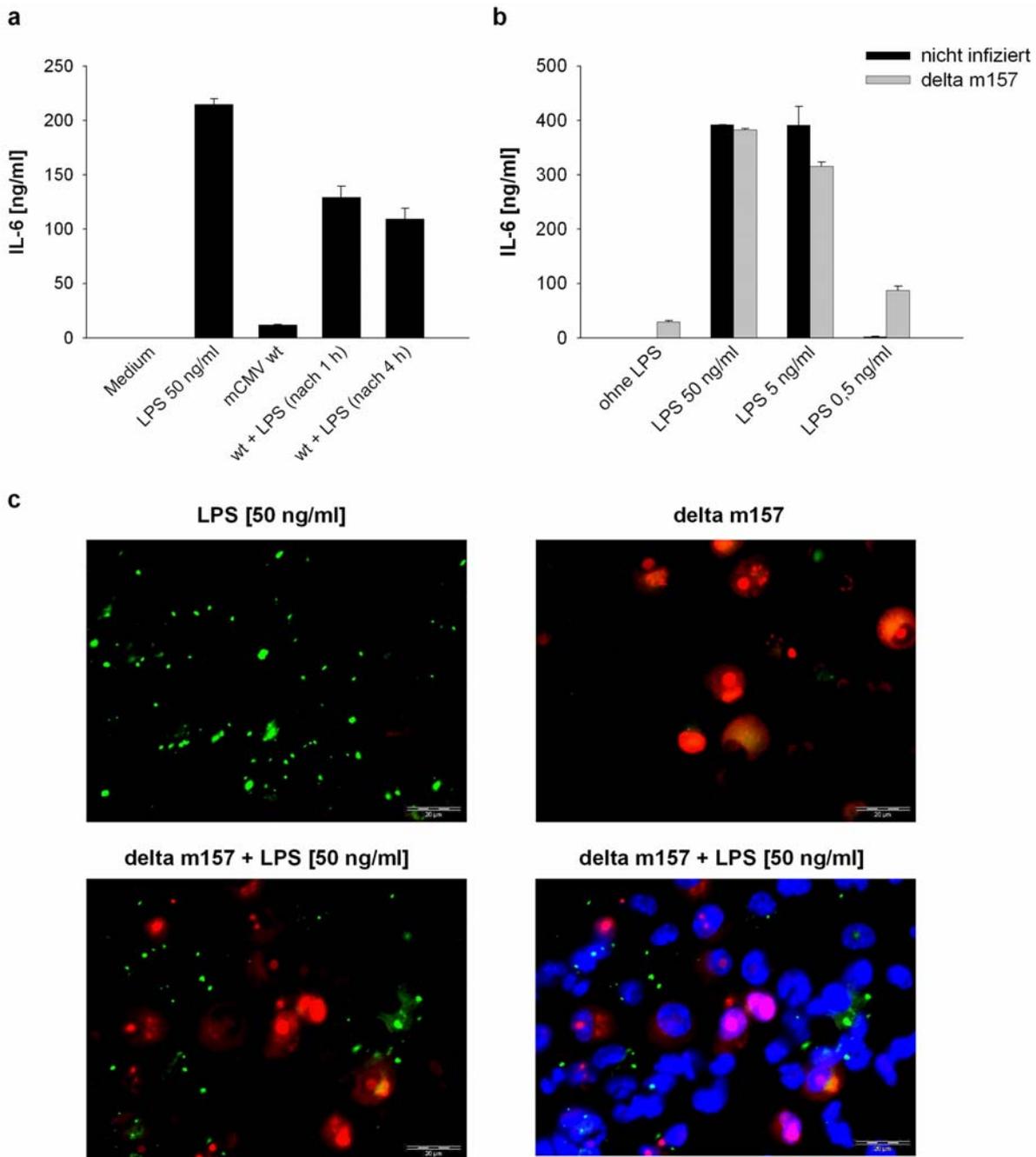


Abb. 3.34.: LPS-Stimulation mCMV-infizierter BMDCs

a) BMDCs wurden mit 1 PFU/Zelle wt BAC zentrifugal infiziert. Nach 1 h bzw. 4 h Inkubation erfolgte die Zugabe von 50 ng/ml LPS zu den infizierten Zellen. Nach weiteren 15,5 h wurden die Zellüberstände abgenommen und im IL-6 ELISA analysiert.

b) BMDCs wurden mit 1 PFU/Zelle delta m157 zentrifugal infiziert und nach 1 h verschiedene Konzentrationen von LPS zu den Zellen titriert. Nach 16 h Inkubationszeit wurden die Überstände abgenommen und die IL-6 Konzentrationen ermittelt.

Ferner wurden die Zellen fixiert und intrazellulär mit FK2 (grün) und CR103 (rot) gefärbt (c). Im Bild rechts unten wurden zusätzlich die Zellkerne in blau dargestellt.

Maßstab: je 20 µm.

Neben der DALIS-Bildung wurde nach Infektion mit mCMV wt bzw. Immunevasionsgenmutanten oder Peptidmutanten mittels intrazellulärer Zytokinfärbung auch überprüft, welche Zellen für die IL-6 Produktion zuständig waren. BMDCs von C57BL/6

sowie C3H/HeJ/TLR2^{-/-} wurden, wie oben bereits erwähnt, zentrifugal mit verschiedenen mCMV-Mutanten oder dem mCMV WT infiziert (1 PFU/Zelle). Als Kontrollen wurden LPS [50 ng/ml] und poly(I:C) [100 µg/ml] verwendet.

Nach 7 h Inkubation wurde Brefeldin A [Endkonzentration 1 µg/ml] zugegeben und die Zellen weitere 9 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet, 3 mal mit PBS gewaschen und mit Cytofix/Cytoperm permeabilisiert. Die intrazelluläre Färbung erfolgte mit anti-IL-6-PE und CR103 sowie anti-Maus-IgG-APC. Zusätzlich wurde eine Oberflächenfärbung mit anti-CD11c-FITC durchgeführt. Abb. 3.35. zeigt einen Teil der erhaltenen FACS-Daten, die dargestellten Zellen sind allesamt CD11c⁺. Abb. 3.36. gibt eine Übersicht über die Induktion der IL-6 Produktion sämtlicher mCMV-behandelter Proben. Dargestellt ist jeweils der Anteil der IL-6⁺ Zellen von den CR103⁻CD11c⁺ bzw. CR103⁺CD11c⁺ Zellen.

Wie in Abbildung 3.35. zu sehen, induzierte poly(I:C) bei BMDCs beider Mausstämme IL-6, während LPS wie erwartet nur Zellen von C57BL/6 Mäusen aktivierte. Bei den mCMV behandelten Zellen sieht man deutliche CR103-Färbungen, wobei die IL-6 Produktion beim mCMV WT generell schwächer ausfiel als bei der Doppelmutante.

Es stellte sich heraus, dass sowohl CR103⁻ als auch CR103⁺ Zellen nach Behandlung mit Immunevasionsgenmutanten IL-6 produzierten, jedoch war der Anteil der IL-6⁺ Zellen unter den CR103⁻ Zellen 2 bis 3 mal so hoch wie bei den infizierten Zellen (Abb. 3.36.).

Infektion mit mCMV wt bzw. IE1 sowie m164 führte bei C57BL/6 Zellen zu keiner ausgeprägten IL-6 Induktion, bei C3H/HeJ/TLR2^{-/-} dagegen produzierten diese Zellen fast genauso viel IL-6 wie BMDCs, die mit Immunevasionsgenmutanten infiziert worden sind.

Die Infektionsrate lag zwischen 49 % und 86 %.

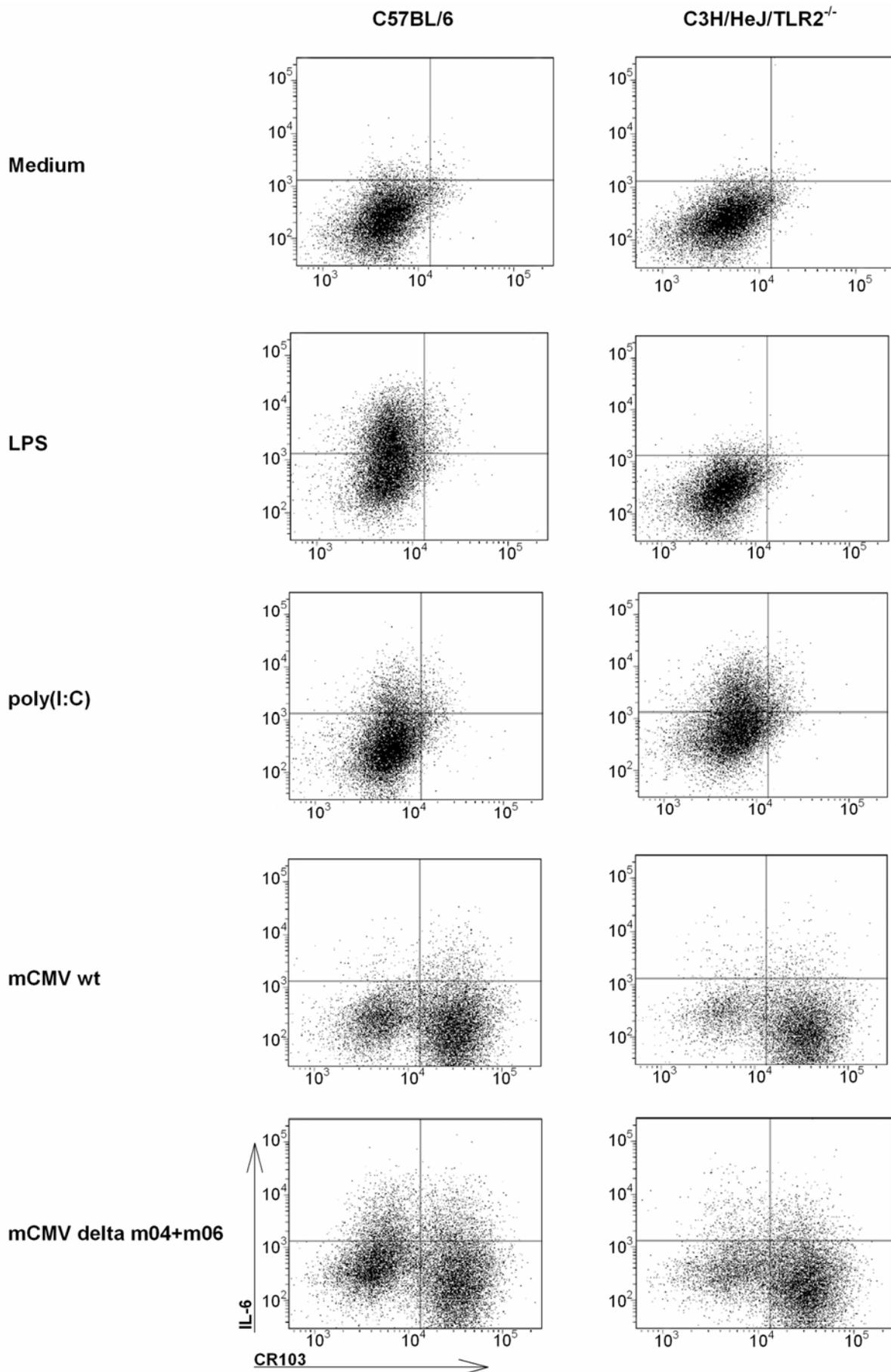


Abb. 3.35.: IL-6 Produktion mCMV-infizierter BMDCs

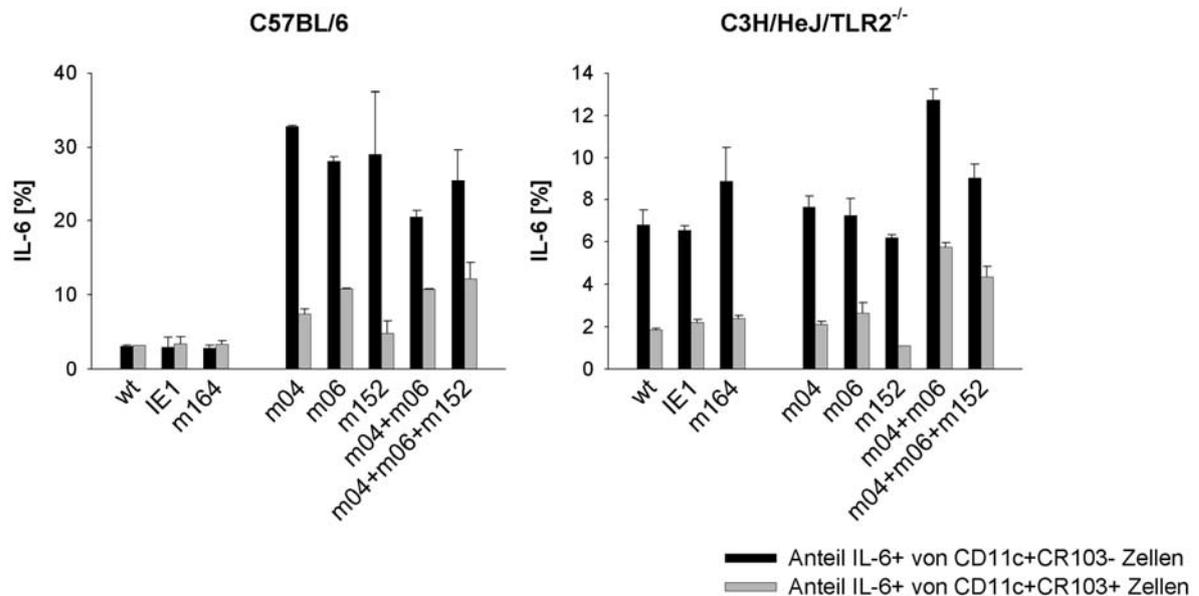


Abb. 3.36.: Vergleich der IL-6 Produktion von infizierten und nicht infizierten BMDCs

BMDCs wurden mit 1 PFU/Zelle mCMV zentrifugal infiziert. Nach 7 h Inkubationszeit wurde Brefeldin A zugegeben und die Zellen weitere 9 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit CR103 sowie anti-IL-6 Antikörper intrazellulär gefärbt. Zusätzlich wurde CD11c auf den Zelloberflächen markiert.

Dargestellt ist der jeweilige Anteil der IL-6 positiven Zellen der infizierten (CR103+) bzw. nicht infizierten (CR103-) CD11c⁺ Zellen.

Die Bezeichnungen der Viren geben an, welche Immunevasionsgene ausgeschaltet worden sind. Bei IE1 und m164 handelte es sich um Peptidmutanten mit intakten Immunevasionsgenen.

Wodurch CR103⁻ BMDCs veranlasst worden sind, DALIS zu bilden und IL-6 zu produzieren, war unklar. Eine denkbare Möglichkeit war, dass von den infizierten Zellen gebildete und sekretierte Botenstoffe die benachbarten nicht infizierten BMDCs aktivierten. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden Überstände von BMDCs, die mit verschiedenen Virusmutanten infiziert worden sind, zu nicht infizierten BMDCs gegeben. Vor Zugabe der Überstände wurden diese mit UV-Licht (254 nm; 15 Minuten; 8 Watt; 15 cm Abstand) bestrahlt, um eventuell noch vorhandene, lebende Viren abzutöten und eine Infektion zu verhindern. Danach wurden je 50 µl Überstand pro Well zu 0,25 Mio BMDCs gegeben, das Gesamtvolumen betrug 200 µl pro Well (in einer 96-U-Platte). Als Kontrolle für den nachfolgenden ELISA wurden die eingesetzten Überstände bei gleichem Gesamtvolumen auch in Wells ohne Zellen gegeben. Nach 17 h wurden die neuen Überstände abgenommen, und im IL-6 ELISA untersucht (Abb. 3.37. a). Die Zellen wurden fixiert und wie bereits beschrieben intrazellulär mit FK2, CR103 sowie DAPI gefärbt und im Fluoreszenzmikroskop analysiert (Abb. 3.37. b).

Es zeigte sich, dass Überstände von BMDCs, die mit aktivierenden Virusmutanten (Δ m04+ Δ m06 und Δ m04+ Δ m152) infiziert worden sind, die Reifung immaturer BMDCs

induzieren konnten. Im Gegensatz dazu aktivierten die Überstände Wildtyp-infizierter und $\Delta m06+\Delta m152$ infizierter Zellen die unreifen BMDCs nicht. Die aktivierenden Überstände induzierten sowohl die Bildung von IL-6 wie auch von DALIS. Die fehlende CR103-Färbung wies darauf hin, dass lösliche Stoffe in den Überständen, nicht aber erneute Infektion für die Reifung der DCs verantwortlich waren.

Neben BMDCs von C57BL/6 Mäusen wurden in weiteren Versuchen auch BMDCs von C3H/HeJ/TLR2^{-/-} verwendet und die Wirkung der Überstände untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass verschiedene Überstände von mCMV-infizierten Zellen nicht in der Lage waren, die IL-6 Produktion oder DALIS-Bildung in diesen Zellen zu induzieren (Daten nicht gezeigt). Lediglich die als Kontrolle verwendeten Überstände poly(I:C) stimulierter Zellen, die die doppelsträngige RNA noch enthielten, aktivierten C3H/HeJ/TLR2^{-/-} BMDCs. Die Überstände LPS-stimulierter C57BL/6 BMDCs, in denen noch LPS vorhanden war, aktivierten nur C57BL/6 BMDCs nicht jedoch C3H/HeJ/TLR2^{-/-} BMDCs.

Dementsprechend war auch IL-6, das in allen bisherigen Versuchen gemeinsam mit der Bildung von DALIS auftrat, nicht in der Lage, BMDCs von C57BL/6 oder C3H/HeJ/TLR2^{-/-} Mäusen zu aktivieren. Dabei wurden IL-6 Konzentrationen zwischen 1 ng/ml und 116 ng/ml getestet. Das verwendete IL-6 stammte entweder von BD (554582) oder wurde in Mainz selbst hergestellt (Institut für Immunologie; A. Hobel; murines IL-6; v28.8.-G.9.01 Jan K.; $8 \cdot 10^4$ U/ml bzw. 463 ng/ml in PBS).

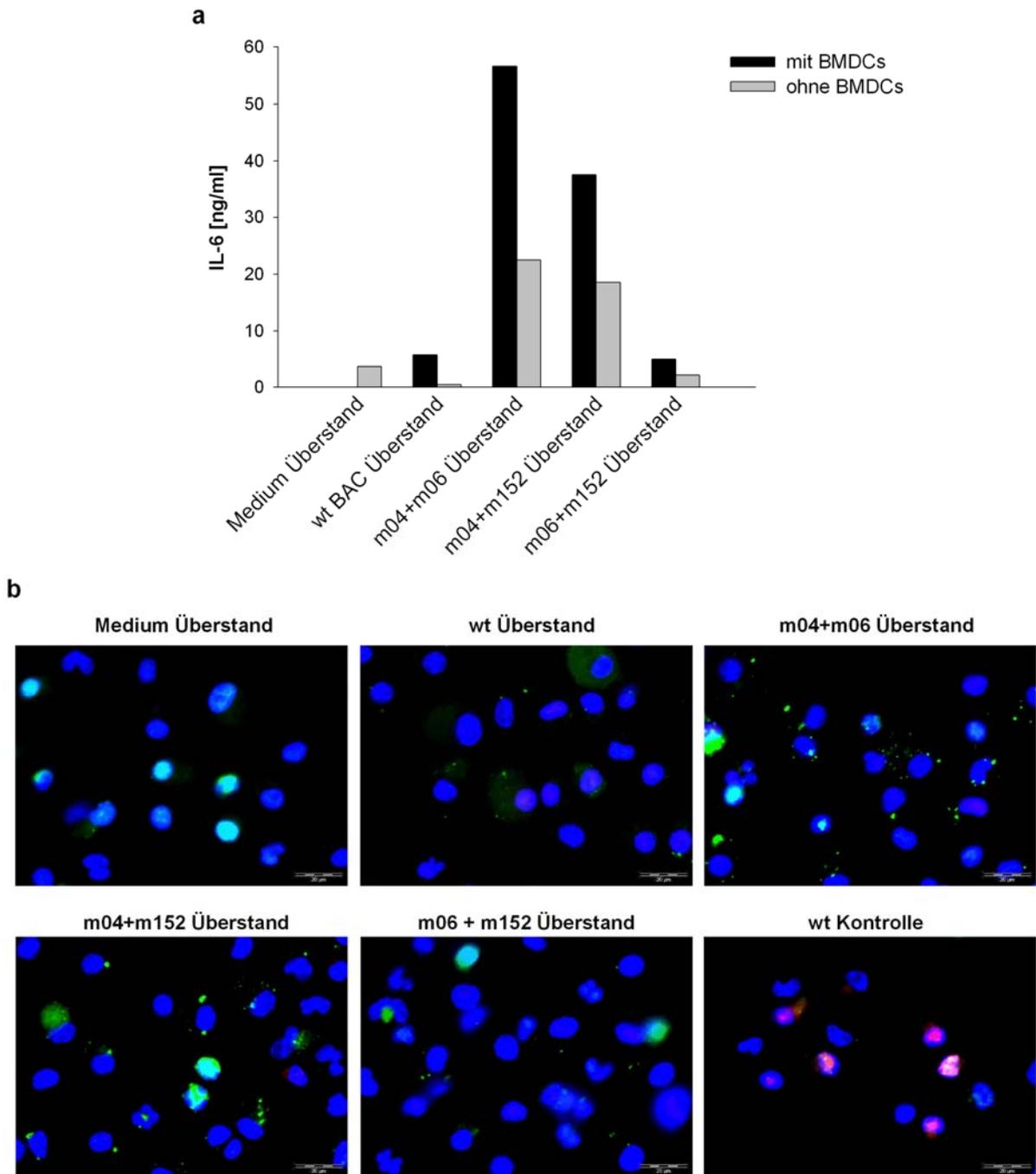


Abb. 3.37.: Überstände infizierter Zellen können die DC-Reifung induzieren

BMDCs wurden mit je 50 μ l UV-behandelten Überstand infizierter Zellen inkubiert und nach 17 h die IL-6 Konzentration im ELISA (a) sowie die Bildung von DALIS im Fluoreszenzmikroskop (b) untersucht. Hierfür wurden die Zellen mit FK2 (grün), CR103 (rot) sowie DAPI (blau) gefärbt. Als Kontrolle für die CR103 Färbung wurden zusätzlich BMDCs mit wt mCMV infiziert (wt Kontrolle). Maßstab: 20 μ m.

3.2.4. Mechanismen der DALIS-Bildung

3.2.4.1. Verschiedene TLR-Liganden induzieren die DC-Reifung und DALIS-Bildung

Bislang sind die Mechanismen, die zur temporären Anhäufung von ubiquitinylierten Proteinen während der DC-Reifung führen, gänzlich unbekannt.

Wie in dieser Arbeit bereits gezeigt worden ist, induzierten TLR-Liganden wie LPS und poly(I:C) die Reifung von BMDCs und die Bildung von DALIS. Diese Beobachtungen sollten nun zunächst auf weitere TLR-Stimuli ausgedehnt werden.

Neben LPS (TLR4-Ligand) und poly(I:C) (TLR3-Ligand) wurden CpG DNA (TLR9-Ligand), Pam₃Cys (TLR2) sowie R848 (TLR7/8) auf ihre Fähigkeit, die DALIS-Bildung bei BMDCs auszulösen, untersucht. Alle getesteten TLR-Stimuli induzierten die Reifung von BMDCs, gemessen an der Produktion pro-inflammatorischer Zytokine und Hochregulation kostimulatorischer Moleküle (Daten nicht gezeigt und ¹⁰⁸). Ferner kam es in allen Fällen während der Reifung der BMDCs zur Ausbildung von DALIS. Abb 3.38. zeigt diese exemplarisch für einige der getesteten TLR-Liganden.

Hierfür wurden 0,25 Mio BMDCs pro Well in einer 96-U-Platte mit 1 µg/ml LPS, 1 µg/ml R848 oder 2,5 µg/ml Pam₃Cys in einem Gesamtvolumen von 200 µl/Well stimuliert. Als Negativkontrolle dienten nicht behandelte Zellen (Medium). Nach 11 Stunden Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen geerntet, gewaschen und mit FK2 und anti-Maus IgG Alexa546 intrazellulär gefärbt. Die Analyse der Zellen erfolgte im Konfokalen Mikroskop.

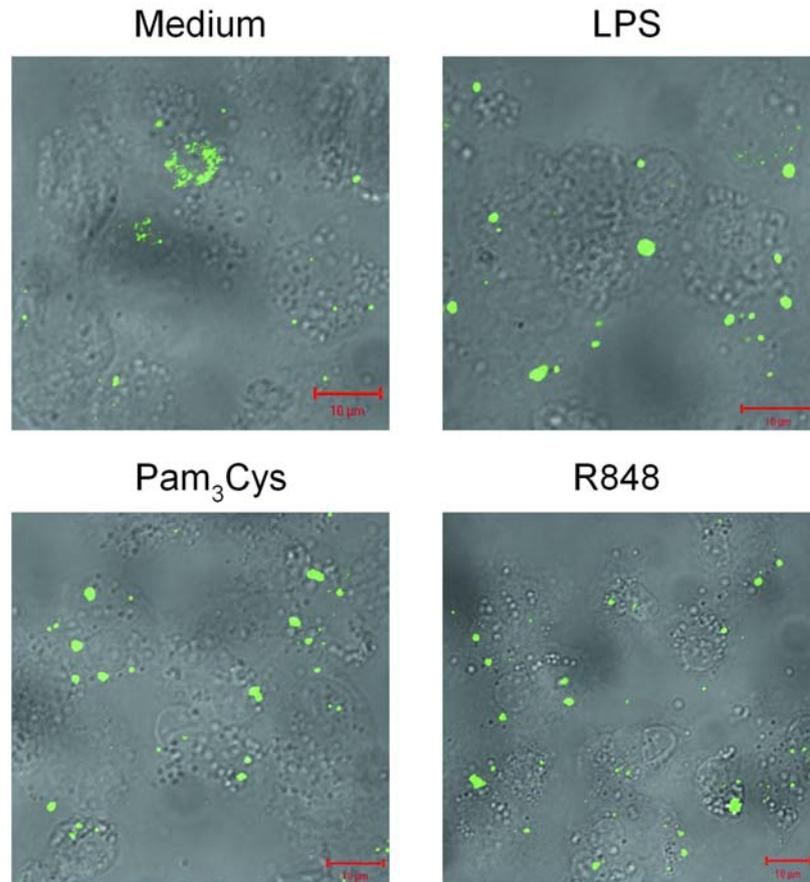


Abb. 3.38.: Verschiedene TLR-Liganden induzieren die DALIS-Bildung
BMDCs wurden mit 1 µg/ml LPS, 1 µg/ml R848 oder 2,5 µg/ml Pam₃Cys stimuliert. Nach 11 Stunden wurden die Zellen intrazellulär mit FK2 (grün dargestellt) und anti-Maus IgG Alexa546 gefärbt und im Konfokalen Mikroskop analysiert. Maßstab: 10 µm.

Während keine Unterschiede in den Kinetiken der DALIS-Bildung zu beobachten waren, gab es Unterschiede in Bezug auf die Anzahl und die maximale Größe der DALIS. Diese waren weitestgehend unabhängig von der eingesetzten Konzentration des Stimulus (Daten nicht gezeigt).

So waren poly(I:C)-induzierte DALIS in der Regel kleiner als z.B. LPS-induzierte DALIS. Auch die Infektion mit dem Influenza Virus PR/8/34 führte zu weniger und kleineren DALIS. Diese Beobachtungen korrelierten mit einer verminderten IL-6 Produktion nach Zugabe von poly(I:C) oder Infektion mit PR/8/34 im Vergleich zu LPS. Im Gegensatz dazu war die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 nach Stimulation der DCs mit poly(I:C) und PR/8/34 höher als nach Zugabe von LPS.

Diese Beobachtungen wiesen auf einen ersten Zusammenhang zwischen der Produktion von IL-6 und der DALIS-Bildung hin.

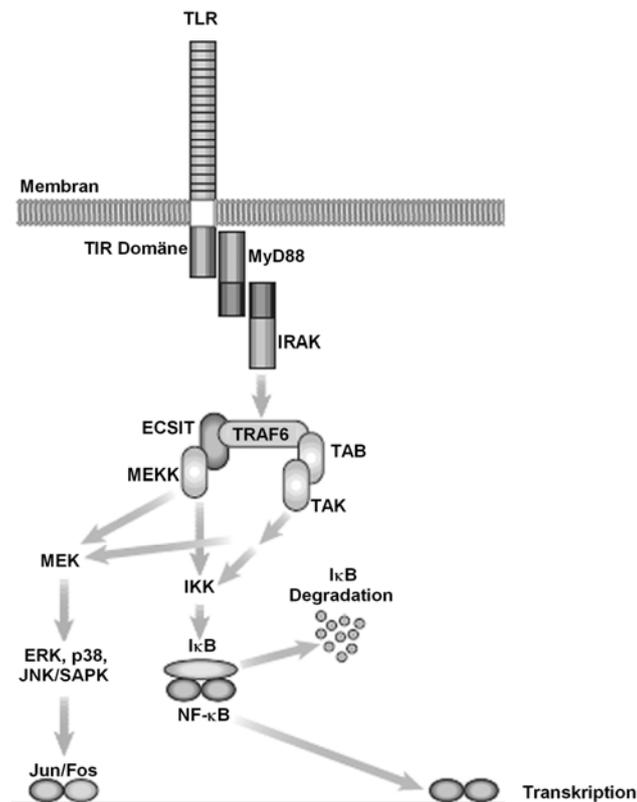
3.2.4.2. DC-Reifung und DALIS-Bildung sind unabhängig von MyD88

Nachdem TLR-Liganden die DC-Reifung bei gleichzeitiger DALIS-Bildung induzieren, sollte in diesem Zusammenhang die Signaltransduktion näher untersucht werden.

Dafür wurde zunächst die Beteiligung des zytosolischen Adaptermoleküls MyD88 bei der DALIS-Bildung überprüft.

MyD88 ist an der TLR-Signalübertragung beteiligt, in dem es an die sogenannte TIR-Domäne (Toll/IL-1 receptor) von stimulierten TLR-Rezeptoren bindet und dadurch die Interaktion und Autophosphorylierung von IRAK (IL-1R-associated kinase) ermöglicht, ebenso wie die nachfolgende Aktivierung von TRAF6 (tumor necrosis factor receptor-associated factor 6), die zur Aktivierung von NF- κ B, JNK, PI3K, p38 und ERK führt ¹⁰⁹.

Schema zur MyD88-abhängigen Signaltransduktion (verändert nach ¹¹⁰):



MyD88 ist für die Signaltransduktion von TLR2, 5, 7 und 9 essentiell ¹¹¹, bei TLR3 und TLR4 wurde jedoch zusätzlich ein MyD88-unabhängiger Weg gefunden ²⁷.

So sind BMDCs von MyD88-defizienten Mäusen nach Stimulation mit LPS herangereift ¹¹², wobei eine induzierte Aktivierung von NF- κ B und MAPK mit einer verzögerten Kinetik beobachtet wurden ²⁷.

Um weitere Hinweise über eine Abhängigkeit der DALIS-Bildung von der DC-Reifung zu erhalten, wurden im folgenden Versuch BMDCs aus dem Knochenmark von MyD88^{-/-} Mäusen hergestellt, mit poly(I:C) oder PR/8/34 stimuliert und die Reifung der Zellen so wie die Ausbildung von DALIS untersucht (Abb. 3.39.).

Es zeigte sich, dass beide Stimuli zu einer Reifung von MyD88-defizienten BMDCs führten, die in der Expression von CD80 und CD86 sowie der Produktion von IL-6 vergleichbar waren mit gleich behandelten C57BL/6-generierten DCs (Abb. 3.39. a). Lediglich die Produktion von IL-6 nach poly(I:C) Stimulation fiel bei den MyD88 knockout BMDCs schlechter aus als bei den Kontrollzellen.

Ferner wurde durch beide Stimuli bei MyD88-defizienten BMDCs die Bildung von DALIS induziert (Abb. 3.39. b).

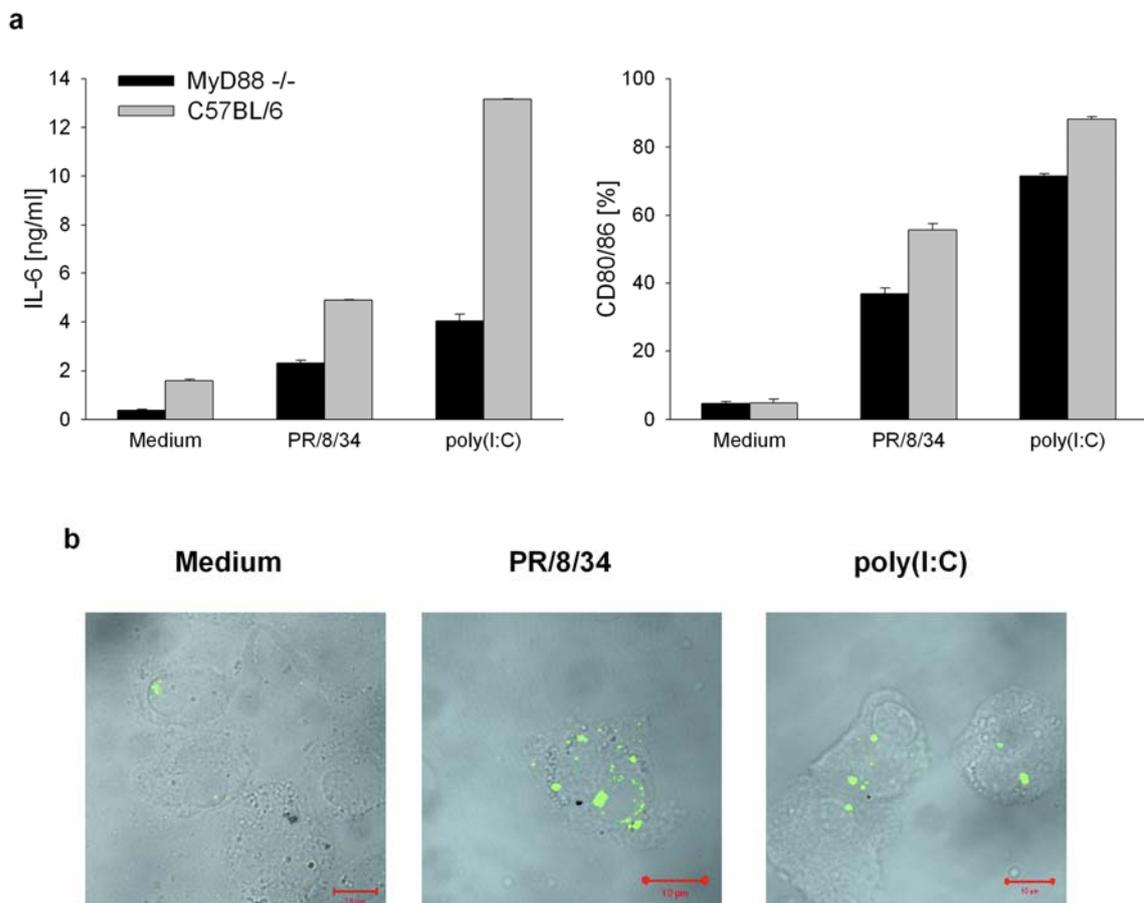


Abb. 3.39.: MyD88-unabhängige DC-Aktivierung und DALIS-Bildung

BMDCs von MyD88^{-/-} und C57BL/6 Mäusen wurden mit 1 PFU/Zelle PR/8/34 oder 50 µg/ml poly(I:C) behandelt.

a) Nach 22 h wurden Überstände abgenommen und die IL-6 Konzentration bestimmt, die Zelloberflächen wurden mit anti-CD80 und anti-CD86 gefärbt und im FACS analysiert.

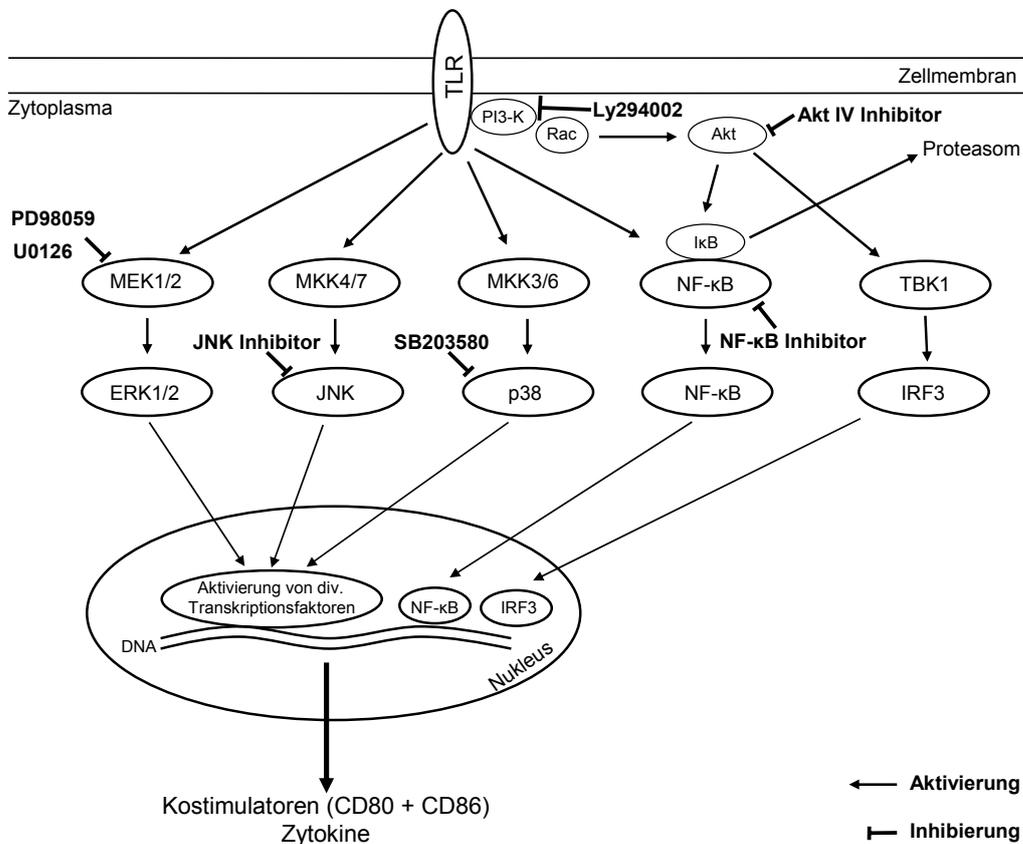
b) Die BMDCs von MyD88^{-/-} Mäusen wurden 13 h nach Stimulation fixiert und intrazellulär mit FK2 sowie anti-Maus IgG-FITC gefärbt und die Bildung von DALIS (grün) im Konfokalen Mikroskop untersucht. Maßstab: 10 µm.

Die MyD88-unabhängige TLR-Signaltransduktion ist von einem anderen Adaptermolekül, TRIF genannt, abhängig ¹¹³. TRIF rekrutiert die IRF-Kinase TBK1, was zu einer Phosphorylierung von IRF3 führt. Es kommt zu einer Bildung von IRF3-Dimeren, deren Translokation vom Zytoplasma in den Zellkern zu einer Induktion von Typ-1-Interferonen führt. Ferner rekrutiert TRIF TRAF6 und RIP-1, wodurch die MyD88-unabhängige Aktivierung von NF-κB und MAPK zustande kommen könnte.

3.2.4.3. Wirkung verschiedener TLR-Signalkaskaden Inhibitoren auf die Reifung und DALIS-Bildung von BMDCs

Im Folgenden sollte der Einfluss verschiedener TLR-Signalkaskaden Inhibitoren auf die DC-Reifung und Entstehung von DALIS untersucht werden, um die Zusammenhänge dieser Vorgänge besser verstehen zu können.

Hierfür wurden Inhibitoren ausgewählt, die einige wesentliche Komponenten der TLR-Signalkaskaden hemmen, wie in der folgenden Übersicht dargestellt:



Um die Wirkung der einzelnen Inhibitoren auf die DC-Reifung und Bildung von DALIS zu überprüfen, wurden BMDCs mit unterschiedlichen Inhibitor-Konzentrationen vorbehandelt, nach 1 Stunde Inkubation bei 37 °C mit LPS [0,5 µg/ml], poly(I:C) [50 µg/ml] oder PR/8/34 [1 PFU/Zelle] stimuliert und weiter inkubiert. Nach ca. 20 Stunden wurden die Überstände zur Analyse im IL-6 ELISA abgenommen und die Zellen mit CD80-FITC und CD86-PE zur Messung der Oberflächenexpression im FACS gefärbt (Abb. 3.40.1. und 3.40.2.).

Dargestellt sind die am jeweiligen Stimulus normierten Mittelwerte (Stimulus ohne Inhibitor = 100 %).

Die Gesamt-IL-6 Produktion der einzelnen Versuche variierte stark, so induzierte LPS zwischen 47 ng/ml und 95 ng/ml IL-6, poly(I:C) zwischen 3 ng/ml und 6 ng/ml und PR/8/34 zwischen 2 ng/ml und 6 ng/ml. Die Verhältnisse blieben jedoch untereinander gleich. Ebenso verhielt es sich für die Expression der kostimulatorischen Moleküle. Je nach BMDC-Präparation lagen die Mediumwerte zwischen 17 % und 53 % doppelpositiver Zellen.

Es zeigte sich, dass die Inhibition der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) durch den Inhibitor Ly294002 zu einer verminderten IL-6 Produktion und einer Reduktion der Oberflächenexpression von CD80 und CD86 führte (Abb. 3.40.1. oben). Diese Wirkung trat ab einer Inhibitor-Konzentration von 10 bis 30 µM auf und betraf die Stimulation aller getesteten TLR-Liganden. Bei einer Konzentration von 90 µM waren über 90 % der Zellen tot, wie eine Trypanblau-Analyse ergab.

Im Gegensatz dazu zeigte die Inhibition von MEK1 durch PD98059 keinen Einfluss auf die DC-Reifung (Abb. 3.40.1. Mitte). Höhere Konzentrationen als 90 µM töteten die Zellen ab.

U0126 inhibiert im Gegensatz zu PD98059 neben MEK1 auch MEK2 und unterbindet somit die gesamte Aktivierung des ERK-Weges. Dieser Inhibitor zeigte in hohen Konzentrationen Wirkung auf poly(I:C) und PR/8/34 behandelte BMDCs (Abb. 3.40.1. unten). Auch hier war eine Inhibitor-Konzentration von 90 µM toxisch – daher der beobachtete Rückgang von IL-6, CD80 und CD86.

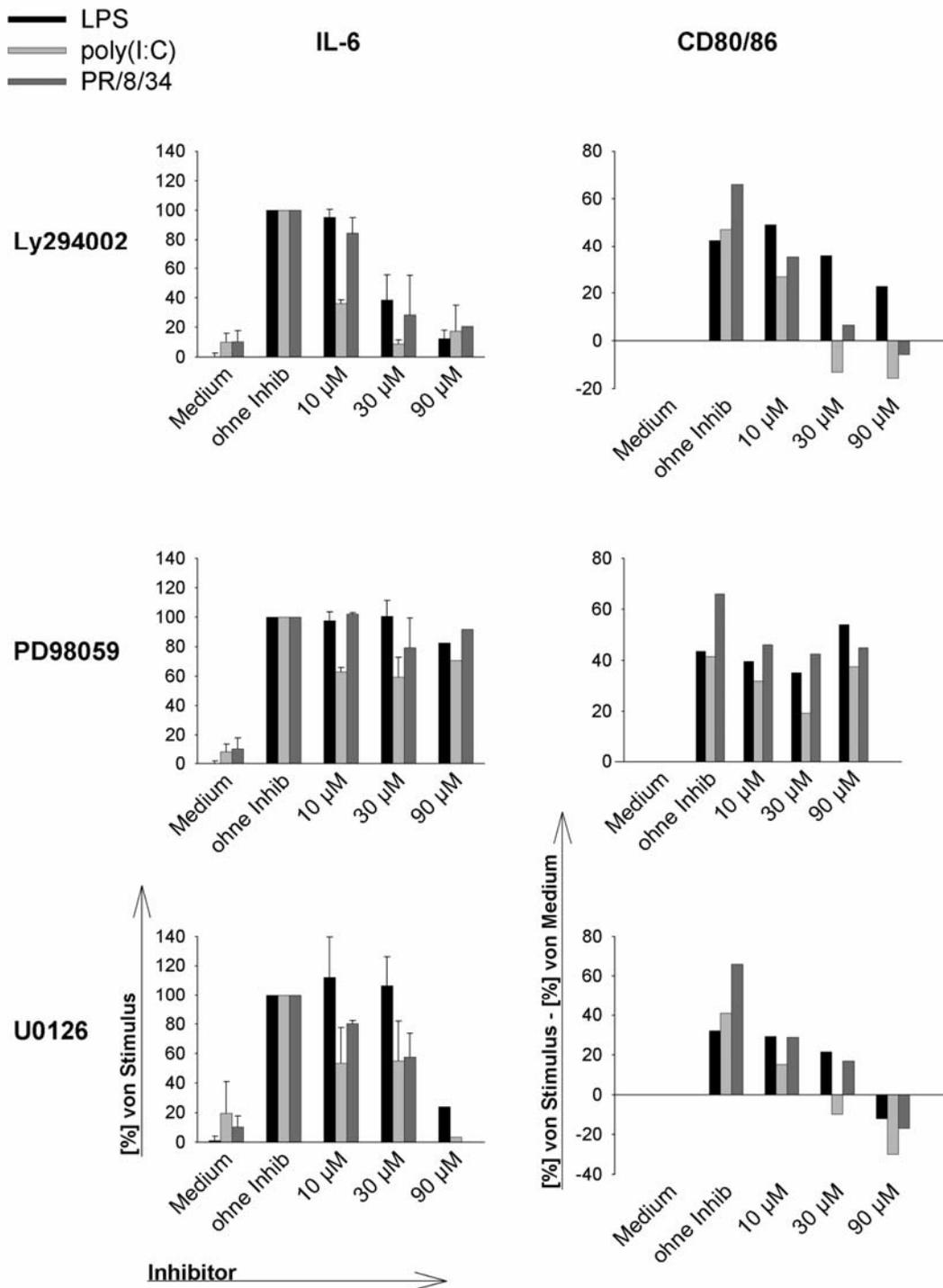


Abb. 3.40.1.: Einfluss einzelner TLR-Inhibitoren auf die DC-Reifung

BMDCs wurden wie angegeben mit unterschiedlichen Konzentrationen verschiedener TLR-Inhibitoren behandelt. Nach 1 h Inkubation bei 37 °C erfolgte die Zugabe der TLR-Stimuli. Die Aktivierung der DCs wurde nach weiteren 20 h durch Messung der IL-6 Konzentrationen in den Überständen sowie Färbung von CD80 und CD86 auf den Zelloberflächen untersucht.

Die Inhibition von NF- κ B führte unerwarteterweise bei höheren Inhibitorkonzentrationen (ca. 10 μ M) zu einer stark erhöhten IL-6 Produktion, insbesondere bei poly(I:C)- und PR/8/34-stimulierten BMDCs (Abb. 3.40.2. oben).

Die Inhibition von JNK hatte keinen Einfluss auf die DC-Reifung, auch der Einsatz des p38 Inhibitors SB203580 zeigte erst ab hohen Konzentrationen von 60 μ M Wirkung auf die IL-6 Synthese, wobei auch hier ein Großteil der Zellen gestorben war.

Die Inhibition von Akt schließlich hatte starke Auswirkungen auf die Expression der kostimulatorischen Moleküle und verminderte die IL-6 Produktion (Abb. 3.40.2. unten). Inhibitorkonzentrationen über 1 μ M erwiesen sich als toxisch für die Zellen.

Neben IL-6 und CD80/CD86 wurde auch die Auswirkungen der Inhibitoren auf die DALIS-Bildung untersucht. Hierzu wurden die Inhibitor-behandelten Zellen ca. 16 Stunden nach Zugabe der Stimuli intrazellulär mit FK2-Biotin und Streptavidin-FITC sowie DAPI gefärbt und im Fluoreszenzmikroskop untersucht.

Dabei wurden folgende Inhibitorkonzentrationen verwendet: Ly294002, PD98059, U0126 je 30 μ M, NF- κ B und JNK Inhibitor je 10 μ M, SB203580 20 μ M und Akt-Inhibitor 1 μ M.

Abbildung 3.41. zeigt exemplarisch den Einfluss einiger Inhibitoren auf die DALIS-Bildung nach LPS-Stimulation. Die Effekte auf poly(I:C) bzw. PR/8/34-behandelte Zellen waren vergleichbar.

Es zeigte sich, dass bei den eingesetzten Konzentrationen lediglich Ly294002 die DALIS-Bildung stark beeinträchtigte. Eine schwache Wirkung zeigten SB203580 und eventuell die Inhibition von Akt.

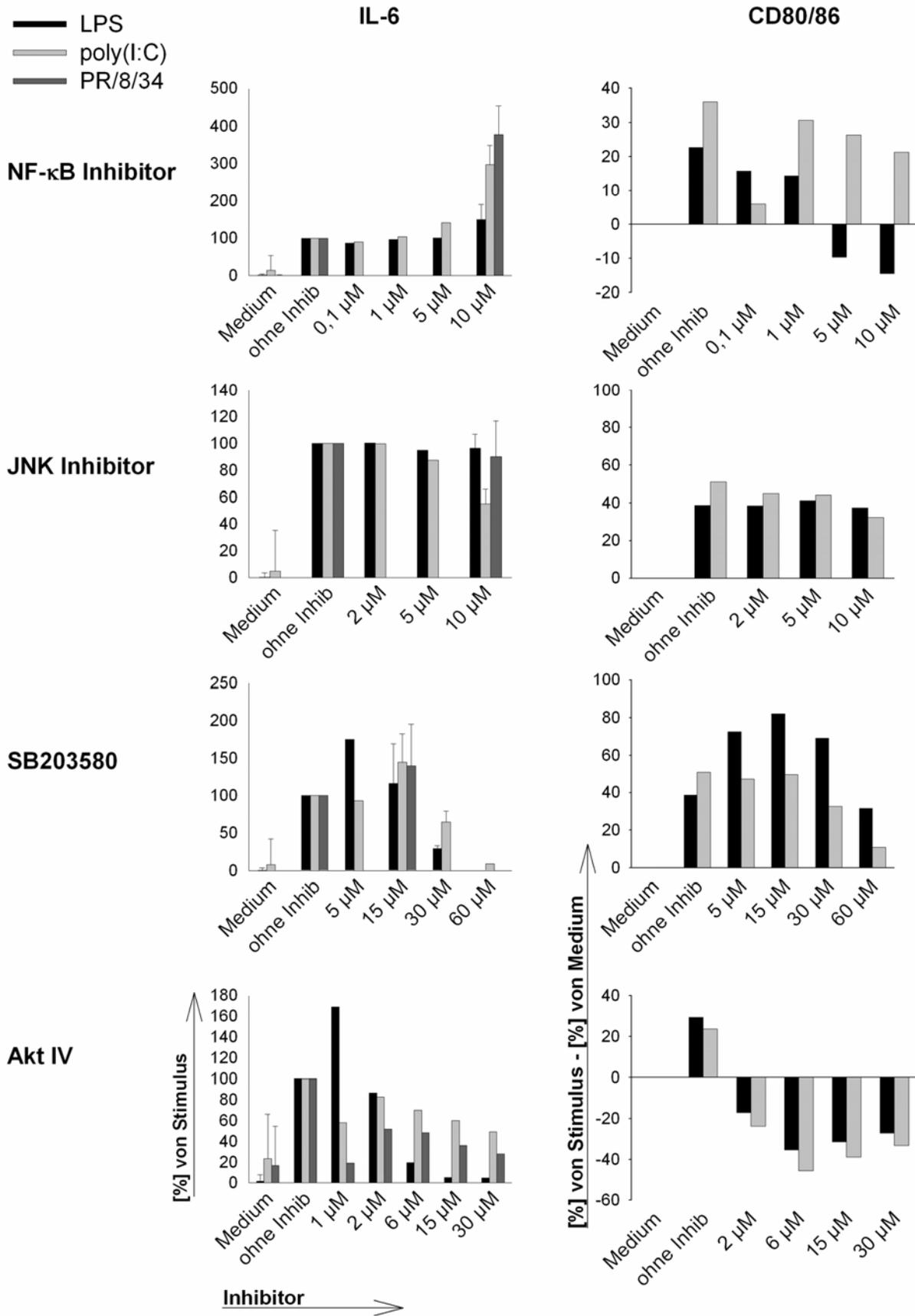


Abb. 3.40.2.: Einfluss einzelner TLR-Inhibitoren auf die DC-Reifung

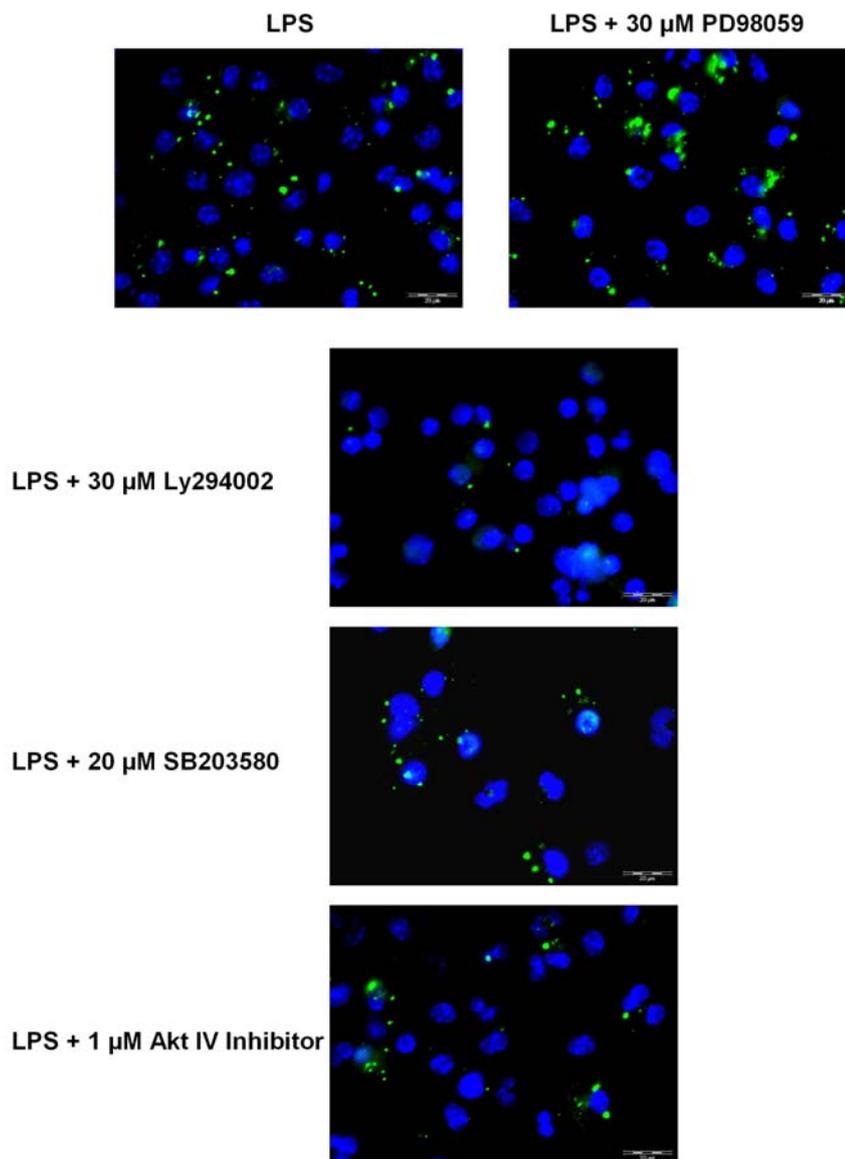


Abb. 3.41.: Einfluss einzelner TLR-Inhibitoren auf die DALIS-Bildung

BMDCs wurden wie angegeben mit unterschiedlichen Konzentrationen verschiedener TLR-Inhibitoren behandelt. Nach 1 h Inkubation bei 37 °C erfolgte die Zugabe von LPS, nach weiteren 17 h wurden die BMDCs intrazellulär mit FK2 (grün) und DAPI (blau) gefärbt und im Fluoreszenzmikroskop analysiert. Maßstab: 20 µm.

3.2.4.4. Antigenpräsentation bei BMDCs nach Inhibition verschiedener Komponenten der TLR-Signalkaskaden

Nachdem von den getesteten TLR-Inhibitoren hauptsächlich Ly294002 einen starken Einfluss auf die Reifung von BMDCs ausübte und die DALIS-Bildung beeinträchtigte, sollten die Auswirkungen dieses Inhibitors auf die Kinetik der Antigenpräsentation untersucht werden.

Die bisherigen Ergebnisse legten nahe, dass es sich bei den DALIS um Antigenpeicher handeln könnte, die die Präsentation von CTL-Epitopen verzögern, um die DC-Reifung zu ermöglichen. Dementsprechend wäre eine Veränderung der Kinetik der Antigenpräsentation zu erwarten, wenn die DALIS-Bildung inhibiert wird.

Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden BMDCs und EL-4 Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten mit 30 μ M Ly294002 oder PD98059 behandelt und nach einer Stunde Inkubation mit 1 PFU/Zelle PR/8/34 infiziert.

Des Weiteren wurde wie in Material und Methoden (^{51}Cr -Freisetzungstest) beschrieben vorgegangen. Kurz zusammengefasst wurden die Zellen nach einer weiteren Inkubationszeit geerntet, zweimal gewaschen und die Lebendzellzahlen bestimmt. Anschließend wurden sie nach Bedarf mit Peptid (ASNENMETM) behandelt bevor sie mit ^{51}Cr gelabelt wurden. Nach erneutem Waschen wurden 20000 Targets zu den ASNENMETM-spezifischen CTL gegeben (E:T 4:1 bzw. 40:1).

Während ohne Inhibitor die bereits beobachtete Verzögerung der Antigenpräsentation auftrat, war bei den Ly294002 behandelten Zellen schon nach 4 h Infektion eine spezifische Lyse zu erkennen (Abb. 3.42. a). Im Gegensatz dazu verhielten sich PD98059 behandelte BMDCs genau wie die unbehandelten Zellen.

Die Oberflächenbeladung von BMDCs mit ASNENMETM bei unbehandelten und Inhibitor-behandelten Zellen zeigte keinerlei Unterschiede in Bezug auf die Empfindlichkeit der BMDCs gegenüber der CTL-induzierten Lyse (Abb. 3.42. b).

Ferner wies keiner der Inhibitoren einen Einfluss auf die Ubiquitinylierungsfähigkeiten der BMDCs auf, wie Abb. 3.42. c zeigt. Hierfür wurden Inhibitor behandelte, stimulierte BMDCs nach 17 h Inkubation lysiert, die Lysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im FK2-Western Blot analysiert. Neben Bestimmung der Zellzahlen wurde ein Aktin-Blot zur Normalisierung der Proben durchgeführt (Daten nicht gezeigt).

Einige Zellen wurden zusätzlich mit dem Proteasominhibitor Epoxomicin (1 μ M) behandelt (Abb. 3.42. c), dadurch verstärkte sich die Anhäufung ubiquitinylierter Proteine in den Zellen. Die Zugabe erfolgte gleichzeitig mit Ly294002.

Neben BMDCs wurden auch EL-4 Zellen mit Ly294002 behandelt (Abb. 3.42. d). Da diese Zellen keine DALIS-Bildung aufweisen, sollte der Inhibitor hier keinen Einfluss auf die Kinetik der Antigenpräsentation haben. Wie erwartet präsentierten EL-4 Zellen bereits nach 4 h Infektion das Antigen, unabhängig von der Zugabe des PI3K-Inhibitors.

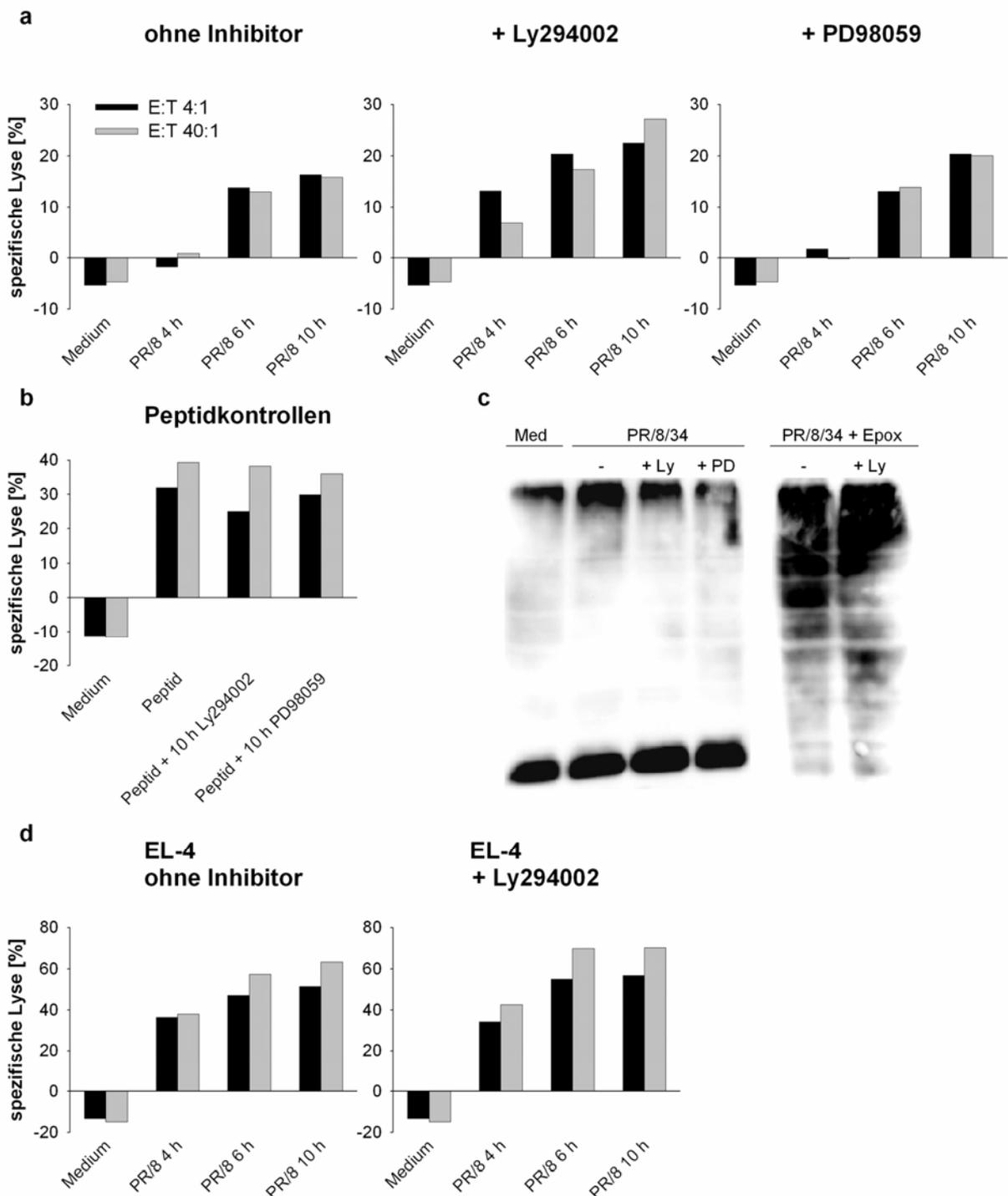


Abb. 3.42.: Einfluss von TLR-Inhibitoren auf die Antigenpräsentation bei BMDCs

3.2.4.5. Einfluss von Inhibitorkombinationen auf DC-Reifung und DALIS-Bildung

Durch die Stimulation eines Toll-like Rezeptors wird ein komplexes Netzwerk von Signaltransduktionskaskaden ausgelöst, bei denen die sogenannten MAP Kinasen (MAPK) eine wichtige Rolle spielen. Die drei bekanntesten Signalwege in Säugerzellen sind die ERK1/2, die p38 und die JNK Kaskade, an deren Enden die Aktivierung einer Reihe von MKs (MAPK-activated protein kinases) und Transkriptionsfaktoren (TF) stehen^{114,115}. Da die verschiedenen Kaskaden z. T. gleiche MKs und TFs aktivieren, ist es möglich, dass einzelne Inhibitoren keine Wirkung zeigen, sondern erst durch Inhibitorkombinationen die Mechanismen, die zur DALIS-Bildung und IL-6 Produktion führen, aufgeklärt werden können.

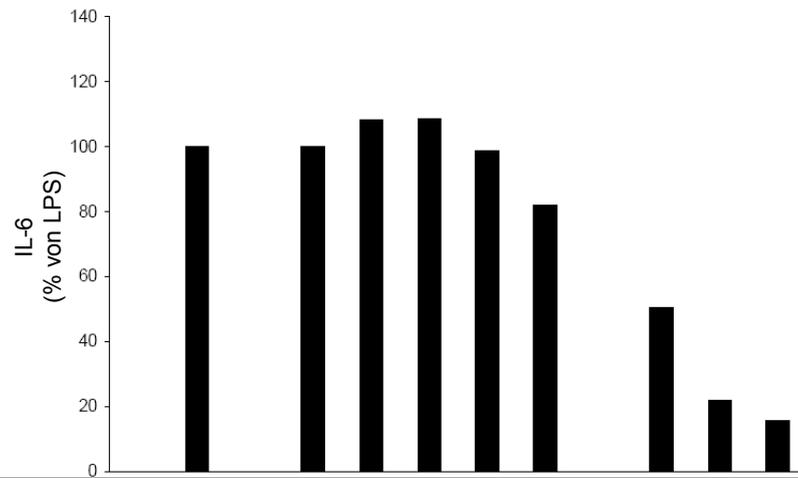
Daher wurde in den folgenden Versuchen verschiedene Zweier-, Dreier- und Vierer-Kombinationen folgender Inhibitoren untersucht: U0126, SB203580, JNK I Inhibitor, Akt IV Inhibitor und NF- κ B Activation Inhibitor. Die Endkonzentrationen jedes einzelnen Inhibitors betragen stets 5 μ M mit Ausnahme des Akt IV Inhibitors (1 μ M).

In allen Versuchen wurde wie folgt vorgegangen: 0,25 Mio BMDCs pro Well in einer 96-U-Form-Platte wurden mit den verschiedenen Inhibitorkombinationen behandelt und für 1 h im Zellinkubator inkubiert. Als Kontrollen dienten unbehandelte Zellen, ferner wurden die Inhibitoren einzeln mitgetestet. Um sicherzustellen, dass eventuelle Unterschiede zu unbehandelten Zellen nicht auf steigende Konzentrationen des Inhibitor-Lösungsmittels DMSO zurückzuführen waren, wurden zu einem Teil der Inhibitor-unbehandelten Zellen äquivalente Mengen DMSO zugegeben. Dabei zeigte sich, dass selbst maximale DMSO-Konzentrationen keinen Einfluss auf die Aktivierung der BMDCs hatten.

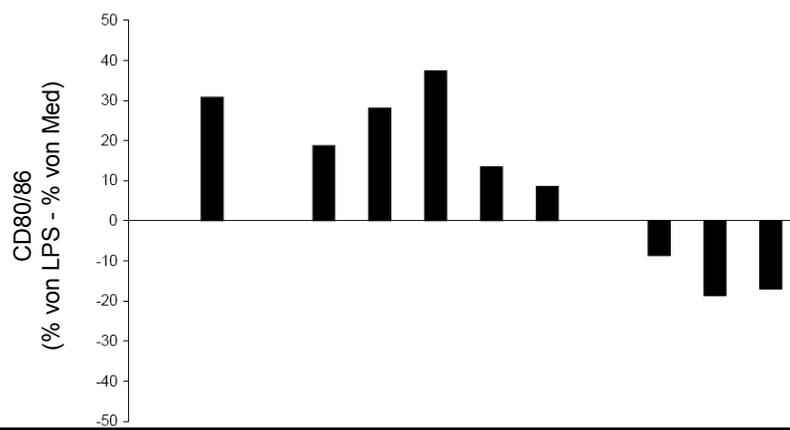
Nach einer Stunde erfolgte die Stimulation mit LPS [0,5 μ g/ml] oder PR/8/34 [1 PFU/Zelle]. Danach wurden die Zellen weiter inkubiert bis nach ca. 17 h bis 20 h die Überstände zur Analyse im IL-6 ELISA entnommen wurden. Ein Teil der Zellen wurde mit CD80 und CD86 gefärbt und im FACS untersucht, der andere Teil wurde intrazellulär mit biotinylierten FK2 Antikörper, Streptavidin-FITC und DAPI inkubiert und die DALIS-Bildung im Fluoreszenzmikroskop überprüft.

Es stellte sich heraus, dass die Kombination von vier bzw. fünf Inhibitoren zu einem starken Rückgang der IL-6 Sekretion führte, wobei die Zugabe des NF- κ B Inhibitors den Rückgang etwas kompensierte. Ferner wurde die Bildung von DALIS reduziert, ebenso wie der Prozentsatz CD80/CD86 doppeltpositiver Zellen. Dieser Rückgang war in erster Linie auf

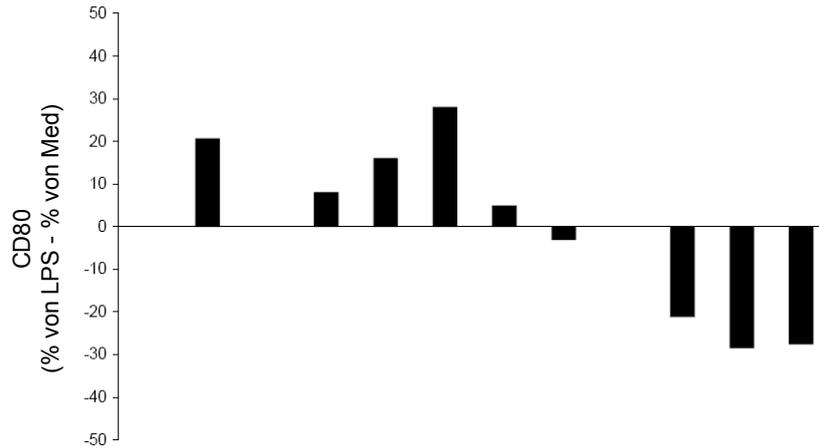
eine verminderte CD80 Expression zurückzuführen, während CD86 weitestgehend unbeeinflusst blieb.



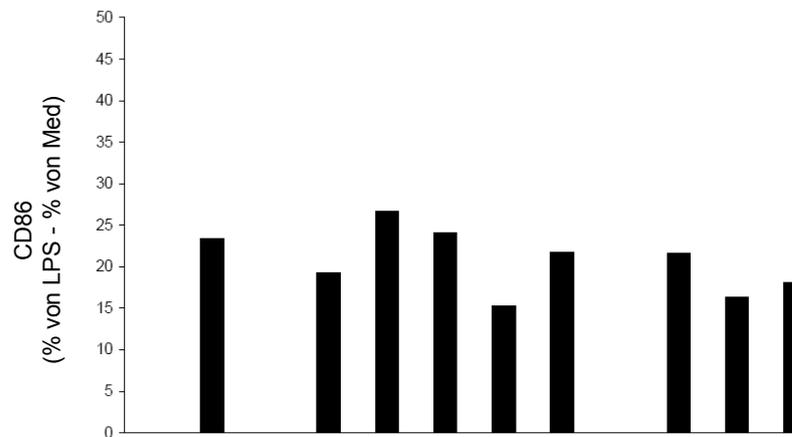
Stimulus	LPS	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Inhibition von	Inhibitor										K1	K2	K5
MEK1/2	U0126	-	-		+	-	-	-	-		+	+	+
p38 Kinase	SB203580	-	-		-	+	-	-	-		+	+	+
JNK	JNK I-Inhibitor	-	-		-	-	+	-	-		+	+	+
NF-κB	NF-κB-Inhibitor	-	-		-	-	-	+	-		+	+	-
Akt	Akt IV-Inhibitor	-	-		-	-	-	-	+		-	+	+



Stimulus	LPS	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Inhibition von	Inhibitor										K1	K2	K5
MEK1/2	U0126	-	-		+	-	-	-	-		+	+	+
p38 Kinase	SB203580	-	-		-	+	-	-	-		+	+	+
JNK	JNK I-Inhibitor	-	-		-	-	+	-	-		+	+	+
NF-κB	NF-κB-Inhibitor	-	-		-	-	-	+	-		+	+	-
Akt	Akt IV-Inhibitor	-	-		-	-	-	-	+		-	+	+



Stimulus	LPS	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+
Inhibition von	Inhibitor									K1	K2	K5
MEK1/2	U0126	-	-		+	-	-	-	-	+	+	+
p38 Kinase	SB203580	-	-		-	+	-	-	-	+	+	+
JNK	JNK I-Inhibitor	-	-		-	-	+	-	-	+	+	+
NF-κB	NF-κB-Inhibitor	-	-		-	-	-	+	-	+	+	-
Akt	Akt IV-Inhibitor	-	-		-	-	-	-	+	-	+	+

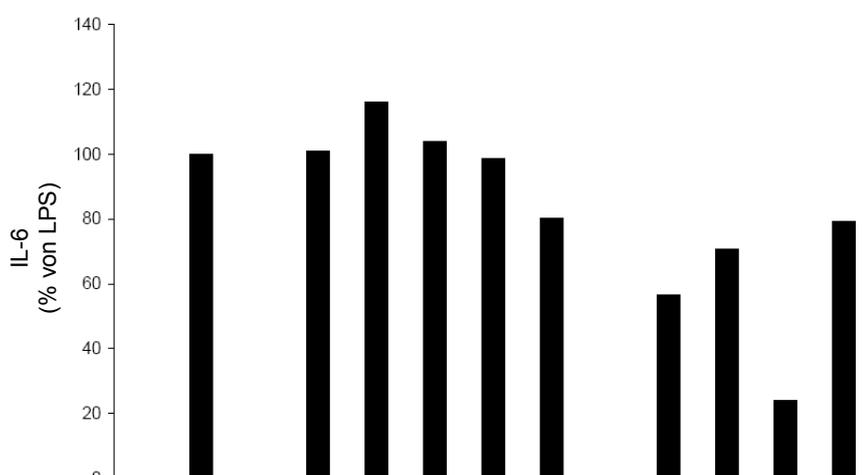


Stimulus	LPS	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+
Inhibition von	Inhibitor									K1	K2	K5
MEK1/2	U0126	-	-		+	-	-	-	-	+	+	+
p38 Kinase	SB203580	-	-		-	+	-	-	-	+	+	+
JNK	JNK I-Inhibitor	-	-		-	-	+	-	-	+	+	+
NF-κB	NF-κB-Inhibitor	-	-		-	-	-	+	-	+	+	-
Akt	Akt IV-Inhibitor	-	-		-	-	-	-	+	-	+	+

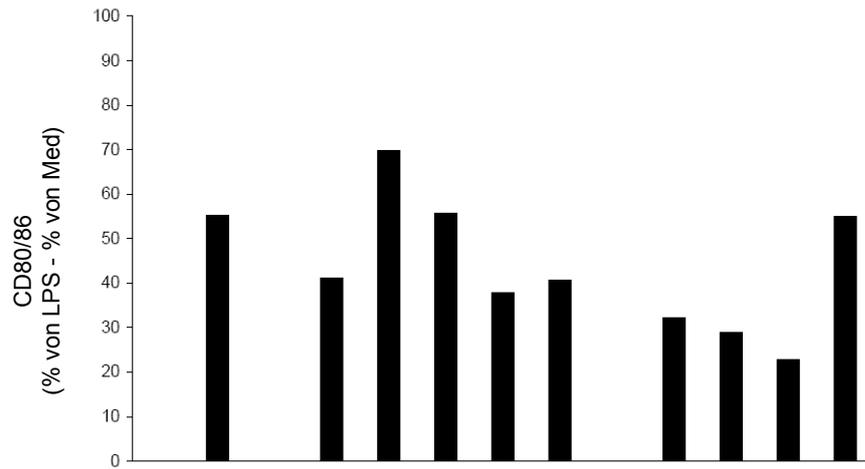
Prinzipiell waren die Wirkungen aller eingesetzten Inhibitorkombinationen bei LPS- und PR/8/34-stimulierten BMDCs vergleichbar, wobei die Effekte bei Virus-infizierten DCs in der Regel stärker ausfielen.

Wegen der besseren Vergleichbarkeit der durchgeführten Experimente wurden die Zytokindaten anhand der jeweiligen IL-6 Produktion der LPS- oder PR/8/34-stimulierten, Inhibitor-unbehandelten Zellen normiert. Die LPS-induzierte IL-6 Produktion lag zwischen 78 ng/ml und 121 ng/ml, die PR/8/34-induzierte IL-6 Produktion betrug 1830 pg/ml bis 4190 pg/ml. Die FACS-Ergebnisse wurden ebenfalls an den Stimuli normiert und der jeweilige Mediumwert abgezogen.

Bei den dreier Kombinationen war besonders die Kombination der Inhibitoren U0126 + SB203580 + Akt Inhibitor (K7) besonders wirkungsvoll. Hier ging die IL-6 Produktion um ca. 80 % zurück. Diese Inhibitorkombination inhibierte auch die DALIS-Bildung am effektivsten, ebenso wurde die Expression von CD80 reduziert.



Stimulus	LPS	-	+		+	+	+	+	+		+	+	+	+
Inhibition von	Inhibitor										K3	K6	K7	K8
MEK1/2	U0126	-	-		+	-	-	-	-		+	+	+	-
p38 Kinase	SB203580	-	-		-	+	-	-	-		+	-	+	+
JNK	JNK I-Inhibitor	-	-		-	-	+	-	-		+	+	-	+
NF-κB	NF-κB-Inhibitor	-	-		-	-	-	+	-		-	-	-	-
Akt	Akt IV-Inhibitor	-	-		-	-	-	-	+		-	+	+	+

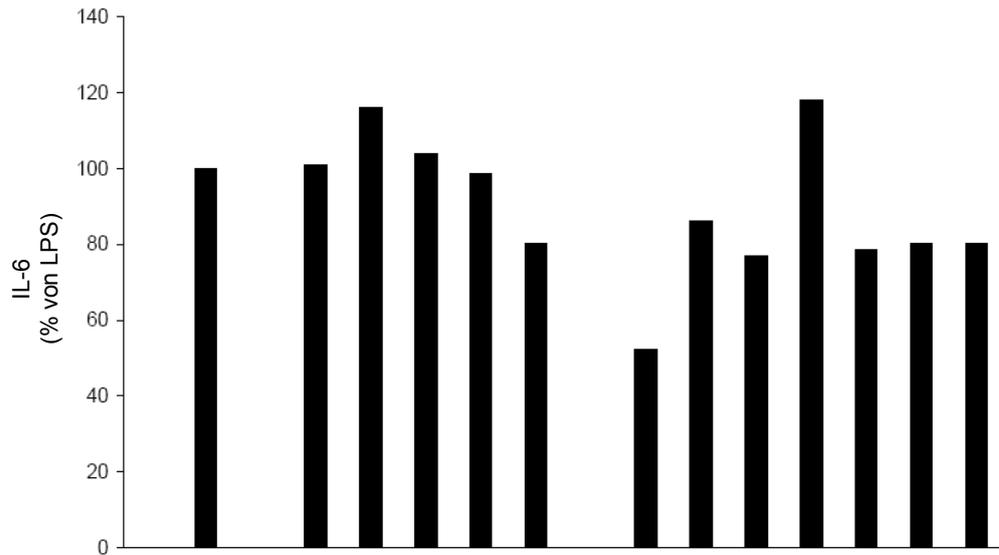


Stimulus	LPS	-	+		+	+	+	+	+		+	+	+	+
Inhibition von	Inhibitor										K3	K6	K7	K8
MEK1/2	U0126	-	-		+	-	-	-	-		+	+	+	-
p38 Kinase	SB203580	-	-		-	+	-	-	-		+	-	+	+
JNK	JNK I-Inhibitor	-	-		-	-	+	-	-		+	+	-	+
NF-κB	NF-κB-Inhibitor	-	-		-	-	-	+	-		-	-	-	-
Akt	Akt IV-Inhibitor	-	-		-	-	-	-	+		-	+	+	+

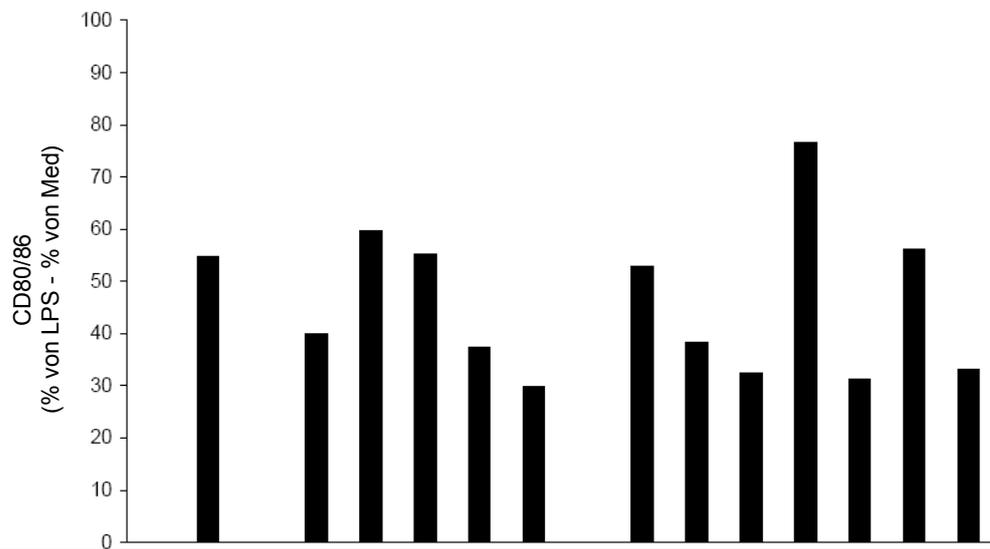
Bei PR/8/34 infizierten BMDCs zeigte die Kombination aus U0126 + SB203580 + JNK Inhibitor (K3) eine ähnlich starke Wirkung.

Die Kombinationen von U0126 + JNK Inhibitor + Akt Inhibitor (K6) sowie SB203580 + JNK Inhibitor + Akt Inhibitor (K8) reduzierten die IL-6 Sekretion im Vergleich zu den unbehandelten Zellen kaum (LPS) bzw. gar nicht (PR/8/34).

Zweierkombinationen der Inhibitoren waren weniger wirksam als Dreierkombinationen. Die stärkste Inhibition zeigte die Kombination von U0126 + SB203580 (K10), hier ging die IL-6 Produktion auf 40 % bis 50 % zurück, auch die DALIS-Bildung wurde vermindert. Erstaunlicherweise induzierten einige Zweierkombinationen bei PR/8/34 behandelten BMDCs eine Verstärkung der IL-6 Produktion (K11, K13) sowie der Expression von CD80.



Stimulus	LPS	-	+		+	+	+	+			+	+	+	+	+	+	
Inhibition von	Inhibitor										K10	K9	K12	K11	K14	K13	K4
MEK1/2	U0126	-	-		+	-	-	-			+	+	+	-	-	-	-
p38 Kinase	SB203580	-	-		-	+	-	-			+	-	-	+	+	-	-
JNK	JNK I-Inhibitor	-	-		-	-	+	-			-	+	-	+	-	+	-
NF-κB	NF-κB-Inhibitor	-	-		-	-	-	+			-	-	-	-	-	-	+
Akt	Akt IV-Inhibitor	-	-		-	-	-	-	+		-	-	+	-	+	+	+



Stimulus	LPS	-	+		+	+	+	+			+	+	+	+	+	+	
Inhibition von	Inhibitor										K10	K9	K12	K11	K14	K13	K4
MEK1/2	U0126	-	-		+	-	-	-			+	+	+	-	-	-	-
p38 Kinase	SB203580	-	-		-	+	-	-			+	-	-	+	+	-	-
JNK	JNK I-Inhibitor	-	-		-	-	+	-			-	+	-	+	-	+	-
NF-κB	NF-κB-Inhibitor	-	-		-	-	-	+			-	-	-	-	-	-	+
Akt	Akt IV-Inhibitor	-	-		-	-	-	-	+		-	-	+	-	+	+	+

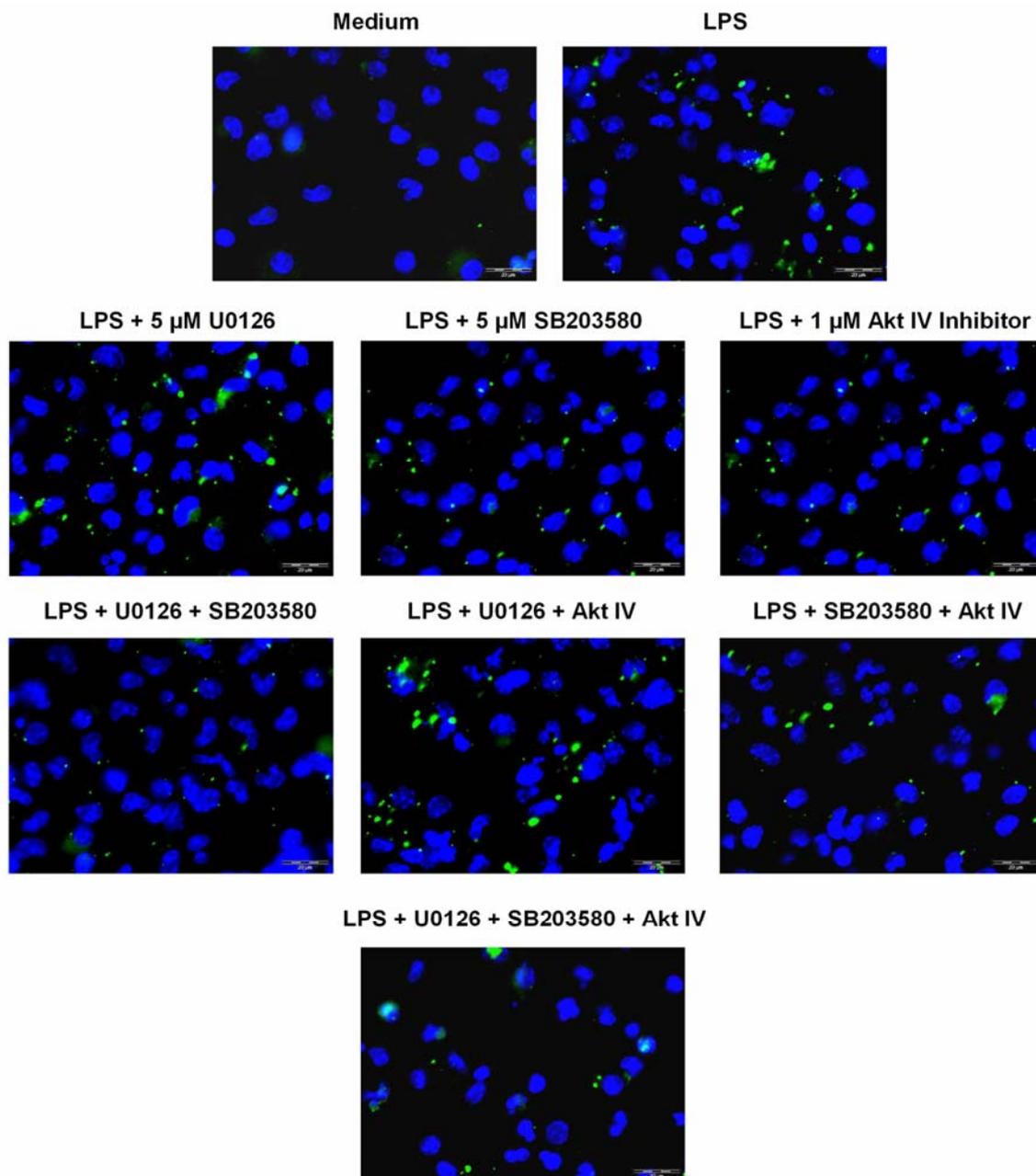
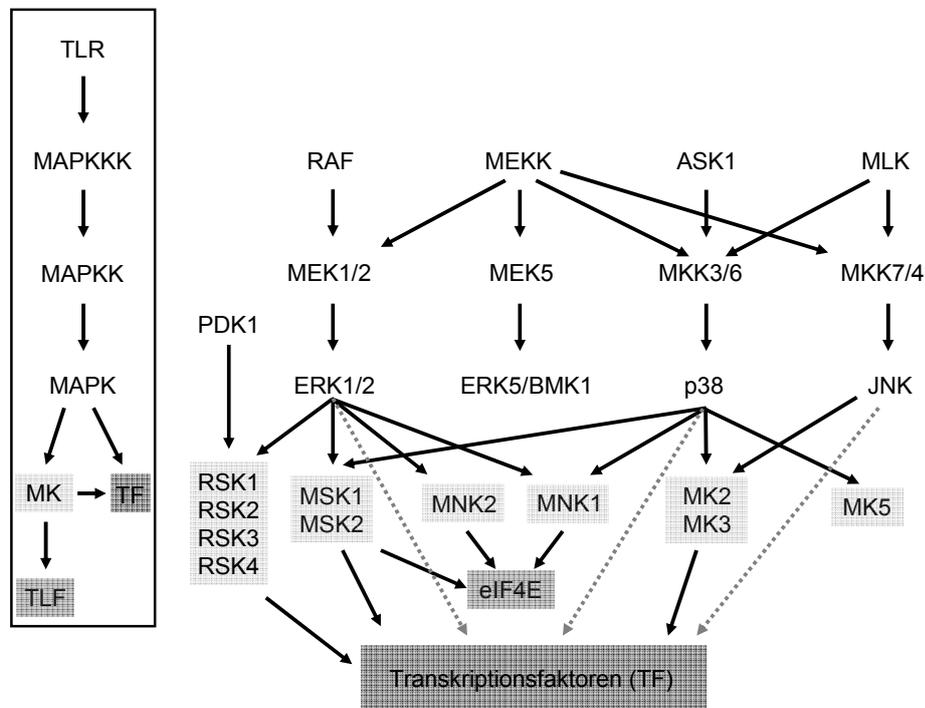


Abb. 3.43.: Einfluss verschiedener Inhibitor-Kombinationen auf die DALIS-Bildung

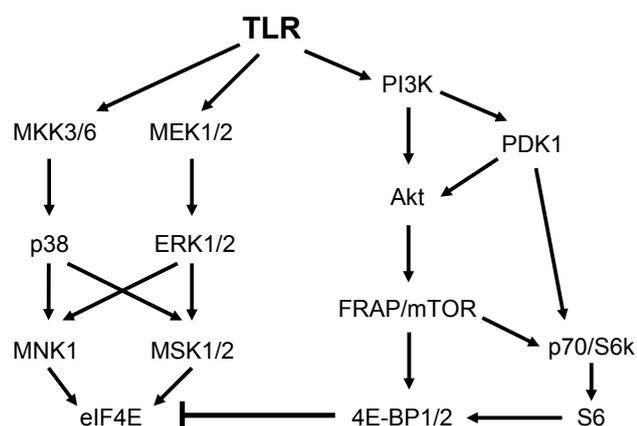
BMDCs wurden mit den angegebenen Inhibitoren einzeln bzw. in Kombination behandelt. Nach 1 h Inkubation wurde LPS zugegeben und die Zellen weitere 17 h inkubiert. Nach dem Fixieren wurden die Zellen intrazellulär mit FK2-Biotin und Streptavidin-FITC sowie DAPI gefärbt und die DALIS-Bildung im Fluoreszenzmikroskop untersucht. Maßstab: 20 μm.

Diese Daten weisen darauf hin, dass die MAPK ERK1/2 und p38 sowie die Proteinkinase B (Akt) essentiell für die DC-Aktivierung und die DALIS-Bildung sind, ebenso wie die PI3 Kinase. Dagegen scheinen NF-κB und JNK nur eine untergeordnete Rolle bei der IL-6 Induktion und der Entstehung von DALIS zu spielen.

Verfolgt man die MAPK-Kaskaden über ERK1/2, p38 und JNK hinaus weiter, stößt man auf ein verzweigtes Netzwerk von MKs, Transkriptions- und Translationsfaktoren, die aktiviert werden. Während es bei den TFs viele Gemeinsamkeiten gibt, aktivieren ERK1/2 und p38 beide die MKs MNK1 sowie MSK1/2, die wiederum den Translationsfaktor eIF4E phosphorylieren und damit aktivieren.



Auch die PI3 Kinase und Akt haben indirekt einen Einfluss auf die Aktivierung des Translationsfaktors eIF4E. Dieser wird normalerweise durch Interaktion mit dem Bindeprotein 4EBP1 inhibiert. Erst wenn dieser Repressor durch FRAP/mTOR phosphoryliert wird, wird die Bindung von 4EBP1 an eIF4E verhindert und der Translationsfaktor kann sich mit eIF4G zu dem aktiven Komplex eIF4F zusammenschließen¹¹⁶, der für die Initiation der Translation von so genannten cap-mRNAs von Bedeutung ist.



Um herauszufinden, ob die Aktivierung von eIF4e für die DALIS-Bildung und/oder die Bildung von IL-6 von Bedeutung ist, wurde im folgenden ein neues Set von Inhibitoren einzeln und in Kombination ausprobiert.

Da bislang keine direkten Inhibitoren für eIF4e erhältlich sind, wurde ein Inhibitor für MNK1 (CGP57380) sowie mehrere Inhibitoren für MSK1/2 (H-89, HA-1077) getestet.

Zunächst wurden die Inhibitoren einzeln wie bereits beschrieben titriert (1 μ M bis 50 μ M) und die BMDCs nach 1 h Inkubation mit LPS [50 ng/ml] stimuliert. Die Analyse der Überstände im IL-6 ELISA ergab eine über 50 % reduzierte IL-6 Produktion bei 30 μ M und 50 μ M CGP57380, während H-89 in keiner der verwendeten Konzentrationen einen signifikanten Einfluss auf die IL-6 Bildung hatte. Der Inhibitor HA-1077 verminderte die IL-6 Produktion bei einer Konzentration von 30 μ M um ca. 40 % (Daten nicht gezeigt). Die Viabilität der Zellen lag bei sämtlichen eingesetzten Inhibitorkonzentrationen über 90 %.

Die Überprüfung der behandelten Zellen im Fluoreszenzmikroskop zeigte lediglich für CGP57380 eine stark verminderte DALIS-Produktion, während die MSK1/2-Inhibitoren keine sichtbare Wirkung auf die Anzahl und Größe der DALIS aufwiesen (Daten nicht gezeigt).

Im nächsten Schritt wurden verschiedene Kombinationen von CGP57380, HA-1077, Akt IV Inhibitor sowie Ly294002 auf ihre Wirkung hin untersucht. Dabei betrug die Endkonzentration jedes Inhibitors 30 μ M mit Ausnahme des Akt IV Inhibitors (1 μ M).

Dabei betrug die Inhibition der IL-6 Produktion der Einzelinhibitoren gegenüber LPS ca. 50 % bis 60 % mit Ausnahme des Akt Inhibitors. Von den Zweierkombinationen zeigte sich CGP57380 + Ly294002 am wirkungsvollsten. Wurde zu dieser Kombination zusätzlich HA-1077 hinzugefügt, fiel die IL-6 Produktion auf ca. 2 % des Ausgangswertes.

Neben der IL-6 Produktion wurde in den behandelten Zellen die DALIS-Bildung überprüft. Hierbei stellte sich heraus, dass diese, wie erwartet, bereits durch CGP57380 und Ly294002 alleine stark beeinträchtigt wurde, während HA-1077- und Akt IV Inhibitor-behandelte Zellen normale DALIS-Bildung zeigten. Ferner war auffallend, dass die Anwesenheit von Akt (auch in Kombinationen) die Anzahl der Zellen stark reduzierte.

Die meisten der getesteten Kombinationen (siehe IL-6 Tabelle) unterbanden die DALIS-Bildung beinahe vollständig. Hierbei war erneut die Dreierkombination von CGP57380 + HA-1077 + Ly294002 am wirkungsvollsten.

Auf die Expression von CD80 und CD86 hatten die Inhibitoren einzeln und in Kombination ähnliche Wirkungen. In der Regel wurde CD80 reduziert, während CD86 nahezu unbeeinflusst blieb. (Daten nicht gezeigt).

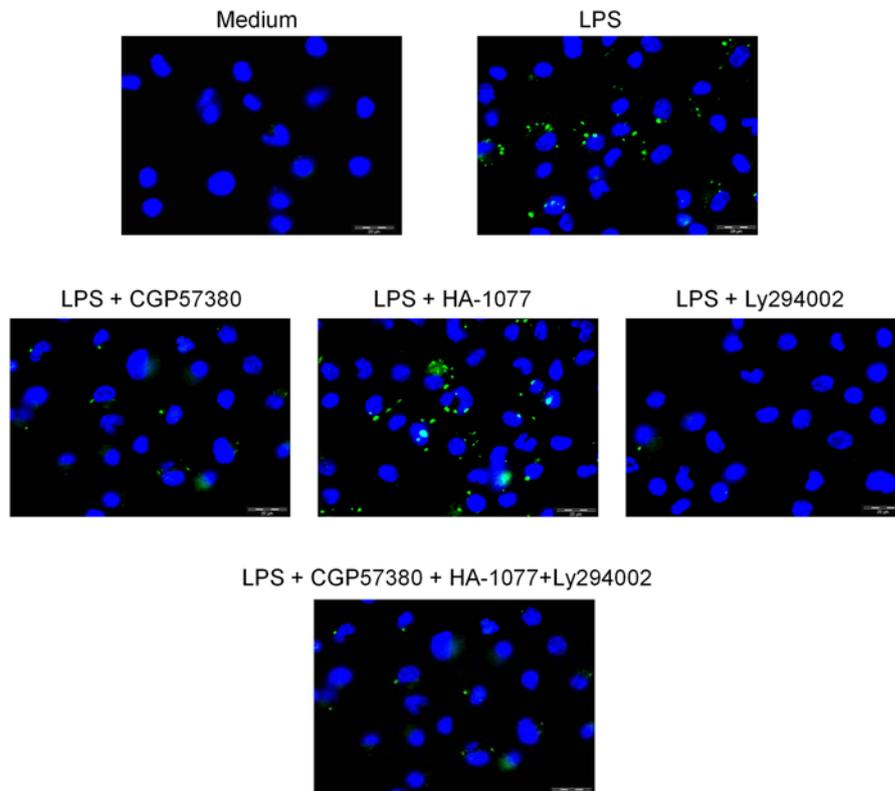
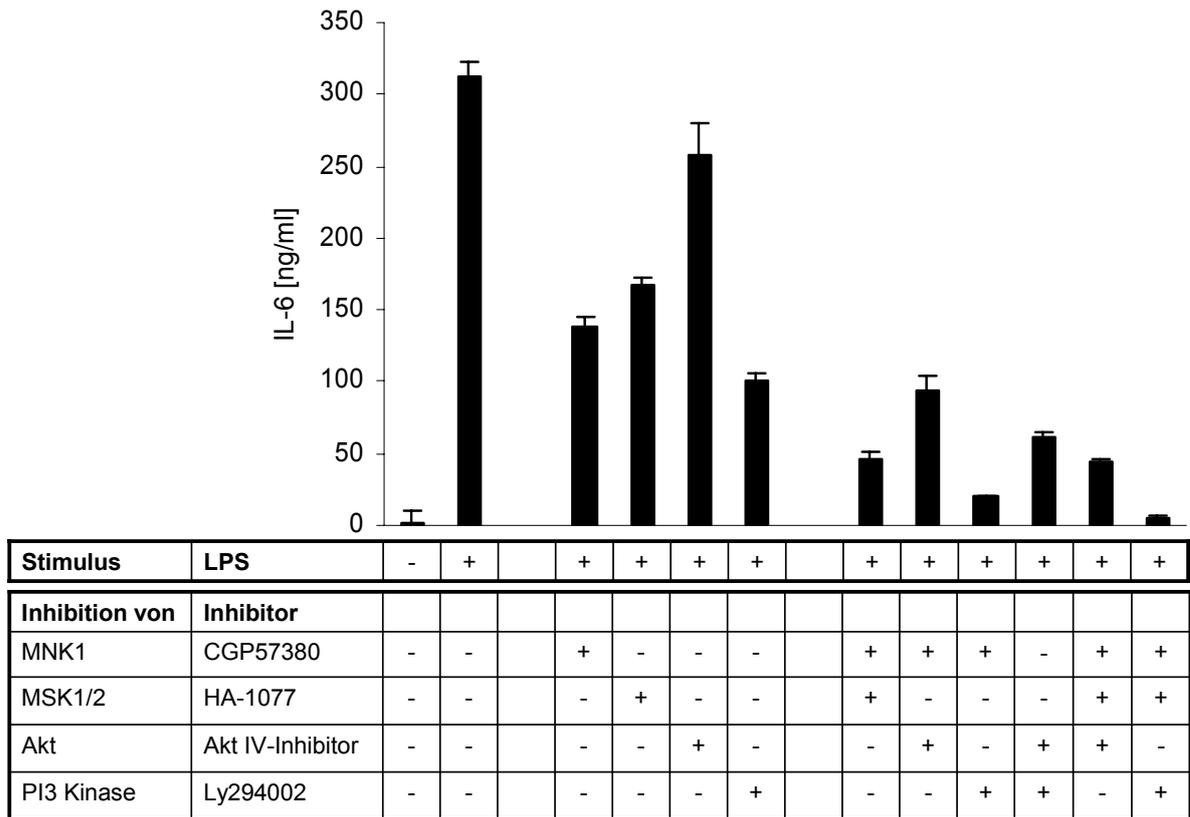


Abb. 3.44.: Einfluss verschiedener Inhibitoren auf die DALIS-Bildung
 BMDCs wurden zunächst mit 30 µM Inhibitor behandelt und nach 1 h Inkubation mit LPS [100 ng/ml] behandelt. Nach 17 h wurden die Zellen intrazellulär mit FK2-Biotin + Streptavidin-FITC (grün) und DAPI (blau) gefärbt und im Fluoreszenzmikroskop untersucht. Maßstab: 20 µm.

4. Diskussion

4.1. Hitzeschockproteine in humanen Wundflüssigkeiten (WF)

4.1.1. Detektion von Hsps in humanen WF und Seren

Für die Detektion von Hsp70 in humanen Wundflüssigkeiten und Seren wurde ein käuflicher Hsp70 ELISA-Kit verwendet. Warum der Kit im Gegensatz zu dem selbst zusammengestellten ELISA bei WF und Seren wesentlich bessere Ergebnisse zeigte, ist unbekannt. Zwar wies der ELISA-Kit einen niedrigeren Hintergrund auf ($OD_{450nm} = 0,07$ statt $OD_{450nm} = 0,3$; Abb. 3.3. a), die Steigungen der Standardgeraden waren jedoch mit 0,021 zu 0,022 vergleichbar. Nach den Ergebnissen des ELISA-Kits enthielten die WF zwischen 55 ng/ml (niedrigste Konzentration) und 2117 ng/ml (höchste Konzentration) Hsp70. Mit den eingesetzten Verdünnungen (1:10 und 1:30) hätte man auf jeden Fall messbare Werte im linearen Bereich der Standardgeraden des selbst zusammengestellten ELISAs erhalten sollen. Das dies jedoch nicht der Fall war, zeigt beispielhaft Abb. 3.3. b. Da der ELISA-Kit speziell für Zelllysate, Seren und Gewebeextrakte ausgelegt war, wäre eine denkbare Erklärung, dass in den WF enthaltene Substanzen zwar keinen oder geringen Einfluss auf die Detektion von Hsp70 mit dem Kit haben, jedoch die Messung im selbst zusammengestellten ELISA stören. Eine Verdünnung in „Sample Diluent“ des ELISA-Kits verbesserte die Ergebnisse im selbst zusammengestellten ELISA nicht. Da auch keiner der anderen Optimierungsversuche die Detektion des Proteins in WF verbesserte, wurde schließlich der ELISA-Kit für die Analysen der Proben verwendet.

Die Detektion von Gp96 erfolgte mittels Immunpräzipitation und Western Blotting. Als Standard wurde aufgereinigtes Gp96 verwendet, jedoch war eine genaue Konzentrationsangabe für Gp96 in WF nicht möglich, da die Gp96-IP das Glykoprotein nicht vollständig sondern nur proportional zur Menge aus den WF präzipitierte. Um die Ergebnisse trotzdem vergleichen zu können, wurden die Signalstärken der einzelnen Banden ermittelt und das Verhältnis der Proben zum jeweils ersten Tag zur Normierung verwendet.

Dabei zeigte es sich, dass die Gp96-Konzentration in den WF von Operationswunden sowohl ohne als auch mit Trauma tendenziell abnimmt.

Da es sich bei Gp96 um ein ER-lokalisiertes Hitzeschockprotein handelt, dass hauptsächlich durch Nekrose in den extrazellulären Raum gelangt, wäre eine denkbare Erklärung für die

erhaltenen Versuchsergebnisse, dass es zum Zeitpunkt der Verletzung oder Operation durch massive Gewebsschädigung zunächst zu einer hohen Freisetzung von Gp96 kommt, welches dann durch Zellen des Immunsystems wie z.B. APCs aufgenommen und dadurch die Konzentration vermindert wird. Zudem ist die erste (inflammatorische) Phase der Wundheilung, die ca. 4 Tage andauert, durch eine mehr oder weniger starke Sekretion gekennzeichnet, durch die Zelltrümmer, Bakterien, Fremdkörper u. a. ausgeschwemmt werden und auch die Konzentration von Gp96 verringert werden könnte.

Chronische Wunden sind häufig von starken Nekrosen belegt. Hier bleibt die Konzentration von Gp96 in den WF einigermaßen konstant, was möglicherweise auf andauernde Nekrosen zurückgeführt werden kann.

Im Gegensatz zu Gp96 handelt es sich bei Hsp70 um ein Stress-induziertes Hitzeschockprotein. Im Gegensatz zu dem konstitutiv exprimierten Hsc70, wird Hsp70 im Normalfall nur schwach exprimiert. Erst durch verschiedene Stressstimuli wird die Expression innerhalb von ca. 2 Stunden stark induziert und steigt ca. um das 20fache an.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass in humanen Gewebeproben heilender Wunden im Gegensatz zu chronischen Wunden Hsp70 exprimiert wird ¹¹⁷, eine Kinetik wurde jedoch nicht durchgeführt, auch ist unklar, an welchem Tag nach Entstehung der Wunde die Proben entnommen wurden. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen wurden in allen untersuchten chronisch/septischen WF dieser Arbeit Hsp70 detektiert, dabei blieben die Konzentrationen ähnlich wie für Gp96 über einen längeren Zeitraum nahezu konstant und nahmen erst im Zuge der Wundheilung ab.

Zwei andere Studien wiesen Hsp70 in der Zerebrospinalen Flüssigkeit (CSF) bei Patienten mit Gehirntraumata nach ^{118,119}. Im Vergleich zu einer Kontrollgruppe wiesen die CSF der traumatischen Patienten erhöhte Hsp70 Konzentrationen auf, mit einem Maximum an Tag 1 nach der Verletzung. Die in dieser Arbeit untersuchten WF traumatischer Wunden zeigten ebenfalls eine hohe Hsp70 Konzentration an Tag 1 nach dem chirurgischen Eingriff, die dann rasch abfiel (Abb. 3.5. a).

Überraschenderweise konnte dagegen eine Zunahme von Hsp70 in den WF von Elektivpatienten über einen Zeitraum von ca. 4 Tagen beobachtet werden (Abb. 3.5. a). Der Grund hierfür ist unklar. Sowohl bei den traumatischen als auch bei den nicht-traumatischen Wunden handelte es sich um heilende Wunden, bei denen die Sammlung der WF einen Tag nach dem chirurgischen Eingriff begann. Trotzdem sind die Hsp70 Konzentrationsverläufe konträr zueinander im Gegensatz zu den Gp96 Konzentrationsverläufen.

Analysen sowohl von Zellen des Immunsystems als auch von Zellen, die an der Wundheilung beteiligt sind (z.B. Keratinozyten) zeigten erhöhte Hsp70 Expressionen nach Stressstimuli¹²⁰ z. T. auch über einen längeren Zeitraum nach der Induktion¹²¹. Somit könnte eine erhöhte Hsp70 Konzentration in WF von Elektivpatienten z.B. auf eine Einwanderung der entsprechenden Zellen in die Wunde zurückzuführen sein. Warum es jedoch einen Unterschied zu traumatischen Wunden gibt, ist vorerst nicht zu beantworten.

4.1.2. Einfluss von WF und Seren auf humane Granulozyten

Nachdem bereits gezeigt werden konnte, dass Gp96 in der Lage ist, humane PMN zu aktivieren¹⁰⁴, weisen die Versuchsergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass auch Hsp70 humane PMN stimuliert und die Phagozytose-Funktion dieser Zellen induziert (Abb. 3.7.).

Da in WF sowohl Gp96 als auch Hsp70 nachgewiesen werden konnte, wurde die Wirkung von WF auf die Aktivierung von humanen PMN untersucht. Dabei zeigte sich, dass WF unabhängig von der Patientenkategorie und den enthaltenen Gp96 sowie Hsp70 Konzentrationen die Phagozytose von PMN induzierte. Dies traf auch auf alle getesteten Seren (Abb. 3.8.) und Gp96- und Hsp70-depletierte WF zu (Daten nicht gezeigt). Daher kann die stimulierende Wirkung von WF auf humane PMN nicht auf die enthaltenen Hitzeschockproteine zurückgeführt werden.

Eine mögliche Erklärung bieten vielleicht im Serum und in der WF enthaltene Immunglobuline oder aktiviertes Komplement, das die Phagozytose-Funktion von Granulozyten stimulieren könnte. Zwar enthielt auch das verwendete Granulozytenmedium 3 % FCS, dieses wurde jedoch vorher hitzeinaktiviert und damit auch Komplement-inaktiviert. Für diese Möglichkeit spricht auch, dass hitzeinaktivierte (56 °C, 45 Minuten) WF und Seren die Phagozytose bei Granulozyten nicht mehr induzierten (Daten nicht gezeigt).

4.1.3. Einfluss von WF und Seren auf humane Dendritische Zellen

Im Knochenmark werden kontinuierlich aus CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen immature DCs hergestellt. Die Entwicklung verläuft dichotom, d.h., es werden zum einen so genannte CLP (common lymphoid progenitors) und zum anderen CMP (common myeloid progenitors)

ausgebildet. Während sich aus den CLP $CD11c^+$ Langerhans Zellen und interstitielle DCs entwickeln, gehen aus den CMP zwei DC-Vorläufer hervor: Pre-DC1 und Pre-DC2 genannt. Bei den Pre-DC1 handelt es sich um Monozyten, aus denen durch den Einfluss von GM-CSF und IL-4 schließlich immature DCs hervorgehen, die auch als „monocyte-derived“ DCs bezeichnet werden ¹²².

Diese Zellen wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet, um den Einfluss von WF auf Dendritische Zellen zu untersuchen.

Für die Differenzierung von Monozyten in unreife DCs gibt es viele verschiedene Protokolle. Während die Verwendung von GM-CSF und IL-4 obligatorisch ist, werden unterschiedliche Medien, Zusätze und Seren zur Generierung der Zellen eingesetzt, die einen Einfluss auf die entstehende DC-Subpopulation ausüben. Je nach Art und Konzentration des eingesetzten Serums entwickeln sich $CD1a^+$ oder $CD1a^-$ DCs, die unterschiedliche Eigenschaften aufweisen. Es ist beschrieben, dass der Einsatz von 10 % Humanserum ^{123,124} oder autologem Plasma ¹²⁴ zu $CD1a^-$ DCs führt, während man mit 1 % Humanserum eine Mischung aus $CD1a^+$ und $CD1a^-$ DCs ¹²³ bzw. hauptsächlich $CD1a^-$ DCs erhält ¹²⁵. Im Gegensatz dazu führt die Zugabe von 10 % FCS oder der Verzicht auf Serum während der Differenzierung in beiden Fällen zu $CD1a^+$ DCs ¹²⁴.

Bei CD1-Molekülen handelt es sich um MHC-Homologa, die genau wie MHC-Klasse I Moleküle auf der Zelloberfläche mit β_2 -Mikroglobulin assoziiert sind. Beim Menschen unterscheidet man 5 Subklassen (CD1a-CD1e), deren Gene auf dem Chromosom 1 lokalisiert sind. Im Gegensatz zu den MHC-kodierenden polymorphen Genen sind die CD1-kodierenden Gene hochkonserviert. Die Funktion der CD1-Moleküle besteht in der Präsentation von Lipidantigenen ¹²⁶.

CD1a Moleküle werden von Langerhans und anderen Dendritischen Zellen exprimiert und präsentieren Lipide und Glykolipide aus der mykobakteriellen Zellwand speziellen CD1-restringierten $\alpha\beta$ -T-Zellen, die z.B. eine wichtige Rolle bei der Abwehr von *M. tuberculosis* spielen.

Es wurde bereits mehrfach beschrieben, dass $CD1a^+$ und $CD1a^-$ DCs unterschiedliche Eigenschaften aufweisen. Während reife $CD1a^+$ DCs hauptsächlich IL-12 p40 exprimieren ^{123,127}, produzieren stimulierte $CD1a^-$ DCs hauptsächlich IL-10 ¹²⁷. Dementsprechend fördern $CD1a^-$ DCs eher eine Differenzierung in die T_H2 -Richtung und $CD1a^+$ DCs in die T_H1 -Richtung ¹²⁷. Jedoch sind sowohl $CD1a^+$ wie auch $CD1a^-$ DCs, die mit 1 % Humanserum herangezogen wurden, gleichermaßen in der Lage, als Stimulatoren in der so genannten gemischten Lymphozytenreaktion (MLR; mixed lymphocyte reaction) zu agieren. Im

Gegensatz dazu, stellen CD1a⁻ DCs, die mit 10 % Humanserum differenziert wurden, schlechte Stimulatoren dar¹²³.

Die in dieser Arbeit verwendeten huDCs wurden entweder in Serum-freien oder 1 % Humanserum-haltigen X-Vivo 15 Medium differenziert. In Übereinstimmung mit den oben aufgeführten Beobachtungen waren serumfreie DCs CD1a⁺, die anderen dagegen CD1a⁻. Es zeigte sich, dass sich CD1a⁻ DCs gut mit LPS aktivieren ließen (Abb. 3.9. b, c). Dabei fiel die Expression von CD80 und CD86 auf der Zelloberfläche eher niedrig aus, während große Mengen (> 30 ng/ml) TNF- α produziert wurden. CD1a⁺ DCs dagegen ließen sich so gut wie überhaupt nicht mit LPS alleine stimulieren. Weder erfolgte eine deutliche Hochregulation von CD80 und CD86, noch war TNF- α im Überstand behandelte Zellen messbar (Abb. 3.9. a, c).

Während die Zugabe von WF zu LPS-stimulierten CD1a⁻ DCs zu einem Rückgang der Expression kostimulatorischer Moleküle und von TNF- α führte, konnte in beiden Fällen ein massiver Anstieg der Expression bei CD1a⁺ DCs beobachtet werden (Abb. 3.9. a, c). WF alleine zeigte dagegen bei keiner Zellpopulation eine aktivierende Wirkung.

Dennoch zeigte sich, dass die Steigerung der Aktivierung nicht auf die Anwesenheit von Gp96 oder Hsp70 zurückgeführt werden konnte, denn genau wie bei den Granulozyten wurde die gleiche Steigerung auch durch Zugabe von Serum erreicht (Abb. 3.9. d), das keine bzw. nur geringe Mengen der Hsps enthielt.

Die genaue Ursache für die Wirkung von WF und Serum auf LPS-stimulierte CD1a⁺ DCs ist unbekannt. Eventuell sind in der WF und im Serum enthaltene lösliche CD14 und LBP (LPS binding protein) für die Verstärkung verantwortlich. LBP wird von der Leber synthetisiert, bindet im Serum an LPS und führt dieses CD14 Molekülen zu. Dendritische Zellen, die kein CD14 auf der Oberfläche exprimieren, werden durch einen Komplex bestehend aus LPS/LBP und löslichem CD14, der an TLR4 bindet, aktiviert.

Es ist daher denkbar, dass eine Aktivierung von CD1a⁺ DCs, die in Serum-freien Medium herangezogen und stimuliert wurden, mit LPS nur durch Zugabe von Serum erfolgen kann. Um dies zu überprüfen, müsste man die Versuche mit anderen Stimulatoren wie CD40L, poly(I:C), CpG oder anderen TLR4-unabhängigen Stimuli wiederholen und den Einfluss von WF und Serum auf die Aktivierung der Zellen untersuchen.

4.1.4. Zytokinprofile humaner WF

Zytokine spielen als pro- und anti-inflammatorische Mediatoren eine wichtige Rolle bei Immunreaktionen und sind auch für die Vorgänge bei der Wundheilung von essentieller Bedeutung. Daher wurden neben den Hitzeschockproteinen auch die Zytokinprofile der gesammelten WF untersucht. Dabei fielen vor allem Verläufe bei den pro-inflammatorischen Zytokinen IL-6 und IL-8 sowie bei dem anti-inflammatorischen Zytokin IL-10 auf.

Bei IL-6 handelt es sich um ein pleiotropes Zytokin, das u. a. von Makrophagen, Monozyten, aktivierten B- und T-Lymphozyten, Mastzellen, Fibroblasten und Endothelzellen gebildet wird. Es spielt eine wichtige Rolle bei der Einleitung der akuten Phase, der Aktivierung von CTL sowie bei der terminalen Differenzierung von B-Zellen und der Hämatopoese und kann als einer der wichtigsten Entzündungsparameter Informationen über systemische Entzündungen und Infektionen liefern. Es zeigte sich, dass die IL-6 Konzentrationen in den untersuchten WF von Trauma-Patienten in den ersten beiden Tagen am höchsten war und dann im Laufe der Wundheilung abnahm (Abb. 3.10. a) genau wie es auch für Hsp70 und Gp96 beobachtet werden konnte (Abb. 3.5.).

Auch IL-8 wird von vielen Zellen des Immunsystems sowie Gewebezellen sekretiert und führt als Chemokin T-Zellen und Granulozyten zum Ort der Entzündung. Dort ist es an der Aktivierung der Granulozyten beteiligt und stimuliert ferner die Endothelproliferation und die Vaskularisierung.

In den WF von Trauma-Patienten wurde in den ersten 5 Tagen nach der Operation ein Anstieg der IL-8 Konzentration festgestellt (Abb. 3.10. c). Diese Ergebnisse decken sich mit denen anderer Untersuchungen¹²⁸.

Das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 wird von Monozyten und Makrophagen gebildet. Als Inhibitor der Expression von IL-1, IL-12 und TNF- α übt es eine wichtige Funktion bei der Eindämmung von Entzündungen aus. IL-10 unterdrückt u. a. die Reifung und APC-Funktion von Dendritischen Zellen¹²⁹.

Bei den meisten Trauma-Patienten ist die IL-10-Konzentration an Tag 1 nach der Operation am höchsten und nimmt dann im Laufe der Wundheilung ab.

Ähnlich wie bei den Hsps kann also auch bei bestimmten Zytokinen ein charakteristischer Verlauf während der Wundheilung beobachtet werden. Dabei beschränkten sich die auf Zytokine untersuchten WF auf Traumapatienten. Ob und wie der Verlauf von IL-6, IL-8 und IL-10 bei chronisch-septischen und elektiven Wunden aussieht, müsste noch geklärt werden.

4.2. DC-Reifung, Antigenpräsentation und DALIS-Bildung

4.2.1. DC-Reifung, DALIS-Bildung und Antigenpräsentation nach Influenza Infektion

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Infektion von BMDCs mit dem humanen Influenza A Virus PR/8/34 möglich ist (Abb. 3.11.) und zu einer Reifung dieser Zellen führt (Abb. 3.12.). Dass die Induktion des Reifungsprozesses tatsächlich auf das Virus selbst und nicht auf kontaminierendes LPS in den Viruspräparationen zurückzuführen war, zeigten Infektionsversuche mit BMDCs von C3H/HeJ Mäusen, die keine funktionsfähigen TLR2 und TLR4 Rezeptoren besitzen und somit LPS-insensitiv sind. Auch hier konnte nach Influenza Infektion die Hochregulation von kostimulatorischen Molekülen und die Produktion von IL-6 nachgewiesen werden (Abb. 3.13.).

Während der Reifung bildeten sich Anhäufungen von ubiquitinylierten Proteinen im Zytoplasma der DCs, die schließlich als DALIS identifiziert werden konnten (Abb. 3.14. und 3.15.). Dabei unterscheidet sowohl die transiente Natur der FK2-positiven Aggregate als auch das Vorhandensein einer Vielzahl von Aggregaten, die nicht mit dem Zellkern verbunden sind, diese Anhäufungen ubiquitinylierter Proteine von PODs und dem MTOC. Bei Nicht-APCs wie EL-4 und MC57 Zellen konnte keine DALIS Bildung nach Influenza Infektion beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Bei Makrophagen konnte dagegen die Entstehung von DALIS nach LPS-Stimulation inzwischen nachgewiesen werden¹³⁰.

Die ersten DALIS wurden ca. 4 Stunden nach Infektionsbeginn beobachtet, das Maximum der DALIS-Expression lag bei 8 bis 15 Stunden nach Zugabe des Virus.

Der Nachweis von Influenza Nukleoprotein in DALIS (Abb. 3.16. und Abb. 3.17.) wies auf eine mögliche Rolle von DALIS als Antigen-speicher in APCs hin. Daher wurden in den nächsten Versuchen die Kinetiken der Antigenpräsentation bei BMDCs sowie EL-4 und MC57 Zellen nach Influenza Infektion verglichen. Hierbei zeigte sich, dass die Antigenpräsentation des immunodominanten Influenza NP Epitops bei BMDCs verzögert ist im Vergleich mit den nicht-professionellen APCs. Die maximale, Influenza NP-spezifische CTL-Antwort wurde bei BMDCs zwischen 8 und 10 Stunden nach Infektionsbeginn beobachtet (Abb. 3.18. a, b). Dabei konnte die Antigenpräsentation durch Einsatz des Proteinsynthese-Inhibitors Cycloheximid oder durch vorherige UV-Behandlung des Virus verhindert werden (Abb. 3.18. c).

Im Gegensatz dazu erfolgte die maximale CTL-Erkennung bei EL-4 und MC57 Zellen bereits nach 4 Stunden Infektion (Abb. 3.18. a, b). Da die beobachteten Unterschiede zwischen BMDCs und EL-4 sowie MC57 Zellen nicht auf verminderte oder verzögerte Expression des Influenza Nukleoproteins in BMDCs zurückzuführen waren, zeigten die Ergebnisse der NP-Expressionskinetiken (Abb. 3.19.).

Eine Überprüfung der Kinetik der Oberflächenexpression von CD80 und CD86 sowie MHC-Klasse I-Molekülen nach Influenza Infektion von BMDCs zeigte eine zeitliche Übereinstimmung mit der Bildung von DALIS (Abb. 3.20.).

Eine zunehmend stärker werdende Fähigkeit Influenza-infizierter DCs, eine CTL-Antwort zu induzieren konnten auch Cella et al. in ihrer Publikation beobachten ¹³¹. Sie zeigten, dass humane DCs, die für 24 Stunden mit Influenza infiziert wurden, 10fach effizienter eine CTL-Antwort auslösten als nach 5 Stunden Infektion. Im Gegensatz dazu berichteten Crowe et al. ¹³² in ihrer Publikation von einer maximalen NP-Peptid Präsentation nach 2 bis 4 Stunden Infektion, die dann zwischen 6 und 8 Stunden sank und erneut nach 24 Stunden anstieg. Der Grund für diese unterschiedlichen Beobachtungen ist nicht klar, sie könnten aber eventuell auf die Verwendung einer DC-Linie anstelle von Primärzellen zurückzuführen sein ¹³² während bei der ersten Publikation ¹³¹ und in dieser Arbeit frisch isolierte bzw. differenzierte DCs verwendet wurden. Ob es einen Unterschied zwischen den verschiedenen DC-Typen in Bezug auf DALIS Bildung gibt, müsste noch geklärt werden.

Es stellt sich nun die Frage nach dem Grund für die verzögerte Antigenpräsentation bei DCs. Im Gegensatz zu nicht-professionellen APCs, bei denen eine frühe Herstellung und Präsentation von CTL-Epitopen wichtig für eine schnelle Viruselimination ist, benötigen DCs Zeit, einen reifen Phänotyp zu entwickeln, um ihre Aufgabe als T-Zell-Aktivatoren erfüllen zu können. Die Aktivierung von naiven CD8⁺ T-Zellen durch DCs benötigt Antigenerkennung auf reifen DCs, die MHC- sowie kostimulatorische und Adhäsions-Moleküle auf ihrer Oberfläche präsentieren. Im Gegensatz dazu führt eine Antigenerkennung auf unreifen DCs zur Induktion von Toleranz.

Die Zwischenlagerung von Peptiden in DALIS könnte eine Möglichkeit darstellen, die Antigenpräsentation in DCs zu verzögern bis die Zelle herangereift ist, um optimale T-Zell-Aktivierung zu gewährleisten.

Nachdem lediglich endogene Proteine in DALIS gefunden werden, greift dieser Mechanismus nicht bei der Präsentation von exogenen Peptiden auf MHC-Klasse I-Molekülen, ein Vorgang, der als Cross-Präsentation bezeichnet wird.

Cross-Präsentation kann zu Cross-Priming oder Cross-Toleranz führen¹³³⁻¹³⁵, in Abhängigkeit vom Reifungszustand der DCs.

Bei unreifen DCs wird Cross-Präsentation kaum beobachtet, während 7 Stunden nach Stimulation der Zellen dieser Vorgang effektiv funktioniert¹³⁶. Demnach ist nicht nur die Präsentation von endogenen sondern auch von exogenen Peptiden verzögert.

Eine mögliche Funktion der DALIS könnte in diesem Zusammenhang auch die Erleichterung der Cross-Präsentation sein. In dem endogene Peptide in DALIS zwischengelagert werden, könnte die Ubiquitylierung, Prozessierung und der Transport exogener Antigene gegenüber endogenen Peptiden verstärkt und somit ihre Präsentation bevorzugt werden. Jedoch konnte bereits gezeigt werden, dass DCs, die auf unterschiedliche Arten stimuliert wurden (LPS versus Hitzeschock) zwar beide DALIS ausbildeten, jedoch nur die Hitzeschock-behandelten DCs eine deutlich verbesserte Cross-Präsentation von Ovalbumin im B3Z System gegenüber unbehandelten Zellen aufwiesen¹³⁷.

Neben der Hochregulation von MHC- und kostimulatorischen Molekülen werden während der DC-Reifung auch Chemokinrezeptoren verstärkt exprimiert, die den DCs die Wanderung zu den drainierenden Lymphknoten erlaubt. Reifende DCs regulieren 1-2 Stunden nach Stimulation CCR1 und CCR5 herunter, nach 3 bis 4 Stunden wird die Expression des Homing-Faktors CCR7 hochreguliert¹¹. Dem entsprechend wurden DCs des Atmungstrakts bereits 6 Stunden nach Influenza Infektion in den drainierenden peribronchialen Lymphknoten gefunden¹³⁸, ein Zeitpunkt der mit der in dieser Arbeit gefundenen Initiation der Antigenpräsentation zusammen fällt.

Die Fähigkeit reifer DCs, naive T-Zellen zu aktivieren, ist zeitlich limitiert. Es scheint ein optimales Zeitfenster zu geben, in dem DCs ihre Aufgabe am besten erfüllen können. Dieses liegt zwischen 8 und 18 Stunden nach Beginn der Reifung. So konnte z. B. gezeigt werden, dass DCs, die mit dem CTL-Epitop TRP-2₁₈₀₋₁₈₈ inkubiert und mit LPS stimuliert wurden, nach 8 Stunden eine stärkere CTL-Antwort in C57BL/6 Mäusen induzierten als nach 48 Stunden Stimulation¹³⁹. Im Hinblick auf die Kinetik der IL-12 Produktion erreichen DCs nach 8 Stunden Stimulation die drainierenden Lymphknoten zu einem Zeitpunkt, an dem die Sekretion des Zytokins maximal ist. Dementsprechend können diese Zellen dort auch CD4⁺ T-Zellen aktivieren und eine T_H1-Antwort auslösen. Mit nachlassender IL-12 Produktion wird dagegen die Initiation einer T_H2-Antwort wahrscheinlicher, auch wenn hierbei noch andere Einflüsse eine Rolle spielen¹³.

Es ist denkbar, dass der enge Zeitrahmen, in dem DCs optimal eine T-Zell-Antwort auslösen können, das Risiko einer Überaktivierung des Systems minimalisiert.

Ein weiterer Grund für DCs die Antigenpräsentation zu verzögern bis ein gewisser Reifungsgrad der Zellen erreicht ist, ist der Schutz vor Zerstörung durch aktivierte CTL. Diese induzieren in Zielzellen Apoptose durch Exozytose von zytotoxischen Granula bzw. Cross-linking von Todesrezeptoren. DCs, die diese Zellen aktivieren, laufen Gefahr, durch eben diese eliminiert zu werden. Während unreife DCs anfällig für CTL-induzierte Apoptose sind, schützen sich reife DCs durch die Expression des Serin-Protease-Inhibitors SPI-6. Dieser Inhibitor wird 8 Stunden nach Stimulation der Zellen exprimiert²¹ und bietet Schutz zum Zeitpunkt der Antigenpräsentation.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass BMDCs am effektivsten zwischen 8 und 18 Stunden nach Stimulation eine CTL-Antwort induzieren können, bedingt durch maximale Hochregulation von MHC- und kostimulatorischen Molekülen, IL-12 Produktion, SPI-6 und CCR7 Expression in diesem Zeitfenster. In dieser Arbeit wird ergänzend gezeigt, dass die MHC-Klasse I-restringierte Antigenpräsentation in BMDCs verzögert ist und der DALIS-Bildung folgt, die synchron zu der DC-Reifung abläuft.

4.2.2. DALIS-Bildung und Antigenpräsentation nach Infektion mit *Listeria monocytogenes*

Die Infektion von BMDCs mit Ovalbumin-transgenen Listerien führte genau wie die Infektion mit humanem Influenza Virus zu einer Reifung der DCs und Ausbildung von DALIS (Abb. 3.21.). Dabei war zu erwarten, dass das von den Listerien gebildete und sekretierte Ovalbumin als exogenes Protein nicht in die DALIS integriert werden würde, jedoch war keine spezifische Ovalbumin-Färbung im Fluoreszenzmikroskop zu erkennen und somit diese Annahme nicht zu überprüfen. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte eine zu geringe Produktion oder Sekretion von Ovalbumin durch die Listerien sein. Ferner können Proteine im Fluoreszenzmikroskop nur detektiert werden, wenn ihre lokale Konzentration hoch genug ist, diffus verteilte Proteine in niedrigen Konzentrationen werden nicht erkannt. Eventuell war auch der gewählte Antikörper ungeeignet.

Zu geringe Mengen Ovalbumin können auch die Ursache dafür sein, dass eine Detektion von SIINFEKL gebunden an H-2 K^b im FACS nicht möglich war. Eine Erhöhung der Listerienkonzentration behob das Problem jedoch nicht.

4.2.3. DC-Reifung, DALIS-Bildung und Antigenpräsentation nach mCMV Infektion

In diesem Teil der Arbeit wurde der Einfluss von mCMV auf die Reifung und Antigenpräsentation von BMDCs untersucht.

Das Zytomegalievirus ist aufgrund seiner Immunevasionsgene in der Lage, die MHC-Klasse I restringierte Antigenpräsentation zu beeinflussen und seine vollständige Elimination durch das Immunsystem zu verhindern.

Es zeigte sich, dass auch BMDCs mit mCMV infiziert werden konnten (Abb. 3.23; 3.35.), aus noch ungeklärten Gründen wurden bei diesem Zelltyp jedoch deutlich weniger mCMV positive Zellen gefunden als bei infizierten MEFs. Hierfür kann es verschiedene Erklärungen geben. Entweder ließen sich BMDCs prinzipiell schlechter infizieren als MEFs oder sie produzierten weniger Virusprotein.

Als wichtige Parameter für die Infektion stellten sich die Viruskonzentration, die Zentrifugationsdauer und das Infektionsvolumen heraus. Nahezu optimal war die Infektion mit 1 PFU/Zelle in einem Infektionsvolumen von 100 μ l (das spätere Gesamtvolumen betrug 200 μ l pro Well) und einer Gesamtzentrifugationsdauer von 20 Minuten, wobei die verwendeten 96-U-Form Platten nach 3 Minuten um 180° in der Zentrifuge gedreht wurden.

Unter diesen Bedingungen wurden Infektionsraten bis zu 90 % erreicht, jedoch konnten Unterschiede zwischen den verschiedenen Virusmutanten beobachtet werden.

Die unvollständige Infektion von BMDC-Kulturen mit Virusmutanten, bei denen eines oder mehrere Immunevasionsgene ausgeschaltet worden sind, führte zu der interessanten Beobachtung, dass Virusprotein-negative (CR103⁻) Zellen DALIS ausbildeten (Abb. 3.33.) und IL-6 produzierten (Abb. 3.35.; 3.36.). Auch CR103⁺ Zellen produzierten IL-6, jedoch um den Faktor 2 bis 3 weniger (Abb. 3.36.).

Im Gegensatz dazu führte die Infektion mit dem mCMV wt oder Peptidmutanten zu keiner Ausbildung von DALIS (Abb. 3.24) und zu einer geringen IL-6 Produktion (Abb. 2.28 a).

Behandelte man diese Zellen jedoch zusätzlich mit LPS, so kam es auch in diesen Kulturen zur Ausbildung von DALIS bei CR103⁻ Zellen (Abb. 3.34 c) und zur Produktion von IL-6 (Abb. 3.34. a).

Diese Beobachtungen wiesen zunächst auf einen Einfluss der Immunevasionsgene auf die Reifung von BMDCs hin, drei zusätzlich gemachte Beobachtungen relativierten diese Versuchsergebnisse jedoch.

Zum einen gab es zwei Revertanten ($\Delta m152$ Rev und m164 Rev), die die IL-6 Produktion und DALIS-Bildung induzierten (Abb. 3.30), obwohl sie formal dem wt entsprechen sollten. Zufällig entstandene Mutationen in den Immunevasionsgenen bei diesen Revertanten konnten durch Sequenzierung ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt).

Außerdem veränderte sich das Muster der IL-6-induzierenden Virusmutanten, wenn man die Viren, statt sie für die Dauer der Versuche in der Zellkultur zu belassen, nach 1,5 h durch Waschen entfernte (Vergleich Abb. 3.30 links und Abb. 3.32 rechts).

Zwar wurden fast alle Mutanten im LAL-Assay negativ auf kontaminierendes Endotoxin getestet, jedoch konnten bei Infektion von C3H/H3J/TLR2^{-/-}-BMDCs keine signifikanten Unterschiede in der IL-6 Induktion zwischen Immunevasionsgenmutanten sowie wt und Peptidmutanten gefunden werden (Abb. 3.36 rechts). Die IL-6 Produktion bei diesen Zellen war in allen Versuchen deutlich niedriger als die von C57BL/6 BMDCs.

Ferner zeigten sich UV-inaktivierte Überstände infizierter C57BL/6 Zellen in der Lage, nicht infizierte C57BL/6 BMDCs zu aktivieren (Abb. 3.37.), dies funktionierte jedoch nicht mit BMDC-Präparationen von C3H/H3J/TLR2^{-/-} Mäusen.

So unklar die Rolle der Immunevasionsgene bei der Aktivierung von BMDCs war, so deutlich war ihr Einfluss auf die Antigenpräsentation.

Das „klassische“ Immunevasionsgen m152 verhinderte die Präsentation des M45-Peptids und somit eine Erkennung der Zellen durch M45-spezifische CD8⁺ T-Zellen (Abb. 3.26.; Abb. 3.32.). Diese Fähigkeit konnte jedoch durch die zusätzliche Anwesenheit von m04 in der Mutante $\Delta m06$ unterbunden werden. Hier kam es zu einer deutlichen T-Zell-Antwort, erkennbar durch die Produktion von IFN- γ im ELISPOT. In diesem Falle schien das Immunevasionsgen m04 eher als „anti-Immunevasionsgen“ zu fungieren. Im Gegensatz zu m04 zeigte sich m06 nicht in der Lage, die Inhibition der Antigenpräsentation durch m152 zu kompensieren. Waren jedoch alle drei Immunevasionsgene im vorhanden (wt) wurde die Präsentation des Peptids ebenfalls unterbunden. Anscheinend beeinflussten sich m04 und m06 hier gegenseitig.

Diese Versuchsergebnisse deckten sich mit den Beobachtungen der Funktionen der Immunevasionsgene in MEFs von Dr. R. Holtappels-Geginat vom Institut für Virologie der Universität Mainz (Manuskript in Bearbeitung).

Neben der Rolle der Immunevasionsgene bei der Antigenpräsentation wurde auch die Kinetik der MHC-Klasse I-restringierten Präsentation nach mCMV-Infektion untersucht.

Die im Ergebnisteil unter 3.2.1. dargestellten Versuchsergebnisse wiesen auf eine Rolle der DALIS als Antigenpeicher hin, die die Antigenpräsentation verzögerten um die DC-Reifung zu ermöglichen.

Nachdem mCMV im Gegensatz zu Influenza keine DALIS in infizierten Zellen induzierte, wäre zu erwarten, dass sich die Kinetik der Antigenpräsentation mCMV-infizierter BMDCs nicht von der anderer Zellen unterscheidet.

Wie schon bei den ⁵¹Chrom-Freisetzungstests mit Influenza-infizierten Zellen als Targets, wurden auch mCMV-infizierte Zellen mit Glutaraldehyd fixiert, um die Dauer der Infektionen genau bestimmen zu können. Hierbei gab es jedoch Probleme mit den als Vergleichszellen gewählten MEFs. Die Fixierung beeinflusste ihre Antigenpräsentation maßgeblich, auch eine alternative Fixierungsmethode, die auf DNA-Ebene agierte, funktionierte im ELISPOT nicht. Erst durch den Wechsel vom C57BL/6 in das BALB/c System wurde eine Vergleichskinetik ermöglicht, da die Präsentation des H2 D^d Peptids stärker ausfiel und somit eine Erkennung der Zielzellen durch die T-Zellen auch nach Fixierung möglich war.

Dabei stellte sich heraus, dass es zwischen BMDCs und MEFs keinen Unterschied im zeitlichen Verlauf der Antigenpräsentation gibt. Die maximale Präsentation des Peptids, das aus dem *early* Protein M45 stammt, wurde zwischen 6 h und 10 h erreicht (Abb. 3.27.).

Diese Ergebnisse unterstützen die Theorie, dass die Anwesenheit von DALIS die Antigenpräsentation verzögern kann und ihnen somit eine Funktion als Antigenpeicher zukommen könnte.

4.2.4. Mechanismen der DALIS-Bildung

In diesem Teil der Arbeit wurden grundlegende Mechanismen untersucht, die zur DALIS-Bildung führen könnten.

Bisher konnte bereits gezeigt werden, dass DALIS aus DRiPs bestehen und Bestandteile des Ubiquitinylierungsapparates der Zelle enthalten können ¹⁹. Warum jedoch ausschließlich APCs (DCs und Makrophagen, für B-Zellen müsste die Frage der DALIS-Bildung noch geklärt werden) DALIS bilden, während die Entstehung von DRiPs in sämtliche Zellen statt findet, ist unbekannt.

Der Grund für die DALIS-Bildung könnte, wie in dieser Arbeit spekuliert wurde, die Notwendigkeit der Reifung Dendritischer Zellen für die Aktivierung von T-Zellen sein. Die Mechanismen, die den Aufbau von DALIS induzieren, sind jedoch bislang völlig unklar.

Fest steht, dass die DALIS-Bildung durch die gleichen Stimuli ausgelöst wird, die die Reifung der DCs induzieren. Dazu gehören sämtliche TLR-Liganden (Kapitel 3.4.2.1.), wie auch die Ligation von CD40¹⁴ und Hitzeschock¹³⁷.

Während es Gemeinsamkeiten der Signaltransduktionswege nach TLR- und CD40-Ligation gibt, sind die Mechanismen, die zur DC-Reifung nach Hitzeschock führen, bislang unbekannt^{140,141}. Zudem erscheinen DALIS erst ca. 12 h nach Beenden des Hitzeschocks¹³⁷, während die ersten DALIS 4 h bis 6 h nach Zugabe der TLR-Stimuli oder CD40L auftreten¹⁴. Jedoch ist auch der Hitzeschock in der Lage, die MAPK-Wege zu aktivieren.

Um die Signaltransduktionswege, die für die Entstehung von DALIS notwendig sind, zu ermitteln, wurden in der vorliegenden Arbeit die Wirkung verschiedener Inhibitoren untersucht, die wesentliche Komponenten der TLR-Signalkaskaden hemmen.

Bei den Titrationen der Einzelinhibitoren zeigte sich schnell, dass außer Ly294002, der die PI3 Kinase inhibiert und eventuell SB203580, der die p38 Kinase hemmt, kein getesteter Inhibitor die DALIS-Bildung vollständig unterbinden konnte (Abb. 3.41.). Ebenso verhielt es sich für die IL-6 Produktion (Abb. 3.40).

Die Unterdrückung der DALIS-Bildung durch Ly294002 hatte zu dem Einfluss auf die Kinetik der Antigenpräsentation von BMDCs (Abb. 3.42.).

BMDCs wurden vor Infektion mit dem Influenza Virus PR/8/34 mit dem Inhibitor Ly294002 behandelt. Nach unterschiedlichen Infektionszeiten wurden die Zellen fixiert und im ⁵¹Cr-Freisetzungstest als Zielzellen für Influenza NP-spezifische T-Zellen verwendet. Dabei zeigte sich, dass die Inhibitor-behandelten Zellen bereits nach 4 h Infektion in der Lage waren, eine CTL-Antwort zu induzieren, während unbehandelte und PD98059-behandelte Zellen erst nach 6 h erkannt wurden. Auf die Antigenpräsentation von EL-4 Zellen, die keine DALIS bilden, hatte der PI3K-Inhibitor keine Wirkung.

Die Fähigkeit der Zellen, Proteine zu ubiquitinylieren blieb von dem Inhibitor unbeeinflusst.

Diese Daten untermauern die Annahme, dass es sich bei den DALIS in der Tat um Antigenpeicher handeln könnte, die die Antigenpräsentation in DCs verzögern.

Durch die Stimulation eines TLR oder von CD40 wird ein komplexes Netzwerk von Signaltransduktionskaskaden ausgelöst, die sich z. T. überlappen und an deren Ende eine Vielzahl unterschiedlicher und gemeinsamer Transkriptionsfaktoren und MKs (MAPK-activated protein kinases) stehen. Daher war es auch nicht verwunderlich, dass die meisten Inhibitoren alleine keine Wirkung zeigen konnten.

Durch gleichzeitigen Einsatz von mehreren Inhibitoren wurden schließlich Kombinationen gefunden, die die DALIS-Bildung ebenso wie die IL-6 Produktion von BMDCs auf ca. 20 % der Ursprungswerte reduzierten. Dabei zeigte sich die Kombination von U0126 (MEK1/2-Inhibitor) + SB203580 (p38 Inhibitor) + Akt IV Inhibitor am wirkungsvollsten (Abb. 3.43). Die JNK Kaskade scheint bei der DALIS-Bildung nur eine untergeordnete Rolle zu spielen, ebenso wie der Transkriptionsfaktor NF- κ B.

Auch die Expression der Oberflächenmoleküle CD80 und CD86 wurde durch die Kombination der Inhibitoren herabgesetzt. Hierbei war der Effekt auf CD80 deutlich stärker als auf CD86, das nahezu unbeeinflusst blieb.

Sucht man nach Gemeinsamkeiten der ERK1/2- und der p38-Kaskade, auf die auch die PI3K sowie Akt einen Einfluss haben, stößt man u. a. auf die MKs MSK1/2 und MNK1, die wiederum den Translationsfaktor eIF4E durch Phosphorylierung aktivieren¹⁴². Dementsprechend könnte eIF4E eine wichtige Rolle bei der Induktion von DALIS und IL-6 spielen.

Da es für diesen Faktor keinen selektiven Inhibitor gibt, wurden MSK- und MNK1-Inhibitoren einzeln und in Kombination getestet. Dabei zeigte sich, dass sowohl die Inhibition von MNK1 als auch von MSK1/2 die IL-6 Produktion der BMDCs ca. halbierte, jedoch nur der MNK1-Inhibitor auch maßgeblich Einfluss auf die DALIS-Bildung hatte (Abb. 3.44). Am wirkungsvollsten ließ sich die IL-6 Synthese durch die Kombination der beiden Inhibitoren zusammen mit dem PI3 Kinase Inhibitor Ly294002 unterdrücken (auf ca. 2 % des Ausgangswertes). Hier wurden auch keine DALIS mehr gebildet.

Diese Ergebnisse deuten auf eine Rolle von MNK1 sowie MSK1/2 und somit auch auf eine wichtige Beteiligung des Translationsfaktors eIF4E bei der IL-6 Synthese und der DALIS-Bildung hin.

Der Translationsfaktor eIF4E bindet in aktiviertem (= phosphoryliertem) Zustand an die 5' m⁷GpppN-Kappe von mRNAs und ist im Komplex mit eIF4A und eIF4G, den man als eIF4F bezeichnet, für die Initiation der Translation dieser RNAs von Bedeutung, in dem eIF4F zusammen mit eIF3 und der ribosomalen 40 S Untereinheit sowie der mRNA den Translations-Initiations-Komplex bildet¹⁴³.

Eine Überexpression von aktiviertem eIF4E führt zu einem Verlust der Wachstumskontrolle einer Zelle und somit zur Entwicklung von Krebs.

Das Inhibitorprotein 4E-BP1 verhindert durch Bindung an eIF4E die Ausbildung von eIF4F und spielt somit eine regulatorische Rolle bei der Translationsinitiation. Phosphorylierung dieses Repressors durch den PI3K/Akt/mTOR-Weg verhindert seine Bindung an eIF4E¹¹⁶.

Obwohl sowohl die PI3 Kinase als auch Akt viele verschiedene Funktionen ausüben, zu denen die Wachstumskontrolle und das Überleben der Zelle ebenso wie eine Beteiligung an der Regulation des Zellzykluses, des Glukose Metabolismuses sowie der Proteinsynthese gehören, wäre in diesem Zusammenhang eine naheliegende Erklärung für die Wirkung des PI3K Inhibitors Ly294002 und des Akt Inhibitors ihr indirekter Einfluss über mTOR auf 4E-BP1. Die Phosphorylierung von 4E-BP1 wird durch die Inhibition von PI3K und Akt unterbunden, somit bleibt der Repressor an eIF4E gebunden und verhindert die Entstehung von eIF4F.

Da nicht nur die PI3 Kinase und Akt, sondern auch alle Komponenten der MAPK Wege in den meisten Fällen verschiedene Funktionen ausüben, ist eine eindeutige Aussage über den Einfluss jedes einzelnen Proteins auf die DC-Reifung und DALIS-Bildung natürlich nicht ohne weiteres möglich. Berücksichtigt werden muss bei der Interpretation der Inhibitor-Ergebnisse auch, dass die Inhibitoren nur in den seltensten Fällen ausschließlich ihr Zielprotein hemmen. Die meisten Inhibitoren haben auch Einfluss auf die Funktion anderer Proteine.

Auf welche Weise eIF4E Einfluss auf die Entstehung der DALIS nehmen könnte, bleibt noch zu klären. Denkbar wäre, dass eIF4E für die Translation bestimmter für die Entstehung und Regulation von DALIS notwendiger Proteine beteiligt ist. Alternativ könnte eIF4E auch Einfluss auf die DRiPs-Bildung haben und somit die DALIS Entstehung indirekt beeinflussen.

Zwar stehen zum jetzigen Zeitpunkt noch keine eIF4E-KO-Mäuse zur Verfügung, jedoch sind MNK1/2 KO Mäuse bekannt, in denen nachweislich eIF4E nicht mehr phosphoryliert wird¹⁴³. Es wäre sehr interessant zu überprüfen, ob BMDCs dieser Tiere nach wie vor zur DALIS-Bildung in der Lage sind, obwohl die generelle Translationsfähigkeit dieser Tiere nicht eingeschränkt ist.

Zusätzlich zu weiteren Untersuchungen über den Einfluss der Translationsfaktoren könnte eine Überprüfung verschiedener, durch die MAPK-Wege induzierter, Transkriptionsfaktoren zur Klärung der Mechanismen der DALIS-Bildung beitragen.

5. Zusammenfassung

Teil 1: Hitzeschockproteine als Indikatoren der Wundheilung

Im ersten Teil der Arbeit wurden Zusammenhänge zwischen Anwesenheit und Konzentrationen der Hitzeschockproteine (Hsps) Gp96 und Hsp70 in humanen Wundflüssigkeiten (WF) und Wundheilungsverläufen untersucht.

Während Hsp70 durch Verwendung eines ELISA-Kits in WF und Seren nachgewiesen werden konnte, musste für Gp96 ein geeignetes immunologisches Detektionssystem entwickelt werden. Hierfür wurde eine Gp96-Immunpräzipitation mit anschließendem Western Blot zur Detektion und Semiquantifizierung des Hsps etabliert.

Um mögliche Korrelationen zwischen Konzentrationen der Hsps in WF und der Wundheilung aufzudecken, wurden WF und Seren von Patienten verschiedener Kategorien über einen Zeitraum von mehreren Tagen beginnend nach der OP gesammelt und analysiert. Verglichen wurden die Hsp-Verläufe von elektiven Eingriffen (Endo), sowie von traumatischen und chronisch/septischen Wunden. Während in allen Patientenseren nur geringe Mengen Gp96 und Hsp70 ohne erkennbaren Verlauf detektiert wurden, fanden sich interessante Konzentrationsverläufe beider Hsps in den WF. In den WF von Traumapatienten nahm sowohl die Konzentration von Hsp70 wie auch Gp96 im Laufe der Wundheilung ab, gleiches galt für Gp96 in WF nach elektiven Eingriffen. Hier gab es deutliche Unterschiede zum Verhalten von Hsp70, dass eine starke Zunahme erfuhr. Im Gegensatz dazu konnten keine Änderungen der Hsp-Konzentrationen in chronisch/septischen Wunden beobachtet werden. Hier blieben sowohl Gp96 als auch Hsp70 bis zur Abheilung nahezu konstant.

Diese Beobachtungen wiesen darauf hin, dass Anwesenheit und Konzentrationsverläufe von Hsps Rückschlüsse auf die Wundheilung zu lassen. Das z. T. unterschiedliche Verhalten der beiden verschiedenen Hsps könnte auf ihre unterschiedliche Herkunft zurückzuführen sein. Während es sich bei Gp96 um ein ER-lokalisiertes Glykoprotein handelt, das hauptsächlich durch Nekrose in den extrazellulären Raum gelangt, gehört Hsp70 zu den Stress-induzierten Hsps.

Teil 2: Koordination von Reifung und Antigenpräsentation bei Dendritischen Zellen der Maus

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigte sich mit den Vorgängen während der Reifung von BMDCs in Zusammenhang mit der Antigenpräsentation.

Im Gegensatz zu nicht-professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APCs), bei denen eine frühe Herstellung und Präsentation von CTL-Epitopen wichtig für eine schnelle Viruselimination ist, benötigen DCs Zeit, einen reifen Phänotyp zu entwickeln, um ihre Aufgabe als T-Zell-Aktivatoren erfüllen zu können.

Tatsächlich wiesen die Ergebnisse dieser Arbeit auf eine verzögerte Antigenpräsentation von BMDCs nach Influenza-Infektion im Vergleich zu nicht-professionellen APCs hin. Diese koinzidierte mit dem Auftreten von so genannten DALIS (dendritic cell aggresome-like induced structures). Hierbei handelt es sich um transiente Anhäufungen ubiquitinylierter Proteine (DRiPs) im Zytoplasma, die während der Reifung von DCs und Makrophagen auftreten. Durch ihre Zwischenspeicherung in DALIS wird der Abbau der DRiPs verzögert, daher wurde in dieser Arbeit postuliert, dass es sich bei DALIS um Antigenpeicher handeln könnte, die es den DCs ermöglichen, die Vorgänge der Reifung und Antigenpräsentation zu koordinieren. Hierfür sprach auch die Entdeckung des Influenza Nukleoproteins in DALIS infizierter BMDCs und das zeitliche Zusammenfallen von DALIS-Entwicklung und Expression von kostimulatorischen Molekülen auf der Oberfläche der DCs sowie anderen Reifungsmarkern. Ferner konnte durch Inhibition der DALIS-Entstehung die Antigenerkennung auf BMDCs beschleunigt werden.

Im Vergleich zu Influenza-infizierten BMDCs wiesen mCMV-infizierte Zellen keine DALIS-Bildung auf. Der Vergleich von Influenza und mCMV Infektion war von besonderem Interesse, da Zytomegalieviren (mCMV) die Reifung von DCs und somit ihre Fähigkeit, T-Zellen zu aktivieren, beeinträchtigten. Hier zeigten BMDCs dieselbe Präsentationskinetik wie infizierte Fibroblasten, die ebenfalls nicht zur DALIS-Bildung fähig waren.

Neben der Aufgabe der DALIS sind auch die Mechanismen, die zu ihrer Entstehung führen, bislang ungeklärt. In dieser Arbeit konnte durch den Einsatz von Inhibitoren gezeigt werden, dass die Aktivierung der MAPK-Wege ERK1/2 und p38 ebenso eine wichtige Rolle spielen wie der PI3K/Akt-Weg. Desweiteren scheint die Aktivierung des Translationsfaktors eIF4E für die DALIS-Bildung und IL-6 Produktion von BMDCs von Bedeutung zu sein.

6. Referenzen

1. Linsley,P.S., Clark,E.A. & Ledbetter,J.A. T-cell antigen CD28 mediates adhesion with B cells by interacting with activation antigen B7/BB-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **87**, 5031-5035 (1990).
2. Linsley,P.S. *et al.* Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin 2 mRNA accumulation. *J. Exp. Med.* **173**, 721-730 (1991).
3. Linsley,P.S. & Ledbetter,J.A. The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. *Annu. Rev. Immunol.* **11:191-212.**, 191-212 (1993).
4. Podack,E.R., Hengartner,H. & Lichtenheld,M.G. A central role of perforin in cytolysis? *Annu. Rev. Immunol.* **9:129-57.**, 129-157 (1991).
5. Apasov,S., Redegeld,F. & Sitkovsky,M. Cell-mediated cytotoxicity: contact and secreted factors. *Curr. Opin. Immunol.* **5**, 404-410 (1993).
6. Steinman,R.M. & Cohn,Z.A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J. Exp. Med.* **137**, 1142-1162 (1973).
7. Banchereau,J. & Steinman,R.M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **19;392**, 245-252 (1998).
8. Lanzavecchia,A. & Sallusto,F. Dynamics of T lymphocyte responses: intermediates, effectors, and memory cells. *Science* **290**, 92-97 (2000).
9. Benvenuti,F. *et al.* Requirement of Rac1 and Rac2 expression by mature dendritic cells for T cell priming. *Science* **20;305**, 1150-1153 (2004).
10. Benvenuti,F. *et al.* Dendritic cell maturation controls adhesion, synapse formation, and the duration of the interactions with naive T lymphocytes. *J. Immunol.* **172**, 292-301 (2004).
11. Sallusto,F. & Lanzavecchia,A. Understanding dendritic cell and T-lymphocyte traffic through the analysis of chemokine receptor expression. *Immunol. Rev.* **177:134-40.**, 134-140 (2000).
12. Gunn,M.D. *et al.* A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**, 258-263 (1998).
13. Langenkamp,A., Messi,M., Lanzavecchia,A. & Sallusto,F. Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. *Nat. Immunol.* **1**, 311-316 (2000).
14. Lelouard,H. *et al.* Transient aggregation of ubiquitinated proteins during dendritic cell maturation. *Nature* **417**, 177-182 (2002).

15. Yewdell, J.W., Anton, L.C. & Bennink, J.R. Defective ribosomal products (DRiPs): a major source of antigenic peptides for MHC class I molecules? *J. Immunol.* **157**, 1823-1826 (1996).
16. Yewdell, J.W., Schubert, U. & Bennink, J.R. At the crossroads of cell biology and immunology: DRiPs and other sources of peptide ligands for MHC class I molecules. *J. Cell Sci.* **114**, 845-851 (2001).
17. Yewdell, J. To DRiP or not to DRiP: generating peptide ligands for MHC class I molecules from biosynthesized proteins. *Mol. Immunol.* **39**, 139-146 (2002).
18. Schubert, U. *et al.* Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* **404**, 770-774 (2000).
19. Lelouard, H. *et al.* Dendritic cell aggresome-like induced structures are dedicated areas for ubiquitination and storage of newly synthesized defective proteins. *J. Cell Biol.* **164**, 667-675 (2004).
20. Banchereau, J. *et al.* Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* **18**:767-811., 767-811 (2000).
21. Medema, J.P. *et al.* Expression of the serpin serine protease inhibitor 6 protects dendritic cells from cytotoxic T lymphocyte-induced apoptosis: differential modulation by T helper type 1 and type 2 cells. *J. Exp. Med.* **194**, 657-667 (2001).
22. Re, F. & Strominger, J.L. Heterogeneity of TLR-induced responses in dendritic cells: from innate to adaptive immunity. *Immunobiology* **209**, 191-198 (2004).
23. Akira, S. & Sato, S. Toll-like receptors and their signaling mechanisms. *Scand. J. Infect. Dis.* **35**, 555-562 (2003).
24. Beutler, B., Hoebe, K., Du, X. & Ulevitch, R.J. How we detect microbes and respond to them: the Toll-like receptors and their transducers. *J. Leukoc. Biol.* **74**, 479-485 (2003).
25. Medzhitov, R. *et al.* MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol. Cell* **2**, 253-258 (1998).
26. Muzio, M., Ni, J., Feng, P. & Dixit, V.M. IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. *Science* **278**, 1612-1615 (1997).
27. Kawai, T., Adachi, O., Ogawa, T., Takeda, K. & Akira, S. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity.* **11**, 115-122 (1999).
28. Yamamoto, M. *et al.* Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *J. Immunol.* **169**, 6668-6672 (2002).
29. Medvedev, A.E., Kopydlowski, K.M. & Vogel, S.N. 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.* **164**, 5564-5574 (2000).

30. Decker,T., Stockinger,S., Karaghiosoff,M., Muller,M. & Kovarik,P. IFNs and STATs in innate immunity to microorganisms. *J. Clin. Invest* **109**, 1271-1277 (2002).
31. Doyle,S. *et al.* IRF3 mediates a TLR3/TLR4-specific antiviral gene program. *Immunity*. **17**, 251-263 (2002).
32. Parsell,D.A. & Lindquist,S. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu. Rev. Genet.* **27:437-96.**, 437-496 (1993).
33. Gething,M.J. & Sambrook,J. Protein folding in the cell. *Nature* **355**, 33-45 (1992).
34. Schild,H., Arnold-Schild,D., Lammert,E. & Rammensee,H.G. Stress proteins and immunity mediated by cytotoxic T lymphocytes. *Curr. Opin. Immunol.* **11**, 109-113 (1999).
35. Srivastava,P. Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 185-194 (2002).
36. Bevan,M.J. Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. *J. Exp. Med.* **143**, 1283-1288 (1976).
37. Arnold,D., Faath,S., Rammensee,H. & Schild,H. Cross-priming of minor histocompatibility antigen-specific cytotoxic T cells upon immunization with the heat shock protein gp96. *J. Exp. Med.* **182**, 885-889 (1995).
38. Heath,W.R. & Carbone,F.R. Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **19:47-64.**, 47-64 (2001).
39. Singh-Jasuja,H. *et al.* Cross-presentation of glycoprotein 96-associated antigens on major histocompatibility complex class I molecules requires receptor-mediated endocytosis. *J. Exp. Med.* **191**, 1965-1974 (2000).
40. Castellino,F. *et al.* Receptor-mediated uptake of antigen/heat shock protein complexes results in major histocompatibility complex class I antigen presentation via two distinct processing pathways. *J. Exp. Med.* **191**, 1957-1964 (2000).
41. Gil-Torregrosa,B.C. *et al.* Control of cross-presentation during dendritic cell maturation. *Eur. J. Immunol.* **34**, 398-407 (2004).
42. Singh-Jasuja,H. *et al.* The heat shock protein gp96 induces maturation of dendritic cells and down-regulation of its receptor. *Eur. J. Immunol.* **30**, 2211-2215 (2000).
43. Basu,S., Binder,R.J., Suto,R., Anderson,K.M. & Srivastava,P.K. Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway. *Int. Immunol.* **12**, 1539-1546 (2000).
44. Binder,R.J., Anderson,K.M., Basu,S. & Srivastava,P.K. Cutting edge: heat shock protein gp96 induces maturation and migration of CD11c⁺ cells in vivo. *J. Immunol.* **165**, 6029-6035 (2000).

45. Binder,R.J., Han,D.K. & Srivastava,P.K. CD91: a receptor for heat shock protein gp96. *Nat. Immunol.* **1**, 151-155 (2000).
46. Basu,S., Binder,R.J., Ramalingam,T. & Srivastava,P.K. CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin. *Immunity.* **14**, 303-313 (2001).
47. Delneste,Y. *et al.* Involvement of LOX-1 in dendritic cell-mediated antigen cross-presentation. *Immunity.* **17**, 353-362 (2002).
48. Panjwani,N.N., Popova,L. & Srivastava,P.K. Heat shock proteins gp96 and hsp70 activate the release of nitric oxide by APCs. *J. Immunol.* **168**, 2997-3003 (2002).
49. Vabulas,R.M. *et al.* The endoplasmic reticulum-resident heat shock protein Gp96 activates dendritic cells via the Toll-like receptor 2/4 pathway. *J. Biol. Chem.* **277**, 20847-20853 (2002).
50. Vabulas,R.M. *et al.* HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway. *J. Biol. Chem.* **277**, 15107-15112 (2002).
51. Asea,A. *et al.* Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J. Biol. Chem.* **277**, 15028-15034 (2002).
52. Triantafilou,K., Triantafilou,M. & Dedrick,R.L. A CD14-independent LPS receptor cluster. *Nat. Immunol.* **2**, 338-345 (2001).
53. Schild,H. & Rammensee,H.G. gp96--the immune system's Swiss army knife. *Nat. Immunol.* **1**, 100-101 (2000).
54. Seong,S.Y. & Matzinger,P. Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 469-478 (2004).
55. Singer,A.J. & Clark,R.A. Cutaneous wound healing. *N. Engl. J. Med.* **341**, 738-746 (1999).
56. Leibovich,S.J. & Ross,R. The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. *Am. J. Pathol.* **78**, 71-100 (1975).
57. Cooper,D.M. Wound healing: new understandings. *Nurse Pract. Forum* **10**, 74-86 (1999).
58. Bellingan,G.J., Caldwell,H., Howie,S.E., Dransfield,I. & Haslett,C. In vivo fate of the inflammatory macrophage during the resolution of inflammation: inflammatory macrophages do not die locally, but emigrate to the draining lymph nodes. *J. Immunol.* **157**, 2577-2585 (1996).
59. Efron,J.E., Frankel,H.L., Lazarou,S.A., Wasserkrug,H.L. & Barbul,A. Wound healing and T-lymphocytes. *J. Surg. Res.* **48**, 460-463 (1990).
60. Peterson,J.M., Barbul,A., Breslin,R.J., Wasserkrug,H.L. & Efron,G. Significance of T-lymphocytes in wound healing. *Surgery* **102**, 300-305 (1987).

61. Nwomeh,B.C., Yager,D.R. & Cohen,I.K. Physiology of the chronic wound. *Clin. Plast. Surg.* **25**, 341-356 (1998).
62. Honess,R.W. & Roizman,B. Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis: sequential transition of polypeptide synthesis requires functional viral polypeptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **72**, 1276-1280 (1975).
63. Alcami,A. & Koszinowski,U.H. Viral mechanisms of immune evasion. *Trends Microbiol.* **8**, 410-418 (2000).
64. Kleijnen,M.F. *et al.* A mouse cytomegalovirus glycoprotein, gp34, forms a complex with folded class I MHC molecules in the ER which is not retained but is transported to the cell surface. *EMBO J.* **16**, 685-694 (1997).
65. Kavanagh,D.G., Gold,M.C., Wagner,M., Koszinowski,U.H. & Hill,A.B. The multiple immune-evasion genes of murine cytomegalovirus are not redundant: m4 and m152 inhibit antigen presentation in a complementary and cooperative fashion. *J. Exp. Med.* **194**, 967-978 (2001).
66. Reusch,U. *et al.* A cytomegalovirus glycoprotein re-routes MHC class I complexes to lysosomes for degradation. *EMBO J.* **18**, 1081-1091 (1999).
67. Ziegler,H. *et al.* A mouse cytomegalovirus glycoprotein retains MHC class I complexes in the ERGIC/cis-Golgi compartments. *Immunity.* **6**, 57-66 (1997).
68. Ziegler,H., Muranyi,W., Burgert,H.G., Kremmer,E. & Koszinowski,U.H. The luminal part of the murine cytomegalovirus glycoprotein gp40 catalyzes the retention of MHC class I molecules. *EMBO J.* **19**, 870-881 (2000).
69. Holtappels,R. *et al.* The putative natural killer decoy early gene m04 (gp34) of murine cytomegalovirus encodes an antigenic peptide recognized by protective antiviral CD8 T cells. *J. Virol.* **74**, 1871-1884 (2000).
70. Holtappels,R., Thomas,D. & Reddehase,M.J. Identification of a K(d)-restricted antigenic peptide encoded by murine cytomegalovirus early gene M84. *J. Gen. Virol.* **81**, 3037-3042 (2000).
71. Reddehase,M.J. The immunogenicity of human and murine cytomegaloviruses. *Curr. Opin. Immunol.* **12**, 738 (2000).
72. Holtappels,R. *et al.* Experimental preemptive immunotherapy of murine cytomegalovirus disease with CD8 T-cell lines specific for ppM83 and pM84, the two homologs of human cytomegalovirus tegument protein ppUL83 (pp65). *J. Virol.* **75**, 6584-6600 (2001).
73. Orange,J.S. & Biron,C.A. Characterization of early IL-12, IFN- α , and TNF effects on antiviral state and NK cell responses during murine cytomegalovirus infection. *J. Immunol.* **156**, 4746-4756 (1996).
74. Scalzo,A.A. *et al.* The effect of the Cmv-1 resistance gene, which is linked to the natural killer cell gene complex, is mediated by natural killer cells. *J. Immunol.* **149**, 581-589 (1992).

75. Tay, C.H., Welsh, R.M. & Brutkiewicz, R.R. NK cell response to viral infections in beta 2-microglobulin-deficient mice. *J. Immunol.* **154**, 780-789 (1995).
76. Welsh, R.M., O'Donnell, C.L. & Shultz, L.D. Antiviral activity of NK 1.1+ natural killer cells in C57BL/6 scid mice infected with murine cytomegalovirus. *Nat. Immun.* **13**, 239-245 (1994).
77. Jonjic, S., Pavic, I., Lucin, P., Rukavina, D. & Koszinowski, U.H. Efficacious control of cytomegalovirus infection after long-term depletion of CD8+ T lymphocytes. *J. Virol.* **64**, 5457-5464 (1990).
78. Jonjic, S. *et al.* Antibodies are not essential for the resolution of primary cytomegalovirus infection but limit dissemination of recurrent virus. *J. Exp. Med.* **179**, 1713-1717 (1994).
79. Hengel, H., Lucin, P., Jonjic, S., Ruppert, T. & Koszinowski, U.H. Restoration of cytomegalovirus antigen presentation by gamma interferon combats viral escape. *J. Virol.* **68**, 289-297 (1994).
80. Lucin, P., Pavic, I., Polic, B., Jonjic, S. & Koszinowski, U.H. Gamma interferon-dependent clearance of cytomegalovirus infection in salivary glands. *J. Virol.* **66**, 1977-1984 (1992).
81. Pavic, I. *et al.* Participation of endogenous tumour necrosis factor alpha in host resistance to cytomegalovirus infection. *J. Gen. Virol.* **74**, 2215-2223 (1993).
82. Polic, B. *et al.* Hierarchical and redundant lymphocyte subset control precludes cytomegalovirus replication during latent infection. *J. Exp. Med.* **188**, 1047-1054 (1998).
83. Hof, H., Ulbricht, A. & Stehle, G. Listeriosis--a puzzling disease. *Infection* **20**, 290-292 (1992).
84. Kaufmann, S.H. Immunity to intracellular bacteria. *Annu. Rev. Immunol.* **11**:129-63., 129-163 (1993).
85. Shen, Y., Naujokas, M., Park, M. & Ireton, K. InIB-dependent internalization of Listeria is mediated by the Met receptor tyrosine kinase. *Cell* **103**, 501-510 (2000).
86. Cossart, P. & Bierne, H. The use of host cell machinery in the pathogenesis of Listeria monocytogenes. *Curr. Opin. Immunol.* **13**, 96-103 (2001).
87. Gedde, M.M., Higgins, D.E., Tilney, L.G. & Portnoy, D.A. Role of listeriolysin O in cell-to-cell spread of Listeria monocytogenes. *Infect. Immun.* **68**, 999-1003 (2000).
88. Cossart, P. & Lecuit, M. Interactions of Listeria monocytogenes with mammalian cells during entry and actin-based movement: bacterial factors, cellular ligands and signaling. *EMBO J.* **17**, 3797-3806 (1998).
89. Tilney, L.G., Connelly, P.S. & Portnoy, D.A. Actin filament nucleation by the bacterial pathogen, Listeria monocytogenes. *J. Cell Biol.* **111**, 2979-2988 (1990).

90. Rothe, J. *et al.* Mice lacking the tumour necrosis factor receptor 1 are resistant to TNF-mediated toxicity but highly susceptible to infection by *Listeria monocytogenes*. *Nature* **364**, 798-802 (1993).
91. Unanue, E.R. Inter-relationship among macrophages, natural killer cells and neutrophils in early stages of *Listeria* resistance. *Curr. Opin. Immunol.* **9**, 35-43 (1997).
92. Harty, J.T., Lenz, L.L. & Bevan, M.J. Primary and secondary immune responses to *Listeria monocytogenes*. *Curr. Opin. Immunol.* **8**, 526-530 (1996).
93. Trinchieri, G. Cytokines acting on or secreted by macrophages during intracellular infection (IL-10, IL-12, IFN-gamma). *Curr. Opin. Immunol.* **9**, 17-23 (1997).
94. North, R.J., Dunn, P.L. & Conlan, J.W. Murine listeriosis as a model of antimicrobial defense. *Immunol. Rev.* **158:27-36.**, 27-36 (1997).
95. Harty, J.T. & Bevan, M.J. CD8⁺ T cells specific for a single nonamer epitope of *Listeria monocytogenes* are protective in vivo. *J. Exp. Med.* **175**, 1531-1538 (1992).
96. Harty, J.T. & Pamer, E.G. CD8 T lymphocytes specific for the secreted p60 antigen protect against *Listeria monocytogenes* infection. *J. Immunol.* **154**, 4642-4650 (1995).
97. Darji, A. *et al.* The role of the bacterial membrane protein ActA in immunity and protection against *Listeria monocytogenes*. *J. Immunol.* **161**, 2414-2420 (1998).
98. Hsieh, B. *et al.* In vivo cytokine production in murine listeriosis. Evidence for immunoregulation by gamma delta⁺ T cells. *J. Immunol.* **156**, 232-237 (1996).
99. Mielke, M.E., Peters, C. & Hahn, H. Cytokines in the induction and expression of T-cell-mediated granuloma formation and protection in the murine model of listeriosis. *Immunol. Rev.* **158:79-93.**, 79-93 (1997).
100. Rogers, H.W., Callery, M.P., Deck, B. & Unanue, E.R. *Listeria monocytogenes* induces apoptosis of infected hepatocytes. *J. Immunol.* **156**, 679-684 (1996).
101. Merrick, J.C., Edelson, B.T., Bhardwaj, V., Swanson, P.E. & Unanue, E.R. Lymphocyte apoptosis during early phase of *Listeria* infection in mice. *Am. J. Pathol.* **151**, 785-792 (1997).
102. Guzman, C.A. *et al.* Apoptosis of mouse dendritic cells is triggered by listeriolysin, the major virulence determinant of *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* **20**, 119-126 (1996).
103. Wagner, M., Gutermann, A., Podlech, J., Reddehase, M.J. & Koszinowski, U.H. Major histocompatibility complex class I allele-specific cooperative and competitive interactions between immune evasion proteins of cytomegalovirus. *J. Exp. Med.* **196**, 805-816 (2002).
104. Radsak, M.P. *et al.* The heat shock protein Gp96 binds to human neutrophils and monocytes and stimulates effector functions. *Blood* **101**, 2810-2815 (2003).

105. Anton,L.C. *et al.* Intracellular localization of proteasomal degradation of a viral antigen. *J. Cell Biol.* **146**, 113-124 (1999).
106. Hodges,M., Tissot,C., Howe,K., Grimwade,D. & Freemont,P.S. Structure, organization, and dynamics of promyelocytic leukemia protein nuclear bodies. *Am. J. Hum. Genet.* **63**, 297-304 (1998).
107. Mathys,S. *et al.* Dendritic cells under influence of mouse cytomegalovirus have a physiologic dual role: to initiate and to restrict T cell activation. *J. Infect. Dis.* **187**, 988-999 (2003).
108. Kaisho,T. & Akira,S. Regulation of dendritic cell function through toll-like receptors. *Curr. Mol. Med.* **3**, 759-771 (2003).
109. Akira,S. & Takeda,K. Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 499-511 (2004).
110. Aderem,A. & Ulevitch,R.J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* **406**, 782-787 (2000).
111. Takeda,K., Kaisho,T. & Akira,S. Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol.* **21**,335-376 (2003).
112. Kaisho,T., Takeuchi,O., Kawai,T., Hoshino,K. & Akira,S. Endotoxin-induced maturation of MyD88-deficient dendritic cells. *J. Immunol.* **166**, 5688-5694 (2001).
113. Yamamoto,M. *et al.* Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* **301**, 640-643 (2003).
114. Roux,P.P. & Blenis,J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**, 320-344 (2004).
115. Yang,S.H., Sharrocks,A.D. & Whitmarsh,A.J. Transcriptional regulation by the MAP kinase signaling cascades. *Gene* **320:3-21**, 3-21 (2003).
116. Gingras,A.C., Kennedy,S.G., O'Leary,M.A., Sonenberg,N. & Hay,N. 4E-BP1, a repressor of mRNA translation, is phosphorylated and inactivated by the Akt(PKB) signaling pathway. *Genes Dev.* **12**, 502-513 (1998).
117. Oberringer,M. *et al.* Differential expression of heat shock protein 70 in well healing and chronic human wound tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **214**, 1009-1014 (1995).
118. Lai,Y. *et al.* Induction of the stress response after inflicted and non-inflicted traumatic brain injury in infants and children. *J. Neurotrauma* **21**, 229-237 (2004).
119. Dutcher,S.A., Underwood,B.D., Walker,P.D., Diaz,F.G. & Michael,D.B. Patterns of heat-shock protein 70 biosynthesis following human traumatic brain injury. *J. Neurotrauma* **15**, 411-420 (1998).
120. Edwards,M.J. *et al.* Heat shock proteins in cultured human keratinocytes and fibroblasts. *J. Invest Dermatol.* **96**, 392-396 (1991).

121. Hashiguchi,N. *et al.* Enhanced expression of heat shock proteins in leukocytes from trauma patients. *J. Trauma* **50**, 102-107 (2001).
122. Liu,Y.J. Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. *Cell* **106**, 259-262 (2001).
123. Jakobsen,M.A., Moller,B.K. & Lillevang,S.T. Serum concentration of the growth medium markedly affects monocyte-derived dendritic cells' phenotype, cytokine production profile and capacities to stimulate in MLR. *Scand. J. Immunol.* **60**, 584-591 (2004).
124. Duperrier,K. *et al.* Distinct subsets of dendritic cells resembling dermal DCs can be generated in vitro from monocytes, in the presence of different serum supplements. *J. Immunol. Methods* **238**, 119-131 (2000).
125. Pietschmann,P., Stockl,J., Draxler,S., Majdic,O. & Knapp,W. Functional and phenotypic characteristics of dendritic cells generated in human plasma supplemented medium. *Scand. J. Immunol.* **51**, 377-383 (2000).
126. Beckman,E.M. *et al.* Recognition of a lipid antigen by CD1-restricted alpha beta+ T cells. *Nature* **372**, 691-694 (1994).
127. Chang,C.C., Wright,A. & Punnonen,J. Monocyte-derived CD1a+ and CD1a- dendritic cell subsets differ in their cytokine production profiles, susceptibilities to transfection, and capacities to direct Th cell differentiation. *J. Immunol.* **165**, 3584-3591 (2000).
128. Rennekampff,H.O. *et al.* Bioactive interleukin-8 is expressed in wounds and enhances wound healing. *J. Surg. Res.* **93**, 41-54 (2000).
129. Bhattacharyya,S. *et al.* Immunoregulation of dendritic cells by IL-10 is mediated through suppression of the PI3K/Akt pathway and of IkappaB kinase activity. *Blood* **104**, 1100-1109 (2004).
130. Canadien,V. *et al.* Cutting edge: Microbial products elicit formation of dendritic cell aggresome-like induced structures in macrophages. *J. Immunol.* **174**, 2471-2475 (2005).
131. Cella,M. *et al.* Maturation, activation, and protection of dendritic cells induced by double-stranded RNA. *J. Exp. Med.* **189**, 821-829 (1999).
132. Crowe,S.R. *et al.* Differential antigen presentation regulates the changing patterns of CD8+ T cell immunodominance in primary and secondary influenza virus infections. *J. Exp. Med.* **198**, 399-410 (2003).
133. Albert,M.L., Sauter,B. & Bhardwaj,N. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* **392**, 86-89 (1998).
134. Kurts,C., Kosaka,H., Carbone,F.R., Miller,J.F. & Heath,W.R. Class I-restricted cross-presentation of exogenous self-antigens leads to deletion of autoreactive CD8(+) T cells. *J. Exp. Med.* **186**, 239-245 (1997).

135. Shen,Z., Reznikoff,G., Dranoff,G. & Rock,K.L. Cloned dendritic cells can present exogenous antigens on both MHC class I and class II molecules. *J. Immunol.* **158**, 2723-2730 (1997).
136. Delamarre,L., Holcombe,H. & Mellman,I. Presentation of exogenous antigens on major histocompatibility complex (MHC) class I and MHC class II molecules is differentially regulated during dendritic cell maturation. *J. Exp. Med.* **198**, 111-122 (2003).
137. DeFillipo,A.M., Dai,J. & Li,Z. Heat shock-induced dendritic cell maturation is coupled by transient aggregation of ubiquitinated proteins independently of heat shock factor 1 or inducible heat shock protein 70. *Mol. Immunol.* **41**, 785-792 (2004).
138. Legge,K.L. & Braciale,T.J. Accelerated migration of respiratory dendritic cells to the regional lymph nodes is limited to the early phase of pulmonary infection. *Immunity.* **18**, 265-277 (2003).
139. Camporeale,A. *et al.* Critical impact of the kinetics of dendritic cells activation on the in vivo induction of tumor-specific T lymphocytes. *Cancer Res.* **63**, 3688-3694 (2003).
140. Zheng,H., Benjamin,I.J., Basu,S. & Li,Z. Heat shock factor 1-independent activation of dendritic cells by heat shock: implication for the uncoupling of heat-mediated immunoregulation from the heat shock response. *Eur. J. Immunol.* **33**, 1754-1762 (2003).
141. Basu,S. & Srivastava,P.K. Fever-like temperature induces maturation of dendritic cells through induction of hsp90. *Int. Immunol.* **15**, 1053-1061 (2003).
142. Parra,J.L., Buxade,M. & Proud,C.G. Features of the catalytic domains and C-termini of the MAP kinase signal-integrating kinases Mnk1 and Mnk2 determine their differing activities and regulatory properties. *J. Biol. Chem.* ., (2005).
143. Ueda,T., Watanabe-Fukunaga,R., Fukuyama,H., Nagata,S. & Fukunaga,R. Mnk2 and Mnk1 are essential for constitutive and inducible phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E but not for cell growth or development. *Mol. Cell Biol.* **24**, 6539-6549 (2004).

7. Quellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1.3. verändert nach <http://rheumb.bham.ac.uk/teaching/immunology/tutorials/mhc%20polymorphism.jpg>
- Abb. 1.7. Witte M B, Barbul A. General principles of wound healing. *Surg Clin N Am* 1997; 77: 509 – 528.
- Abb. 1.8. verändert nach <http://www.icbm.de/pmbio/vl/allgbio/vl-simon.pdf>
- Abb. 1.9. <http://www.m-ww.de/krankheiten/infektionskrankheiten/grippe-influenza.html>
<http://www.public-health.uiowa.edu/ceid/Influenza.html>
- Abb. 1.10. <http://textbookofbacteriology.net/Listeria.html>

Verwendete Literatur aus dem Internet

- Tabelle Immunsystem: http://www.wissen.swr.de/sf/begleit/bg0003/bg_tm01d.htm
- Bakterienzellwände: <http://www2.uni-jena.de/biologie/mikrobio/lehre/winter/g1/kapitel4.html>
- Wundheilung: <http://www.m-ww.de/themenspezial/wundversorgung/wundheilung.html>
<http://www.bioglan.de/wms/bioglan/hautratgeber/wundheilung>
<http://www.medizinfo.de/wundmanagement/wundheilung.htm>
- Virulenzfaktoren: http://www.infektionsbiologie.ch/seiten/lernwege/lernweg%20infektionsbiologie%20bakterien/infbakterien_kap2_01.htm

Verwendete Literatur

- Abb. Zytomegalievirus: **Roizman, B. (1996).** *Herpesviridae*. In *Fields Virology*, pp. 2221-2230. Edited by B. N. Fields, D. M. Knipe & P. M. Howley. Philadelphia: Lippincott–Raven
- Janeway, C.A. Jr., Travers, P., Walport, M. and Shlomchick, M.. Immunobiology, Fifth Edition, Garland Publishing, New York, 2001.

8. Publikationsverzeichnis

Vabulas RM, Braedel S, Hilf N, Singh-Jasuja H, Herter S, Ahmad-Nejad P, Kirschning CJ, Da Costa C, Rammensee HG, Wagner H, Schild H. 2002. The endoplasmic reticulum-resident heat shock protein Gp96 activates dendritic cells via the Toll-like receptor 2/4 pathway. *J. Biol. Chem.* 277:20847-53

Herter S, Osterloh P, Hilf N, Rechtsteiner G, Hohfeld J, Rammensee HG, Schild H. 2005. Dendritic cell aggresome-like-induced structure formation and delayed antigen presentation coincide in influenza virus-infected dendritic cells. *J. Immunol.* 175:891-898

9. Akademische Lehrer

in alphabetischer Reihenfolge

Eberhard-Karls Universität Tübingen

PD Dr. M. Albinus, Prof. Dr. U. Breyer-Pfaff, Prof. Dr. V. Hemleben, Prof. Dr. G. Jürgens, Prof. Dr. B. Mühlbauer, Prof. Dr. H. Ninnemann, Prof. Dr. H. Oßwald, Dr. R. Prändl, Prof. Dr. U. Quast, Prof. Dr. H.G. Rammensee, Prof. Dr. R. Reuter, Prof. Dr. H. Schild, Prof. Dr. W.J. Schmidt, Dr. T. Schmülling, Prof. Dr. F. Schöffl, Prof. Dr. H. Schulz-Key, Prof. Dr. U. Seitz, PD Dr. S. Stevanović, Prof. Dr. J. Werringloer, PD Dr. U. Zentgraf

Rheinische Friedrich-Wilhelms Universität Bonn

Prof. Dr. D. Bartels, Prof. Dr. W. Barthlott, Dr. E. Bast, Prof. Dr. H. Bleckmann, Dr. M. Boecker, Prof. Dr. H. Böhme, Prof. Dr. E. Breitmeier, Prof. Dr. F. von Busch, Dr. H.J. Bünger, Dr. B. Buß, Dr. P.J. Eitner, Prof. Dr. J. Ernst, PD Dr. Fischer, Prof. Dr. W. Hachtel, Prof. Dr. H.G. Heinzl, Prof. Dr. F. Hinterberger, PD Dr. D. Hodick, Prof. Dr. M. Höfer, Prof. Dr. J.H. Klemme, Prof. Dr. W. Mader, Prof. Dr. D. Menzel, Dr. D. Mertler, Prof. Dr. E. Niecke, Prof. Dr. S. Perry, Prof. Dr. B. Ross, Prof. Dr. K.P. Sauer, Prof. Dr. U. Schmidt, Dr. D. Sedlmeier, PD Dr. O. Traub, Prof. Dr. Dr. Dr. H.G. Trüper, Prof. Dr. K. Willecke

10. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei den vielen Menschen innerhalb und außerhalb des Labors bedanken, ohne die diese Arbeit nicht hätte gelingen können. Besonders die tolle Arbeitsatmosphäre im Labor hat diese Zeit unvergesslich gemacht. Vielen Dank an alle, die dazu beigetragen haben!

Im Einzelnen sei gedankt:

Prof. Hans-Georg Rammensee für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe zu promovieren, und seine Bereitschaft, auch auf die Entfernung diese Arbeit zu betreuen.

Prof. Hansjörg Schild für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die vielen guten Ideen und konstruktiven Vorschläge für diese Arbeit, seine Hilfe beim Schreiben von Papern und seine stetige Diskussionsbereitschaft.

Unserer Tübinger TA Beate Pömmerl für ihre stetige Hilfsbereitschaft, gute Laune und Freundschaft sowie Claudia Falkenburger für die Herstellung von Medien und das Bereitstellen von Zellen. Den Mainzer TAs Andrea Drescher und Anne Meinel danke ich für die wöchentliche Präparation von BMDCs.

Auch der Tübinger Spülfrau Franziska Löwenstein und den Mainzer Spülfrauen Barbara Krentscher und Ulla Burkart sei für ihre unverzichtbare Arbeit im Hintergrund gedankt.

Nicht zu vergessen auch unsere Sekretärinnen Lynne Yakes und Birgit Caspar für die Unterstützung mit dem „Papierkram“ und der Verwaltung.

Markus Radsak für sein Interesse an dieser Arbeit und die interessanten Diskussionen.

Meinen Arbeitskollegen Mark Schatz und Stefan Tenzer, ohne die die Zeit im Labor nicht so lustig und abwechslungsreich geworden wäre. Für anregende Gespräche, gute Ideen, Spieleabende und Freundschaft. ...und ihr seid doch die Laborschlümpfe!!!

Meinen Kollegen Philipp Osterloh, Norbert Hilf und Gerd Rechtsteiner für experimentelle Unterstützungen und ihr Engagement im Labor. Außerdem danke ich Melanie Faßbender für häufiges Füttern der BMDCs an Wochenenden!

Ferner möchte ich meinen Kooperationspartnern Prof. M. Reddehase, Dr. Rafaela Holtappels-Geginat und Doris Thomas aus dem Institut für Virologie der Universität Mainz für ihre Hilfe im Zytomegalievirus-Projekt danken.

Mein Dank gilt außerdem Dr. Jon Yewdell, Oliver Planz und Dr. Jürgen Höhfeld für die Bereitstellung von Antikörpern, Dr. Stefan Pleschka für die Herstellung des Influenza Viruses, Dr. Michael Neuenhahn für die Listerien, sowie Dr. Corinna Wicke, Dr. Stefan Beckert, Dr. Jürgen Müller und Dr. Dürr für ihre Unterstützung beim Sammeln von Wundflüssigkeiten. Ferner möchte ich Dr. H. Gram (Novartis) für die Bereitstellung des Inhibitors CGP57380 bedanken.

Außerhalb der Wissenschaft möchte ich mich ganz besonders bei meiner Familie bedanken, die mich stets unterstützt und ermutigt hat und immer für mich da war, sowie bei meinem Freund Matthias Stöckle, der mir über Frustrationen und Fehlschläge im Labor hinweg half und mich daran erinnerte, dass es auch noch andere Dinge im Leben gibt als die Forschung.

11. Lebenslauf

Name	Herter
Vorname	Sylvia
Geburtsdatum	03.04.1978
Geburtsort	Stuttgart
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig
Private Adresse	Grabenstraße 54, 55124 Mainz Tel.: 06131/9459570
E-Mail	Sylvia.Herter@web.de

Schulbildung

1984-1988	Grundschule Uferstraße, Leichlingen
1988-1996	Landrat-Lucas-Gymnasium, Leverkusen
31.01.1994	Versetzung von Klasse 10.1 in Jahrgangsstufe 11.2
1996	Abitur, Landrat-Lucas-Gymnasium; Note: 1,1

Studium

1996 – 02/1999	Studium der Biologie an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn Vordiplom; Durchschnittsnote: 1,7
02/1999 – 11/2001	Fortsetzung des Studiums der Biologie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen Diplomprüfungen in den Fächern Genetik, Immunologie, Pharmakologie; Durchschnittsnote: 1,0
02/2001 – 10/2001	Diplomarbeit im Institut für Zellbiologie der Universität Tübingen, Abt. Immunologie (Prof. Hans-Georg Rammensee)
10/2001	Diplomabschluß
12/2001	Beginn der Promotion im Fach Biologie im Institut für Zellbiologie, Abt. Immunologie (Prof. Hans-Georg Rammensee)
10/2003	Umzug mit der Arbeitsgruppe Prof. H. Schild von Tübingen nach Mainz; Einrichtung des Instituts für Immunologie an der Johannes-Gutenberg Universität Mainz; Fortsetzung der Promotion