

Analyse der Auswirkungen einer Infektion von
Dendritischen Zellen mit dem murinen Friend
Retrovirus

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.

des Fachbereichs
Biologie und Geographie
an der
Universität-Duisburg-Essen

vorgelegt von:

Frank Krux

aus Detmold

April 2007

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Virologie der Universität-Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Dittmer

2. Gutachter: Prof. Dr. Küppers

3. Gutachter:

Vorsitzender des Prüfungsausschusses:

Tag der mündlichen Prüfung: 19.09.2007

Für meine Eltern, Tanja, Carla, und Thea

Doch Forschung strebt und ringt, ermüdend nie,
nach dem Gesetz, dem Grund, Warum und Wie

Johann Wolfgang von Goethe

Inhaltsverzeichnis I

1.	Einleitung	1
1.1.	Die Entdeckung der Retroviren	1
1.2.	Weltweite Verbreitung von HIV	2
1.3.	Tiermodelle für Retroviren	2
1.4.	Virologische Grundlagen von Retroviren	3
1.4.1.	Struktur von Retroviren	3
1.4.2.	Replikationszyklus von Retroviren	6
1.4.3.	Klassifizierung Muriner Leukämie Viren	6
1.5.	Pathogenese des Friend Virus Komplex (FV)	7
1.6.	Die Immunantwort gegen ein Pathogen	8
1.7.	Immunität gegen eine FV-Infektion	9
1.8.	Krankheitsverläufe verschiedener Mausstämmen nach FV-Infektion	11
1.9.	Immunbiologie der Dendritischen Zellen (DCs)	14
1.9.1.	Entstehung von DCs und Charakterisierung der einzelnen Subtypen	16
1.9.2.	Dendritische Zellen als Mediatoren der Immunantwort	18
1.9.3.	Plasmazytoide Dendritischen Zellen	23
1.9.4.	Regulatorische T-Zellen und Dendritischen Zellen	25
1.10.	Die Rolle der DCs bei viralen Infektionen	27
1.11.	Fragestellung und Zielsetzung	29
2.	Material	30
2.1.	Geräte	30
2.2.	Verbrauchsmaterial	31
2.3.	Versuchstiere	32
2.3.1.	Wildtype Mäuse	32
2.3.2.	Transgene Mäuse	32
2.4.	Chemikalien und Medien	33
2.5.	Wachstumsfaktoren	33
2.6.	Antibiotika	34

2.7.	Häufig verwandte Puffer und Medien	34
2.8.	Antikörper für die Durchflusszytometrie	36
2.9.	F-MuLV spezifische Peptid (T-Zell-Epitop)	38
2.10.	Kommerzielle Standardtests	38
2.11.	Viren und Zelllinien	39
2.12.	Oligonukleotid-Primer	39
2.13.	CpG ODN Sequenzen	40
3.	Methode	41
3.1.	Versuchstiere	41
3.1.1.	Infektion	41
3.1.2.	Betäubung der Mäuse mit Isofluran®	41
3.1.3.	Palpieren von Milzgrößen	41
3.1.4.	Organentnahmen	41
3.2.	<i>In vivo</i> Herstellung eines Friend Virus Stocks	41
3.3.	Herstellung eines Friend Murine Leukemia Virus-Stocks <i>in vitro</i>	42
3.4.	Zellzahlbestimmung	42
3.5.	Zellkultur	42
3.5.1.	Kultivierung von Zellen	42
3.5.2.	Einfrieren und Auftauen von Zellen	43
3.5.3.	Generierung und Kultur von murinen myeloiden Dendritischen Zellen (DCs)	43
3.5.4.	Generierung und Kultur von murinen plasmazytoiden DCs (pDCs)	44
3.5.5.	Gewinnung von infizierten DCs	44
3.5.6.	Stimulation von infizierten und uninfizierten DCs	45
3.6.	Das MACS-System zum Sortieren und Isolieren von Zellen	45
3.7.	Isolierung von Dendritischen Zellen aus der Milz	45
3.8.	Durchflusszytometrie	46
3.8.1.	Färbung von Oberflächenmarker (CD)	46
3.8.2.	Bestimmung der Prozentzahl von FV-infizierten Dendritischen Zellen	46
3.8.3.	Vitalitäts-Nachweis der uninfizierten und infizierten DCs	47

3.8.4.	Endozytose von DQ™ Ovalbumin	48
3.9.	Zytokinnachweis mittels ELISA	48
3.9.1.	IL-12 und IL-10 Produktion von DCs	48
3.9.2.	Nachweis der Produktion von GM-CSF und IL-4 von Zelllinien	48
3.10.	Transmissionselektronenmikroskopie	49
3.10.1.	Probenvorbereitung (Fixierung)	49
3.11.	Nachweis von infektiösen DCs mit Hilfe des Infectious Center Assay	49
3.12.	{³H} Tymidin-Proliferationsassay	50
3.13.	CFSE-Proliferationsassay	51
3.14.	Stimulation von virus-spezifischen CD8⁺ T-Zellen mit infizierten und uninfizierten DCs	52
3.15.	3-D-Kollagen-Assay	52
3.15.1.	Herstellung des 3-D-Kollagengels	52
3.15.2.	Herstellung der Versuchskammer	53
3.16.	Zeitraffer Videomikroskopie	53
3.16.1.	Identifizierung der Zellkontakte	54
3.16.2.	Analyse der T-Zell Aktivierung nach dem Gelversuch	55
3.17.	Arbeiten mit RNA	56
3.17.1.	Isolierung von Gesamt-RNA	56
3.17.2.	Bestimmung der mRNA für TLR-3,-4, und -9 aus DCs mittels Echtzeit-PCR (Light Cycler/Roche)	56
3.17.3.	One Step PCR	57
3.17.4.	Two Step PCR für Friend Virus	58
3.18.	Herstellung der Standards	59
3.19.	Statistische Analyse	59
4.	Ergebnisse	60
4.1.	Generierung und Charakterisierung von Dendritischen Zellen (DCs) aus murinen Knochenmark	60
4.2.	Reinheitskontrolle von DC-Kulturen im Durchflusszytometer	61
4.3.	Expression von Oberflächenmolekülen auf unreifen Dendritischen Zellen	62

4.4.	Oberflächenmarkerexpression von reifen DCs	63
4.5.	Generierung und Bestimmung von FV-infizierten DCs	65
4.5.1.	Nachweis von FV-infizierten DCs mittels Antikörper 34	65
4.5.2.	Infektionsverlauf von FV-infizierten DCs in Kultur	66
4.5.3.	Infektionsraten von DCs bei unterschiedlichen Mausstämmen	67
4.5.4.	Elektronenmikroskopischer Nachweis von Virus-Partikel in FV-infizierten DCs	68
4.5.5.	Infections Center Assay (IC) zum Nachweis von FV-infizierten DCs	69
4.5.6.	RT-PCR zum quantitativen Nachweis der viraler RNA in infizierten DCs	70
4.5.7.	Transfer von FV durch infizierte DCs <i>in vivo</i>	71
4.5.8.	FV-Infektion von DCs <i>in vivo</i>	73
4.6.	FV-Infektion von plasmazytoiden DCs	74
4.6.1.	Keine FV-Infektion von pDCs <i>in vivo</i>	74
4.6.2.	Infektion von pDCs mit FV <i>in vitro</i>	75
4.7.	Phänotyp von FV-infizierten myeloiden DCs	76
4.7.1.	FV verändert die Expression von Oberflächenmolekülen auf DCs	76
4.7.2.	Stimulation von FV-infizierten DCs mit Poly(I:C) und INF α	78
4.7.3.	Endozytose-Aktivität FV-infizierter DCs	80
4.7.4.	IL-12 Produktion von uninfizierten und FV-infizierten DCs	82
4.7.5.	IL-10-Produktion von uninfizierten und FV-infizierten DCs	83
4.7.6.	Vergleich der Apoptose von uninfizierten und infizierten DCs nach siebentägiger Kultur	84
4.7.7.	Die FV-Infektion von DCs verändert die Interaktion von DCs und naiven CD4 ⁺ T-Zellen	85
4.7.8.	Expression von Aktivierungsmarkern auf CD4 ⁺ T-Zellen nach Stimulation mit Antigen-beladenen uninfizierten und FV infizierten DCs	87
4.7.9.	Einfluss von FV-infizierten DCs auf die Antigen-spezifische CD4 ⁺ T-Zell-Proliferation	88
4.7.10.	Infizierte DCs induzieren regulatorische T-Zellen	89
4.8.	Stimulation von FV-infizierten DCs zur Therapie der FV-induzierten Immunsuppression	91

4.8.1.	Quantitativer Nachweis von TLR-3,-4 und -9 auf uninfizierten und infizierten DCs	91
4.8.2.	CpG steigert die Expression von kostimulatorischen Molekülen auf FV-infizierten DCs	92
4.9.	Interaktion von FV-infizierten DCs und CD8⁺ T-Zellen	94
4.9.1.	Einfluss von FV-infizierten DCs auf die FV-spezifischen CD8 ⁺ T-Zell-Proliferation	94
4.9.2.	IFN γ Produktion von antigen-spezifischen CD8 ⁺ T-Zellen nach Stimulation mit uninfizierten und FV-infizierten DCs	96
5.	Diskussion	98
5.1.	Übersicht über die experimentellen Befunde	98
5.2.	FV-Infektion von myeloiden und plasmazytoiden DCs	98
5.3.	Einfluss der FV-Infektion auf die Funktion von DCs	100
5.4.	Die Rolle Dendritischer Zellen in der FV-induzierten Immunsuppression	105
5.5.	Therapeutische Relevanz der Aktivierung von FV-infizierten DCs durch CpG	109
6.	Zusammenfassung/Summary	111
7.	Literaturverzeichnis	114
8.	Anhang	139
8.1.	Abkürzungsverzeichnis	139
8.2.	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	142
8.3.	Lebenslauf	145
8.4.	Veröffentlichung	146
8.5.	Danksagung	147
8.6.	Erklärung	148

1. Einleitung

1.1. Die Entdeckung der Retroviren

Retroviren wurden Anfang des 20. Jahrhunderts im Zuge der Erforschung von Tumorerkrankungen bei Hühnern entdeckt. Rous (1911) fand heraus, dass sich Tumorerkrankungen bei Verwendung zellfreier Extrakte aus Geflügelsarkomen die auf gesunde Hühner übertragen lässt. Im Jahr 1911 wurde dann von Rous das erste onkogene Retrovirus, das „Rous sarcoma virus“ (RSV) identifiziert. In den darauf folgenden Jahren wurde eine Vielzahl von Retroviren entdeckt, darunter z.B. das „Simian foemy virus“ (SFV) (ENDERS & PEEBLES, 1954), das Friend murine leukemia virus“ (F-MuLV) (FRIEND, 1957) und das „Feline leukemia virus“ (FeLV) (JARRET et al., 1964).

Als erstes mit einer Erkrankung assoziiertes Retrovirus des Menschen wurde 1980 das „Human T-cell leukemia virus-1 (HTLV-1) isoliert (GALLO, 1986). Etwa 2% der mit HTLV-1 infizierten Menschen entwickeln eine adulte T-Zell-Leukämie. Im Jahr 1983 wurde am Pasteur Institut im Paris ein bisher unbekanntes Retrovirus entdeckt (BARRE-SINOUSSE et al., 1983), welches 1984 von BRUN-VEZINET et al., mit der im Jahr 1981 beschriebenen „acquired immunodeficiency syndrom“ (AIDS) Erkrankung in Verbindung gebracht wurde. Bei einer AIDS-Erkrankung weisen die betroffenen Patienten einen schlechten Allgemeinzustand und verschiedene opportunistische Infektionen auf. Das Isolat von BARRE-SINOUSSE et al. (1983), sowie Isolate von POPVIC et al. (1984) und LEVY et al. (1984) wurden später unter der Bezeichnung „Human immunodeficiency virus typ 1“ (HIV-1) zusammengefasst.

1.2. Weltweite Verbreitung von HIV

Seit den frühen achtziger Jahren haben sich nach Angaben des AIDS Programms der Vereinten Nationen (UNAIDS) weltweit schätzungsweise 40-50 Millionen Menschen mit dem Humanen Immundefizienzvirus (HIV) infiziert. An AIDS sind bis Ende 2005 ungefähr 23 Millionen Menschen verstorben, allein im Jahr 2005 belief sich die Zahl der an AIDS Verstorbenen auf 3,1 Millionen Menschen, zur Zeit sind etwa 38 Millionen Menschen infiziert und die Zahl der Neuinfektionen mit HIV betrug 2005 4,9 Millionen Menschen. Das Humane Immundefizienzvirus ist in jedem Land der Welt verbreitet, wobei 95% aller infizierten in den Entwicklungsländern leben. (Quelle: UNAIDS 2006 Report on the global AIDS epidemic, URL http://www.unaids.org/en/HIV_data/2006GlobalReport/default.asp).

Als 1983 HIV zum ersten Mal beschrieben wurde, begannen sofort die ersten Vakzinestudien zur Bekämpfung von HIV. Dennoch vermittelt keine der bis heute entwickelten Prototyp-Vakzinen einen Schutz vor der HIV-Infektion. Die HAART-Therapie („high active antiretrovirale therapy“), welche zurzeit die einzige wirksame antiretrovirale Therapie dargestellt, ist außerdem nur einem geringen Teil der Weltbevölkerung (ca. 5% der HIV-Infizierten) zugänglich. Bei dieser Therapie handelt es sich um eine Kombinationstherapie, die aus mindestens drei verschiedenen Präparaten besteht. Nachteile dieser Therapie sind die hohen Kosten, die große Belastung der Patienten aufgrund der Nebenwirkungen der Präparate und die trotz Kombinationstherapie auftretende Resistenzbildung von HIV.

1.3. Tiermodelle für Retroviren

Ein Problem, welches bei der Erforschung von HIV-1 auftaucht, ist die begrenzte Anzahl an möglichen Tiermodellen. Nur Schimpansen lassen sich reproduzierbar mit HIV-1 infizieren. Jedoch replizieren die meisten HIV-1 Virusisolate in Schimpansen sehr schlecht und die Tiere entwickeln innerhalb einer Dekade nach Infektion keine AIDS-ähnliche Erkrankung. Hinzu kommt, dass ethische und finanzielle Gründe gegen Experimente mit Schimpansen sprechen. Viele Studien zur Untersuchung der Immunantwort gegen das Immundefizienzvirus wurden daher in Rhesusmakaken mit dem verwandten „Simian Immunodeficiency Virus“ (SIV) durchgeführt. Die Probleme dieses Tiermodells sind die limitierte Anzahl an Affen, ihr heterogener genetischer Hintergrund, das geringe Wissen über die molekulare Immunologie von Affen und die geringe Möglichkeit, deren Immunsystem zu manipulieren. Daher sind Erkenntnisse über fundamentale Grundlagen der Retrovirusimmunologie im Mausmodell einfacher zu erlangen. Ein Vorteil des Mausmodells ist der genetisch definierte immunologische Hintergrund der Tiere, wobei kongene, transgene und knockout Tiere von besonderer Bedeutung sind.

Weil Mäuse nicht mit HIV oder SIV infizierbar sind, muss ein anderes Retrovirus in der Forschung verwendet werden. Es gibt eine große Anzahl von onkogenen Retroviren in der Maus, jedoch induzieren sehr viele dieser Retroviren nur bei neugeborenen Mäusen eine Erkrankung, während sie bei erwachsenen Tieren apathogen sind. Das Friend Virus (FV) ist ein Retrovirus-Komplex, welches in erwachsenen Mäusen eine lethale Erkrankung (Erythroleukämie) verursacht. Die genetischen und immunologischen Merkmale von FV sind intensiv in den letzten

zwanzig Jahren untersucht worden (HASENKRUG & CHESEBRO, 1997). Aufgrund der unterschiedlichen Pathogenese von FV im Gegensatz zu HIV oder SIV im Menschen oder Affen ist die FV-Infektion als Modell für pathologische Aspekte nicht geeignet. In der akuten Phase einer FV- Infektion bzw. HIV- oder SIV-Infektion sind jedoch große Ähnlichkeiten in der Auseinandersetzung des Immunsystems mit dem jeweiligen Virus zu beobachten (DITTMER & HASENKRUG, 2001). Daher lassen sich die immunologischen Merkmale einer retroviralen Infektion gut am FV-Modell untersuchen. Das Friend Virus Mausmodell wurde in dieser Arbeit als Grundlagenmodell verwendet, um die Interaktion von Dendritischen Zellen mit dem FV in der akuten Phase der Infektion zu untersuchen.

1.4. Virologische Grundlagen von Retroviren

1.4.1. Struktur von Retroviren

Die Familie der *Retroviridae* ist eine große und divergente Familie von umhüllten RNA-Viren, die einen Durchmesser von 80-100nm haben. Charakteristisches Merkmal aller Retroviren ist der Besitz des Enzyms Reverse Transkriptase. Das Genom dieser Viren besteht aus einer linearen, einzelsträngigen, nicht segmentierten RNA positiver Polarität mit einer Größe von 7-12kb. Zwei positive einzelsträngige RNA-Moleküle bilden zusammen mit dem Nukleokapsidprotein und dem Reverse-Transkriptase-Molekül einen Ribonukleoproteinkomplex (*Core*), der von einer Matrix und einer Hülle (*Envelope*) umgeben ist.

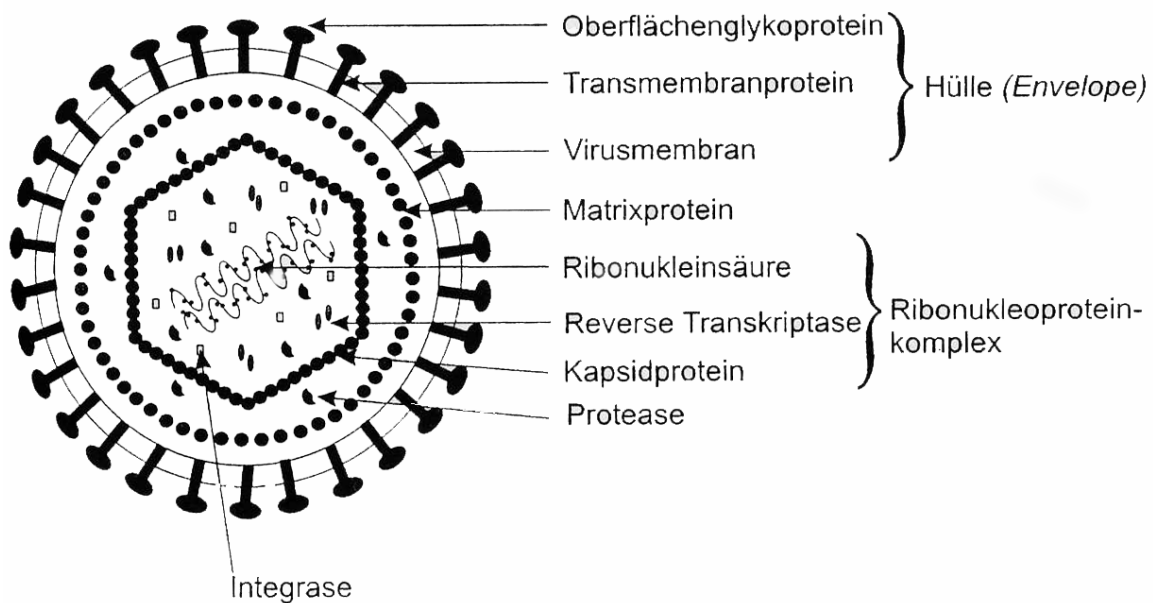


Abbildung 1: Aufbau von Typ-C Retroviren bei Säugetieren am Beispiel von F-MuLV (MODROW & FALKE, 1998)

Alle Retroviren haben folgende Hauptgene gemeinsam:

- ***gag*-Gen:** Synthetisiert interne Strukturproteine (Matrix, Kapsid, Nukleoproteinstruktur)
- ***pol*-Gen:** Enthält die Informationen für die Enzyme Reverse-Transkriptase, Protease und Integrase.
- ***env*-Gen:** Synthetisiert die Oberflächen- und Transmembran-Komponenten des viralen Hüllproteins.

Außerdem besitzen alle Retroviren eine kleine Domäne, das *pro*-Gen, welches die Virusprotease synthetisiert. Die Familie der *Retroviridae* lässt sich in zwei Gruppen einteilen. Die einfachen und die komplexen Retroviren.

Einfache Retroviren tragen nur die oben aufgeführten elementaren Gene, während komplexe Retroviren (z.B. HIV) zusätzlich noch eine Reihe von regulatorischen nicht-viralen Strukturproteinen besitzen.

A: MuLV

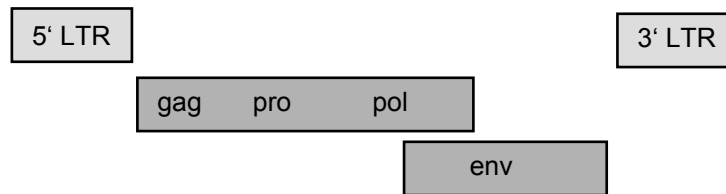


Abbildung 2: Aufbau von einfachen Retroviren am Beispiel von MuLV

Retroviren sind vor allem bei Wirbeltieren zu finden, wo sie für verschiedene Erkrankungen verantwortlich sind, dazu gehören Tumorerkrankungen (z.B. HTLV-1), Immundefizienz (z.B. HIV) und neurologische Defekte bis hin zu inapparenten Infektionsverläufen. Die Familie der *Retroviridae* lässt sich in 7 Gattungen einteilen:

Tabelle 1: Taxonomie der *Retroviridae* (MODROW & FALK, 1998)

Unterfamilie	Gattung	Beispiel	Genom
Onkoviren	Alpharetrovirus	ALV (<i>Avian leukosis virus</i>)	Simple
	Betaretrovirus	MMTV (<i>Mouse mammary tumor virus</i>)	Simpel
	Gammaretrovirus	MuLV (<i>Murine leucemia virus</i>)	Simpel
	Deltaretrovirus	HTLV-I (<i>Humane T-cell leukemia virus</i>)	Komplex
	Epsilonretrovirus	WDSV (<i>Walleye dermal sarcoma virus</i>)	Simpel
Lentiviren	Lentivirus	HIV-1 (<i>Humane immunodeficiency virus</i>)	komplex
Spumaviren	Spumavirus	Human-, Bovine-, Feline- Spumaviren	komplex

Außerdem muss zwischen **exogenen** und **endogenen** Retroviren unterschieden werden. Die **exogenen** Retroviren besitzen alle Informationen, die für einen kompletten Infektionszyklus mit anschließender Partikelfreisetzung notwendig sind auf ihrem Genom. So kann das Virus „aktiv“ verbreitet werden. Im Gegensatz dazu sind die **endogenen** Retroviren in das Wirtsgenom integriert und können aufgrund von Gendefekten nur noch vertikal übertragen werden.

Bei Retroviren kann es zu Defekten im Genom kommen, die zum Verlust des produktiven Infektionszyklus führen können. Helferviren können diese Defekte

komplementieren, so dass das defekte Retrovirus mit Hilfe des Helfervirus einen kompletten Infektionszyklus durchlaufen kann.

1.4.2. Replikationszyklus von Retroviren

Die Replikation von murinen Leukämieviren ist typisch für Retroviren und lässt sich in folgende Abschnitte einteilen:

1. Bindung des Virions an seinen Rezeptor auf der Wirtszelloberfläche.
2. Internalisierung der Core-Struktur in das Zytoplasma.
3. Aktivierung der reversen Transkription mit Synthese der doppelsträngigen viralen DNA.
4. Transport der DNA in den Zellkern.
5. Integration der viralen DNA in das Wirtsgenom.
6. Transkription des Provirus durch die zelluläre oder virale Polymerase.
7. Transport gespleißter und ungespleißter mRNA in das Zytoplasma und dortige Translation.
8. Verpackung der viralen RNA und der viralen Proteine zu kompletten Viren an der Plasmamembran und anschließende Freisetzung neuer viraler Partikel.

Die Replikation von murinen Leukämieviren ist nicht lytisch und findet in stabilen Virus-produzierenden Wirtszellen statt.

1.4.3. Klassifizierung Muriner Leukämie Viren

Die murinen Leukämieviren (MuLV) gehören zu den Gammaretroviren und sind daher simple Retroviren. Ursprünglich wurden murine Leukämieviren aus Mausstämmen isoliert, welche eine hohe Anzahl von Leukämieerkrankungen aufwiesen. Es wurden mehrere Virusisolate hergestellt, z.B. führte das Isolat von GOSS UND MOLONEY (1960) in infizierten Mäusen zu einer T-Zell Leukämie, während Isolate von RAUSCHER (1962) und FRIEND (1957) zu einer Erythroleukämie führten. Weitere Syndrome, die durch MuLV verursacht werden, sind MAIDS ("murine acquired immunodeficiency syndrom"), Sarkome und Tumore (LIANG et al., 1996; RUSCETTI, 1995; HOATLIN & KABAT, 1995; SOURVINOS et al., 2000).

Die Viren, die ein solches Krankheitsbild verursachen, sind zum überwiegenden Teil eine Mischung aus defekten und kompletten Viren. Bei den kompletten Viren handelt es sich um nicht-pathogene aber replikationskompetente Viren, auch Helferviren genannt. Die defekten Viren sind pathogen aber nicht replikationskompetent. Bei

einer Koinfektion einer Zelle mit beiden Viren können von dem defekten Virus mit Hilfe der Helferviren neue infektiöse Partikel gebildet werden.

1.5. Pathogenese des Friend Virus Komplex (FV)

Das Friend Virus (FV) ist ein muriner Retrovirus-Komplex. Der Komplex besteht aus zwei Retroviren: Dem replikationskompetenten "Friend murine leukemia virus" (F-MuLV), ein in adulten Mäusen nicht-pathogenes Helfervirus, und dem replikationsinkompetenten aber pathogenen „spleen focus-forming virus“ (SFFV). Das SFFV besitzt größere Deletionen im *gag*-Gen, so dass keine viralen Partikel gebildet werden können. Erst eine Koinfektion der Wirtszellen durch beide Viren (F-MuLV und SFFV) führt zur Verpackung des SFFV in F-MuLV kodierte Viruspartikel und damit zur Verbreitung des SFFV. Durch diese Verbreitung des SFFV wird in den Mäusen eine Erythroleukämie verursacht. F-MuLV alleine ist in erwachsenen Mäusen apathogen, kann aber in neugeborenen Mäusen, welche kein voll ausgebildetes Immunsystem haben, eine Splenomegalie, Anämie und Erythroleukämie verursachen.

Der Rezeptor für F-MuLV, SFFV und andere ekotrophe murine Leukämieviren ist Pit-1/2 ("inorganic phosphate transporter") (KABAT, 1989). Die Zielzellen für das FV sind daher Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten und Erythrozytenvorläuferzellen (DITTMER et al., 2002).

Nachdem SFFV eine Zelle infiziert hat, wird ein defektes *env* kodiertes Glykoprotein gp55 an der Zelloberfläche exprimiert. Das gp55 bindet an den Erythropoetin-Rezeptor (EPO-R) von kernhaltigen Erythrozytenvorläuferzellen, bei denen es als konstitutives Mitogen eine polyklonale Proliferation induziert (KABAT, 1989). Diese Proliferation der Erythrozytenvorläuferzellen führt zu einer massiven Splenomegalie, bei der das Milzgewicht von FV suszeptiblen Mäusen innerhalb der ersten zwei Wochen nach Infektion auf das 10 bis 20fache des Normalgewichts ansteigt. Das Immunsystem dieser Mäuse ist nicht in der Lage, eine schützende Immunantwort gegen das FV auszubilden, so dass die Tiere 3-4 Wochen nach Infektion eine maligne Erythroleukämie entwickeln. Die entstandenen malignen Zellen besitzen zwei charakteristische Merkmale: Zum einen aktiviert das Provirus durch seine Integration ein zelluläres Onkogen der *ets*-Familie, zum anderen besitzen viele FV transformierte Zellen ein inaktiviertes p53 Tumorsuppressor-Gen (KABAT, 1989).

1.6. Die Immunantwort gegen ein Pathogen

Um die Immunantwort auf eine Friend Virus Infektion zu verstehen, wird ein kurzer Überblick über die Funktion der Immunantwort bei einer Virusinfektion gegeben. Bei Säugetieren gibt es zwei unterschiedliche Abwehrsysteme, die "angeborene" und die "erworbene" Immunantwort.

Die "natürliche oder angeborene" Immunantwort vermittelt einen unspezifischen Schutz gegen eine Infektion. Bei dieser Immunantwort sind unter anderem phagozytierende Zellen (z.B. Makrophagen, Dendritische Zellen) und natürliche Killerzellen (NK-Zellen) beteiligt.

Die "erworbene" Immunität ist spezifisch und wird durch die Zellpopulation der Lymphozyten vermittelt. Diese antigenspezifischen Zellen sind in der Lage, verschiedene Effektorfunktionen im Kampf gegen eine Infektion, sowie ein immunologisches Gedächtnis auszubilden. Die Lymphozyten befinden sich in großer Anzahl im Blut, in der Lymphe und in den lymphoiden Geweben. Sie entwickeln sich aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen, der fötalen Leber bzw. des Knochenmarks. Es werden zwei Gruppen unterschieden: Die T-Zellen und die B-Zellen. Die B-Zellen entwickeln sich direkt aus den hämatopoetischen Stammzellen, während die T-Zellen vom Knochenmark bzw. der fötalen Leber in den Thymus wandern und dort ausreifen.

Anhand von Oberflächenmarkern (CD19, CD4, CD8) lassen sich die Lymphozytenpopulationen experimentell unterscheiden (PARNES, 1989). B-Zellen tragen auf der Zelloberfläche das Molekül CD19. T-Zellen werden in die CD4⁺-Zellen (T-Helferzellen) und die CD8⁺-Zellen (zytotoxische T-Zellen, CTLs) eingeteilt.

Mit den zwei Typen der Lymphozyten (T- und B-Zellen) lassen sich zwei Hauptmechanismen der erworbenen Immunantwort assoziieren, die humorale und zelluläre Immunantwort. B-Zellen produzieren antigenspezifische Antikörper (Immunglobuline, Ig). Diese Antikörperantwort wird als humorale Immunantwort bezeichnet. Je nach Beschaffenheit des Antigens produzieren B-Zellen unabhängig oder abhängig von T-Zellen Antikörper. GREAVES et al. (1973) beobachteten, dass Menschen, die keine T-Zellen besitzen, eine geringere Antikörperantwort aufweisen. CHESNUT UND GREY (1986) zeigten, dass dieses Phänomen auf der Funktion von bestimmten T-Zellen beruht, die eine Regulation der humoralen Immunantwort innehaben. Die Funktion dieser T-Zellen besteht darin, die Aktivität von Effektorzellen zu regulieren. Daher heißen diese Zellen T-Helferzellen (Th-Zellen).

Die zelluläre Immunantwort wird auch von anderen T-Zellen, den sogenannten zytotoxischen T-Zellen (CTLs), vermittelt. Sie töten Virus-infizierte oder neoplastisch entartete Zellen durch direkten Zellkontakt. Die CTLs werden zusammen mit den B-Zellen als Effektor-Lymphozyten bezeichnet. Die antigenspezifische T-Helferzell-Antwort wird in zwei Typen, Typ 1 (Th1) und Typ 2 (Th2), eingeteilt. Die Th-Zell-Typen unterscheiden sich in ihrer Effektorfunktion und ihrer Sekretion von Zytokinen (ABBAS et al., 1996; MOSMANN & COFFMAN; 1989; SEDER & PAUL, 1994). Zytokine sind Effektormoleküle. Diese werden von Zellen des Immunsystems sekretiert und beeinflussen das Verhalten der umgebenden Zellen.

Th1-Zellen sekretieren Zytokine wie $\text{IFN}\gamma$, Interleukin (IL-2) und Lymphotoxin. Das sekretierte $\text{IFN}\gamma$ aktiviert Makrophagen und verstärkt den Immunglobulin-Klassenwechsel (Immunglobulin-Switch) von IgM zu IgG2a, ein Kennzeichen einer Th1-Immunität (FINKELMAN et al., 1990).

Th2-Zellen produzieren IL-4, -5, -10 und IL-13 und hemmen die Makrophagenaktivität. Kennzeichen einer Th2-assoziierten Immunantwort ist die hohe Konzentration an IL-4 und der Immunglobulin-Switch zu IgG1.

Eine Th1-dominierte Immunantwort wird vor allem bei einer Infektion mit Viren oder intrazellulären Bakterien beobachtet. Bei einer parasitären oder extrazellulären bakteriellen Infektion ist eine Th2-Immunantwort dominant.

1.7. Immunität gegen eine FV-Infektion

Ob ein Mausstamm nach der Infektion mit dem Friend Virus eine maligne Erythroleukämie entwickelt (FV-suszeptibler Mausstamm) oder das Virus nach einer vorübergehenden Splenomegalie kontrolliert werden kann (FV-resistenter Mausstamm), ist abhängig von der Virusdosis und dem genetischen Hintergrund der infizierten Maus.

Die Resistenz gegen FV wird durch eine Reihe von Genen vermittelt. Es gibt mindestens sechs Gene (Fv 1-6), die eine Resistenz auf nicht-immunologischer Grundlage induzieren (STOYE, 1998) und mindestens vier Gene des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC, in der Maus als H-2 bezeichnet), die die zelluläre und humorale Immunantwort gegen das FV beeinflussen.

So sind C57BL/6 Mäuse, die den H-2^b Haplotyp tragen, resistent gegen eine FV-induzierte Erythroleukämie, während z.B. B10A Mäuse mit einem H-2^a Haplotyp suszeptibel sind. Hinzu kommt, dass C57BL/6 Mäuse noch das nicht-

immunologische Resistenzgen Fv-2 tragen, welches die polyklonale Zellaktivierung von Erythrozytenvorläuferzellen und die damit verbundene Splenomegalie limitiert (HOATIN & KABAT, 1995).

Zwischen den Mausstämmen mit dem H-2^b und dem H-2^a Haplotyp lassen sich eine Anzahl von kongenen Mausstämmen einordnen, welche unterschiedlich suszeptibel für eine FV-Infektion sind. Diese kongenen Mausstämme, welche sich nur in dem H-2 Genlokus unterscheiden, sind F1-Generationen aus der Verpaarung von H-2^a und H-2^b Haplotyp Mäusen. Aus der Verpaarung von A.BY x B10 entstehen Y10 Mäuse mit einem H-2^{b/b} Genlokus, welche resistent gegen eine FV Infektion sind. Y10A Mäuse mit dem Genlokus H-2^{a/b} aus der Kreuzung von A.BY x B10A Mäusen sind hingegen FV-suszeptibel. Die H-2 Gene sind wichtig für die Präsentation von viralen T-Zell-Epitopen. Der immunologische Schutz vor einer FV-induzierten Erythroleukämie in FV-resistenten Mäusen wird durch die Kombination von FV-spezifischen CTLs, T-Helferzellen und neutralisierenden Antikörpern vermittelt. Nur ein Bestandteil der Immunantwort (z.B. CTLs) reicht nicht aus, um einen Schutz zu erzeugen. Die Depletion von z.B. CD4⁺- oder CD8⁺-Zellen in FV-resistenten Mäusen führt dazu, dass das Immunsystem dieser Tiere nicht mehr in der Lage ist, das Virus zu kontrollieren. Die Tiere erkranken, wie FV-suszeptible Mäuse, an einer Erythroleukämie.

Entscheidend für den Schutz vor einer Erythroleukämie ist neben der Anzahl an spezifischen T-Zellen und B-Zellen auch die Kinetik der spezifischen Immunantwort. So können in FV-infizierten Mäusen mit dem Halotyp H-2^{a/b} erst später als in FV infizierten Mäusen mit H-2^{b/b} T-Helferzellen detektiert werden. Durch die verzögerte und schwächere Immunantwort in FV-suszeptiblen Mäusen kann sich das Virus stark vermehren, bevor das Immunsystem die Virusinfektion kontrollieren kann. Die Virus-induzierte Erkrankung ist zu diesem Zeitpunkt schon so weit vorangeschritten, dass ein vom Immunsystem vermittelter Schutz nicht mehr aufgebaut werden kann.

1.8. Krankheitsverläufe verschiedener Mausstämme nach FV-Infektion

Der Krankheitsverlauf einer FV-infizierten Maus lässt sich anhand der Veränderung der Milzgröße (Splénomegalie) verfolgen. Die Milzgrößen werden durch Palpation dokumentiert. Die Viruslast in der Milz korreliert mit der Milzgröße, so dass vier Wochen nach der Infektion anhand der Milzgröße Rückschlüsse über die Schwere der FV-induzierten Erkrankung gezogen werden können. Die Schwere der Splénomegalie wird in verschiedene Stufen eingeteilt, die mit dem Krankheitsverlauf korrelieren (Abbildung 3). So spiegelt die Milzgröße 1 (Milzgewicht von 0,1-0,2g) die Milz einer uninfizierten Maus wider. Die Milzgrößen 2-4 stellen die verschiedenen Stadien der Splénomegalie nach FV Infektion dar.

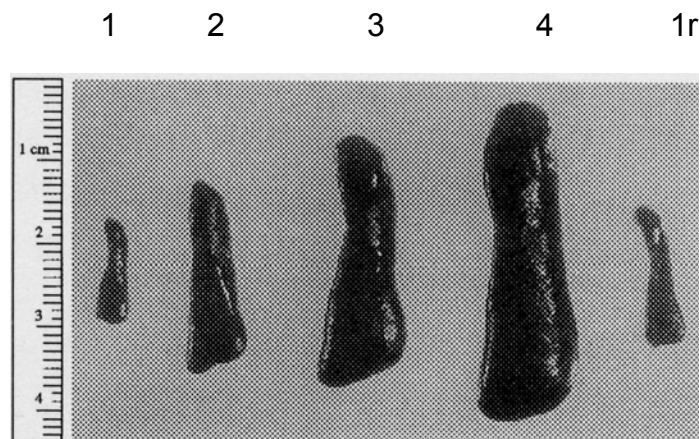


Abbildung 3: Einteilung der unterschiedlichen Stadien einer Splénomegalie nach FV-Infektion

(HASENKRUG et al., 1998)

Die Milz einer uninfizierten Maus mit etwa 0,1-0,2g ist als Milzgröße 1 definiert. Die Einteilung der Milzgrößen 2-4 stellt die verschiedenen Stadien der Splénomegalie nach FV-Infektion dar. Folgende Milzgrößeneinteilungen entsprechen folgenden Gewichten: 1 < 0,5g, 1-2 = 0,5-0,6g, 2 = 0,6-0,8g, 2-3 = 0,8-1,2g, 3 = 1,2-1,7g und 4 > 1,7g. Die Milzgröße 1r bezeichnet die Milzgröße einer persistierend infizierten Maus.

Die Milzvergrößerung bis zu zwei Wochen nach der Infektion wird als Splénomegalie bezeichnet, sie entsteht durch die rasche polyklonale Erythroblastenproliferation (Zielzellen). Bei einer Milzgröße von 3-4 wird ab 4 Wochen nach der Infektion von einer Erythroleukämie gesprochen. Zu diesem Zeitpunkt treten die ersten FV-transformierten Zellen auf. Tiere, welche eine Milzgröße von 3-4 aufweisen, sterben in der Regel an den Folgen der Erythroleukämie ab der 10ten Woche nach Infektion.

Ist bei den FV-infizierten Tieren 4 Wochen nach der Infektion eine Milzgröße kleiner als bei den Kontrolltieren nachweisbar, so sind diese Mäuse nicht an einer Erythroleukämie erkrankt. Diese Mäuse haben eine normale Lebenserwartung, sind aber persistierend mit FV infiziert. Im Folgenden werden die Krankheitsverläufe der in dieser Arbeit verwendeten Mausstämme kurz beschrieben (HASENKRUG & CHESEBRO, 1997).

C57BL/6; (H-2^{b/b}):

Die Infektion von C57BL/6-Mäusen mit einer hohen Dosis von FV (>5000 SFFU; "spleen focus forming units") induziert in den ersten zwei Wochen eine leichte Splenomegalie (mindestens Verdopplung des Milzgewichtes), die sich danach zurückbildet. Die C57BL/6-Mäuse sind in der Lage, das Virus über das nicht-immunologische Fv-2 Gen und ihre effiziente FV-spezifische Immunantwort (MHC H-2^{b/b}) zu kontrollieren. Die Tiere erkranken nicht an einer Erythroleukämie, bleiben aber lebenslang persistierend infiziert und haben eine normale Lebenserwartung.

Y10-Mäuse; (H-2^{b/b}):

Die F1-Generation der Verpaarung von B10-Mäusen mit A.BY-Mäusen wird als Y10-Mäuse bezeichnet. Diese Y10-Mäuse besitzen den MHC H-2^{b/b} Halotyp und sind FV-resistent. Anders als die C57BL/6 Mäuse kontrollieren diese Mäuse das FV nur über ihre effiziente Virus-spezifische Immunantwort. Y10 Mäuse besitzen keine vom Fv-2 Gen vermittelte genetische Resistenz gegen das FV.

Nach einer FV-Infektion entwickelt sich in Y10 Mäusen in den ersten zwei Wochen eine massive Splenomegalie (bis zu 25faches des normalen Milzgewichtes). Ab der zweiten bis dritten Woche nach der Infektion bildet sich die Milzvergrößerung zurück. Die Milzgröße bleibt dennoch zeitlebens leicht vergrößert (bis 0,5g). Die Tiere sind persistent mit FV infiziert und haben aber eine normale Lebenserwartung.

Y10A-Mäuse; (H-2^{a/b}):

Als Y10A wird die (B10AxABY) F1-Generation bezeichnet. Y10A-Mäuse besitzen einen H-2^{a/b} Halotyplokus.

Y10A-Mäuse zeigen denselben FV-induzierten Krankheitsverlauf wie Y10-Mäuse wenn sie mit geringer Virusdosis infiziert werden (<3000 SFFU), entwickeln aber bei einer hohen Virusdosis (>3000 SFFU) zu >95% eine FV-induzierte Erythroleukämie. Die Mäuse sterben an den Folgen der Erythroleukämie etwa 10-12 Wochen nach

Infektion. (HASENKRUG & CHESEBRO, 1997; MIYAZAWA et al., 1988; PETERSON et al., 2000). Aufgrund des heterozygoten H-2 Gens bildet sich die FV-spezifische Immunantwort langsamer und schwächer aus als es bei Y10-Mäusen mit dem Halotyp H-2^{b/b} zu beobachten ist. Diese unterschiedliche Kinetik in Y10A-Mäusen verschafft dem Virus einen Vorsprung vor der spezifischen Immunantwort, so dass das Immunsystem bei einer hohen Infektionsdosis nicht mehr in der Lage ist, die Infektion zu kontrollieren. Etwa drei bis vier Wochen nach der Infektion bildet sich in Y10A-Mäusen die FV-induzierte Erythroleukämie aus, die tödlich verläuft.

Balb/c (H-2^{d/d}):

Balb/c-Mäuse (Halotyp H-2^{d/d}) haben im Gegensatz zu den H-2^{a/b} Mäusen keine nachweisbare FV-spezifische Immunantwort, so dass geringste Dosen von FV zu einer Erythroleukämie und zum Tod führen.

1.9. Immunbiologie der Dendritischen Zellen (DCs)

Die Dendritischen Zellen wurden erstmals 1868 in der Epidermis identifiziert und beschrieben. Sie wurden nach ihrem Entdecker Langerhans „Langerhans Zellen“ genannt (LANGERHANS, 1868).

Als ein neuer Zelltyp wurden die DCs erstmals von STEINMANN und COHN (1973) in peripheren Lymphorganen der Maus beschrieben. Sie benannten die Zellen nach dem griechischen Wort dendron (Baum). In der Zwischenzeit wurden diese Zellen auch aus nichtlymphatischen Geweben einschließlich der Haut, Lunge, Synovialflüssigkeit, dem Gastrointestinaltrakt und dem Blut isoliert.

Bakterielle oder virale Krankheitserreger und Tumorzellen werden über spezifische Antigene vom Immunsystem erkannt und in den meisten Fällen eliminiert. Ausgelöst und gesteuert wird die Immunantwort über Antigen-präsentierende Zellen (APC). Zu den professionellen APC zählen Dendritische Zellen (DC), B-Zellen und Makrophagen, wobei die DCs die potentesten APC darstellen.

Mit dem erweiterten Wissen über die Dendritischen Zellen zeigt sich immer mehr ihre zentrale Rolle in der Kontrolle der Immunität im Körper, die sich auf verschiedene Funktionen erstreckt (BANCHERAU & STEINMAN, 1998):

- Immun-Wächter des Immunsystems. Sie nehmen Antigene auf und wandern anschließend zu den Lymphorganen und stimulieren CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen.
- Initiatoren der Immunantwort mit Stimulation naiver und Memory T-Zellen.
- Verstärker der Immunantwort, da auch bei niedrigen Antigen-Konzentrationen wenige DCs eine starke T-Zellantwort induzieren können.
- Induktion von immunologischer Toleranz.

DCs werden anhand ihres Reifungsgrades in unreife (im) und reife (m) DCs klassifiziert. Sie weisen jeweils unterschiedliche Rezeptor- und Integrinprofile in der Zellmembran auf und unterscheiden sich somit stark in zellbiologischen Prozessen wie Migration und Antigenpräsentation (SHORTMAN & LIU, 2002). In Abhängigkeit ihres Reifezustandes regulieren DCs den T-Zell-Aktivierungsprozess und sind demzufolge in der Lage, sowohl eine Immuntoleranz als auch eine Immuninduktion auszulösen. Die Aktivierung von naiven T-Zellen und deren Differenzierungen zu T-Effektorzellen

findet in mehreren Phasen statt, die sich in die Antigenaufnahme, die Migration in sekundäre Lymphorgane und die Formierung des DC/T-Zell-Komplexes in den T-Zellbereichen der Lymphknoten untergliedern (BANCHEREAU & STEINMAN, 1998). Im unreifen Zustand residieren DCs in der Peripherie des Körpers und nehmen kontinuierlich potentielle Fremdartigene auf. In Anwesenheit eines immunologischen Stimulus unterlaufen DCs einen Reifungsprozess, in dem die Expression einer Vielzahl für die Aktivierung von T-Lymphozyten benötigten Rezeptoren erhöht wird. Dazu zählen in erster Linie die kostimulatorischen Moleküle CD80, CD86, CD40, die antigenpräsentierenden Moleküle wie MHC I und MHC II, der Reifungsmarker CD83 sowie die Chemokinerezeptoren CCR5 und CCR7 (siehe auch Abbildung 4) (STEINMAN, 2003).

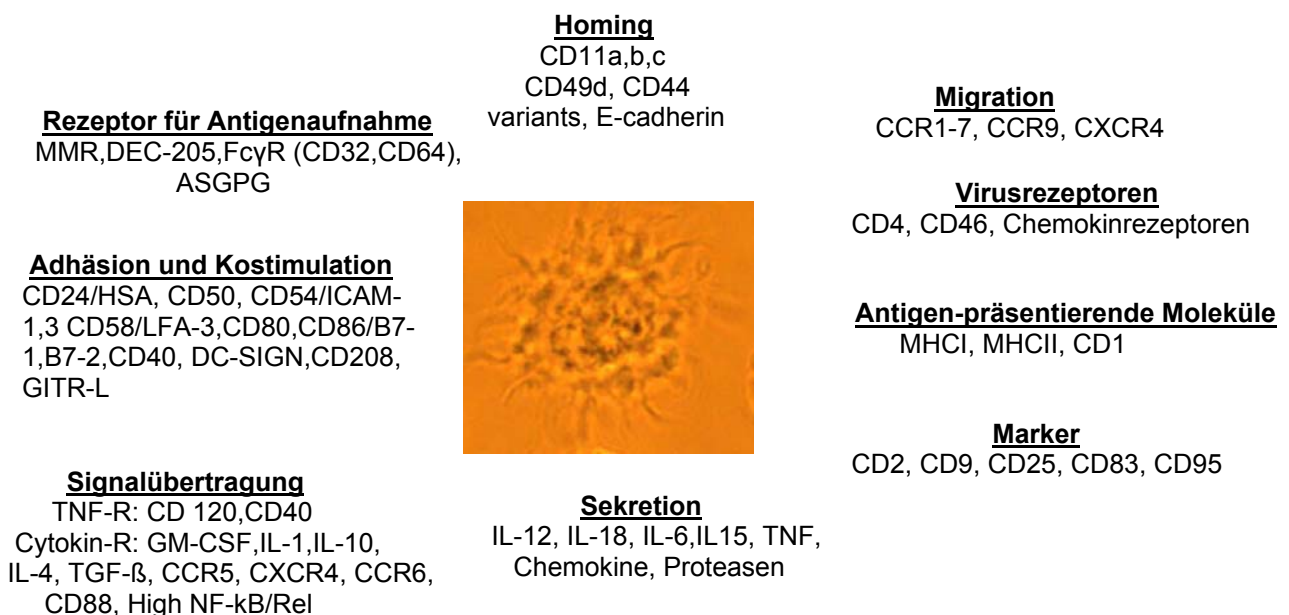


Abbildung 4: Unterschiedliche Oberflächenmarker von Dendritischen Zellen

Modifiziert nach BELL et al. (1999) und BANCHEREAU & STEINMAN (1998). Lichtmikroskopische Aufnahme einer DC (300x)

1.9.1. Entstehung von DCs und Charakterisierung der einzelnen

Subtypen

Dendritische Zellen gehören zur Gruppe der Leukozyten. DC-Populationen zeigen *in vivo* ein heterogenes Bild, gekennzeichnet durch unterschiedliche Entwicklungslinien und daraus resultierend, verschiedene Effektorfunktionen (BANCHEREAU & STEINMAN, 1998, GRABBE et al., 2000, SHORTMANN & LIU, 2002, SHORTMAN & NAIK, 2007). Nach heutigem Verständnis liegt ihr Ursprung im Knochenmark. Die Zellen entstehen aus CD34⁺-positiven pluripotenten Stammzellen. Die neu gebildeten unreifen DCs wandern vom Knochenmark durch den Blutstrom in nicht lymphatisches Gewebe ein. Die entstehenden DCs werden in zwei große DC-Linien unterschieden, myeloide und lymphoide DCs, deren Entwicklungslinien in Abbildung 5 zusammengefasst sind.

Die Entwicklung von lymphoiden DCs ist noch nicht vollständig verstanden. Man geht heute davon aus, dass sie sich wahrscheinlich aus CD11c⁻-Vorläufern des Blutes entwickeln. Diese Vorläuferzellen sind identisch mit den so genannten IPC („interferon-producing cells“). Der Flt-3 Ligand (Flt-3L) ist das wichtigste Zytokin für die Entwicklung von plasmazytoiden DCs aus hämatopoietischen Vorläuferzellen des Knochenmarks sowohl beim Menschen als auch bei der Maus (BARCHET et al., 2005). Die myeloiden DC-Vorläufer entwickeln sich zu CD11c exprimierenden DC-Populationen, die wahrscheinlich über das Blut die peripheren Gewebe und Organe infiltrieren und ein Netz aus unreifen DCs in diesen Geweben aufbauen. Zu diesen unreifen DCs sind wahrscheinlich die Langhans-Zellen (LC) in der Epidermis zu zählen, ebenso die in der Haut und die mit der Mukosa-assoziierten interstitiellen DCs in Darm- und Lungenepithelien, und eine CD11c-exprimierende DC Population im peripheren Blut (CELLA et al., 1999, CAUX, 1998). Nach Infektion oder Kontakt mit Erregern oder nach Aktivierung durch proinflammatorische Zytokine verlassen diese unreifen DCs die Peripherie, wandern über die Lymphbahnen in die lokalen Lymphknoten ein und werden nun als interdigitierende DCs bezeichnet.

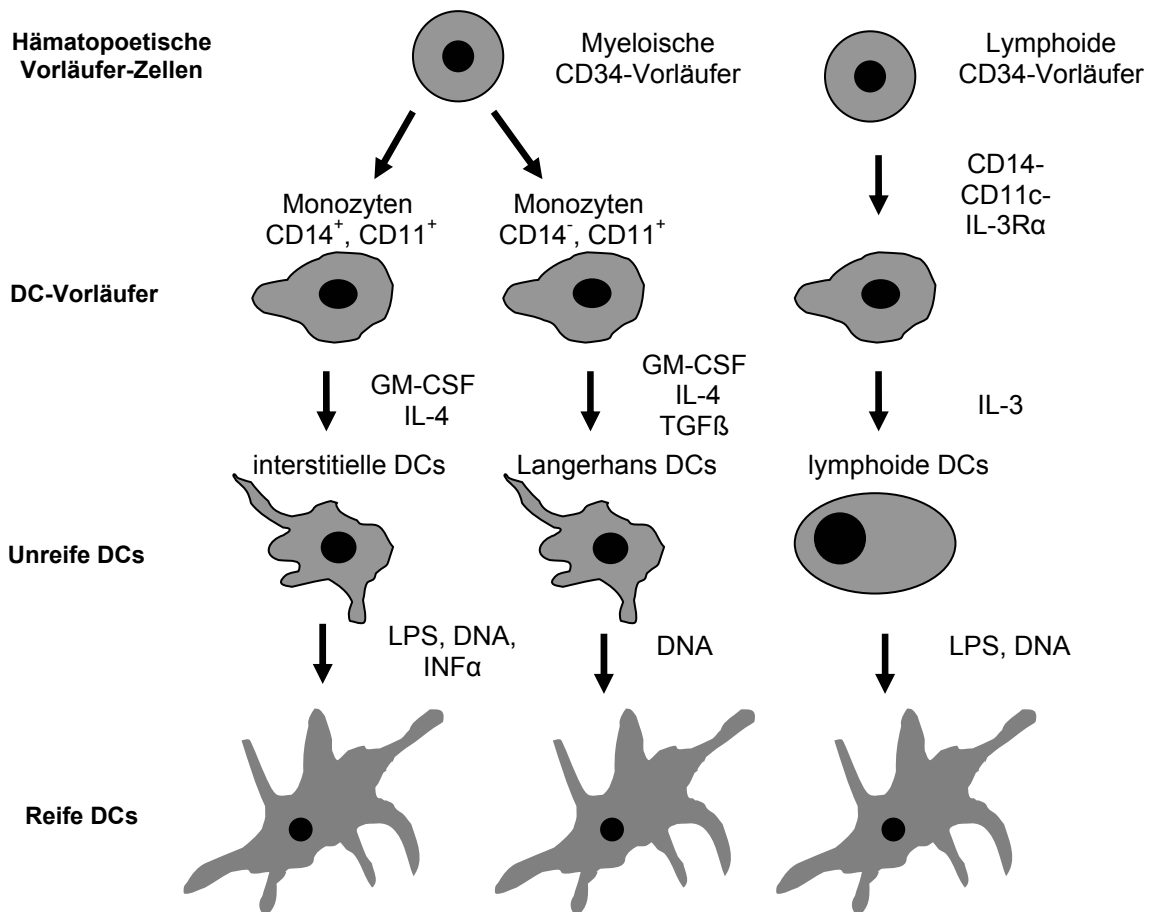


Abbildung 5: Entwicklung verschiedener DC-Subtypen aus hämatopoietischen CD34⁺ Stammzellen des Knochenmarks.

Unter dem Einfluss endogener Stimuli entstehen verschiedene DC-Subpopulationen. Langerhans DCs und interstitielle DCs verbleiben in einem reifen aber ruhenden Zustand. Andere Linien verbleiben bis zur Aktivierung durch exogene Stimuli in einer Art Vorläuferstadium (Monozyten, Plasmacytoide DC) und differenzieren dann zu reifen DCs aus (Modifiziert nach SHORTMAN & LIU, 2002).

Während dieser Migration in die T-Zell-reichen Areale der Lymphorgane reifen die myeloiden DCs aus und erwerben einen funktionellen Phänotyp mit hoher T-Zell-stimulatorischer Kapazität (BANCHEREAU & STEINMAN, 1998). *In vitro* lassen sich myeloide DCs durch Kultur aus CD34⁺-Vorläuferzellen oder CD14⁺-Monozyten in geeigneten Differenzierungsmedien generieren (CAUX et al., 1996, ROMANI et al., 1996). Aus den Vorläuferzellen entstehen zunächst unreife DCs, die eine hohe phagozytische Aktivität und eine geringe Expression von MHCII-Rezeptoren, sowie den für die T-Zell-Aktivierung notwendigen kostimulatorische Rezeptoren CD80, CD86, und CD40 aufweisen (CARRENO & COLLINS, 2002). Diese unreifen DCs sind mit

einer Vielzahl von Rezeptoren für die Erkennung von mikrobiellen Strukturen ausgestattet. Dazu zählen die hoch konservierten Toll-like Rezeptoren (TLRs). Es existieren insgesamt 10 verschiedene TLRs, die jeweils auf unterschiedliche mikrobielle Antigene reagieren (MEDZHITOV UND JANEWAY, 2000). Die einzelnen DC-Subtypen unterscheiden sich in ihrem TLR-Expressionsmuster und leiten unterschiedliche Immunreaktionen, abhängig vom mikrobiellen Antigen, ein (MEDZHITOV & JANEWAY, 2000). DCs, die als reife DC klassifiziert sind, exprimieren CD11c, CD80, CD86, CD40 und verstärkt viel MHCII und werden anhand der Expression von CD4, CD8, CD11b und CD205 in 5 Subtypen (siehe Tabelle 2) eingeteilt (SHORTMAN & LIU, 2002).

Tabelle 2: Verteilung von reifen DC-Subtypen im lymphatischen Gewebe der Maus (nach SHORTMAN & LIU, 2002)

% der Gesamt-DCs in Organen	Lymphoide DCs CD4 ⁻ CD8 ^{hi} CD205 ^{hi} CD11b ⁻	Myeloide DCs CD4 ⁺ CD8 ⁻ CD205 ⁻ CD11b ⁺	Myeloide DCs CD4 ⁻ CD8 ⁻ CD205 ⁻ CD11b ⁺	Myeloide DCs CD4 ⁻ CD8 ⁻ CD205 ⁺ CD11b ⁺	LCs CD4 ⁻ CD8 ^{lo} CD205 ^{hi} CD11b ⁺
Milz	23	56	19	<4	<1
Thymus	70	-	-	-	-
Mesenteriale Lymphknoten	19	4	37	26	<4
Haut-assoziierte Lymphknoten	17	4	17	20	33

1.9.2. Dendritische Zellen als Mediatoren der Immunantwort

Das Immunsystem wird von Dendritischen Zellen (DCs) kontrolliert. DCs kommen in nahezu allen peripheren Geweben des Körpers vor. In der Peripherie beginnen sie mit der Antigenaufnahme und Prozessierung, bevor sie anschließend in die sekundären lymphatischen Organe migrieren. Bei dieser Wanderung kommt es auch zu morphologischen Veränderungen durch Ausbildung langer zytoplasmatischer Fortsätze, welche als Dendriten bezeichnet werden.

Eine Aufgabe von unreifen DCs ist die Aufnahme von extrazellulären Bestandteilen durch Phagozytose und Endozytose. Dabei können unreife DCs auf unterschiedlichen Wegen Antigene aufnehmen: Makropinozytose (ENGERING et al., 1997), Rezeptor-vermittelte Endozytose über Typ-C Lektin-Rezeptoren (wie z.B. den Mannose-Rezeptor (SALLUSTO et al., 1995) oder DEC-205 (JIANG et al., 1995) oder Phagozytose (REIS E SOUSA & AUSTYN, 1993).

Dendritische Zellen können Antigene über zwei unterschiedliche Oberflächenmoleküle, die „Major Histocompatibility“-Komplexen I oder II (MHC-Klasse-I und MHC-Klasse-II) präsentieren. MHC-Klasse-I Moleküle bestehen aus drei Immunglobulin-ähnliche Domänen, einer Transmembrandomäne und dem nicht-kovalent assoziierten extrazellulären β_2 -Mikroglobulin. MHC-Klasse-II Moleküle dagegen besitzen eine α und eine β -Kette mit je zwei Immunglobulin-ähnlichen Domänen und einer Transmembrandomäne. Endogene Antigene werden im Zytoplasma durch intrazelluläre Proteasen und Peptidasen in Peptidfragmente gespalten. Diese Peptidfragmente werden durch die Bindung an den TAP1/TAP2-Translokator in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums transportiert. Im endoplasmatischen Retikulum werden die MHC I Moleküle zurückgehalten bis sie mit einem geeigneten Peptidfragment beladen worden sind. Nach der Beladung wandern die MHC I Moleküle zur Oberfläche der Zelle (HOWARD, 1995, LEHNER & CREWELL 1996, YORK & ROCK, 1996, JENSEN, 1999). Durch MHC I Moleküle werden $CD8^+$ T-Zellen aktiviert, die dann zu zytotoxischen T-Zellen ausdifferenzieren.

Exogene Antigene, die durch Phagozytose oder Endozytose in die DCs gelangen, werden in Vesikeln bei sinkendem pH-Wert in kleine Peptidfragmente gespalten. Bei der Bildung von MHC II Molekülen werden die α - und die β -Kette synthetisiert und dann an HLA-DM gebunden. Anschließend werden diese MHC II-Kompartimente innerhalb des endoplasmatischen Retikulums transportiert. Dort erhalten sie ihre endgültige Struktur, werden in Vesikel verpackt und zur Plasmamembran geschleust (GERMAN et al., 1996, LANZAVECCHIA, 1996, JENSEN, 1999, NICHOLAS & VILLADAGOS, 2005). MHC II-Moleküle aktivieren $CD4^+$ Helfer T-Zellen, die dann B-Zellen zur Proliferation und zur Produktion von Antikörpern anregen.

Dendritische Zellen sind aber auch in der Lage, exogen aufgenommene Antigene über MHC I Moleküle zu präsentieren. Diese Art der Präsentation wird als „Kreuz-Präsentation“ oder „Cross-Priming“ bezeichnet. Auf diese Weise wird die Induktion

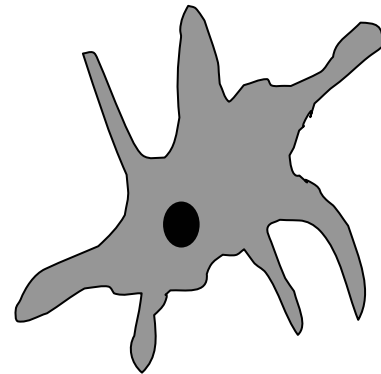
einer zytotoxischen T-Zellantwort auch gegen extrazelluläre Antigene ermöglicht (SHEN et al., 1997).

Unreife DCs enthalten viele MHCII Moleküle und exprimieren kaum kostimulatorische Moleküle auf ihrer Oberfläche. Sie sind somit perfekt ausgerüstet für die Aufnahme und Prozessierung von Antigenen. Typische Antigene, die von DCs über *Pattern Recognition Receptors* aufgenommen werden, sind mikrobielle oder virale Bestandteile. Daneben gibt es spezifische Moleküle wie z.B. LPS, CpG-DNA, Poly (I:C), oder ds-RNA, die DCs zur Reifung anregen (MELLMAN & STEINMAN 2001). Aber auch inflammatorische Zytokine wie z.B. TNF- α , IL-1, IL-6 wirken als Gefahren- bzw. Reifesignale. Nach der Antigenaufnahme wandern die DCs zu den T-Zell-Bereichen des lymphatischen Gewebes, wie z.B. zur Milz oder zu den Lymphknoten (BANCHEREAU & STEINMAN 1998). Bei dieser Wanderung reifen die dendritischen Zellen aus und besitzen dann die typische verzweigte Morphologie (dendritische Ausläufer), exprimieren viel MHCII Moleküle und sind auch nicht mehr zur Endozytose fähig. Im Gegensatz werden dann verstärkt Adhäsions- und kostimulatorische Moleküle, vor allem CD54, CD80, CD86 und CD40 exprimiert, die für den direkten Zellkontakt mit T-Zellen und deren Aktivierung unerlässlich sind (siehe Abbildung 6) (LIU, 2001).

unreife DCs

- verstärkte Antigenaufnahme
- wenige MHC-II Moleküle
- kaum kostimulatorische Moleküle
- kaum Expression des Reifungsmarkers CD83
- kaum CCR7 Moleküle

Reifungssignale durch:
Zytokine, LPS, Poly (I:C)
usw.

**reife DCs**

- keine Antigenaufnahme
- viele MHC-II Moleküle
- viele kostimulatorische Moleküle
- starke Expression des Reifungsmarker CD83
- viele CCR7 Moleküle

Abbildung 6: Wichtige Oberflächenmarker von unreifen und reifen murinen DCs

Während der Reifungsphase durchlaufen unreife DCs verschiedene morphologische und funktionelle Veränderungen. Reife DCs verlieren die Fähigkeit, Antigene aufzunehmen und steigern gleichzeitig die Fähigkeit, T-Zellen zu stimulieren (modifiziert nach BANCHEREAU & STEINMAN, 1998).

Nach der Antigenaufnahme werden Signale die die Wanderung der DCs zu den Lymphorganen, dem Ort der T-Zell-Stimulation einleiten, induziert. Diese Wanderung erfolgt entlang von Chemokingradienten. So exprimieren Langerhans Zellen beispielsweise CCR6-Moleküle und reagieren auf das Chemokin MIP-3 α , DCs des Blutes exprimieren CCR2 und reagieren auf MCP, aus Monozyten generierte DCs exprimieren CCR1 und CCR5 und reagieren auf MIP-1 α/β . Es gibt vermutlich unterschiedliche Chemokine, über die selektiv einzelne DC-Subpopulationen rekrutiert werden können, so dass die Art der Immunantwort beeinflusst werden kann. Nach der Aufnahme von Antigenen erfolgt eine verminderte Expression dieser Chemokinrezeptoren und eine verstärkte Expression des Chemokinrezeptors CCR7. Dieser Rezeptor bindet die Chemokin SLC/6CKine und MIP-3 β . SLC/6CKine werden

in den Lymphgefäßen von spezialisierten säulenförmigen Endothelzellen produziert, die sich in den Venulen der Lymphknoten befinden („high endothelial venuels“ (HEV)). Dieses Chemokine bewirkt die direkte Wanderung der reifen DCs zu den afferenten Lymphgefäßen (CAUX et al., 2000, DUBSKY et al., 2005, YONEYAMA et al., 2005). Wenn die DCs in der T-Zell-Region des Lymphknotens angekommen sind, präsentieren reife DCs das Antigen naiven T-Zellen. Diese reifen Zellen können in diesem Stadium kein Antigen mehr aufnehmen, sind aber mit Oberflächenmarkern ausgestattet, die ihnen die Interaktion mit T-Zellen erlauben. Um mit möglichst vielen T-Zellen in Kontakt zu kommen, produzieren diese DCs verschiedene Zytokine wie MIP-3 β DCCK (*dendritic cell-derived C-C chemokine*). Denn je mehr naive T-Zellen mit DCs interagieren, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit der Antigenerkennung (CYSTER, 1999). Naive T-Zellen verfügen über die intrazellulären Adhäsionsmoleküle (ICAM-) 3 und CD 11a/CD 18, mit denen sie an DC-SIGN und CD54 der antigenpräsentierenden Zellen binden (GEIJTENBEEK et al., 2000, GUNZER, 2000). Diese unspezifische Bindung erlaubt es den naiven T-Zellen, die DCs zu prüfen und auf ihre spezifischen Peptide zu untersuchen (GUNZER et al., 2000, LANZAVECCHIA & SALLUSTO, 2000). Erkennt die naive T-Zelle ihren spezifischen Peptid-MHC-Liganden, bindet sie diesen mit ihren T-Zellrezeptoren. Allerdings reicht die Bindung allein nicht für eine Aktivierung der T-Zelle aus. Es muss noch zu einem zweiten Signal kommen, bei dem die kostimulierenden Oberflächenmoleküle CD80 und CD86 über CD28 an die naive T-Zelle binden (INABA et al., 1994, LARSEN et al., 1994).

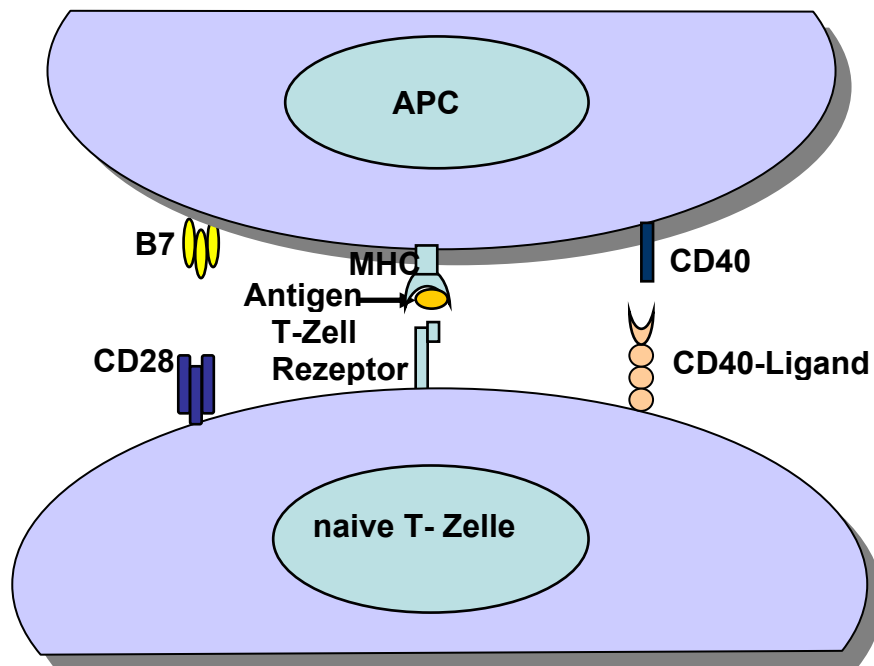


Abbildung 7: Immunologische Synapse

Um eine effiziente Immunantwort auszulösen, wird ein Kontakt zwischen DCs und T-Zelle hergestellt, der in der Aktivierung der T-Zelle resultiert. Dabei ist die Expression von unterschiedlichen Oberflächenmolekülen auf DCs und T-Zelle wichtig für die Ausbildung der Immunologischen Synapse (modifiziert nach BANCHEREAU & STEINMAN, 1998).

Die so aktivierten T-Zellen produzieren dann große Mengen an IL-2, wodurch die T-Zellen zur Proliferation angeregt werden (JANEWAY & TRAVERS, 1997).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass DCs wichtige Zellen für das Immunsystem sind. Sie existieren in verschiedenen Aktivierungsstadien, mit jeweils unterschiedlichen Aufgaben wie Antigenaufnahme und Prozessierung oder Antigenpräsentation. Der Aktivierungszustand der DCs bestimmt dabei auch die Lokalisation der Zellen in der Peripherie oder in den lymphatischen Organen.

1.9.3. Plasmazytoide Dendritische Zellen

Die Sekretion von Type I IFN (IFN- α/β) hat eine große Bedeutung für die antivirale Abwehr durch das angeborene Immunsystem (SAMUEL, 2001). Plasmazytoide DCs (pDC) sind in der Lage, große Mengen an IFN α/β zu produzieren, weswegen diese Zellen auch als „interferon producing cells“ (IPC) bezeichnet werden (ABB et al.,

1983). Die Produktion von IFN α/β geschieht hauptsächlich durch Ligandenbindung an die Toll-like Rezeptoren TLR 7 und TLR 9. Durch das freigesetzte IFN α/β und IL-12 werden Natürliche Killer-Zellen aktiviert und zur Sekretion von INF γ angeregt.

Die charakteristischen Merkmale der pDCs sind:

- Die Fähigkeit, große Mengen von Interferon α/β zu produzieren.
- Plasmazytoide Morphologie (rund, glatte Oberfläche, großer Nukleus).
- Vorkommen in Milz, Knochenmark, Lymphknoten, Thymus, Blut und Leber.
- Sehr geringe Anzahl (0,2-1,5% der Blutzellen) im Organismus.
- Dendritische Morphologie nach Aktivierung.

Erst im Jahre 2001 konnten pDCs auch aus der Maus isoliert werden (ASSELIN-PATUREL, 2001, BJORCK, 2001, NAKANO, 2001). Sie besitzen viele morphologische, phänotypische und funktionelle Gemeinsamkeiten mit den humanen pDCs, unterscheiden sich aber in der Expression charakteristischer Oberflächenmarker. Wesentliche Unterschiede liegen bei der Expression von CD45R (B220), CD123 und CD11c. Auf murinen pDCs wird der Marker CD45R stark exprimiert, nicht aber auf humanen pDCs. Im Gegensatz zu den humanen pDCs exprimieren die murinen pDCs den Marker CD11c. Hingegen wird der „klassische“ Marker für humane pDCs, CD123, nicht exprimiert (COLONNA et al., 2004).

Die pDCs werden zu der Gruppe der Dendritischen Zellen gezählt, allerdings stellt sich die Frage, ob die pDCs als professionelle antigenpräsentierende Zellen (APC) bezeichnet werden können, da bei frisch isolierten pDCs die Fähigkeit, Antigen aufzunehmen, zu prozessieren und zu präsentieren nur sehr schwach ausgeprägt ist (COLONNA et al., 2004).

Weiterhin scheinen pDCs eine wichtige Rolle bei der Erkennung von Viren im Organismus zu spielen. Wichtige Funktionen von pDCs sind die IFN α/β -Ausschüttung, die einen Einfluss auf die Virusreplikation hat und die Aktivierung anderer DC-Subpopulationen (ASSELIN-PATUREL et al., 2001, KADOWAKI et al., 2001, NAKANO et al., 2001, DIEBOLD et al., 2003, LE BON et al., 2003).

1.9.4. Regulatorische T-Zellen und Dendritische Zellen

Im Jahre 1996 haben SAKAGUCHI und Kollegen die in den späten 70er Jahren beschriebenen Suppressor T-Zellen „wiederentdeckt“ und sie regulatorische T-Zellen (Treg) genannt (ASANO et al., 1996). Sie haben in verschiedenen Zell-Transfer-Experimenten im Mausmodell eine Population von $CD4^+CD25^+$ T-Zellen nachgewiesen, die suppressierende Wirkung auf $CD8^+$ T-Zellen und Helfer T-Zellen von Typ 1 haben und damit vor allem gegen Autoimmunerkrankungen schützen. Diese Zellen werden als natürliche Treg Zellen bezeichnet (MITTRÜCKER & KAUFMANN, 2004, BECKER et al., 2006). Sie reifen im Thymus und erkennen vor allem Selbst-Antigene. Der wichtigste Oberflächenmarker dieser T-Zell Population ist der IL-2 Rezeptor (alpha-Kette) $CD25^+$, der als charakteristisch für diese Zellen angenommen wird. Jedoch wird $CD25$ von jeder T-Zelle nach Aktivierung exprimiert und kann insofern nicht als alleiniger Marker dienen. Andere Marker wie GITR (TNFRSF18), $CD152$ (CTLA-4), $CD103$ (alphaE-Integrin) und $CD134$ (OX40) werden auch zur Differenzierung von Treg-Zellen herangezogen. Außerdem wird die Expression des Transkriptionsfaktors Foxp3 als essentiell für natürliche Treg Zellen angesehen. Foxp3 wird spezifisch in regulatorischen T-Zellen exprimiert. Retroviraler Gentransfer von Foxp3 wandelt naive T-Zellen in regulatorischen T-Zellen um. So konnte Foxp3 als regulatorisches Schlüsselgen für die Entstehung von regulatorischen T-Zellen identifiziert werden (HORI et al., 2003). Es scheint, als ob Foxp3 die Expression anderer Treg assoziierter Moleküle wie $CD25$, $CD152$ und GITR kontrolliert (SAKAGUCHI, 2005).

Der Mechanismus der Suppression durch Treg-Zellen konnte noch nicht definitiv geklärt werden. Eine wichtige Rolle spielen vermutlich die Cytokine IL-10 und TGF- β . Dies scheint jedoch nicht für alle Infektionsmodelle oder Autoimmunmodelle der Fall zu sein. (JONULEIT et al., 2001; HORI et al., 2003).

Fest steht, dass natürliche regulatorische T-Zellen Zell-Zell-Kontakt brauchen, um ihre suppressive Aktivität ausüben zu können. JONULEIT et al., (2001) konnte zeigen, dass $CD4^+ CD25^+$ ihre regulatorische Eigenschaft auf konventionelle $CD4^+$ Zellen übertragen können. Hierzu ist Zell-Zell-Kontakt notwendig und lösliches TGF- β spielt eine Rolle. Diese neu entstandenen „regulatorischen“ T-Zellen brauchen allerdings zur Ausübung ihrer suppressiven Aktivität keinen Zell-Zell-Kontakt mehr und die Suppressoraktivität wird dem löslichen TGF- β zugeschrieben (JONULEIT et al., 2002; HORI et al., 2003).

Die natürlich auftretenden regulatorischen T-Zellen werden im Thymus als funktionell distinkte und reife T-Zellpopulation gebildet, die durch Foxp3 charakterisiert werden kann (SAKAGUCHI, 2005). Natürliche Treg Zellen machen ca. 5-10% aller CD4⁺ T-Zellen aus und proliferieren *in vitro* nicht nach Stimulation über den T-Zell-Rezeptor. Die Bedeutung der natürlichen Treg Zellen *in vivo* wird dadurch deutlich, dass Mäuse, die diese Zellen nicht besitzen, eine Vielzahl von Autoimmunerkrankungen entwickeln (ASANO et al., 1996).

In Tumor- und Infektionsmodellen ist inzwischen eine weitere Population von Treg Zellen, die sogenannten induzierten Treg Zellen, beschrieben worden (MITTRÜCKER & KAUFMANN, 2004). Diese CD4⁺ T-Zellen erlangen ihre suppressierenden Eigenschaften erst während ihrer Aktivierung *in vivo* oder *in vitro*. Sie stammen deshalb vermutlich von Helfer-T-Zellen ab. Während einer Tumorentstehung oder Infektion kommt es zu einer starken Vermehrung von spezifischen CTL. Diese müssen aber, im Idealfall nach Eliminierung des Tumors oder des Virus, in die Apoptose gehen oder in ihrer Funktion supprimiert werden, um die Gefahr von Autoimmunerkrankungen zu minimieren. Für den Funktionsverlust von CTL sind vermutlich induzierte Treg Zellen verantwortlich. Offensichtlich können aber bestimmte Viren mit Hilfe von induzierten Treg Zellen der antiviralen CTL Antwort entgehen und so chronische Infektionen verursachen. Bisher sind bei den persistierenden Infektionen mit Hepatitis C (CABRERA et al., 2002), Herpes Virus Simplex (SUVAS et al., 2003), HIV (WEISS et al., 2004) und Feline Immundefizienzvirus (VAHLENKAMP et al., 2004) Treg Zellen beschrieben worden. Besonders im Friend Virus Maus-Modell konnte am deutlichsten gezeigt werden der Zusammenhang zwischen induzierten Treg Zellen und der Persistenz von Viren gezeigt werden (DITTMER et al., 2004).

Welche Rolle die unreifen DCs bei der Induktion von Treg-Zellen spielen, ist noch nicht ganz geklärt. Interessant ist jedoch die Tatsache, dass unreife DCs die Treg-Zellen *in vitro* als auch *in vivo* induzieren können (GAD et al., 2004, LEVINGS et al., 2005). Viele Fragen bleiben offen, sodass noch genügend Forschungsbedarf besteht.

1.10. Die Rolle der DCs bei viralen Infektionen

DCs sind ein wichtiger Bestandteil der angeborenen Immunabwehr, die eine erste Verteidigungslinie gegen Viren bildet. Diese Eigenschaft machen DCs aber auch zum idealen Angriffspunkt für Viren, welche versuchen, die Effektorcomponenten des Immunsystems zu unterlaufen (Immunevasion). Viele Viren können DCs *in vitro* und *in vivo* infizieren, darunter sind Retroviren, Herpesviren, Influenza usw. (siehe Tabelle 3). Eine Infektion von DCs durch Viren bietet den DCs die Möglichkeit, virale Antigene über MHC I Moleküle zu präsentieren und damit über die Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen Virus-infizierte Zellen zu bekämpfen. (ALBERT et al., 1998).

Allerdings haben viele Viren im Laufe der Koevolution mit ihren Wirtsorganismen vielfältige Strategien entwickelt, die Induktion einer Immunantwort durch DCs zu verhindern. So kann durch Infektionen der Zellen die Morphologie, der Phänotyp oder sogar die Funktion von DCs verändert werden. Solche Funktionsverluste sind z.B. die Blockierung der Apoptose, die Verringerung der Expression von MHC oder kostimulatorischen Molekülen, verminderte Zytokinausschüttung und die Einschränkung der Migration von DCs. (BOSNJAK et al., 2005, POLLARA et al., 2005).

Für Retroviren, besonders für HIV, werden unterschiedliche Beeinflussungen von DCs beschrieben. Bei der Infektion kommt es zu einem Verlust von DCs, welcher sowohl durch die Inhibition der DC-Entwicklung aus peripheren Stammzellen (PATTERSON et al., 1998), als auch durch CTL-vermittelte Lyse von DCs hervorgerufen wird (KNIGHT et al., 1997). Neben der Verringerung der Anzahl von DCs kommt es bei der HIV-Infektion aber auch zu einem DC-Funktionsverlust. So wird bei DCs aus lymphoidem Gewebe von Patienten mit einer akuten HIV-Infektion eine reduzierte Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 gezeigt (LORE et al., 2002). KNIGHT et al., (1997) weisen außerdem eine reduzierte T-Zell-Stimulation durch HIV-infizierte DCs nach. Bei HIV sind die molekularen Ursachen des DC-Funktionsverlustes gut bekannt. Die Proteine Vpr und Nef spielen dabei die entscheidene Rolle (MAJUMDER et al., 2005, QUARANTA et al., 2006).

Diese Forschungsergebnisse zeigen aber auch, dass die Interaktionen zwischen DCs und Retroviren sehr komplex sind und somit noch viele Fragen offen bleiben. Besonders die Frage, wie die Interaktion von infizierten DCs mit T-Zellen im Detail abläuft, ist weitgehend ungeklärt. Die vorliegende Arbeit versucht daher Fragen

bezüglich der Interaktionen zwischen Retrovirus infizierten DCs und T-Zellen zu beantworten.

Tabelle 3: Funktionale Veränderungen von Monozyten-abgeleiteten DCs nach Infektion mit verschiedenen Viren. (modifiziert nach POLLARA et al., 2005)

Erhöhte Funktion	Keine Änderung	Blockierte Funktion*
Denguevirus	HBV	Adenovirus
Hantavirus	HCV	Ebolavirus
Influenzavirus		HBV
		HCV
		HHV
		HIV-1
		HSV-1
		HCMV
		Lassafieber
		Masern
		Parainfluenza
		RSV
		Vacciniavirus
		VZV

*Diese Viren können folgende Funktionen bei DCs blockieren: Apoptose, Expression von kostimulatorischen Molekülen, Chemokinsekretion oder Zytokineproduktion.

1.11. Fragestellung und Zielsetzung

DCs sind professionelle Antigen-präsentierende Zellen und spielen die Hauptrolle bei der Initiierung einer antiviralen T-Zellantwort. Diese Eigenschaft macht sie zu einem „Ziel“ viraler Immunevasionsstrategien, welche einer antiviralen Immunantwort entgegenwirken.

Die Infektion von Mäusen mit dem retroviralen Friend Virus (FV) sollte daher als Modell dienen, um die Immunevasionsstrategien von Retroviren aufzuklären. Das FV löst nach Infektion eine starke Immunsuppression aus, die vor allem durch regulatorische T-Zellen vermittelt wird.

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob FV in der Lage ist, DCs zu infizieren und welche funktionellen Konsequenzen sich aus einer Infektion ergeben. Von besonderem Interesse waren die Interaktionen von infizierten DCs mit T-Zellen. Darüber hinaus sollte geklärt werden, ob infizierte DCs an der Induktion von regulatorischen T-Zellen beteiligt sind.

Aus den in diesen Experimenten gewonnenen Erkenntnissen könnten sich neue Therapieoptionen gegen die Retrovirus-induzierte Immunsuppression ableiten lassen.

2. Material

2.1. Geräte

Tabelle 4: Geräteliste:

Geräte	Hersteller
CO ₂ Brutschrank	Thermo, Dreieich
Durchflusszytometer FACS Calibur	BD Pharmingen, Heidelberg
FACSDiVA Sorter	BD Pharmingen, Heidelberg
Zentrifuge	Megafuge 1.0R Heraeus, München
Kühlschrank	LIEBHERR Comfort, Ochsenhausen
Gefrierschrank	LIEBHERR Comfort, Ochsenhausen
Manuelle Pipetten	Eppendorf 10, 20 100, 200, 1000µl, Hamburg
Werkbank	KOJAIR [®] , Meckenheim
Auflichtmikroskop (Umkehrmikroskop) CK 2	Hund, Wetzlar
MACSMULTI Stand	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch- Gladbach
Szintillationszähler	JVC, SR-S970E, Japan
Zell-Harvester	TOMTEC, Orange, CO, USA
Licht- und Fluoreszenzmikroskop	Leica, Bensheim
S-VHS Videorekorder	JVC, Friedberg
Thermoregulatoren	MAWI-Therm, Monheim
Wärmelampen	Phillips, Amsterdam
LightCycler 2.0	Roche, Mannheim

2.2. Verbrauchsmaterial

Tabelle 5: Materialliste:

Material	Hersteller
50ml Teströhrchen, steril	Greiner bio-one, Frickenhausen
25ml Teströhrchen, steril	Greiner bio-one, Frickenhausen
FACS-Röhrchen	BD, Heidelberg
1ml Pipetten, steril	Greiner bio-one, Frickenhausen
5ml Pipetten, steril	Greiner bio-one, Frickenhausen
10ml Pipetten, steril	Greiner bio-one, Frickenhausen
25ml Pipetten, steril	Greiner bio-one, Frickenhausen
Petrischalen für Gewebekulturen, Cellstar®	Greiner bio-one, Frickenhausen
5ml Einmalspritzen	B. Braun, Melsungen
10ml Einmalspritzen	B. Braun, Melsungen
G23-Nadel	BD, Heidelberg
G25-Nadel	BD, Heidelberg
G27-Nadel	BD, Heidelberg
TC-6 Well Platte, steril	Greiner bio-one, Frickenhausen
TC-24 Well Platte, steril	Greiner bio-one, Frickenhausen
PS-96 K Mikroplatte U-Form	Greiner bio-one, Frickenhausen
Microtest™, Zellkulturplatte, 96 Well, Flachplatte	Falcon BD, Heidelberg
Zählkammer nach Neubauer	BD, Heidelberg
25cm ² Zellkulturflaschen	Greiner bio-one, Frickenhausen
Pinzetten gebogen, spitz	Oehmen, Essen
Pinzetten gebogen	Oehmen, Essen
Scheren	Oehmen, Essen

2.3. Versuchstiere

2.3.1. Wildtyp Mäuse

Balb/c :	Resistenzgene: H-2D ^{d/d} Harlan Winkelmann GmbH, Borchen, (Deutschland)
C57BL/6, (B6):	Resistenzgene H-2D ^{b/b} Harlan Winkelmann GmbH, Borchen, (Deutschland)
(B10xA.BY), F1 (Y10A):	Resistenzgene: H-2D ^{a/b} , eigene Zucht, Zentrales Tierlabor, Universitätsklinikum Essen
(B10xA.BY), F1 (Y10):	Resistenzgene: H-2D ^{b/b} , eigene Zucht, Zentrales Tierlabor, Universitätsklinikum Essen

2.3.2. Transgene Mausstämme

CD-8 TCRtg:	Spezifisch für D ^b GagL FV Epitop (OHLEN et al., 2002)
Balb/c DO11.10:	TCR OVA, Peptid 323-339, (HOGQUIST et al., 1997) Tier- zuchtanlage, Prof. Blankenstein (Max-Delbrück-Centrum, Berlin)

Alle Tiere waren zum Versuchsbeginn mindestens acht Wochen alt. Alle Mäuse stammen aus einer speziell pathogenfreien (SPF) Tierzuchtanlage. Die Tiere wurden für die Dauer der Versuche unter SPF Bedingungen gehalten und hatten freien Zugang zu Trinkwasser und Standardfutter. Tierexperimente wurden gemäß den Richtlinien der „Federation of European Laboratory Animal Science Association“ durchgeführt. Die Mäuse am Universitätsklinikum Essen wurden unter tierärztlicher Kontrolle gezüchtet.

2.4. Chemikalien und Medien

Wenn nicht anders vermerkt, wurden alle Chemikalien und Medien von der Firmen *Applichem* (Darmstadt), *Merk* (Darmstadt), *Roth* (Karlsruhe), *Gibco* (Karlsruhe) und *Sigma* (München) bezogen.

Agarose, AIM-V[®]-Medium, 3-Amino 4-Ethylencarbazole (AEC), Ammoniumchlorid, Bleicitrat, BSA (Rinderserum Eiweiß), Calciumchlorid, CFSE, Chloroform, DEPC, N-N-Dimethylformamid, Dimethylsulfoxid (DMSO), DNaseI, Dinatriumhydrogenphosphat, DQ-OVA (Invitrogen), EDTA, Ethanol, Essigsäure, FCS, Formalin (40%), Fötale Kälberserum (Biochrom KG), Glucose, Glutaraldehyd, L-Glutamin, Heparin, Hexadimethrine bromide (Polybren), Isopropanol, Kaliumchlorid, Kaliumdihydrogenphosphat, Kollagenase Typ 3 (Worthington), Kollagenase Typ VII von *C. histolyticum* (CO773), Magnesiumchlorid, Magnesiumsulfat, MEM-Medium, β -Mercaptoethanol, Natriumacetat, Natriumazid, Natriumchlorid, Natriumhydrogencarbonat, Natriumpyruvat; Osmiumtetroxid, Phenolrot, Polybrene A, PP2 (Calbiochem[®]), Propylenoxid, RPMI-Medium, Salzsäure, Schwefelsäure, Streptavidin-AP, TRIzol (GIBCOBRL), Trypanblau, Trypsin, Tween 20, Uranylacetat, Wasserstoffperoxid,

2.5. Wachstumsfaktoren

Tabelle 6: Wachstumsfaktoren

Zytokine	Hersteller
GM-CSF	Zelllinie NIH 3T3-GM-CSF von Dr. Blankenstein, Berlin
IL-4	Zelllinie NIH 3T3-IL-4 von Dr. Schmitt, Wien, AU
IL-2	ImmunoTools, Friesoythe
Recombinantes Human FLT 3 Ligand	ImmunoTools, Friesoythe

Tabelle 7: Stimulationsfaktoren

Zellstimuli	Hersteller
LPS (<i>E.coli</i> 026:B6)	Sigma, Deisenhofen
Poly(I:C)	InvivoGen, San Diego
Universal Interferon- α (AID) -recombinant-	PBL Biomedical Laboratories, Piscataway
OVA Pepid	Applied Biosystems, Weidenstadt
CpG siehe Tabelle: 13	

2.6. Antibiotika

Penicillin-Streptomycin (Gibco)

2.7. Häufig verwendete Puffer und Medien

Alle Lösungen und Puffer wurden, wenn nicht anders vermerkt, mit zweifach destilliertem H₂O angesetzt.

Tabelle 8: Puffer und Medien

Bezeichnung	Zusammensetzung
AEC Gebrauchslösung	AEC-Stock-Lösung wurde 1:20 in 0,05 M Natriumacetat angesetzt und die Reaktion mit 0,5 μ l 30% H ₂ O ₂ /ml Lösung gestartet.
AEC-Stocklösung (4mg/ml)	AEC-Tabletten in N-N-Dimethylformamid gelöst.
Einfriermedium	20ml FCS 10ml DMSO 20ml RPMI
Medium für Dendritische Zellen	RPMI 1650 (500ml) 10% FCS 50 μ M 2-Mercaptoethanol 4mM L-Glutamin 1mM Natriumpyruvat 1% Penicilin/Steptomycin

	5ng/ml GM-CSF (Überstand) 1ng/ml IL-4 (Überstand)
Medium für T- Zellen	AIM-V [®] Medium 5% FCS 100U/ml IL-2
PBBS	0,2g KH ₂ PO ₄ 1,15g Na ₂ HPO ₄ 0,14g CaCl ₂ 0,32g KCl 7,2g NaCl 0,2g MgCl ₂ x 6H ₂ O 0,2g MgSO ₄ x7H ₂ O 1ml Phenolrot (1%) 1,0g Glukose Σ 1Liter H ₂ O _{dest}
PBS	137mM NaCl 2,7 mM KCl 4,3mM Na ₂ HPO ₄ x 7H ₂ O 1,4mM KH ₂ PO ₄ 1,5mM CaCl ₂ 1mM MgCl ₂ Σ 1Liter H ₂ O _{dest}
Lysepuffer (für die Lysierung von Erythrozyten)	4,15g NH ₄ Cl 0,5g KHCO ₃ 1,85g NaEDTA ad 500ml Aqua dest
MACS Puffer (entgast)	0,5% BSA 2mM EDTA Σ 1Liter PBS
FACS Puffer	PBS 0,02% Natriumazid 0,1% BSA

2.8. Antikörper für die Durchflußzytometrie

Tabelle 9: In der hier vorliegenden Arbeit eingesetzte Antikörper

Epitop (Anti-Maus-)	Konjugat	Klon	Bezugsquelle
H-2D ^b	FITC PE	KH95	BD Pharmingen
H-2D ^d	FITC	34-2-12S	BD Pharmingen
I-A/I-E	FITC PE	2G9und M5114.15.2	BD Pharmingen
CD4	FITC PE PerCP APC	L3T4, H129.19 und RM4-5	BD Pharmingen
CD8	FITC PerCp APC	Ly-2	BD Pharmingen
CD11b	FITC PE APC	M 1/70	BD Pharmingen
CD11c	FITC PE APC	HL3	BD Pharmingen
CD14	FITC	mC5-3	BD Pharmingen
CD19	FITC PE APC	1D3	BD Pharmingen
CD25	FITC PerCP APC	PC61und 7D4	BD Pharmingen
CD40	FITC PE	3/23	BD Pharmingen
CD44	FITC	IM7	BD Pharmingen
CD45R	FITC	RA3/6B2	BD Pharmingen
CD54	FITC	3E2	BD Pharmingen
CD62L	FITC	MRC-OX-85	ImmunoTools
CD69	PE	H1.2F3	BD Pharmingen
CD80	FITC	16-10A1	BD Pharmingen
CD86	FITC	GL1	BD Pharmingen
CD 83	PE	Michel 17	eBioscience
CD197	FITC	4B12	Serotec
IgG2b	FITC PE		Caltag, San Francisco, CA,USA
Anti-Foxp3	FITC	FJK-16s	eBioscience
Anti-GITR	PE	DTA-1	eBioscience
TER 119	PE	Ly-76	eBioscience
Anti-mPDCA	FITC	JF05-1C2.4.1	Miltenyi Biotec

Tabelle 10: Charakterisierung der Fluorochrome

Bezeichnung	Absorption (nm)	Emission (nm)
FITC	488	525
PE	488	575
CyChrome	488	670
PerCP	488	670
7- AAD	633	650
APC	633	660

Tabelle 11: Sonstige Antikörper

Horse Radish Peroxidase HRP gekoppelte Ratte anti Maus IgG ₁ monoklonaler AK (Klon: X56)
HRP gekoppelter Ziege anti-Maus IgG2a (NatuTec Nr. E 90-107)
HRP gekoppelter Ziege anti-Maus Immunglobulin (bindet bevorzugt IgG , IgA und IgM; Dako)
Monoklonaler AK 720: Maus Anti MuLV env. (Isotyp IgG2b) (ROBERTSON et al., 1991)
Monoklonaler AK 34: Maus Anti MuLV p15 (Isotyp IgG2b) (CHESEBRO et al., 1983)
Monoklonaler IgG2b PE-gekoppelter Antikörper Ziege-anti-Maus (Caltag)
Monoklonaler IgG2b FITC-gekoppelter Antikörper Ziege-anti-Maus (Caltag)
Monoklonaler CD11c MikroBeads Hamster anti-Maus Antikörper (Klon: N418) (Miltenyi Biotec)
Monoklonaler PE MikroBeads anti-PE Antikörper (Miltenyi Biotec)
Monoklonaler CD8 MikroBeads anti-Maus Antikörper (Klon: L3T4) (Miltenyi Biotec)

2.9. F-MuLV spezifische Peptid (T-Zell-Epitop)

Das verwendete MuLV spezifische CD-8 T-Zell-Peptid wurde von der Firma PAN Tecs (Tübingen) synthetisiert. Das Peptid wurde in 100% sterilem DMSO gelöst.

Tabelle 12: T-Zell-Epitop

Peptidname	Sequenz	Referenz
FMR -H-2D ^b GagL CD-8 epitope	AbuAbuLAbuLTVFL	SCHEPERS et al., 2002

2.10. Kommerzielle Standardtests

Annexin V- FITC Apoptosis Detection KIT I BD Pharmingen, Heidelberg
 MACS anti- CD 11c Beads Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
 MACS anti-CD 8 Beads Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach,
 MACS anti- PE Beads Miltenyi Biotec ,Bergisch Gladbach
 OptEIA Mouse IFN γ Set, ELISA, BD Pharmingen, Heidelberg,
 OptEIA Mouse GM-CSF, ELISA, BD Pharmingen, Heidelberg
 OptEIA Mouse IL-4 BD, ELISA, Pharmingen, Heidelberg
 Mouse IL-12 p70, ELISA, eBioscience, San Diego
 Mouse Interferon Alpha, ELISA, PBL Biomedical Laboratories, Piscataway
 RNeasy Mini Kit, Qiagen, Hilden
 QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit, Qiagen, Hilden
 QuantiTect Probe PCR Kit, Qiagen, Hilden

2.11. Viren Zelllinien

Viren

Friend Virus Komplex (DITTMER et al., 1999)

Der verwendete FV Stock wurde aus infizierten Mäusen gewonnen (siehe. Kapitel 3.2.).

Friend Murine Leukemie Virus (Helper Virus) (DITTMER et al., 1999)

Der verwendete Helfer Virus Stock wird von *Mus dunni* Zellen produziert (siehe Kapitel 3.3.).

Tabelle 13: Zelllinien

Zelllinie	Herkunft
GM-CSF Zelllinie	Zelllinie NIH 3T3-GM-CSF von Dr. Blankenstein, Berlin
IL-4 Zelllinie	Zelllinie NIH 3T3-IL-4 von Dr. Schmitt, Wien, AU
<i>Mus dunni</i>	Maus Fibroblasten Zell-Linie (LANDER & CHATTOPADHYAY, 1984)

2.12. Oligonukleotid-Primer

β-Aktin

5' AAA TCG TGC GTG ACA TCA AA 3' (sense)

5' CAA GAA GGA AGG CTG GAA AA 3' (anti-sense)

F- MULV env

5"-(6FAM) ACTCCCACATTGATTTCCCGTCC (TAMRA)-3

5' AAG TCT CCC CCC GCC TCT A 3' (sense)

5' AGT GCC TGG TAA GCT CCC TGT 3' (anti-sense)

TLR 3 Qiagen, Hilden

TLR 4 Qiagen, Hilden

TLR 9 Qiagen, Hilden

2.13. CpG ODN Sequenzen

Die CpG-ODN wurden von der Firma MWG (Ebersberg) hergestellt. Die ODN wurden in sterilem PBS verdünnt und bei 4°C gelagert.

Tabelle 14: CpG ODN Sequenzen

ODN-Name	Sequenz
CpG-1668	5'- tcc atg acg ttc ctg atg ct -3'
CpG-Kontrolle	5'- tcc atg agc ttc ctg atg ct -3'
CpG.1826	5'- tcc atg acg ttc ctg acg tt -3'

3. Methoden

3.1. Versuchstiere

3.1.1. Infektion

Die Infektion der Mäuse mit dem Friend Virus wurde mit einer 0,5 x 25mm Kanüle intravenös (i.v.) in die laterale Schwanzvene durchgeführt. Dazu wurde der Virusstock mit sterilem PBS verdünnt. Es wurde mit 3000SFFU (Balb/c) oder 4500SFFU (Y10A) pro Maus injiziert. Das Injektionsvolumen betrug 0,5ml.

3.1.2. Betäubung der Mäuse mit Isofluran[®]

Für die Palpation der Milz und die retroorbitale Blutentnahme wurden die Mäuse mit Isofluran betäubt. Dazu wurden die Tiere in einen Glastopf gesetzt, in dem sich ein mit Isofluran[®] getränktes Tuch befand.

3.1.3. Palpieren von Milzgrößen

Mit Hilfe der Palpation der Milz wurde der FV-induzierte Krankheitsverlauf verfolgt. Für die Palpation wurde die Maus betäubt und den Milzgrößen ein Wert von 1-4 zugeteilt. (siehe Abbildung 3)

3.1.4. Organentnahme

Zur Organentnahme wurden die Tiere mit Isofluran[®] betäubt und dann durch Genickbruch getötet. Die Milz wurde entnommen und in eine 6-Well-Platte mit 5ml PBBS überführt.

3.2. *In vivo* Herstellung eines Friend Virus Stocks

Das Friend Virus (FV) besteht aus zwei Viren, dem „Spleen Focus Forming Virus“ und dem „Friend Murine Leukemia-Virus“ (siehe Kapitel 1.4.3.). Der FV-Stock wurde aus infizierten Mäusen gewonnen. Dazu wurden Balbc-Mäuse mit 1000-1500SFFU infiziert, nach neun Tagen getötet und aus den Milzen ein Milzzell-Homogenat (10-20%) in PBBS mit 2mM EDTA hergestellt. Der Virusstock wurde bei -80°C gelagert.

Zur Titration dieses Stocks wurden Y10A Mäuse infiziert und den Tieren nach 14 Tagen die Milzen entnommen. Mit Hilfe der sogenannten Bouin's Lösung (Sigma) lassen sich maligne Zellhaufen, die durch die FV Infektion entstehen, auf der Milz

anfärben. Die Anzahl dieser ausgezählten Foci ergab die Viruskonzentration („Spleen Focus Forming Units“, SFFU).

3.3. Herstellung eines Friend Murine Leukemia Virus-Stocks *in vitro*.

Mus dunni Zellen wurden in 25cm² Zellkulturflaschen in 10ml RPMI Medium (10% FCS, Penicillin/Streptomycin) ausplattiert und anschließend 50µl Polybrene 0,8µg/ml zugegeben. Danach wurden die Zellen mit F-MuLV (MOI 1) Stock infiziert. Die Zellen wurden anschließend bei 5% CO₂ und 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach drei Tagen wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst und in RPMI Medium aufgenommen. Zur Überprüfung der Prozentzahl an infizierten *Mus dunni* Zellen wurden diese mit AK 720 und PE-gekoppelten Ziege-anti-Maus anti-IgG2b Antikörper für jeweils 30min inkubiert. Die Prozentzahl infizierter Zellen wurde anschließend im Durchflusszytometer bestimmt. Wenn die Zellen zu 50-100% infiziert waren, wurden diese in 175cm² Zellkulturflaschen in 50ml RPMI Medium ausplattiert. Die Zellen wurden bei 5% CO₂ und 37°C im Brutschrank inkubiert, bis diese ca. 50-75% konfluent waren. Dann wurde das Medium gewechselt und die Zellen für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Danach wurde der Überstand geerntet, aliquotiert und bei -80°C gelagert. Für die weitere Verwendung wurde die Aktivität des F-MuLV bestimmt. Der Test zur Bestimmung der Aktivität des F-MuLV-Stocks beruhte auf dem Prinzip des „Infections center“-Tests (siehe Kapitel 3.11.). Es wurde eine Verdünnungsreihe des Überstandes hergestellt und dieser dann auf *Mus dunni* Zellen gegeben. Nach drei Tagen Inkubation im Brutschrank wurde der Test ausgewertet.

3.4. Zellzahlbestimmung

Für die Bestimmung von Zellzahlen wurden Einzelzellsuspension 1:2 oder 1:10 verdünnt, mit 0,4% Trypanblau (in PBS gelöst) versetzt und in einer Neubauerkammer gezählt. Trypanblau färbt tote Zellen an. Für die Zellzahlbestimmung wurden nur lebende Zellen gezählt.

3.5. Zellkultur

3.5.1. Kultivierung von Zellen

Die Zellkultur erfolgte in einem Begasungsbrutschrank bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂/Luft-Gemisch.

Adhärenz wachsende Zelllinien wurden in liegenden Kulturflaschen inkubiert. Zum Ernten und Verdünnen dieser Zellen wurde das verbrauchte Medium dekantiert und die Zellen mit 5% Trypsin-EDTA überschichtet und kurz im Brutschrank inkubiert, bis sich ein Großteil der Zellen vom Boden ablöste. Dieser Prozess wurde anschließend mit 10ml kaltem Vollmedium gestoppt, und die Zellsuspension wurde abzentrifugiert (1200U/min 5 Minuten). Das so gewonnene Zellpellet wurde in 1ml Vollmedium gelöst und in neue Kulturflaschen ausgesät. In Suspension wachsende Zelllinien wurden stehend in Kulturflaschen inkubiert. Zum Ernten und Verdünnen dieser Zellen wurden sie abzentrifugiert.

3.5.2. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zur längeren Lagerung von Zellkulturzellen wurden diese in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. 1×10^6 Zellen/ml wurden dazu in Einfriermedium (40% FCS, 10% DMSO und 50% RPMI-Medium) resuspendiert. Aliquots von 2ml wurden in Einfriereröhrchen überführt und bei -20°C für 2-3 Stunden eingefroren. Vor der Überführung der Zellen in den flüssigen Stickstoff wurden die Zellen über Nacht bei -80°C gelagert.

Zum Auftauen von Zellen wurden diese schnell im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und sofort in 10ml aufgewärmtes Medium (37°C) überführt. Die Zellen wurden 10min bei 1200rpm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde erneut mit Medium gewaschen um das DMSO aus dem Medium gänzlich zu entfernen. Die Einzelzellsuspension wurde im Verhältnis 1/5 und 4/5 gesplittet, in kleine Zellkulturflaschen überführt und auf ein Endvolumen von 10ml mit RPMI-Medium aufgefüllt.

3.5.3. Generierung und Kultur von murinen myeloiden Dendritischen Zellen

Eine 6-8 Wochen alte Maus wurde durch Isofluran[®] anästhesiert und durch Genickbruch getötet. Anschließend wurde das Tier mit einem Desinfektionsmittel (Terralin[®]) besprüht. Das Fell wurde an den Beinen von Muskulatur abgelöst und die Beine im Bereich der Hüftknochen abgetrennt. Die Füße wurden entfernt. Nach der Trennung von Ober- und Unterschenkelknochen wurden die Knochen von Muskeln und Sehnen befreit und die Epiphysenenden eröffnet. Durch die eröffneten Epiphysen konnte das Knochenmark aus Femur und Tibia mit Hilfe einer 5ml Spritze mit ca. 5ml sterilem DC-Medium und einer 23G Kanüle ausgespült werden. Der Inhalt der Markhöhle wurde in einem Greiner Röhrchen gesammelt. Um eine Zellsuspension herzustellen wurden die Zellen durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren durch eine 23G Kanüle gespritzt. Die Zellsuspension wurde

anschließend in 50ml Röhrchen für 10 Minuten, 1300U/min 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und mit 1ml neuem DC Medium aufgefüllt, anschließend wurde die Zellzahl bestimmt.

In jede Petrischale wurden 3×10^6 Stammzellen zu 10ml DC-Medium gegeben. Zur Kultivierung wurden dem Medium 5ng/ml GM-CSF (Überstand) und 1ng/ml IL-4 (Überstand) zugegeben. Am nächsten Tag wurde pro Petrischale 10ml frisches DC-Medium zugegeben. Nach drei Tagen wurde pro Platte 10ml des alten DC-Mediums abgenommen, die Zellen abzentrifugiert, in 10ml frischem DC-Medium aufgenommen und wieder auf die Petrischale zurückgegeben. Nach sieben Tagen Kultur unter Standardbedingungen standen die Dendritischen Zellen für Experimente zur Verfügung.

3.5.4. Generierung und Kultur von murinen plasmazytoiden Dendritischen Zellen (pDCs)

Frische isolierte Knochenmarkzellen (siehe Kapitel 3.5.3.) wurden mit DC-Medium auf eine Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml eingestellt, mit 100ng/ml humanem Flt3-Ligand versetzt und 5ml Zellsuspension je Napf in eine 6-well Platte ausgesät. Die Kultivierung der Zellsuspension erfolgte für 10Tage im CO₂-Inkubator bei 5% CO₂ und 37°C nach drei, fünf und sieben Tage wurde die Hälfte des Mediums gewechselt. Nach dieser Zeit lagen die gewünschten Zellen als Suspensionszellen vor und wurden nach mehrmaligem Spülen des Bodens mit dem Kulturmedium aus der 6-well Platte pipettiert.

3.5.5. Gewinnung von infizierten DCs

Zur Gewinnung von infizierten DCs wurde eine Balbc-Maus mit 3000 SFFU infiziert. Zehn Tage nach der Infektion war die Maus akut an einer FV-induzierten Leukämie erkrankt. Die Isolierung von Knochenmarkzellen und Anzucht von infizierten DCs erfolgte dann wie im Kapitel 3.5.3. beschrieben. Der Phänotyp der so generierten DCs wurde anschließend mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

3.5.6. Stimulation von uninfizierten und infizierten Dendritischen Zellen

Soweit im Text nicht anders angegeben, wurden die Stimulation von DCs mit Toll-like receptor Liganden und Interferon-alpha (siehe Tabelle 15) durchgeführt.

Tabelle15: Konzentrationen von Stimulationssubstanzen für DCs

Stimulus	Eingesetzte Endkonzentration
CpG-ODN	6µg/ml
Poly(I:C)	100µg/ml
IFNα	1000U/ml

3.6. Das MACS-System zum Sortieren und Isolieren von Zellen

Um Zellpopulationen, die bestimmte Proteine auf ihrer Oberfläche exprimieren, zu isolieren, wurde die Magnetseparation verwendet. Das „Magnetic Activated Cell Sorting“ (MACS; Miltenyi Biotech GmbH, Deutschland) arbeitet mit submikroskopisch kleinen, superparamagnetischen, antikörpergekoppelten Kügelchen (MicroBeads) die keinen Einfluss auf die Funktionalität der Zellen haben (SCHUMM et al., 1999).

Die Dendritischen Zellen oder Milzzellen wurden in einer Konzentration von 1×10^7 bis 1×10^8 Zellen/ml in MACS-Puffer resuspendiert und 15 Minuten mit MicroBeads (CD11c-Beads) markierten Antikörpern bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden dann zweimal gewaschen und über eine auf einen Magneten gesetzte und mit 3ml MACS-Puffer gewaschene Säule gegeben. Nachdem die Zellsuspension durchgelaufen war, wurde die Säule dreimal gewaschen. Zellen, die mit Antikörper markiert waren, wurden von dem Magneten zurückgehalten, alle anderen Zellen flossen durch die Säule durch. Bei einer Positivselektion musste die Säule aus dem Magnetfeld entfernt werden. Die markierten Zellen wurden mit einem Stempel und ca. 5ml MACS-Puffer aus der Säule gewonnen.

3.7. Isolierung von Dendritischen Zellen aus der Milz

Die Isolierung von DCs aus der Milz ist beschrieben in VREMEC et al., 1992. Zur Erstellung einer Milzzellsuspension wurde die entnommene Milz in 5ml PBBS durch ein Sieb zerrieben, die groben Bestandteile entfernt und die Einzelzellsuspension in ein Röhrchen überführt. Die Suspension wurde auf 10ml mit PBBS aufgefüllt und mit 200µl Kollagenase Typ 3 (Worthington) (Stock: 50mg/ml), 100µl DNase I (Applichem) (Stock 20mg/ml) und 200µl FCS versetzt. Die Röhrchen wurden auf einem

Schüttelinkubator bei 37°C für 20min inkubiert. Anschließend wurde zu der Lösung noch 70µl 0,5M EDTA-Lösung zugegeben und für weitere 5min im Brutschrank inkubiert. Danach wurde die Suspension 10min bei 1200U/min zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 5ml Lysepuffer gelöst und 5min bei Raumtemperatur stehengelassen, dabei wurden alle kernlosen Zellen (Erythrozyten) lysiert. Anschließend wurde mit 5ml PBBS aufgefüllt, eine Zählprobe entnommen und die Zellzahl mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellen wurden auf eine Zellzahl von 1×10^8 eingestellt. Anschließend wurden alle CD11c⁺ Zellen mit dem MACS-System (siehe Kapitel 3.6.) isoliert. Anschließend konnte die Prozentzahl an FV-infizierten DCs mittels Durchflußzytometrie in der Milz bestimmt werden (siehe Kapitel 3.8.2.).

3.8. Durchflußzytometrie

Mit Hilfe der Durchflußzytometrie lassen sich einzelne Zellen oder Zellpopulationen aus einer heterogenen Zellpopulation analysieren. Dabei können spezielle Oberflächenstrukturen und intrazelluläre Proteine der Zellen identifiziert, charakterisiert und quantifiziert werden. Dazu wurden spezifische Fluorochrom-markierte Antikörper verwendet, die an Oberflächenproteine binden (siehe Tabelle 9). Die Fluoreszenzeigenschaften der Zellen wurden mit einem FACS Calibur von Becton Dickinson gemessen und mit CellQuest-Software analysiert.

3.8.1. Färbung von Oberflächenproteinen (CD)

5×10^5 bis 1×10^6 Dendritische Zellen wurden mit FACS-Puffer gewaschen, in 100µl FACS-Puffer und 0,5-2µl konjugiertem Antikörper aufgenommen und 30min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach einmaligem Waschen in FACS-Puffer wurden die DCs im Durchflußzytometer (FACScan, Heidelberg, Germany) analysiert. Falls nicht anders angegeben, wurden alle Antikörper von Pharmingen (Heidelberg, Germany) bezogen.

3.8.2. Bestimmung der Prozentzahl von FV-infizierten Dendritischen Zellen

Für die Bestimmung der Anzahl von FV-infizierter DCs, wurden 1×10^6 DCs mit dem Antikörper 34 (AK 34) inkubiert. FV infizierte Zellen exprimieren an der Oberfläche das glykolysierte FV Gag-Protein, an welches der AK 34 bindet. Der AK 34 ist nicht mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert, so dass für die durchflußzytometrische

Analyse ein zweiter Antikörper eingesetzt werden musste. Dieser zweite AK (IgG2b-PE; monoklonaler Ziege anti-Maus AK) bindet an den AK 34. Mit den Antikörpern CD 11c, CD80, CD86, CD40 und CD83 wurde die jeweilige Zellpopulation gefärbt. Vor der Färbung mit dem AK 34 musste eine Fc-Rezeptor-Absättigung durchgeführt werden um eine unspezifische Bindung des zweiten Antikörpers zu verhindern. Dazu wurde der Anti-Maus CD16/CD32 AK 10min bei 4°C mit den Zellen inkubiert. Die Zellen wurden dann mit FACS-Puffer 1x gewaschen. Anschließend wurden die Zellen 30min bei 4°C mit dem AK 34 inkubiert und dann 2x mit FACS-Puffer gewaschen. Nun wurden die Zellen mit dem zweiten AK (Monoklonaler IgG2bPE) und mit dem Antikörper CD11c für 30min bei 4°C inkubiert. Nachdem die Zellen 2x mit FACS-Puffer gewaschen wurden, wurde die Anzahl der FV-infizierten DCs mittels Durchflußzytometer bestimmt.

3.8.3. Vitalitäts-Nachweis der uninfizierten und infizierten DCs

Bei dieser Methode wurden die apoptotischen Zellen nach einer bewährten Methode, der Annexin V-Durchflusszytometrie, sichtbar gemacht. Annexin V ist ein Protein mit der Fähigkeit, Ca^{2+} -Ionen an Phospholipide zu binden. Dies kann man sich bei der durchflusszytometrischen Apoptosebestimmung zunutze machen. Phosphatidylserin ist ein Phospholipid, das sich bei intakten Zellen an der Innenseite der Zellmembran befindet. Bei fehlender Verfügbarkeit von ATP in der frühen Phase des kontrollierten Zelltodes wechselt dieses Molekül von der Innenseite der Lipiddoppelschicht der Zellmembran auf die Außenseite. Externalisiertes Phosphatidylserin ist daher bereits in der frühen Phase der Apoptose zu detektieren, indem man es mit Annexin V, das an ein FITC-Molekül gekoppelt ist, markiert. Um die Unterschiede zwischen uninfizierten und infizierten DCs in ihrer Vitalität zu berechnen, wurde auf die DCs gegatet die (Annexin positiv/7AAD negativ) sind. Für die Durchführung des Tests wurde der kommerzielle Standardtest Annexin V- FITC Apoptosis Detection KIT I von BD Pharmingen (Heidelberg) verwendet. Die DCs wurden im Durchflusszytometer mit dem Programm CellQuest (BD) ausgewertet.

3.8.4 Endozytose von DQ™ Ovalbumin

Um die Endozytose-Aktivität und die Verarbeitung von Antigen an uninfizierter und infizierter DCs zu untersuchen, wurden die Zellen bei 37°C für 1h mit 0,5µg/ml FITC-markierten Ovalbumin inkubiert. Das DQ™ Ovalbumin ist „quenched“ und fängt erst an zu fluoreszieren, wenn es von den Zellen aufgenommen und im Proteosom zerkleinert wurde.

Als Kontrolle dienten DCs, die mit DQ™ Ovalbumin bei 4°C inkubiert wurden. Anschließend wurden die Zellen zweimal gewaschen und im Durchflusszytometer analysiert. Die Endozytose von DCs wurde zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen.

3.9. Zytokinnachweis mittels ELISA

3.9.1. IL-12 und IL10 Produktion von DCs.

Die IL-12 und IL-10 Produktion von uninfizierten und infizierten DCs wurde im Überstand gemessen. Dazu wurden DCs aus uninfizierten und infizierten Balb/c-Mäusen angezüchtet (siehe Kapitel 3.5.3.). Nach sieben Tagen wurden die uninfizierten DCs mit CD11c und die infizierten DCs mit CD11c und AK 34 Antikörpern angefärbt. Anschließend wurden die uninfizierten DCs auf CD11c positive Zellen und die infizierten DCs auf CD11c und AK 34 positive Zellen im FACSDiVA gesortet. Diese isolierten Zellen wurden dann auf eine Zellzahl von 1×10^6 DCs eingestellt und 24 Stunden mit CpG 1826 oder Poly(I:C) stimuliert. Als Kontrolle dienten uninfizierte DCs und infizierte DCs ohne Stimulation. Im zellfreien Überstand wurde dann entsprechend der Anleitung des Herstellers mit einem kommerziellen Mouse- IL-12 und IL-10 ELISA-KIT (eBioscience, San Diego) der Gehalt an den IL-12 p70 und IL-10 in Doppelbestimmung quantifiziert und die absolute Zytokinmenge über eine Eichkurve ermittelt.

3.9.2. Nachweis der Produktion von GM-CSF und IL-4 von Zelllinien

Aus den Kulturfleichen wurde nach 60 Stunden Kultivierung der Zelllinien der Überstand abgenommen und mit kommerziellen ELISA-Kits (Mouse GM-CSF und Mouse IL-4 BD, Pharmingen, Heidelberg) gemäß der Anleitung der Hersteller der Gehalt an GM-CSF und IL-4 quantifiziert.

3.10. Transmissionselektronenmikroskopie

3.10.1. Probenvorbereitung (Fixierung)

Für die Untersuchung von infizierten Dendritischen Zellen im Elektronenmikroskop wurden sieben Tage alte infizierte DC-Kulturen verwendet. Die DCs wurden auf eine Zellzahl von 5×10^6 Zellen eingestellt und bei 1200U/min 10min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 2%igem Glutaraldehyd über Nacht bei 4°C fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit 2%iger Agarose in einen Block gegossen. Die weitere Fixierung und Vorkontrastierung des Zellblockes erfolgte für 2h in 1% Osmiumtetroxid. Abschließend wurden die Proben dreimal 15min in Natriumcacodylatpuffer 0,1M gespült. Das Material wurde dann in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Ethanol 50%, 70%, 90%, 100% je 30min) dehydriert und über Propylenoxid (2x 30min; 1h Propylenoxid: Epon (2:1); 24Stunden in Propylenoxid: Epon 1:1; 60min pures Epon) in Epon eingebettet und in Gelatine kapseln gegossen. Die Polymerisation erfolgte über 48 h im Wärmeschrank bei 60°C.

An einem Ultramikrotom Reichert Ultracut (Reichert, Wien, Österreich) wurden 60nm dicke Schnitte angefertigt. Die Schnitte wurden auf Kupfernetzchen aufgezogen und mit 5%igem Uranylacetat und Bleicitrat (1,33g auf 50ml) jeweils für 15 min nachkontrastiert. Die nachfolgende Auswertung und die fotografische Dokumentation erfolgte mit einem Zeiss EM 902A Transmissionselektronenmikroskop (Zeiss AG, Oberkochen).

3.11. Nachweis von infektiösen DCs mit Hilfe des „Infectious Center Assay“

Die Anzahl FV infektiösen DCs in der Kultur wurde mit diesem Test bestimmt. Dazu wurden aus DC-Kulturen mit Hilfe der CD-11c⁺ Beads die Dendritischen Zellen isoliert. (siehe Kapitel 3.6.). Die aufgereinigten DCs wurden titriert und mit Indikatorzellen (*Mus dunni*) koinkubiert. Infektiöse DCs infizieren durch Zell-Zellkontakt die *Mus dunni*-Zellen. Diese teilen sich und geben das FV an ihre Tochterzellen weiter. Es entsteht ein Virus-Focus. Diese Foci können mittels Antikörperreaktion und Substratreaktion angefärbt werden. Als FV-spezifischer Antikörper wurde AK 720 verwendet, dieser bindet an das MuLV-env. Der zweite „Horse Radish Peroxidase“ (HRP) gekoppelte Antikörper (Ziege anti-Maus IgG2b-HRP) bindet an die Fc-Region des ersten Antikörpers. Das lösliche Substrat (3-

Amino-9-Ethylcarbazole; AEC) wurde von HRP umgesetzt und in ein lösliches rotes Produkt umgewandelt. Die entstandenen roten Punkte markieren auf dem Zellrasen die Virus-Foci. Anhand der Verdünnungsreihe und der Gesamtzellzahl konnte die Anzahl der infektiösen DCs bestimmt werden.

Dazu wurden am ersten Tag eine definierte Anzahl Indikatorzellen in eine 6 well Gewebekulturschale ($6,6 \times 10^3$ Zellen/ml) ausgesät. Es wurden 3ml Indikatorzellsuspension pro well ausplattiert. Am nächsten Tag wurden zu den kultivierten Indikatorzellen die DCs nach der Aufreinigung mit CD11c Beads auf 1×10^7 Zellen/ml eingestellt und eine Verdünnungsreihe von 10^6 bis 10^2 hergestellt. Jeweils 1×10^6 /ml bis 1×10^2 /ml Zellen wurden auf die Indikatorzellen gegeben und drei Tage koninkubiert. Die Inkubation fand bei 37°C und 5% CO_2 statt. Als Kontrolle des Tests wurden jeweils drei wells mit F-MuLV und drei wells ohne Virus mitgeführt. Bei der Kontrolle mit freiem Virus musste Polybrene A ($4 \mu\text{g/ml}$) hinzugegeben werden. Das Polybrene A diente dazu, dass das freie Virus besser an die Rezeptoren der Zelloberfläche binden konnte (TOYOSHIMA & VOGT, 1969).

Nach drei Tagen wurde der Test ausgewertet. Dazu wurde das Medium dekantiert und die Zellen mit 95% Ethanol für 5-10min fixiert. Die fixierten Zellen wurden 1x mit PBS und 1x mit PBS/0,1% BSA gewaschen. Der erste Antikörper (AK 720) wurde 1-2 Stunden bei RT inkubiert. Dazu wurden pro Well 600 μl Hybridomaüberstand (AK 720) verwendet. Anschließend wurden die Platten 2x mit PBS/0,1% BSA gewaschen. Der zweite Antikörper (Ziege anti- Maus IgG2b-HRP; 0,05mol/L) wurde 1:400 in PBS/0,1% BSA verdünnt und jeweils 600 μl pro Well pipettiert. Die Inkubation betrug 20min bei RT. Nach dem Waschen mit PBS (2x) wurden 2ml frisch angesetzte Substratlösung (AEC) pro Well zugegeben und 20min bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach dem Dekantieren, Waschen und Trocknen der Platten wurden die Foci gezählt.

3.12. $\{^3\text{H}\}$ Tymidin Proliferationsassay

Die DCs wurden gezählt und zentrifugiert (1500 U/min, 5min, 4°C). Die uninfizierten und infizierten DCs aus der Balb/c-Maus wurden auf 5×10^4 Zellen in 2 μl Kompletmedium verdünnt und mit $0,1 \mu\text{g/ml}$ OVA drei Stunden beladen. T-Zellen von DO 11.10 Mäusen wurden in eine Suspension von 5×10^5 Zellen/1,3 μl gebracht. In einer 96-Loch-Mikrotiterplatte wurden 2 μl der T-Zell-Suspension mit 7,7 ml Kollagengel (Zusammensetzung siehe Kapitel 3.15.1.) und mit 2 μl der DC Suspension gemischt, anschließend wurde das zur Polymerisierung im Brutschrank

aufbewahrt. Sobald das Gel polymerisiert war, wurden weitere 40µl Kollagengel hinzugefügt, um zu verhindern, dass das Gel im später zugegebenen Komplettmedium aufschwamm. Nachdem auch diese Schicht im Brutschrank auspolymerisiert war, wurden 160µl Komplettmedium als Nahrungsbasis für die Zellen aufpipettiert und der Ansatz in den Brutschrank gestellt.

Alle Proben wurden dreifach angesetzt. Als Kontrollen wurden T-Zellen, infizierte und uninfizierte DCs jeweils separat in den Test eingesetzt. Nach 60h Inkubation wurde das Komplettmedium abpipettiert und durch 100µl frisches Komplettmedium ersetzt. Zusätzlich wurden die Zellen mit 20µl $\{^3\text{H}\}$ Thymidin (=1 µCi) beladen und wieder in den Brutschrank gestellt.

Weitere 15h später wurde das Kollagengel verdaut, um die Zellen freizusetzen. Dazu wurde Kollagenase Typ VII eingesetzt (1U Kollagenase/4µl Kollagengel). Nach einer Inkubation von ca. 30min im Brutschrank war das Medium klar und das Kollagengel somit gelöst. Ein Waschvorgang wurde angeschlossen und die Proliferation gestoppt, indem mit Hilfe eines Harvesters die Flüssigkeit abgesaugt und die Zellen auf ein Filterpapier gebracht wurden. Das Filterpapier wurde mit Szintillationsflüssigkeit in einer Plastikfolie eingeschweißt und konnte dann im Szintillationszähler analysiert werden. Der Szintillationszähler misst die Radioaktivität in Form von „counts per minute“ (cpm). Die CPM wurden zweifach bestimmt und der Mittelwert der drei identischen Ansätze in der Graphik dargestellt.

3.13. CFSE–Proliferationsassay

Um die Zellteilungsrate von antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen zu bestimmen, wurden DCs vorher drei Stunden mit dem 1µg/ml FMR-H-2D^b GagL CD-8 Peptid beladen. Die CD8⁺ T-Zellen wurden von CD8 TCR transgenen Mäusen mit Hilfe des MACS-System wie in Kapitel 3.6. beschrieben isoliert. Anschließend wurden die CD8⁺ T-Zellen mit 5-(6)-Carboxyfluorescein-Diazetat-Succinimidylester (CFSE) markiert. CFSE ist ein fluoreszierender Farbstoff, der mit großer Genauigkeit zwischen den Tochterzellen aufgeteilt wird und es dadurch erlaubt, jede neue Generation von Tochterzellen mittels FACS zu identifizieren. CFSE ist seiner ursprünglichen Form membranpermeabel und nicht fluoreszierend. Nach Diffusion in die Zelle wird es so verändert, dass das Molekül stark fluoresziert und die Zellmembran nicht länger durchdringen kann. Zusätzlich bindet CFSE stabil an intrazelluläre Proteine. Proteine mit langer Halbwertszeit, wie z.B. die des

Zytoskeletts, sind für die lange Haltbarkeit der CFSE-Färbung verantwortlich. Um die CD8⁺ T-Zellen mit CFSE zu markieren, wurden die Zellen auf eine Konzentration von 5×10^4 /ml in PBS eingestellt. Anschließend wurde dem Gemisch eine Konzentration von 0,5µM CFSE für 3min bei 37°C zugesetzt. Die Färbung wurde dann mit FCS gestoppt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Danach wurden 5×10^4 CD8⁺ T-Zellen mit 5×10^3 uninfizierte bzw. infizierte DCs in 250µl AIM-V+5% FCS in eine Flachbodenmikrotiterplatte pipettiert.

Diese Flachbodenmikrotiterplatte wurde bei 37°C für drei Tage inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die Zellen mit APC-konjugierten AK, gegen CD8 gerichtet war, gefärbt und mittels FACS analysiert.

3.14. Stimulation von virus-spezifischen CD8⁺ T-Zellen mit FV-infizierten und uninfizierten DCs

Bei diesem Test soll gezeigt werden, ob FV-infizierte DCs virus-spezifische CD8⁺ T-Zellen zur INF γ Produktion anregen können. Dazu wurden die Milzen von C57BL/6 (Kontrolltier) und CD8 transgenen Mäusen entnommen und die CD8⁺ T-Zellen mit Hilfe des MACS wie in Kapitel 3.6. beschrieben isoliert. Die CD8⁺ T-Zellen wurden auf eine Konzentration von 1×10^5 Zellen/ml eingestellt. Uninfizierte und infizierte DCs wurden vorher drei Stunden mit dem 1µg/ml FMR-H-2D^b GagL CD-8 Peptid beladen. Anschließend wurden 2×10^4 uninfizierte oder infizierte DCs mit 1×10^5 T-Zellen, 250µl AIM-V+5% FCS und IL-2 (100U) in eine Flachbodenmikrotiterplatte pipettiert.

Diese Flachbodenmikrotiterplatte wurde bei 37°C drei Tage inkubiert. Nach dieser Zeit wurde der Überstand abgenommen, zentrifugiert und die Menge an INF γ mit einem ELISA bestimmt.

3.15. 3-D-Kollagen-Assay

Um zu untersuchen, welche Unterschiede zwischen uninfizierten und infizierten DCs bezüglich ihrer antigenspezifischen Wechselwirkung mit CD4⁺- Zellen bestehen, wurde das 3-D-Kollagenmodell verwendet. In dieses wurden TZR-transgene CD4⁺T-Zellen aus DORAG-Mäusen eingesetzt, die mit ihrem transgenen TZR ein Peptid aus OVAAlbumin (OVA) (ROBERTSON et al., 2000) im Kontext von MHC II (IA^d) erkennen (HURST et al., 1997, MURPHY et al., 1990). Uninfizierte DCs und infizierte DCs wurden mit OVA Peptid beladen, und dieses Antigen wurde spezifischen CD4⁺ T-Zellen

präsentiert. Zur Analyse des Einflusses von Antigen auf die Wechselwirkungen, liefen als Kontrolle die gleichen Ansätze ohne antigenbeladene DCs mit.

3.15.1. Herstellung des 3-D-Kollagengels

Kollagengele für die Analyse der Interaktionen von DCs und T-Zellen wurden wie FRIEDL UND GUNZER, 2001 beschrieben hergestellt.

5×10^4 uninfizierte oder infizierte DCs aus der Balbc-Maus bzw. 5×10^5 -Zellen aus DORAG-Mäusen wurden in $33 \mu\text{l}$ Komplettmedium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde mit einer Kollagenlösung in einem Verhältnis von 1:3 (Zellsuspension: Kollagengemisch) gründlich gemischt. Die Kollagenlösung bestand aus einem Teil NaHCO_3 (7,5%), zwei Teilen 10x MEM und 15 Teilen Kollagen. Die Endkonzentration an Kollagen betrug 1,67mg/ml.

Die Kollagen-Zellen-Mischung wurde in eine selbst konstruierte Glaskammer gefüllt (siehe Kapitel 3.14.2.). Nach Polymerisierung des Gels (30-40min., 37°C , 5% CO_2) wurde das fehlende Volumen mit Komplettmedium aufgefüllt und die Kammer mit Wachs luftdicht abgeschlossen.

3.15.2. Herstellung der Versuchskammer

Zur Herstellung der Versuchskammer wurde nach FRIEDL et al., (1993) verfahren. Ein Objektträger wurde mehrfach mit einem erhitzten 1:1 Gemisch (=Wachs) aus Paraffin und Vaseline bestrichen, bis eine Höhe von 400-500 μm erreicht war. Nach dem Aushärten des Wachses wurde ein Deckglas (Stärke 0) aufgelegt und mit der Wachsmischung an den Rändern luftdicht abgeschlossen.

3.16. Zeitraffer Videomikroskopie

Zur Analyse der Kontakte zwischen uninfizierten und infizierten DCs mit T-Zellen im Kollagengel kam eine Apparatur zum Einsatz, welche aus einem Lichtmikroskop, einer Schwarz-Weiß-Kamera, einem Zeitraffervideorekorder, einer Temperaturkammer und einer Temperaturregelungsanlage bestand.

Die Versuchskammer wurde in die Temperaturkammer gebracht, die mit einem Sensor für die Temperaturmessung ausgestattet war. Dieser gab die IST-Temperatur an den Temperaturregler weiter, der über das An- und Abschalten von zwei Infrarotlampen, die extern auf die Klimakammer gerichtet waren, für eine konstante Temperatur von 37°C sorgte. Das Gel wurde nun von oben nach unten

durchfokussiert. Die Oberflächen konnten an der höheren Zellzahl und am Matrixmuster erkannt werden. Es musste dann eine Ebene gefunden werden, die sicher im Gelniveau lag. In dieser Ebene wurde ein Bereich mit zwei DCs und einer möglichst großen Anzahl von T-Zellen gesucht. Die Videoaufnahmen wurden im Echtzeitmodus begonnen, bevor das Gel noch einmal durchfokussiert wurde, um festzuhalten, dass in der richtigen Ebene gefilmt wurde. Danach wurde auf den Zeitraffermodus 480h (23 Bilder/Minute = alle 2,7s ein Bild) umgestellt und bei 400-facher Vergrößerung und mit einem Zoom von 0,5mm gefilmt. Die Aufnahmen wurden auf VHS Videofilme aufgezeichnet. Einige Übersichtsaufnahmen wurden in 25-200facher Vergrößerung mit einem Zoom von 0,5-0,63mm aufgenommen.

3.16.1. Identifizierung der Zellkontakte

Der Beginn eines Zellkontaktes wurde durch zwei Kriterien definiert:

1. Identische Graustufen der Zellen zum selben Zeitpunkt.

Nachdem zunächst deutlich zu sehen war, dass sich zwei Zellen aufeinander zu bewegt haben, waren ihre Zellgrenzen am Kontaktpunkt auf den Monitor mit dem menschlichen Auge nicht mehr zu erkennen.

2. Offensichtliche morphologische Veränderungen oder Änderungen der Bewegung, die durch den Kontakt hervorgerufen wurden:

- Anhalten der Zelle: Eine migrierende T-Zelle bewegte sich auf eine DC zu und stellte daraufhin ihre Migration ein.

- Verzögerung der Zellbewegung: Eine migrierende T-Zelle bewegte sich auf eine APC zu und verzögerte daraufhin ihre Migration.

- Richtungsänderung entlang der Oberfläche der anderen Zelle: Eine migrierende T-Zelle bewegte sich auf eine DC zu, behielt ihre Geschwindigkeit bei und veränderte ihre Bewegungsrichtung so, dass diese deutlich dem Oberflächenrelief der DC entsprach.

- Zytoplasmaeinstülpungen durch die andere Zelle: Eine migrierende T-Zelle bewegte sich auf eine DC zu und ihr Zytoplasma wurde in Folge des physikalischen Widerstandes und gemäß der Oberflächenstruktur der kontaktierten DC eingestülpt.

Als Abreißen eines Kontaktes wurde definiert:

1. Das Verlassen der gleichen Graustufe: Die Zellgrenzen der Zelle waren wieder zu erkennen.
2. Abstand und Richtungsänderung der Bewegung: Die Zellen sind so weit von einander entfernt, dass kein Kontakt vorhanden sein kann und bewegen sich in unterschiedliche Richtungen.
3. Geschwindigkeitsänderungen im Verhältnis zur kontaktierten Zelle. Die Zellen zeigen eine mit dem Auge erkennbare Beschleunigung, die sich deutlich voneinander unterscheidet.

Auf die Weise wurden alle Anfangs und Endzeiten der Zellinteraktionen im Beobachtungszeitraum notiert und daraus die Kontaktdauer und die Anzahl der Kontakte berechnet.

3.16.2. Analyse der T-Zell Aktivierung nach dem Gelversuch

Nach Abschluss der Aufnahmen konnte durch zwei Beobachtungen eine Aktivierung der T-Zellen nachgewiesen werden:

1. Durch die aktive Zellproliferation und die Produktion von sauren Metaboliten war der pH-Wert gesunken und das Kollagengel hatte sich gelb verfärbt.

2. Analyse der Zellpopulation in der Durchflusszytometrie:

Nach Abheben des Deckglases von der Versuchskammer wurde das Gel mit Hilfe einer Pipette in Eppendorf-Röhrchen gebracht. Zur Auflösung des Gels wurden 30µl Kollagenase VII hinzugegeben und der Ansatz im Brutschrank 45min inkubiert. Nach Zentrifugation (5min 4500 U/min, 20°C) wurden 100µl PBS und 400µl Propidiumjoidid/PBS-Lösung (50ng/ml) hinzugefügt und die Zellen wurden auf ihre Aktivierungsmarker (CD25, CD44 und CD69) oder auf die Expression des Transkriptionsfaktor Foxp3 im FACS analysiert. Eine Blasenbildung und damit eine T-Zell-Aktivierung wurde durch Vorhandensein einer separaten Population mit deutlich größeren und dichteren Zellen nachgewiesen.

3.17. Arbeiten mit RNA

Alle Arbeiten mit RNA wurden mit Handschuhen durchgeführt. Es wurden spezielle RNAase freie Lösungen und gestopfte Pipettenspitzen verwendet. Alle Arbeiten wurden an einem separaten RNase freien Platz durchgeführt.

3.17.1. Isolierung von Gesamt-RNA

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus uninfizierten und infizierten DCs wurde mit TRIZOL nach dem Standardprotokoll der Firma AppliChem (Darmstadt, Germany) durchgeführt. Die Aufreinigung der TRIZOL-RNA erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden). Bei der Gewinnung der RNA für Realtime-PCR Analysen wurde ein Verdau mit DNase zum Abbau genomischer DNA durchgeführt, um die Amplifikation genomischer Sequenzen zu vermeiden.

3.17.2. Bestimmung der mRNA für TLR 3, 4 und 9 aus DCs mittels Echtzeit-PCR (Light Cycler/Roche)

Im Gegensatz zum konventionellen PCR System konnten PCR-Produkte mit der Echtzeit-PCR während der Amplifikation erfasst werden. Bei einer RT-PCR ist eine Methode zur Quantifizierung der Genexpression ausgehend von der mRNA. Die mRNA wurde zunächst durch die reverse Transkription in eine cDNA umgeschrieben. Zur Quantifizierung der PCR Produkte wurde der fluoreszierende Farbstoff SYBR Green I in doppelsträngige (ds) DNA eingebaut.

SYBR Green I bindet sich ausschließlich an doppelsträngige DNA, also an hybridisierte Primer und an durch die Taq Polymerase synthetisierte dsDNA. Die emittierte Fluoreszenz der PCR Produkte wurde durch eine Photozelle aufgezeichnet und konnte so von Zyklus zu Zyklus verfolgt werden. Für die RT-PCR wurde das QuantiTect SYBR Green RT-PCR KIT (Qiagen) verwendet. Die Bestimmung erfolgte dabei immer gegen ein Referenzgen, in diesem Fall wurde β -Actin verwendet. Die Messung erfolgte auf einem Light Cycler 2.0 von Roche.

Tabelle 16: Master Mix für die Echtzeit-PCR

I. 19µl Master Mix	Zusammensetzung
0,8µl	H ₂ O (RNase-free)
10µl	2x QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix
4µl	Primer 1
4µl	Primer 2
0,2µl	QuantiTect RT
II 1µl mRNA	

Als Standard für die Quantifizierung wurde eine Verdünnungsreihe von β -Aktin in einer Kopiezahl von 10^2 bis 10^6 verwendet. Als negative Kontrolle wurde H₂O (RNase-free) verwendet.

3.17.3. One-Step PCR

Bei der One-Step-PCR laufen sowohl reverse Transkription als auch PCR in demselben Reaktionsgefäß ab. Taq-DNA-Polymerasen und alle benötigten Primer und Reagenzien werden beim Ansetzen der Reaktion zusammengegeben. Während der Reversen-Transkriptase-Reaktion bei 37°C wird cDNA synthetisiert, die Taq-DNA-Polymerase ist unter diesen Bedingungen nur wenig aktiv. Nach einer ausreichenden langen Reaktionszeit für die reverse Transkription wird dann die Temperatur erhöht, wodurch die Reverse Transkriptase inaktiviert und durch die zunehmende Aktivität der Taq-DNA-Polymerase die cDNA amplifiziert.

Die RT-PCR wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Einstellung der RT-PCR Programme

Reverse Transkription		52°C; 30min
1) Initialphase	Heißstart	95°C; 15min
2) Hauptphase	Denaturierung	96°C; 20s
	Primerbindung	57°C; 25s
	DNA-Synthese	72°C; 40s
3) Schmelzphase		94°C: 0s 60°C; 15s 95°C; 0s
4) Kühlung		38°C, 60s

Die Temperaturänderungsrate lag bei 20°C/s. Nur während des Schmelzprozesses wurde eine Änderung von 0,1°C/s verwendet.

3.17.4. Two Step PCR für Friend Virus

Bei der Two-Step oder zweistufigen RT-PCR wird zunächst während der reversen Transkription die cDNA synthetisiert. Nach Abschluss der Reversen-Transkriptase-Reaktion wird dann ein Aliquot daraus entnommen und in einer PCR-Reaktion eingesetzt. Der wesentliche Vorteil der zweistufigen RT-PCR liegt darin, dass die PCR optimiert werden kann, ohne dass die Reverse-Transkriptase-Reaktion beeinflusst wird.

Reversen-Transkriptase-Reaktion

10µl Probe +2,5µl rev Primer

5min 70°C erhitzen (RNA entknäult sich und Primer lagert sich an)

Dann bei 4°C auf Eis lagern.

Anschließend werden für jede Probe: 10µl RT Puffer, 1µl Sybre Green, 0,2µl RT, 5µl Probe.

Die Proben werden dann 20min bei 50°C inkubiert.

Im Light Cycler wird dann der forward Primer in den Glaskapillare vorgelegt und 19µl des Ansatzes hinzugefügt. Als negative Kontrolle wurde H₂O (RNase-free) verwendet.

Einstellung der RT-PCR Programme

1) Initialphase	Heißstart	95°C; 15min
2) Hauptphase	Denaturierung	96°C; 15s
	Primerbindung	57°C; 25s
	DNA-Synthese	72°C; 40s
3) Schmelzphase		94°C: 0s
		60°C; 15s
		95°C; 0s
4) Kühlung		38°C, 60s

Die Temperaturänderungsrate lag bei 20°C/s. Nur während des Schmelzprozesses wurde eine Änderung von 0,1°C/s verwendet.

3.18. Herstellung der Standards

Voraussetzung für die Quantifizierung über Standards ist, dass der Standard die Sequenz der Ziel-DNA in bekannter Konzentration enthält.

Für den β -Actin Standard wurde über eine Real-Time PCR das spezifische Amplifikat gewonnen, und photometrisch vermessen. Anschließend wurde dann die Kopiezahl in der Stammlösung berechnet und eine Verdünnung angesetzt.

Zur Generierung eines Standard für die absolute Quantifizierung der Friend Virus RNA wurde das Ziel-cDNA-Fragment in den pCRII-TOPO Vektor kloniert und dann mit dem AmpliScribe™ T7,T3 und SP6 High Yield transcription Kit *in vitro* inRNA transkribiert. Die Konzentration des RNA-Standards wurde mit dem RiboGreen® Quantitation Kit bestimmt und eine Verdünnungsreihe von 4×10^1 bis 4×10^9 RNA Kopien angesetzt.

3.19. Statistische Analyse

Die Ergebnisse werden zum Teil als Mittelwert und Standardabweichung dargestellt. Für Kontaktzeiten wurde der Median berechnet. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe Student'schen t-Tests für unverbundene Stichproben Die Mittelwerte zweier Stichproben gilt $p < 0,05$. als signifikant. Bei dem $\{^3\text{H}\}$ -Thymidin Proliferationstest wurde der ANOVA und Dunnett's Multiple Comparison Test angewendet.

4. Ergebnisse

4.1. Generierung und Charakterisierung von Dendritischen Zellen (DCs) aus murinen Knochenmark

Die Generierung von DCs aus murinem Knochenmarkstammzellen wurde nach der von INABA et al. (1992) beschriebenen Methode durchgeführt. Die Knochenmarkszellen wurden mit GM-CSF und IL-4 für sieben Tage kultiviert. Anschließend konnten die DCs für Versuche verwendet werden. In der Kultur wurde in diesem Zeitraum unter dem Mikroskop eine deutliche Veränderung der Zellmorphologie beobachtet. Aus einer homogenen Population von rundlichen Zellen wurden Zellen mit feinen, sternförmig ausgerichteten Zellausläufern, den so genannten Dendriten (siehe Abbildung 8). Diese Dendriten wurden im Verlauf einer 24-stündigen Aktivierung mit z.B. LPS oder Poly(I:C) länger. Zudem lösten sich die Zellaggregate aus unausgereiften DCs zunehmend in kleinere nicht adhärente Einzelzellen auf.

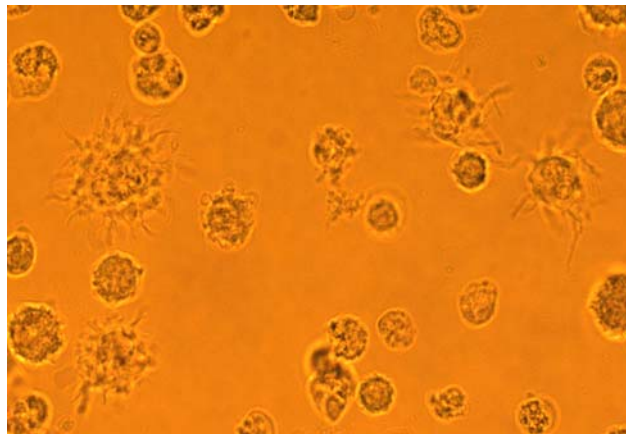


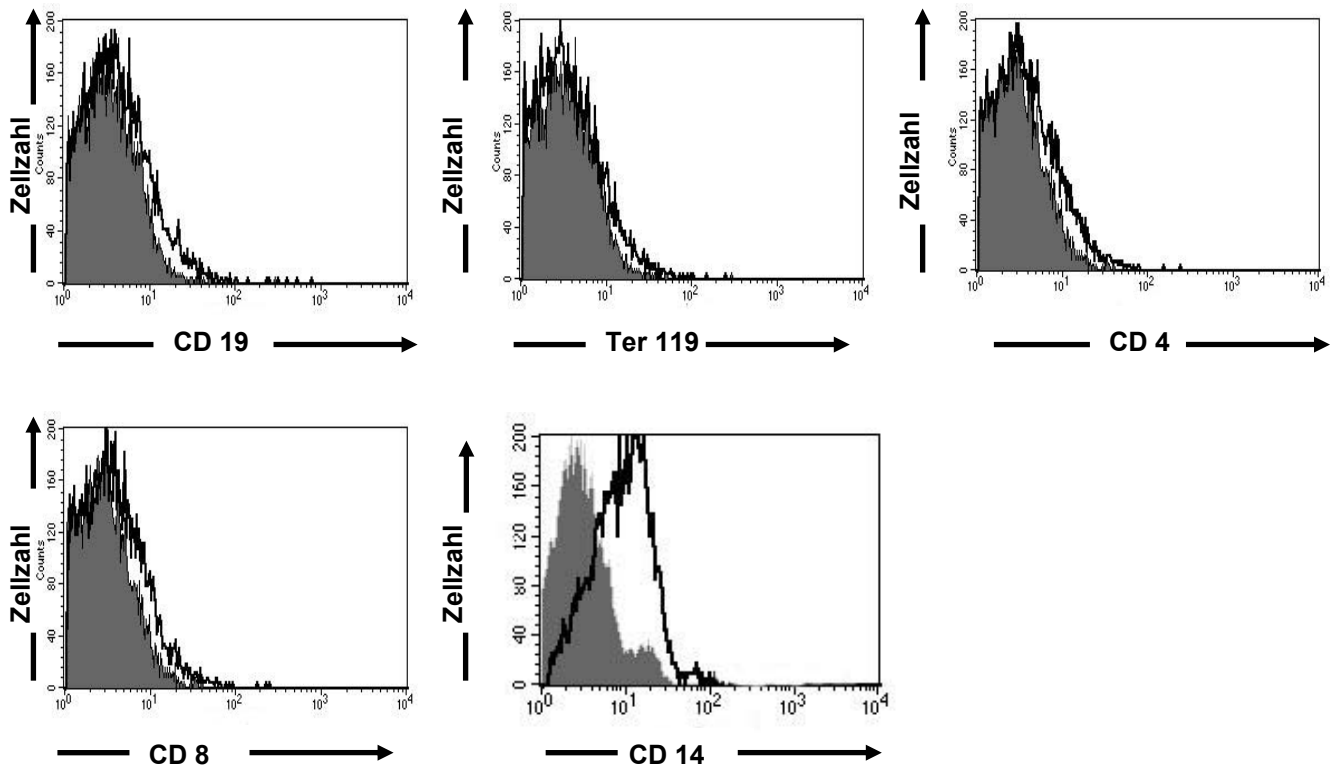
Abbildung 8: Unreife DCs nach sieben Tagen Kultur

Das Foto zeigt sieben Tage alte unreife murine Dendritische Zellen (Vergrößerung 100x).

4.2. Reinheitskontrolle von DC-Kulturen im Durchflusszytometer

Zur Reinheitskontrolle wurden 1×10^6 Zellen zur durchflußzytometrischen Messung nach sieben Tagen aus der Kultur entnommen. Um Zellen nachzuweisen, die möglicherweise die DC-Kultur verunreinigen, wurden die Proben mit verschiedenen Antikörpern gefärbt: Anti-CD4/8 für T-Zellen, Anti-CD19 für B-Zellen, Anti-Ter119 für Erythrozyten und Anti-CD14 für Monozyten. Dabei wurden die größten Verunreinigungen in den Kulturen erwartungsgemäß durch Monozyten (8-10%) verursacht, da Monozyten aus den gleichen Stammzellen wie DCs entstehen. Bei den anderen getesteten Zelltypen wurden nur geringe Verunreinigungen von 1-2% der Gesamtzellen gemessen.

Um zu bestimmen, wie viele Dendritische Zellen sich nach Kultur in Gegenwart von GM-CSF und IL-4 entwickelt haben, wurde der Anteil an Anti-CD11c⁺ Zellen in der DC-Kultur gemessen. Es konnte gezeigt werden, dass die Kultivierung muriner Knochenmarkvorläuferzellen mit GM-CSF und IL-4 nach sieben Tagen zu 60-70% CD11c⁺ DCs führte. Diese Zellen waren auch für den DC- Marker Anti-CD11b positiv. Somit gehörten die Zellen zu dem Subtyp der myeloiden DCs.



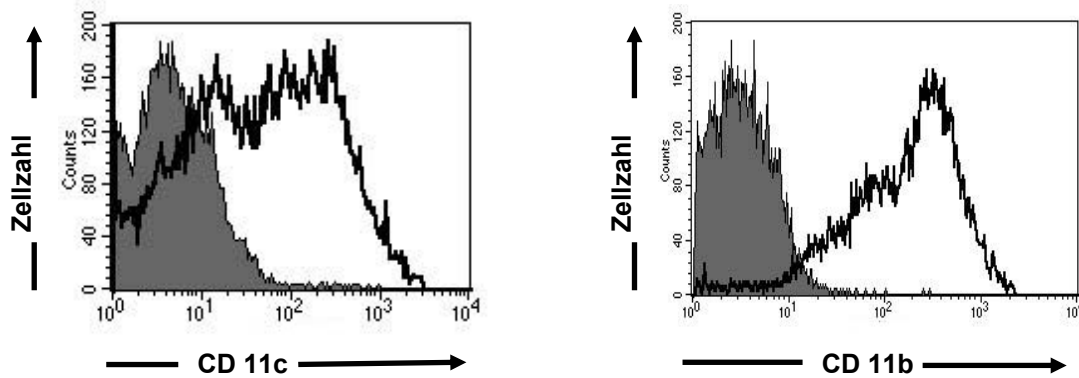


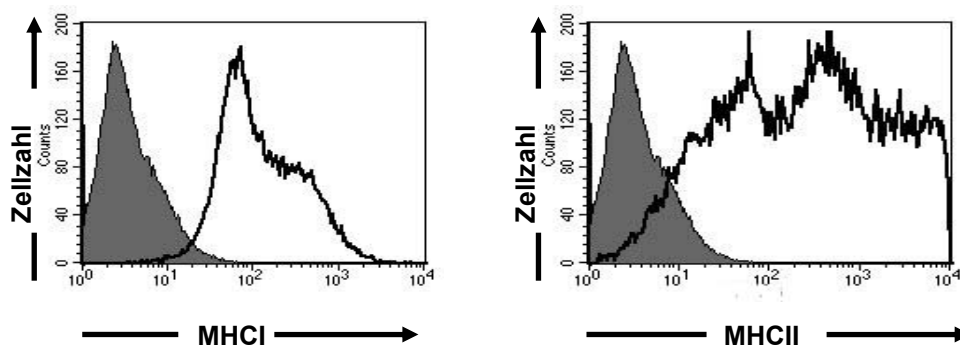
Abbildung 9: Nachweis von DCs und kontaminierenden Zellen in DC-Kulturen.

Zellen aus den DC-Kulturen wurden nach sieben Tagen für die Oberflächenmarker CD19, CD4, CD8, Ter119, CD14, CD11b und CD11c gefärbt. Die grauen Histogramme repräsentieren ungefärbte Zellen als Kontrolle. Ein repräsentatives Ergebnis aus zwei Experimenten ist gezeigt.

4.3. Expression von Oberflächenmolekülen auf unreifen Dendritischen Zellen

Eine phänotypische Charakterisierung der unreifen DCs erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Nach siebentägiger Kultivierung wurde die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80, CD86 und CD40, die wichtig für die Interaktion zwischen DCs und T-Zellen sind gemessen. Des Weiteren wurde die Anzahl der Antigen-präsentierenden Moleküle MHC I und MHC II bestimmt. Der Reifungsmarker CD83, dessen Funktion noch nicht genau bekannt ist, wurde ebenfalls bestimmt.

Wie in Abbildung 10 dargestellt, exprimierten die unreifen DCs eine große Anzahl von MHC I und MHC II Molekülen. Die Marker CD80, CD40, und CD83 wurden von den DCs in geringerer Anzahl exprimiert, CD86 wurde von unreifen DCs im Vergleich zu den anderen Markern am geringsten exprimiert.



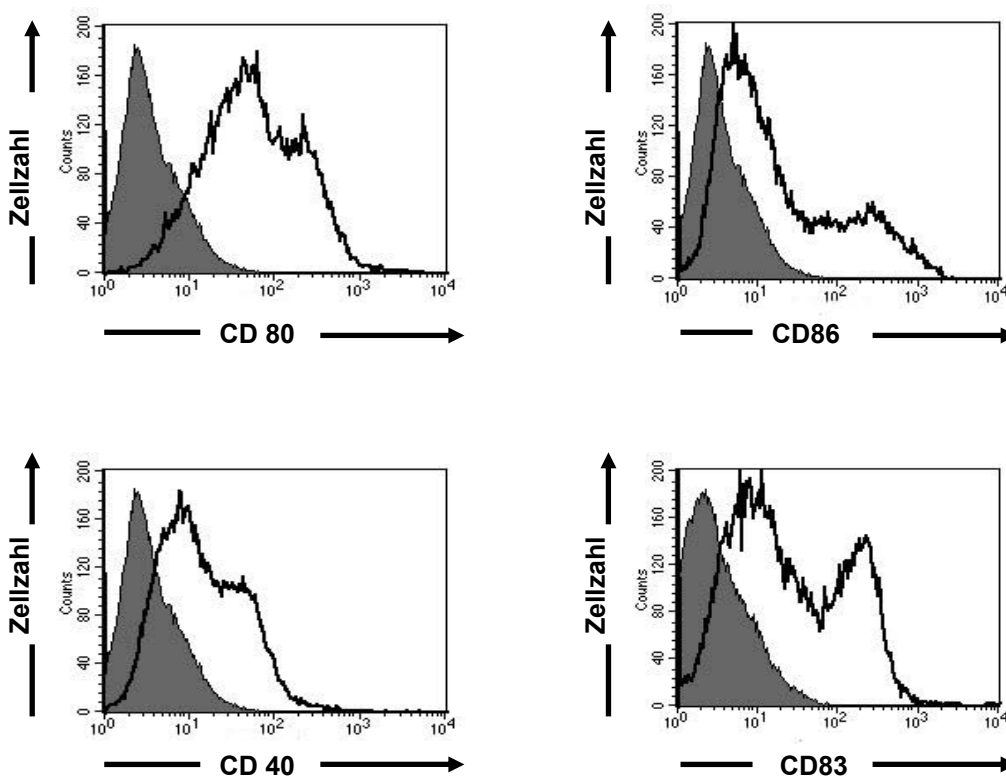


Abbildung 10: Expression von Oberflächenmarkern auf unreifen DCs

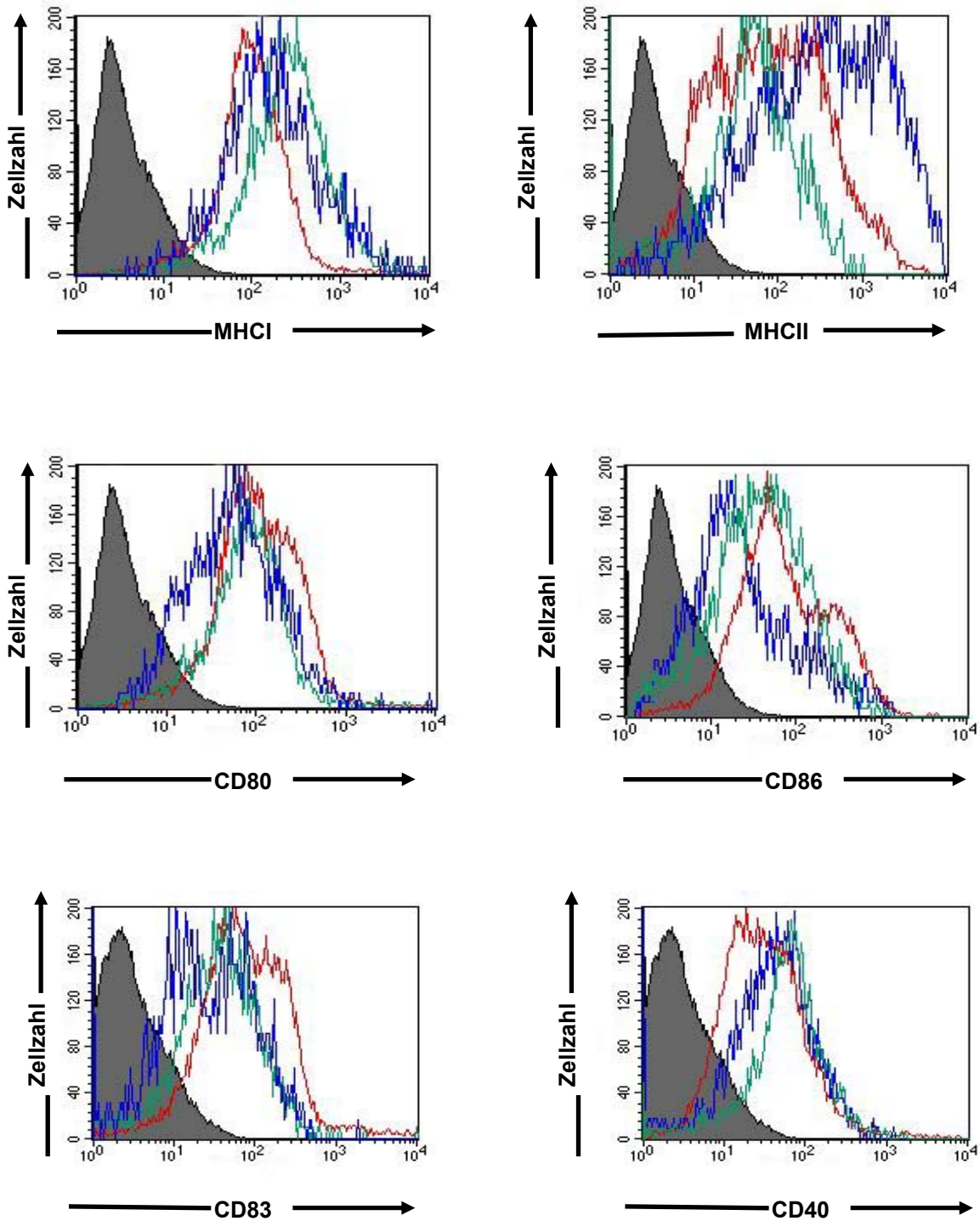
Die Oberflächenmarker MHC I, MHC II, CD 80, CD 86, CD 83 und CD 40 wurden auf unreifen DCs bestimmt. Die gefüllten Histogramme repräsentieren ungefärbte DCs als Kontrolle und die weißen Histogramme die Oberflächen-Färbung. Ein repräsentatives Ergebnis aus drei Experimenten ist gezeigt.

4.4. Oberflächenmarkerexpression von reifen DCs

Eine durchflusszytometrische Analyse charakteristischer Oberflächenmarker auf DCs erfolgte nach siebentägiger Kultur und anschließender 24-stündiger Aktivierung mit den Reifungsstimuli Poly(I:C), CpG 1826 und INF α .

Wie in Abbildung 11 dargestellt, hatten DCs, die ohne Reifungsstimulus kultiviert wurden, eine niedrige bis mittlere Expressionsdichte für die kostimulatorischen Moleküle CD 80, CD 86, CD 40 und den Reifungsmarker CD 83.

Bei allen drei untersuchten Reifungsstimuli konnte eine Expressionszunahme der untersuchten Oberflächenmarker gezeigt werden. Poly(I:C) erwies sich im Bezug auf die Expression von CD 80, CD 86 und CD 83 als potentester Stimulus. CpG 1826 stimulierte besonders gut die Expression von MHC I und CD 40, während INF α vor allem die MHC II Expression verstärkte.



Stimulation mit:

■ CpG 1826 6µg/ml ■ Poly(I:C) 100µg/ml ■ INFα 1000U/ml

Abbildung 11: Expression von Oberflächenmarkern auf reifen DCs

Die Oberflächenmarker MHC I, MHC II, CD80, CD86, CD83 und CD40 wurden auf reifen DCs bestimmt. Die gefüllten Histogramme repräsentieren ungefärbte DCs als Kontrolle.

Die verschiedenen Stimuli sind durch Linien in unterschiedlichen Färbungen grün CpG 1826, rot Poly(I:C) und blau INF α dargestellt. Ein repräsentatives Ergebnis aus zwei Experimenten ist gezeigt.

Die verwendeten Kulturbedingungen erwiesen sich somit als geeignet, um eine unreife dendritische Zellpopulation aus murinem Knochenmark zu generieren und diese im weiteren Verlauf der Kultur mit verschiedenen Stimuli zu reifen DCs zu differenzieren.

4.5. Generierung und Bestimmung von FV-infizierten DCs

4.5.1. Nachweis von FV-infizierten DCs mittels Antikörper 34

Für die Anzucht von infizierten DCs wurde von einer seit 10 Tagen FV-infizierten Balb/c-Maus das Knochenmark isoliert und daraus wurden nach dem Standardprotokoll (siehe Kapitel 3.5.3.) DCs angezüchtet. Der Anteil an infizierten DCs wurde mit Hilfe des Durchflusszytometers bestimmt. Für die Bestimmung von infizierten DCs wurde ein FV-spezifischer Antikörper (AK 34) (Siehe Kapitel 3.8.2.) eingesetzt. Dieser Antikörper erkennt an der Oberfläche von infizierten Zellen das glykolysierte FV Gag-Protein. Das Protein wird auf der Membran infizierter Zellen exprimiert, wenn das Virus in der Zelle repliziert.

Nach sieben Tagen wurden durchflusszytometrisch 20% infizierte DCs (siehe Abbildung 12B) durch das glykolysierte FV Gag-Protein detektiert. Bei DCs aus naiven Kontroll-Mäusen (siehe Abbildung 12A) ließen sich erwartungsgemäß keine infizierten Zellen anfärben.

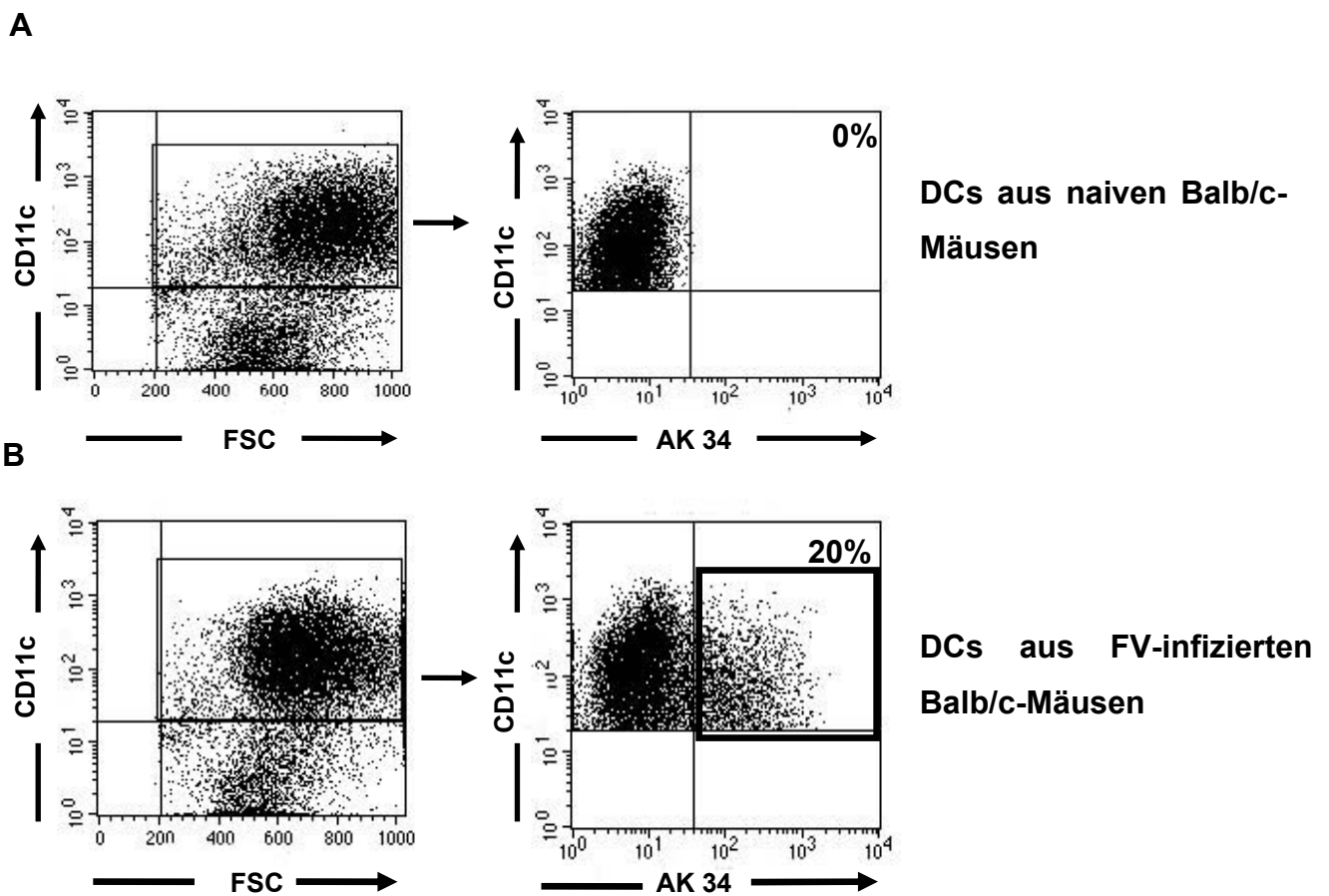


Abbildung 12: Nachweis von infizierten DCs mittels FV-spezifischem Antikörper (AK 34)

DCs aus uninfizierten (A) und FV-infizierten Mäusen wurden auf die Expression des glykolytierten FV Gag-Proteins untersucht. Abbildung B zeigt FV-infizierte DCs im oberen rechten Quadranten. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Experiment, welches mindestens 10fach mit fast identischen Ergebnissen wiederholt wurde.

Die verwendeten Kulturbedingungen erwiesen sich somit als geeignet, um unreife FV infizierte DCs *ex vivo* zu generieren.

4.5.2. Infektionsverlauf von FV-infizierten DCs in Kultur

Nach sieben Tagen Kultur von infiziertem Knochenmark aus Balb/c-Mäusen konnten mit GM-CSF und IL-4 ca. 20% infizierte DCs generiert werden. Nun sollte der Infektionsverlauf in einer solchen Kultur bis zum Tag 10 untersucht werden. Für die Bestimmung der FV-Infektion wurde der AK 34 verwendet (siehe Kapitel 3.8.2.). Nach dem siebten Tag kam es zu einem leichten Anstieg der Infektionsrate. Dies war bei allen Experimenten zu finden. Die höchste Infektionsrate wurde immer am Tag neun mit bis zu ca. 23% infizierten Zellen gemessen. Danach fiel die Infektionsrate

wieder auf ca. 20% ab. Dieses Ergebnis zeigt, dass sich die Infektionsrate der DCs in der Kultur über einen Zeitraum von drei Tagen nur wenig verändert.

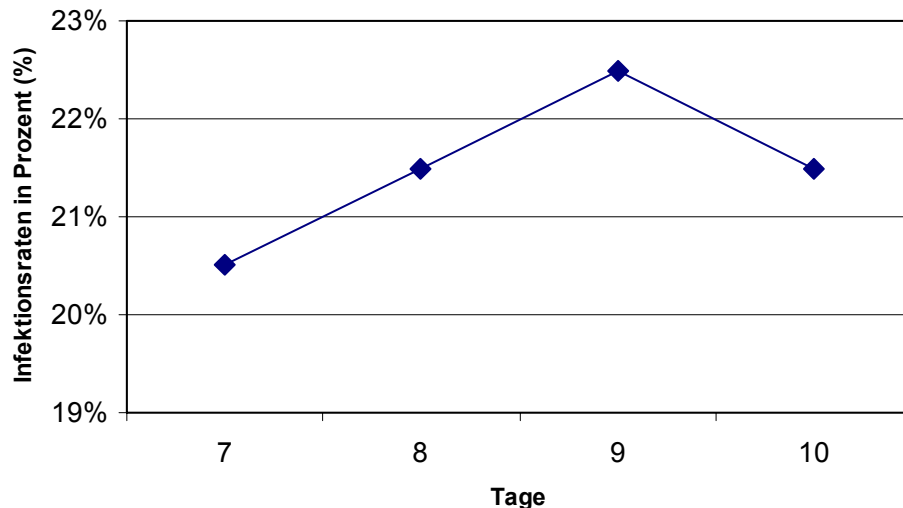


Abbildung 13: Infektionsraten von DCs in Kultur zu verschiedenen Zeitpunkten

Infizierte DCs wurden aus einer vor 10 Tagen infizierten Balb/c-Maus angezüchtet. Nach sieben, acht, neun und zehn Tagen wurde die Infektionsrate mit dem AK 34 im FACS bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte in Prozent von insgesamt drei unabhängigen Experimenten.

4.5.3. Infektionsraten von DCs bei unterschiedlichen Mausstämmen

Ob ein Mausstamm nach der Infektion mit dem FV eine maligne Erythroleukämie entwickelt (suszeptibler Mausstamm) oder das Virus nach einer vorübergehenden Splenomegalie vom Immunsystem kontrolliert werden kann (resistenter Mausstamm), ist abhängig von der Virusdosis und dem genetischen Hintergrund der infizierten Maus (siehe auch Kapitel 1.7.). Aus den zwei suszeptiblen Balb/c, Y10A und den zwei resistenten Mausstämmen Y10 und C57BL/6 sollten infizierte DCs angezüchtet werden. Dazu wurden die unterschiedlichen Mausstämme mit FV infiziert und nach 10 Tagen das Knochenmark isoliert. Aus dem infizierten Knochenmark wurden dann nach dem Standardprotokoll infizierte DCs angezüchtet (siehe auch Kapitel 3.5.3. und 3.5.5.). Nach sieben Tagen Kultur wurde die Infektion der DCs mit dem AK 34 im FACS bestimmt. Dabei zeigte sich, dass aus den suszeptiblen Mausstämmen Balb/c und Y10A mehr infizierte DCs generiert werden konnten als aus den resistenten Mausstämmen Y10 und C57BL/6. Der Unterschied in der Ausbeute zwischen suszeptiblen und resistenten Mäusen war allerdings nur gering. Der größte Unterschied betrug bei den resistenten C57BL/6 Mäusen 12,1% gegenüber 20,8%

bzw. 20,4% bei den suszeptiblen Mausstämmen Balb/c und Y10A (siehe Tabelle 17). Es bestand also eine Korrelation zwischen der Suszeptibilität gegen das FV und der Anzahl der infizierten DCs, die aus einer Maus generiert werden können (siehe Kapitel 1.8.).

Tabelle 17: Anzahl von infizierten DCs in verschiedenen Mausstämmen

Mausstämme	Infizierte DCs (%)¹	Immunstatus gegen FV
Balb/c	20,8% (n=8)	Suszeptibel
Y10A	20,4% (n=5)	suszeptibel
Y10	16,2% (n=2)	Resistent
C57BL/6	12,1% (n=5)	resistent

¹ Mittelwert aus der angegebenen Anzahl von unabhängigen Experimenten

4.5.4. Elektronenmikroskopischer Nachweis von Virus-Partikeln in FV-infizierten DCs

Um optisch zu zeigen, dass virale Partikel in infizierten DCs gebildet werden, wurden uninfizierte DCs und infizierte DCs für die Elektronenmikroskopie isoliert (siehe Kapitel 3.10.). Die elektronenmikroskopische Aufnahme zeigt Abbildung 14. Dargestellt sind infizierte DCs mit viralen Partikeln im Zytoplasma.

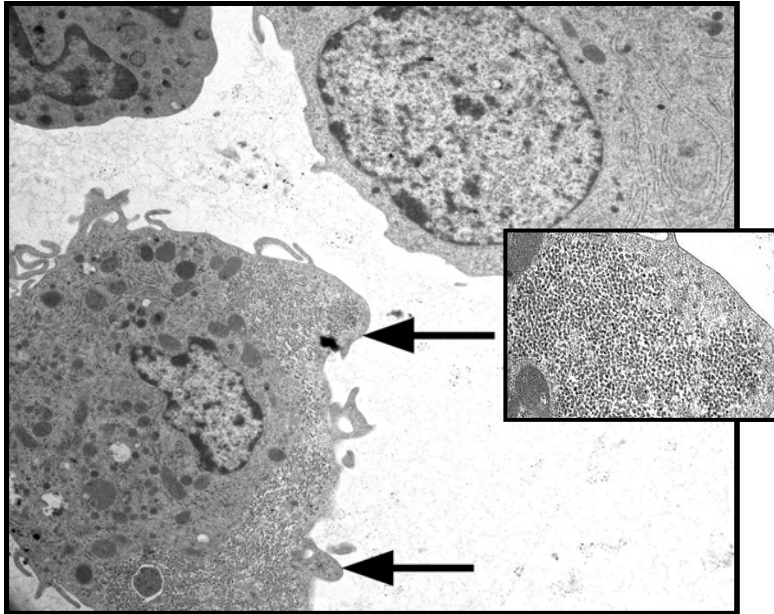


Abbildung 14: Elektronenmikroskopische Aufnahme von FV-infizierten DCs

Auf dem EM-Bild sieht man uninfizierte und infizierte DCs. Die Viruspartikel sind als schwarze Punkte im Cytoplasma zu erkennen (Vergrößerungsfaktor x3800).

4.5.5. Infections Center Assay (IC) zum Nachweis von FV-infizierten DCs

Infizierte DCs wurden im FACS und Elektronenmikroskop nachgewiesen. Nun sollte *in vitro* getestet werden, ob sich das FV über Zell-Zellkontakt von den DCs auf andere Zellen überträgt. Als Indikatorzelllinie wurden *Mus dunni* Zellen im „Infectious Center Assay“ verwendet (siehe Kapitel 3.11.). Für den Test wurden uninfizierte und infizierte DCs aus Balb/c-Maus angezüchtet (siehe Kapitel 3.5.3.) und mit CD11c⁺ Beads (siehe Kapitel 3.6.) mit einer Reinheit von ca. 99% aufgereinigt (siehe Abbildung 16A). Diese DCs wurden titriert und mit *Mus dunni* Zellen koinkubiert. Wenn infizierte DCs durch Zell-Zellkontakt das FV an *Mus dunni* Zellen weitergeben, entstehen Foci (Abbildung 15B). Bei uninfizierten DCs ließen sich erwartungsgemäß keine Foci nachweisen. Dagegen wurden im Mittel 23×10^4 infizierte DCs bei einer Gesamtzahl von 1×10^5 DCs (23%) ermittelt. Somit konnte gezeigt werden, dass infizierte DCs über Zell-Zellkontakt das FV *in vitro* übertragen.

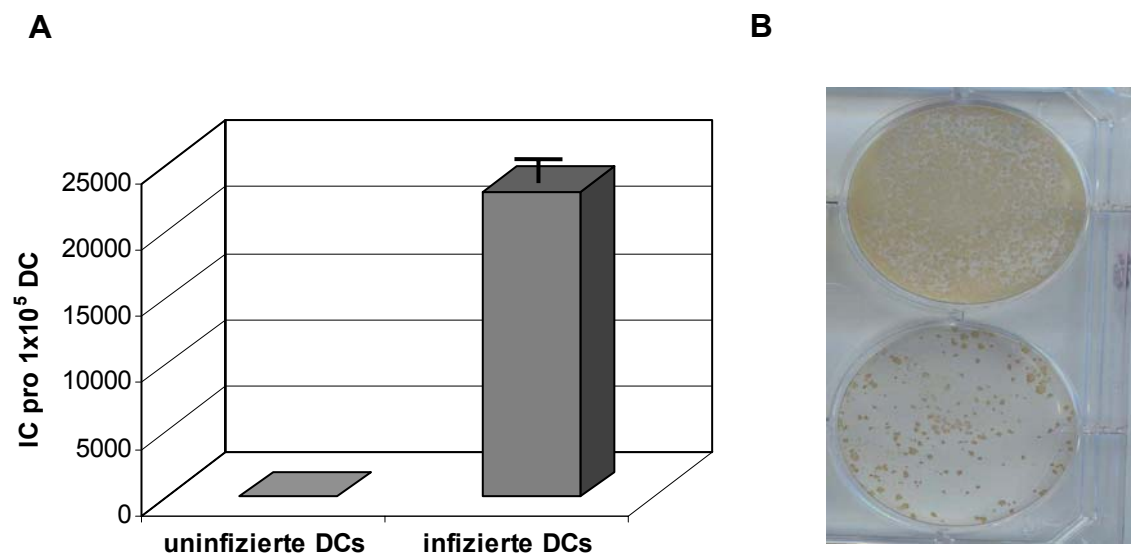


Abbildung 15: Nachweis von FV-infizierten DCs im Infections Center Assay

Infizierte DCs wurden aus einer vor 10 Tagen infizierten Balb/c-Maus angezüchtet und die Übertragung von FV im Infections Center-Assay untersucht (A). Uninfizierte DCs dienen als Negativ-Kontrolle. Bild B zeigt einen Ausschnitt von einer 6-well Platte mit Virus-Foci. Dieses Experiment wurde zweimal wiederholt. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichung aus zwei Versuchen.

4.5.6. RT-PCR zum quantitativen Nachweis viraler RNA in infizierten DCs

Der Nachweis von FV in infizierten Zellen mittels RT-PCR wurde von STROMMES et al. (2002) beschrieben. Für die quantitative Bestimmung der FV-Infektion in DCs wurden DCs aus uninfizierten und infizierten Balb/c-Maus angezüchtet. Nach sieben Tagen wurden die DCs mittels $CD11c^+$ Beads (siehe Kapitel 3.6.) aufgereinigt, so dass $CD11c^+$ Zellen mit einer Reinheit von ca. 99% vorlagen (siehe Abbildung 16A). Aus diesen Zellen wurde die RNA isoliert (siehe Kapitel 3.17.) und die FV-Kopien pro DC mit der Two Step PCR (siehe Kapitel 3.17.4.) bestimmt. In uninfizierten DCs wurden keine FV-Kopien gefunden. Bei infizierten DCs wurden dagegen 700 FV-Kopien pro DC nachgewiesen.

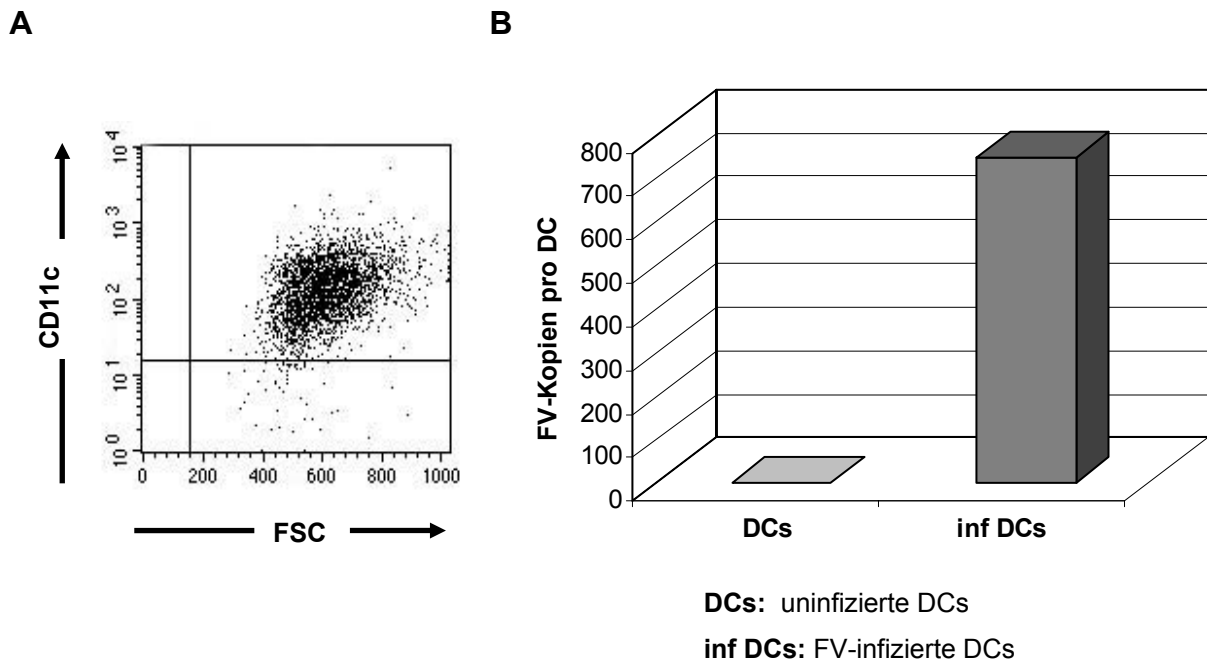


Abbildung 16: Quantitative Bestimmung der FV-Infektion in DCs

Uninfizierte und infizierte DCs wurden mit CD11c⁺ Beads (A) aufgereinigt und anschließend die virale RNA mit Hilfe der RT-PCR (B) quantitativ bestimmt. Die Ergebnisse wurden in einem weiteren Experiment bestätigt.

4.5.7. Transfer von FV durch infizierte DCs *in vivo*

In vitro konnte gezeigt werden, dass infizierte DCs FV auf die Indikatorzelllinie *Mus Dunningi* übertragen können (siehe Kapitel 4.5.5.). Nun sollte untersucht werden, ob sich das Virus auch *in vivo* übertragen lässt und infizierte DCs eine Leukämie in suszeptiblen Mäusen auslösen können. Dafür wurde eine Balb/c-Maus mit FV infiziert. 10 Tage nach den Infektion wurde das Knochenmark isoliert und aus diesem infizierte DCs generiert. Als Kontrolle wurden DCs aus einer naiven Balb/c-Maus generiert. Für den Transfer wurden die infizierten und uninfizierten DCs mit CD11c⁺ Beads aufgereinigt. Die CD11c⁺ Zellen liegen mit einer Reinheit von ca. 99% vor (siehe Abbildung 16A). Von diesen aufgereinigten Zellen wurden dann $1,5 \times 10^6$ DCs i.v. in naive Balb/c-Mäuse injiziert. Bei den Mäusen wurde anschließend wöchentlich die Milzgröße palpiert (siehe Tabelle 18). Dabei zeigte sich, dass bei der Maus, die die infizierten DCs erhalten hatte, eine Vergrößerung der Milzgröße ab der Woche zwei nach Infektion festzustellen war. Bei der Kontrollmaus blieb die Milzgröße unverändert. In der dritten Woche wurden die Mäuse getötet und die Milzgewichte dokumentiert. Die Kontroll-Maus hatte ein normales Milzgewicht von 0,18g

(Abbildung 17A), die Maus mit den infizierten DCs hatte dagegen ein Milzgewicht von 4,07g (Abbildung 17B). Damit wurde gezeigt, dass infizierte DCs das FV *in vivo* übertragen und eine Leukämie auslösen können.

Tabelle 18: Milzgrößen (siehe Kapitel 1.8. und Abbildung 3)

DCs aus	1. Woche	2. Woche	3. Woche
Naive Balb/c	1	1	1
Infizierte Balb/c	1	1-2	4

Milzgrößen:

Naive Milz 1: 0,1g-0,2g

Infizierte Milz siehe Einteilung

Kapitel 1.8. und Abbildung 3

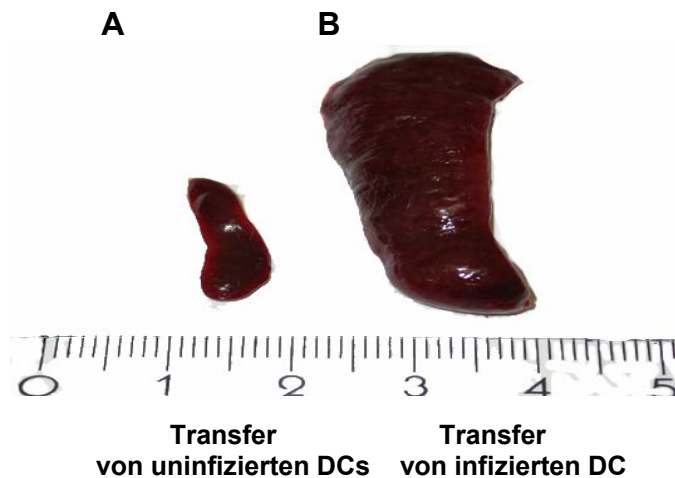


Abbildung 17: Transfer von FV-infizierten DCs in naive Balb/c Mäuse

Uninfizierte DCs und infizierte DCs wurden i.v. in eine naive Balb/c Maus injiziert. Bild A zeigt eine naive Milz (Milzgewicht 0,18g) einer Balb/c-Maus nach Injektion von uninfizierten DCs und Bild B zeigt eine infizierte Milz (Milzgewicht 4,07g), einer Balb/c-Maus nach Injektion von infizierten DCs (siehe auch Abbildung 3). Dieses Experiment wurde einmal mit demselben Ergebnis wiederholt.

4.5.8. FV-Infektion von DCs *in vivo*

In kultivierten DCs aus FV-infizierten Balb/c Mäusen konnten infizierte DCs angezüchtet und mit dem AK 34 nachgewiesen werden. Nun sollte *ex vivo* bei infizierten Balb/c Mäusen, die akut an einer Leukämie erkrankt waren, die Infektionsrate von DCs in der Milz bestimmt werden. Dazu wurden Balb/c-Mäuse mit FV infiziert und 10 Tage nach der Infektion die Milz entnommen. Als Kontrolle dienten die Milzen uninfizierter Mäuse. Aus den Milzen wurden die DCs isoliert, nach dem bei VREMEC et al (1992) beschriebenen Verfahren isoliert (siehe Kapitel 3.7.) und anschließend im FACS analysiert. Dabei wurden in der Milz uninfizierter Mäuse keine infizierten DCs detektiert (Abbildung 18A). In den Milzen infizierter Mäuse konnten dagegen durchschnittlich 20% der CD11c⁺ DCs mit dem AK 34 gefärbt werden (Abbildung 18B). Diese FV-infizierten DCs wurden auf Grund ihrer Oberflächenmarker (CD11c⁺, CD11b⁺) als myeloide DCs charakterisiert. Die Infektionsrate von DCs in FV-infizierten Mäusen deckt sich damit exakt mit der Infektionsrate von in der Zellkultur generierten DCs aus infizierten Tieren.

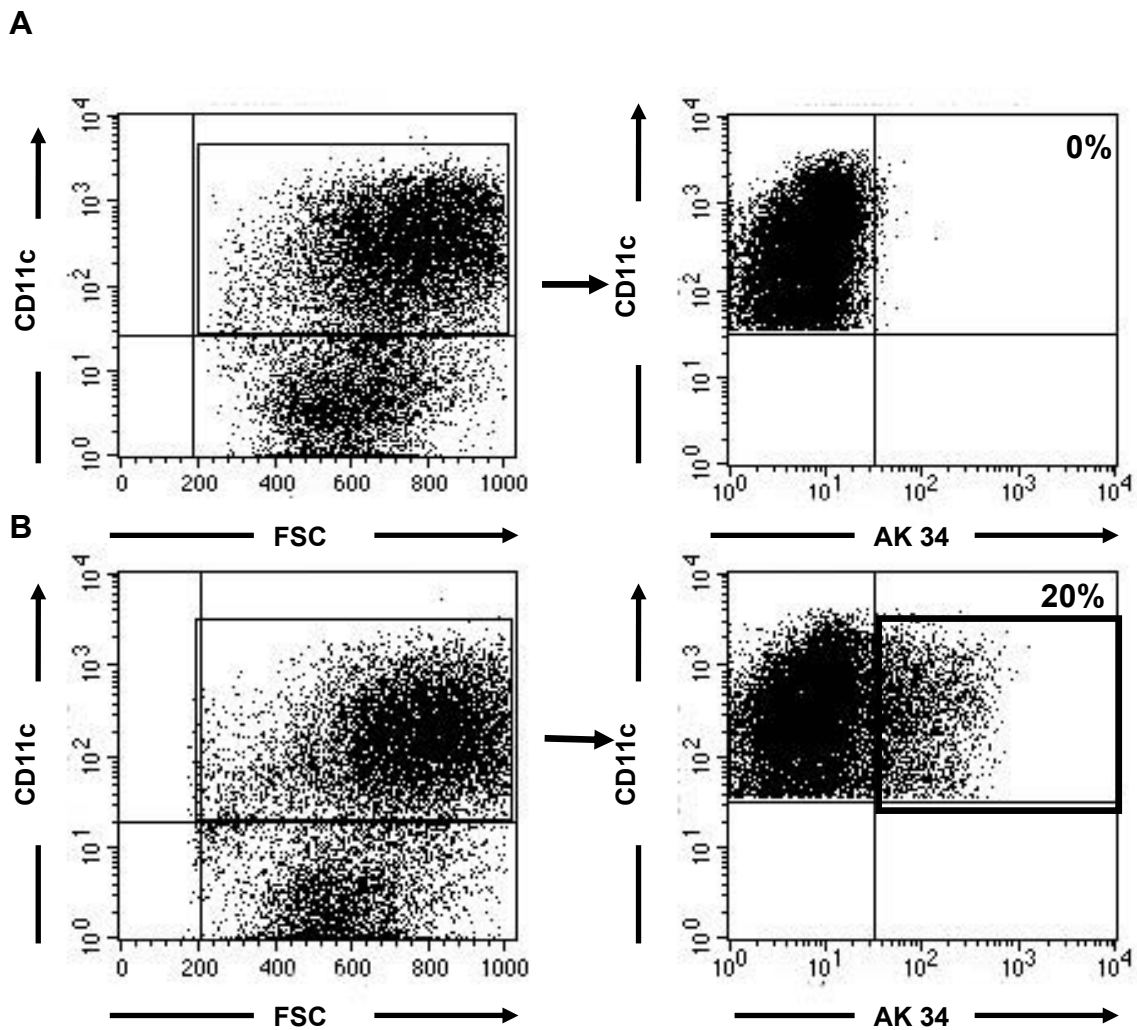


Abbildung 18: Nachweis von FV-infizierten DCs *ex vivo*

Aus einer 10 Tage infizierten Balb/c Maus wurden DCs *ex vivo* isoliert und mit dem AK 34 im FACS auf infizierte DCs untersucht. Untersucht wurden nur myeloide DCs, die CD11c⁺ und CD11b⁺ waren. Abbildung B zeigt FV-infizierte DCs im oberen rechten Quadranten. Eine uninfizierte Maus (A) diente als Kontrolle. Dieses Experiment wurde einmal mit demselben Ergebnis wiederholt.

4.6. FV-Infektion von plasmazytoiden DCs

4.6.1. Keine FV-Infektion von pDCs *in vivo*

DCs lassen sich in verschiedene Subpopulationen unterteilen (siehe Kapitel 1.9.1.). Plasmazytoide DCs (pDCs) sind eine sehr kleine Population bei Säugetieren und konnten in verschiedenen lymphoiden und nicht-lymphoiden Organen wie z.B. Knochenmark, Thymus, Milz, Lymphknoten, Blut oder Leber identifiziert werden.

Es sollte nun untersucht werden, ob FV in der Lage ist, nicht nur myeloide sondern auch pDCs zu infizieren. Zu diesem Zweck wurden pDCs aus der Milz einer Balb/c Maus 10 Tage nach der Infektion isoliert (siehe Kapitel 3.7.). Die pDCs wurden mit

einem spezifischen Antikörper gegen pDC (Anti-mPDCA) von der Firma Miltenyi Biotec angefärbt. Um zu analysieren, ob die pDCs infiziert sind, wurden sie gleichzeitig mit dem AK 34 auf die Expression des glykolysierten FV Gag-Proteins untersucht. Wie in der Abbildung 19 ersichtlich, konnten 0,7% pDC pro PBMC bestimmt werden. Es wurden aber keine infizierten Zellen detektiert.

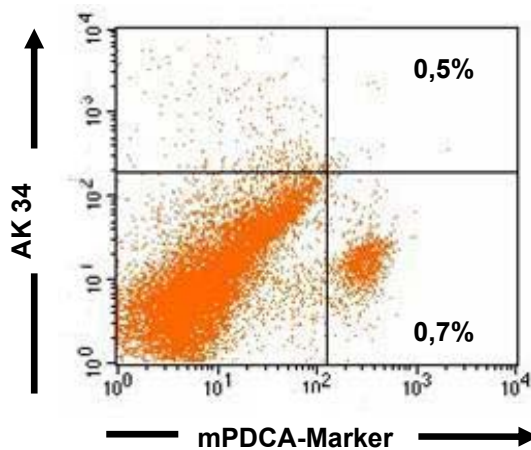


Abbildung 19: Kein Nachweis von FV-infizierten pDCs
Aus einer FV-infizierten Balb/c Maus wurden nach 10 Tagen die pDCs isoliert und mit einem spezifischen mPDCA-Marker der Firma Miltenyi angefärbt. Um eine FV-Infektion von pDCs festzustellen, wurden diese gleichzeitig mit AK 34 angefärbt. Dieses Ergebnis wurde in einem weiteren Versuch bestätigt.

4.6.2. Infektion von pDCs mit FV *in vitro*

In vivo ließen sich keine infizierten pDCs in der Milz nachweisen. Deswegen wurde versucht, wie bei den myeloiden DCs (Kapitel 3.5.5.), infizierte pDCs in Kultur anzuzüchten. Aus CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen lassen sich durch Zugabe von Flt3-Ligand pDCs generieren (BLOM et al., 2000). Dieses Protokoll wurde verwendet, um aus Knochenmark von Balb/c Mäusen pDCs anzuzüchten (siehe Kapitel 3.5.4.). Um die *in vitro* angezüchteten pDCs im FACS zu analysieren, konnte der spezifische anti-mPDCA-Marker von Miltenyi nicht eingesetzt werden, da der Marker auf kultivierten Zellen offensichtlich nicht exprimiert wird. Somit musste der pDC Marker CD45R eingesetzt werden. Als pDCs wurden Zellen definiert, die CD11c^{low}, CD11b⁻ und CD45R⁺ (B220) waren (COLONNA et al., 2004). Nach 10 Tagen ließen sich in der Kultur im Mittel ca. 14% pDCs (Abbildung 20A) der Gesamtkulturzellen bestimmen. Um zu analysieren, ob die pDCs *in vitro* infiziert waren, wurden sie gleichzeitig mit dem AK 34 auf die Expression des glykolysierten FV Gag-Protein untersucht. Die pDCs die aus der Kultur von FV-infizierten Balb/c Mäusen angezüchtet wurden, zeigten geringe Infektionsraten von 2,5% der Gesamtkulturzellen (Abbildung 20B). Bei pDCs aus naiven Kontroll-Mäusen wurde erwartungsgemäß keine FV-Infektion detektiert.

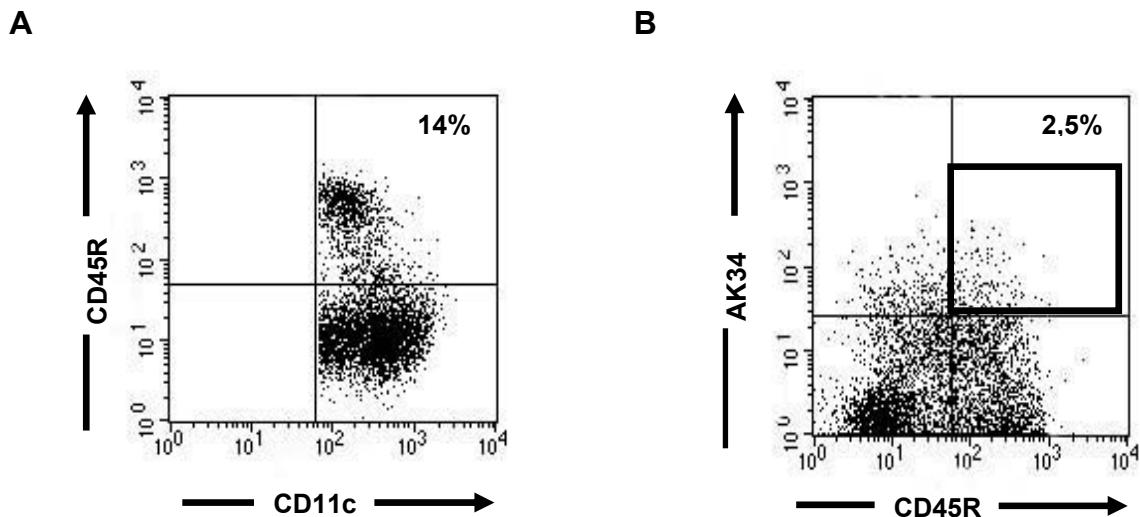


Abbildung 20: FV-Infektion von pDCs *in vitro*

In Bild A sind pDCs (CD11c^{low} und CD11b⁻) aus der Kulturen von Balb/c Mäusen abgebildet. Diese wurden mit dem Marker CD45R (B220) angefärbt und waren damit als pDCs eindeutig zu erkennen. Abbildung B zeigt FV-infizierte pDCs (CD45R) im oberen rechten Quadranten, die mit Hilfe des AK 34 detektiert wurden. Dieses Experiment wurde einmal mit demselben Ergebnis wiederholt.

Da *in vivo* keine und auch *in vitro* nur eine sehr geringe FV Infektion von pDCs gefunden wurden, konzentrierten sich die weiteren Versuche auf Untersuchungen von myeloiden DCs.

4.7. Phänotyp von FV-infizierten myeloiden DCs

4.7.1. FV verändert die Expression von Oberflächenmolekülen auf DCs

Es konnte gezeigt werden, dass DCs produktiv mit FV infiziert sind. *In vitro* und *in vivo* konnten ca. 20% infizierte myeloide DCs detektiert werden. Nun sollte analysiert werden, welche Auswirkung die FV-Infektion auf die Expression von Oberflächenmolekülen bei DCs hat. Dazu wurden Balb/c-Mäuse mit FV infiziert und 10 Tage nach Infektion das Knochenmark entnommen und infizierte DCs angezüchtet (siehe Kapitel 3.5.5.). Nach sieben Tagen wurde die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80, CD86 und CD40 der Antigen-präsentierenden Molekülen MHC I und MHC II und des Reifungsmarkers CD83 auf infizierten DCs analysiert. Dabei wurde im Durchflusszytometer auf CD11c⁺ DCs gated. Um die infizierten DCs zu detektieren, wurden sie mit dem spezifischen AK 34 (siehe Kapitel 3.8.2.) angefärbt. Als Kontrolle dienten uninfizierte DCs aus derselben DC-Kultur. 15-40% der uninfizierten DCs exprimierten die Oberflächenmoleküle CD80, CD86 und

CD40, während weniger als 4% der infizierten DCs diese Moleküle exprimierten (siehe Abbildung 21). Der Reifungsmarker CD83 wurde von 34% der uninfizierten DCs exprimiert, dagegen wurde der Marker auf infizierten DCs so gut wie gar nicht gefunden. Bei den Antigenpräsentierenden Molekülen MHCI und MHCII wurden keine Unterschiede in der Expression zwischen uninfizierten und infizierten DCs festgestellt.

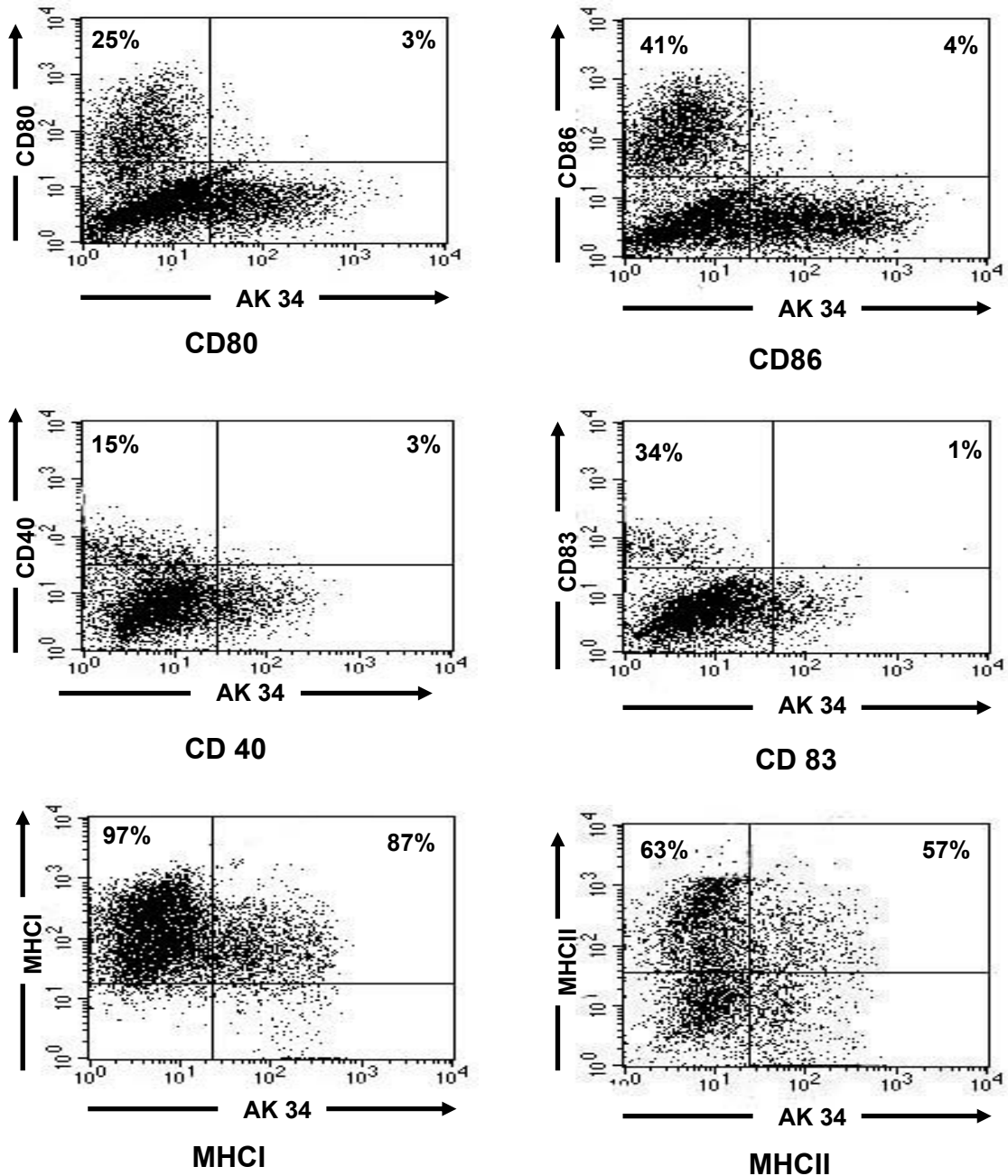


Abbildung 21: Expression von kostimulatorischen und Antigen-präsentierenden Molekülen auf FV-infizierten DCs

Myeloide DCs wurden aus dem Knochenmark FV-infizierter Balb/c Mäuse generiert, um die Expression von Oberflächenmarkern zu analysieren. CD11c⁺ DCs wurden gegatet und die infizierten DCs wurden mit dem AK 34 angefärbt. Es wurden folgende Marker CD80, CD86, CD40 (kostimulatorische Moleküle), CD83 (Reifungsmarker), MHCI und MHCII (Antigen-präsentierende Moleküle) analysiert. Die infizierten DCs befinden sich in den rechten Quadranten und die uninfizierten in den linken Quadranten der einzelnen FACS-Abbildungen. Die Prozentzahlen geben die Expression der unterschiedlichen Oberflächenmarker auf uninfizierten und infizierten DCs an. Ein repräsentatives Ergebnis aus drei Experimenten ist gezeigt.

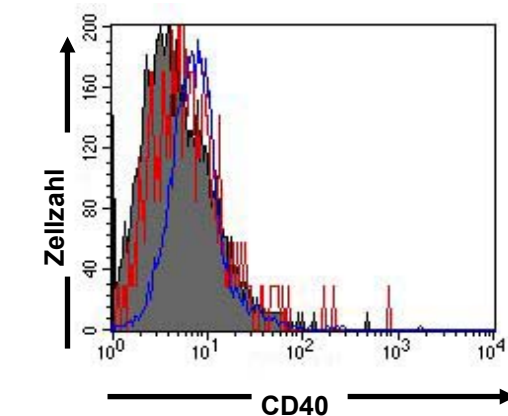
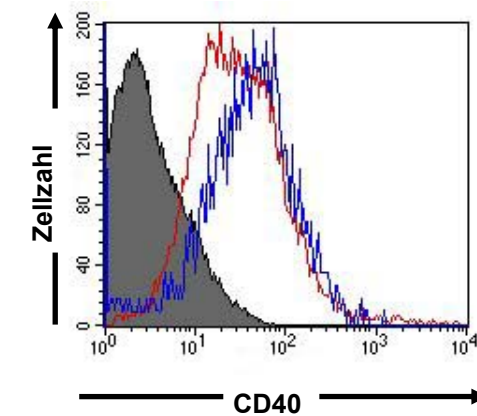
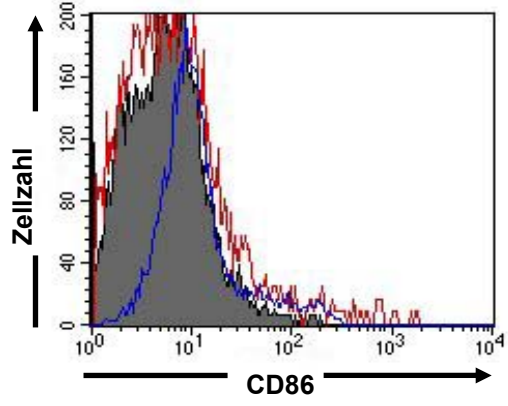
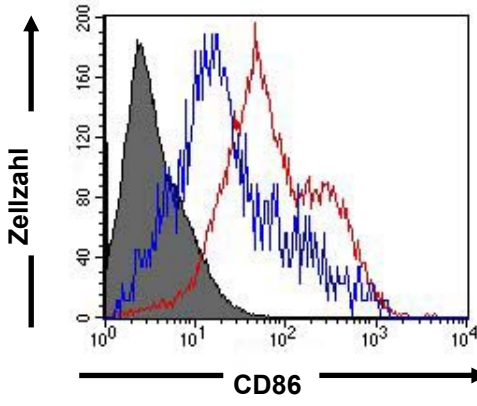
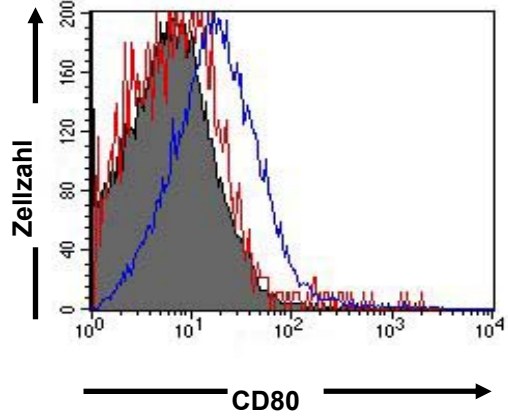
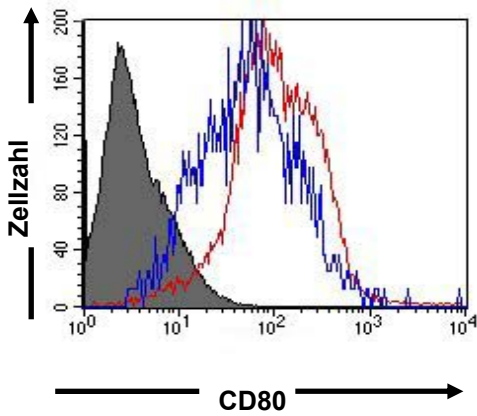
4.7.2. Stimulation von FV-infizierten DCs mit Poly(I:C) und INF α

Unreife infizierte DCs exprimieren kaum kostimulatorische Moleküle CD80, CD86, und CD40. Diese Oberflächenmarker sind aber wichtig für die Interaktion zwischen DC und T-Zellen (INABA et al., 1994, LARSEN et al., 1994). Im folgenden Experiment sollte untersucht werden, ob sich die infizierten DCs durch exogene Stimuli ausreifen lassen und die Expression kostimulatorischer Moleküle so induziert werden kann. Als Stimuli wurden Poly(I:C) (TLR-3 ligand) und INF α verwendet, da diese beiden Faktoren bei der FV-Infektion *in vivo* eine Rolle spielen (GERLACH et al., 2006, ABUJAMRA et al., 2006).

Dazu wurde aus FV infizierten Mäusen das Knochenmark isoliert und infizierte DCs angezüchtet (siehe Kapitel 3.5.3. und 3.5.5.). Als Kontrolle wurden aus uninfizierten Balb/c Mäusen DCs angezüchtet. Am siebten Tag der Kultur wurden die unreifen uninfizierten und infizierten DCs mit Poly(I:C) oder INF α über 24 Stunden stimuliert. Dabei zeigte sich das die kostimulatorischen Marker auf uninfizierten DCs nach Stimulation vermehrt exprimiert wurden. Die DCs reiften also aus. Dagegen wurde nach Stimulation mit Poly(I:C) und INF α so gut wie keine Expression der kostimulatorischen Marker auf infizierten DCs gemessen (siehe Abbildung 22). Ausnahme war das CD80 Molekül, bei dem eine leichte Expression nach Stimulation mit Poly(I:C) im FACS gemessen wurde. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass ein Reifungsdefekt bei den infizierten DCs vorlag.

uninfizierte DCs

FV-infizierte DCs



Stimulation mit:

■ Poly(I:C) 100µg/ml
 ■ INFα 1000U/ml

Abbildung 22: Expression von kostimulatorischen Molekülen nach Stimulation von FV-infizierten DCs

Myeloide DCs wurden aus Knochenmark FV-infizierter Balb/c Mäuse generiert, um die Expression von Oberflächenmarkern nach Stimulation mit Poly(I:C) 100µg/ml und INFα 1000U/ml zu analysieren. CD11c⁺ DCs wurden gegatet und die infizierten DCs wurden mit dem AK 34 angefärbt. Es wurden folgende kostimulatorische Moleküle analysiert: CD80, CD86 und CD40. Die gefüllten Histogramme repräsentieren ungefärbte DCs als Kontrolle. Die verschiedenen Stimuli sind durch Linien in unterschiedlichen Farben dargestellt; rot Poly(I:C) und blau INFα. Dargestellt in den Histogrammen ist die Fluoreszenzintensität der einzelnen Färbungen. Ein repräsentatives Ergebnis aus zwei Experimenten ist gezeigt.

4.7.3. Endozytose-Aktivität FV-infizierter DCs

DCs sind in der Lage, u.a. durch Endozytose lösliche Antigene aus ihrer Umgebung aufzunehmen. Diese aufgenommenen Antigene werden dann durch Proteasomen prozessiert und über MHC Moleküle den T-Zellen präsentiert. Durchflusszytometrisch läßt sich die Endozytose-Aktivität und Antigen-prozessierung der DCs durch die Aufnahme von FITC-markiertem OVA nachweisen und quantifizieren. Dieses FITC-markierte OVA läßt sich erst im FACS detektieren, wenn es im Proteasom prozessiert worden ist.

Infizierte und uninfizierte DCs wurden nach siebentätiger Kultur auf die Aufnahme und Prozessierung von FITC-OVA untersucht. Als negative Kontrolle wurden DCs bei 0°C mit FITC-OVA inkubiert.

Wie in Abbildung 23 dargestellt, gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen uninfizierten und infizierten DCs in der Aufnahme und Prozessierung von Antigenen. Nach 1h Inkubation mit FITC-OVA, nahmen 54% der uninfizierten DCs und 59% der infizierte DCs das FITC-OVA auf und prozessierten es im Proteasom. Nach 2,5h nahmen 61% der uninfizierten DCs und 74% der infizierten DCs das FITC-OVA auf. Auch zu diesem Zeitpunkt bestand kein Unterschied in der Aufnahme und Verarbeitung des FITC-OVA in uninfizierten und infizierten DCs. Bei den bei 0°C inkubierten Kontrollen wurde dagegen, nur eine geringe Aufnahme und Verarbeitung des FITC-OVA gemessen. Sowohl uninfizierte als auch infizierte DCs zeigten somit eine ausgeprägte Endozytoseaktivität.

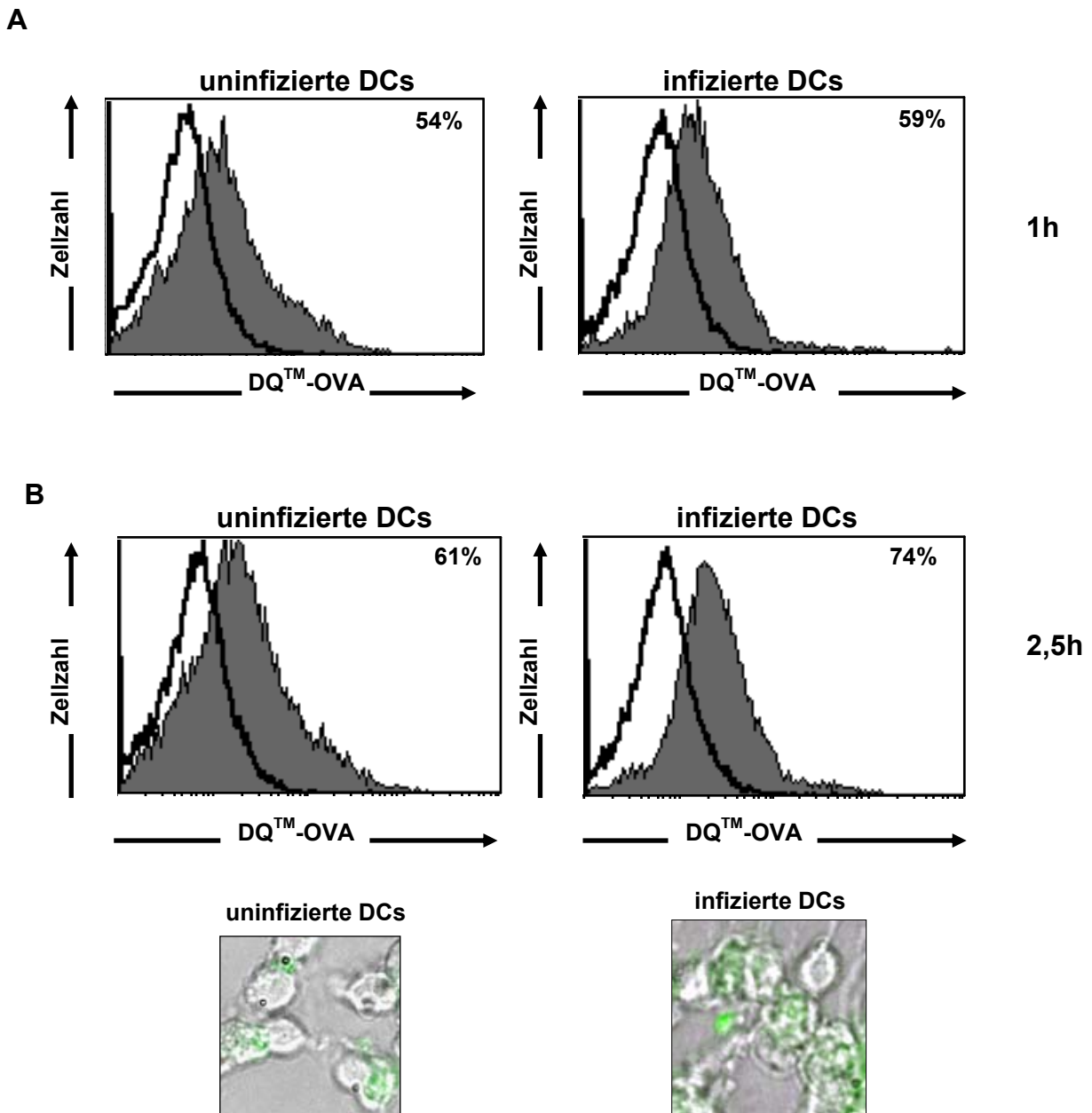


Abbildung 23: Endozytose-Aktivität und Antigen-Prozessierung von uninfizierten und FV-infizierten DCs

Kultivierte uninfizierte und infizierte DCs wurden untersucht. Die weißen Histogramme stellen die Kontrolle (Inkubation bei 0°C) dar, die grauen Histogramme zeigen die Fluoreszenzintensität bei 37°C an. Es wurde auf CD11c⁺ DCs gegatet. An zwei verschiedenen Zeitpunkten (1h (A) und 2,5h (B)) wurde die Fluoreszenz-Aktivität des FITC-OVA im FACS gemessen.

4.7.4. IL-12 Produktion von uninfizierten und FV-infizierten DCs

IL-12 gilt als zentrales Zytokin bei der Induktion einer Th1-gerichteten Immunantwort und wird von aktivierten DCs sezerniert (MOSER & MURPHY, 2000). Um die IL-12 Produktion von uninfizierten und infizierten DCs zu untersuchen, mussten die Zellen nach siebentägiger Kultur mit TLR-Liganden stimuliert werden. Die infizierten DCs wurden mit AK 34 und CD11c markiert, dagegen uninfizierte DCs nur mit CD11c. Anschließend wurden die infizierten und uninfizierten DCs mit einem FACS DIVA Sorter isoliert. Die gesortete Population von infizierten und uninfizierten DCs hatte eine Reinheit der von ca. 99%. Anschließend wurden die DCs 24 Stunden mit Poly(I:C) und CpG 1826 stimuliert. Im Zellkulturüberstand konnte dann die Konzentration von IL-12 p70 mit einem ELISA bestimmt werden.

Wie in der Abbildung 24 dargestellt, sezernierten unstimulierte DCs kein IL-12. Wurden uninfizierte und infizierte DCs mit Poly(I:C) stimuliert, produzierten diese Zellen geringe Mengen an IL-12, es gab aber keine Unterschiede zwischen den Populationen. Wenn dagegen uninfizierte DCs mit CpG stimuliert wurden, produzierten diese große Mengen an IL-12. Infizierte DCs produzierten dagegen ca. 90% weniger IL-12 als uninfizierte DCs. Die FV-Infektion beeinflusst also die IL-12 Produktion von infizierten DCs nach CpG aber nicht nach Poly(I:C) Stimulation.

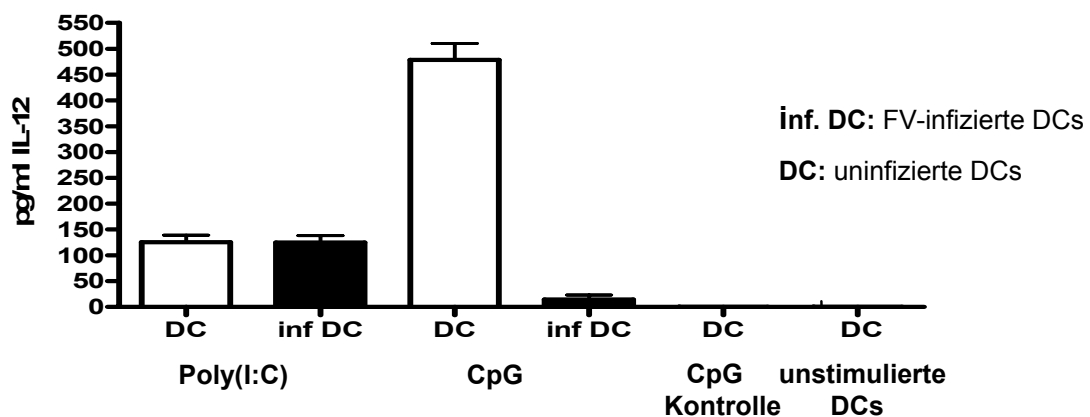


Abbildung 24: Die IL-12 Produktion von uninfizierten und infizierten DCs

Nach siebentägiger Kultur wurden infizierte und uninfizierte DCs mit Poly(I:C) (100µg/ml) oder CpG 1826 (6µg/ml) stimuliert. 24 Stunden später wurde IL-12 in den Überständen der Zellkulturen mittels ELISA bestimmt. Als Kontrolle dienten unstimulierte DCs und DCs stimuliert mit einer CpG Kontrolle. Diese CpG-Kontrolle kann nicht stimulieren, da in der Sequenz kein CpG-Motiv vorhanden ist. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten und deren Standardabweichungen.

4.7.5. IL-10 Produktion von uninfizierten und FV-infizierten DCs

IL-10 spielt eine große Rolle bei der Regulation der T-Zell-Antwort durch DCs (MOSEK & MURPHY, 2000). Dabei wird IL-10 vor allem eine supprimierende Wirkung auf T-Zellen zugeschrieben.

Um die IL-10 Produktion von infizierten und uninfizierten DCs zu untersuchen, wurden die Zellen nach siebentägiger Kultur mit TLR-Liganden stimuliert. Das weitere Vorgehen war identisch mit der Messung von IL-12, nur dass ein IL-10 ELISA verwendet wurde.

Wie in der Abbildung 25 dargestellt, sezernierten unstimulierte DCs kein IL-10. Wurden uninfizierte und infizierte DCs mit Poly(I:C) oder CpG 1826 stimuliert, produzierten diese Zellen IL-10. Die Produktion von IL-10 durch uninfizierte DCs war nach Stimulation mit CpG 1826 fast doppelt so hoch wie nach Poly(I:C) Gabe. Der Vergleich zwischen uninfizierten und infizierten DCs ergab keinen Unterschied für die Poly(I:C) Stimulation und eine verringerte Produktion von IL-10 nach Stimulation von infizierten DCs mit CpG. Dieser Unterschied war aber statistisch nicht signifikant.

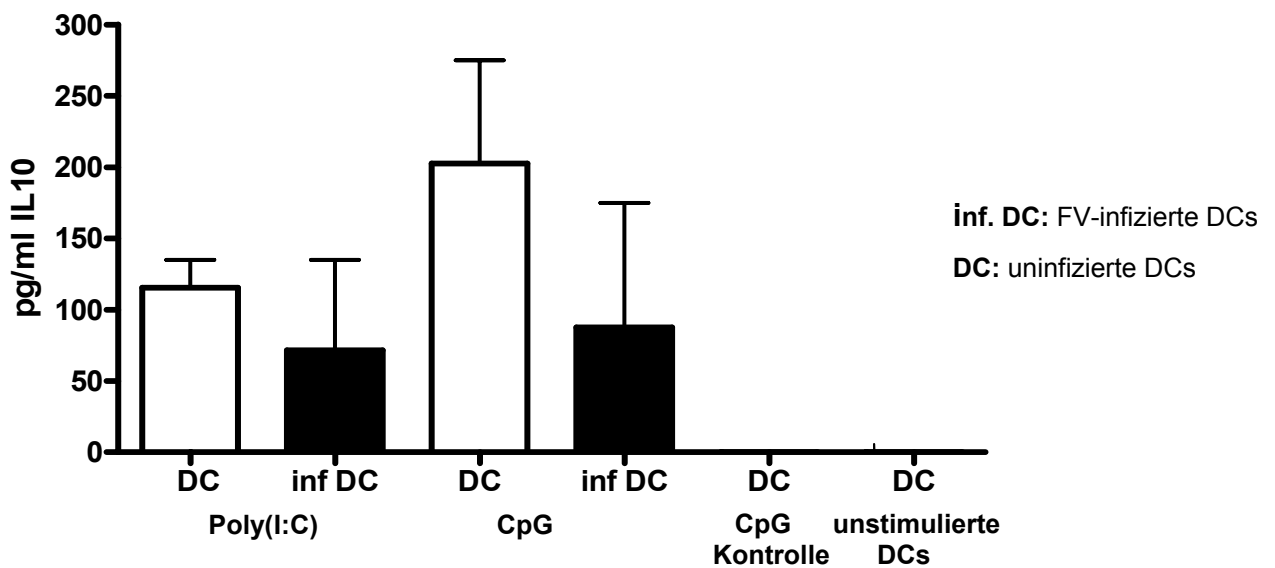


Abbildung 25: Die IL-10 Produktion von uninfizierten und infizierten DCs

Nach siebentägiger Kultur wurden infizierte und uninfizierte DCs mit Poly(I:C) (100µg/ml) oder CpG 1826 (6µg/ml) aktiviert. 24 Stunden später wurde IL-10 in den Überständen der Zellkultur mittels ELISA bestimmt. Als Kontrolle dienten unstimulierte DCs und DCs stimuliert mit einer CpG Kontrolle. Diese CpG-Kontrolle kann nicht stimulieren da, in der Sequenz kein CpG-Motiv vorhanden ist. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten und deren Standardabweichungen.

4.7.6. Vergleich der Apoptoserate von uninfizierten und infizierten

DCs nach siebentägiger Kultur

Um die Apoptoserate von uninfizierten und infizierten DCs miteinander vergleichen zu können, wurden sieben Tage alte DCs jeweils mit Annexin V-FITC angefärbt (siehe Kapitel 3.8.3). Es folgte die Zugabe von 7AAD und unmittelbar danach die durchflusszytometrische Beurteilung. Als Positiv-Kontrolle wurden uninfizierte DCs 24h mit LPS stimuliert. LPS ist einer der stärksten Stimuli für DCs, welcher zum Ausreifen und dadurch zu verstärkter Apoptose führt. Die apoptotischen Zellen wurden in der CD11c⁺ Population angefärbt. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 26 dargestellt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen uninfizierten und infizierten DCs in der Apoptoserate gemessen werden. Uninfizierte DCs, die 24 Stunden mit LPS stimuliert wurden, zeigten dagegen eine ca. 20% höhere Apoptoserate als unstimulierte DCs.

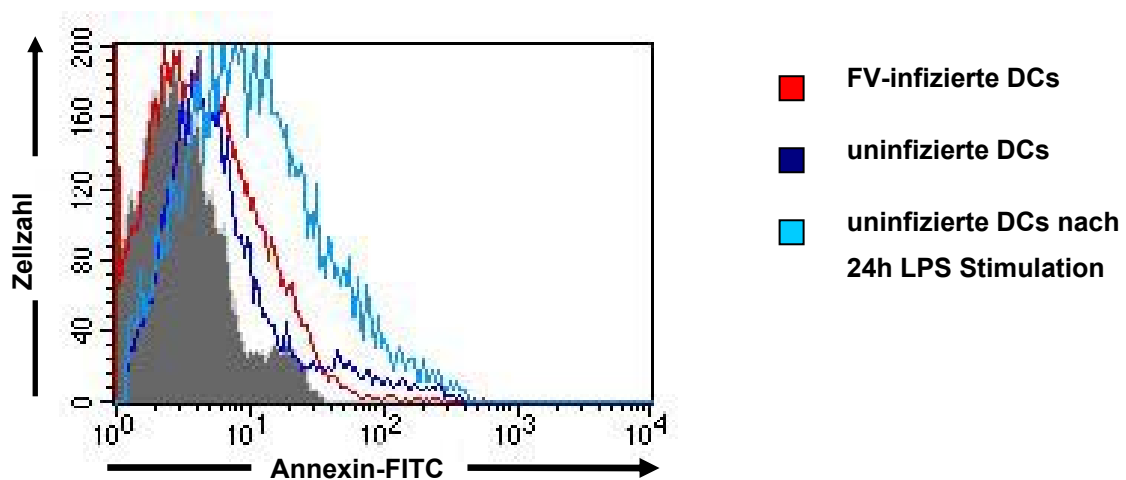


Abbildung 26: Apoptoserate von uninfizierten und infizierten DCs

Uninfizierte und infizierte DCs wurden mit Annexin-FITC angefärbt. Als Positiv-Kontrolle dienten uninfizierte DCs, die 24 Stunden mit LPS (10µg/ml) stimuliert wurden. Die verschiedenen Zellkulturen sind durch Linien in unterschiedlichen Färbungen dargestellt: Rot: infizierte DCs, dunkelblau: uninfizierte DCs, hellblau: uninfizierte DCs nach 24 Stunden LPS-Stimulation. Das graue Histogramm repräsentiert ungefärbte Zellen als Negativ-Kontrolle. Es wurde auf CD11c⁺ DCs gegatet. Ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten ist gezeigt.

4.7.7. Die FV-Infektion von DCs verändert die Interaktion von DCs und naiven CD4⁺ T-Zellen

T-Zellen können nur über APC aktiviert werden, wenn es zu physiologischen Interaktion zwischen diesen beiden Partnern kommt. Dabei bildet sich die so genannte Immunologische Synapse (SIMS & DUSTIN, 2002, BROMLEY et al., 2001). In den folgenden Experimenten sollte daher untersucht werden, ob die FV-Infektion einen Einfluss auf die Interaktion zwischen infizierten DCs und naiven CD4⁺ T-Zellen hat.

Dafür wurde das 3-D-Kollagensystem verwendet (siehe Kapitel 3.15.) In diesem lassen sich die Interaktionen von syngenen DCs und T-Zellen im Zeitraffermodus beobachten (siehe Kapitel 3.16.). Für den Versuch wurden OVA-spezifische TCR transgene CD4⁺ T-Zellen aus einer DO11.10 Maus isoliert und mit OVA-beladenen uninfizierten und infizierten DCs im 3-D-Kollagengel kultiviert. Über acht Stunden wurden die Bewegungen und die Zell-Kontakte mittels Videomikroskopie aufgezeichnet. Dabei wurde beobachtet, dass die Kontakte zwischen infizierten DCs und CD4⁺ T-Zellen signifikant länger waren (mittlere Kontaktdauer: 20min) als zwischen uninfizierten DCs und CD4⁺ T-Zellen (mittlere Kontaktdauer: 12min) (siehe Abbildung 27A). Dieser signifikante Unterschied resultiert aus einer großen Anzahl von sehr langen Kontakten zwischen infizierten DCs und CD4⁺ T-Zellen. Im Mittel dauerten 29% aller Kontakte zwischen infizierten DCs und CD4⁺ T-Zellen länger als 60min (siehe Abbildung 27B) während nur 16% aller Kontakte zwischen uninfizierten DCs und CD4⁺ T-Zellen mehr als 60min lang waren. Beispiele für den Kontakt zwischen uninfizierten und infizierten DCs sind in Abbildung 27C und 27D dargestellt.

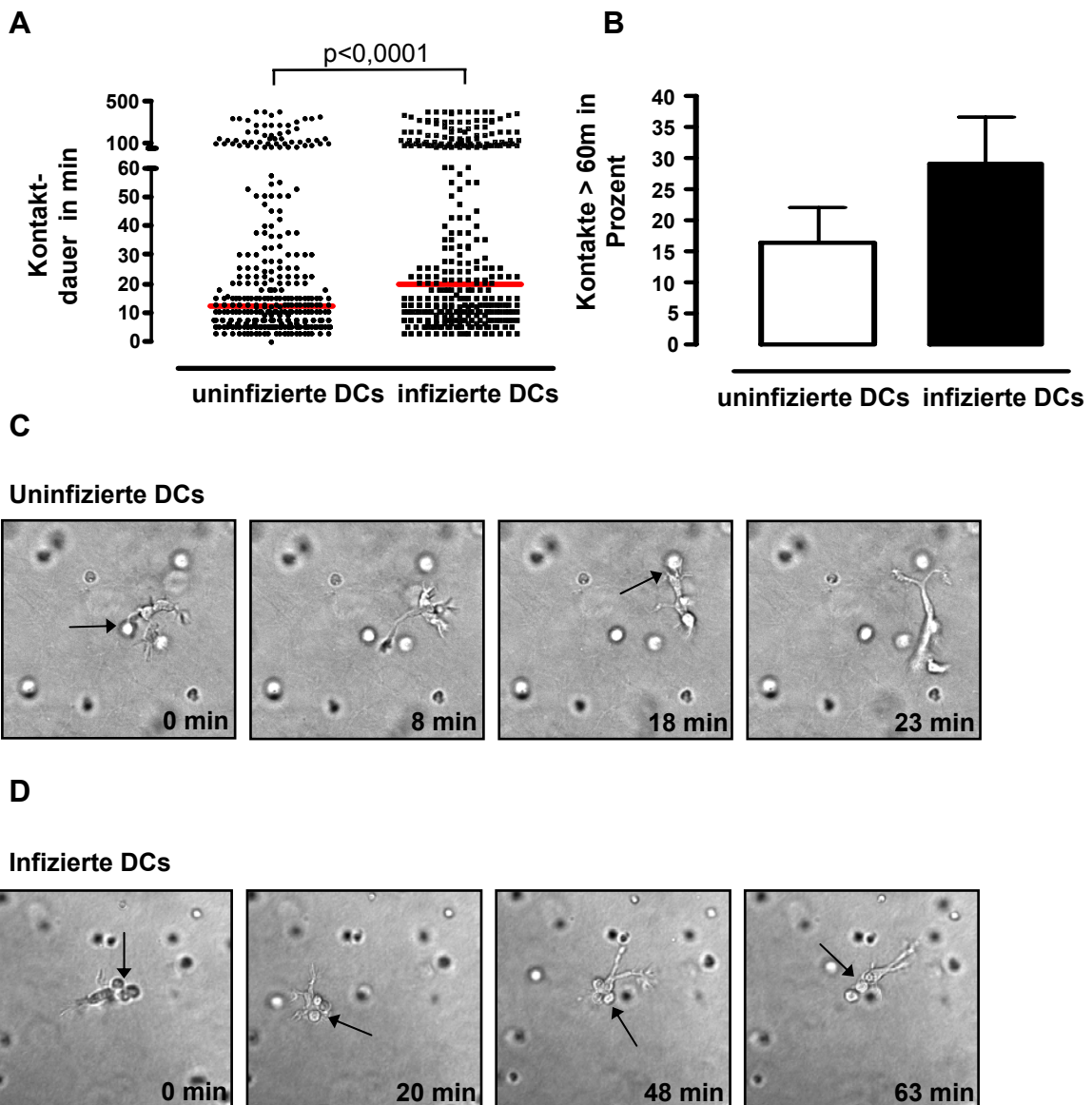


Abbildung 27: Kontaktzeiten zwischen Antigen-beladenen DCs und naiven OVA-spezifischen T-Zellen.

Der DC-T-Zell Kontakt wurde im 3-D Kollagengel analysiert. Transgene $CD4^+$ T-Zellen von DO11.10 Mäusen wurden mit OVA-Antigen beladenen uninfizierten (weißer Balken) und infizierten (schwarzer Balken) DCs gemischt. Im Bild A ist die Kontaktdauer in min zwischen uninfizierten und infizierten DCs und $CD4^+$ T-Zellen dargestellt. Der rote Balken gibt den Mittelwert aus allen Kontaktzeiten zwischen DCs und $CD4^+$ T-Zellen an. Der Unterschied ist signifikant ($p < 0,0001$, Student t-Tests). Dargestellt sind die Ergebnisse aus vier unabhängigen Experimenten. In Bild B sind die Kontakte in Prozent angegeben, die länger als 60min zwischen uninfizierten und infizierten DCs und $CD4^+$ T-Zellen dauerten. Dargestellt sind die Mittelwerte aus vier unabhängigen Experimenten. Bild C zeigt ein repräsentatives Beispiel für kurze Kontakte zwischen uninfizierten DCs und $CD4^+$ T-Zellen. In Bild D ist ein repräsentatives Beispiel für lange Kontakte zwischen infizierten DCs und $CD4^+$ T-Zellen

dargestellt. Die Dauer (min) der Kontakte ist auf den einzelnen Bildern angegeben. Die Pfeile zeigen auf die Kontaktstelle zwischen DCs und CD4⁺ T-Zelle.

4.7.8. Expression von Aktivierungsmarkern auf CD4⁺ T-Zellen nach Stimulation mit Antigen-beladenen uninfizierten und FV-infizierten DCs.

Als funktioneller Nachweis für die Aktivierung von CD4⁺ T- Zellen kann die Expression von Aktivierungsmarkern vor und nach der Inkubation mit Antigen-beladenen DCs bezeichnet werden. Als Marker dafür wurden CD62L, CD25, CD69, CD54 und CD44 ausgewählt. CD54, auch *intracellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) genannt, ist ein Transmembranprotein, das adhäsive Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen vermittelt (ZUCKERMAN et al., 1998). CD69 wird zu den C-Typ-Lektinen gezählt. Es handelt sich um einen frühen Aktivierungsmarker, der nach Aktivierung auf T-Zellen verstärkt exprimiert wird (SANCHO et al., 2005). Die Funktion des Oberflächenglykoproteins CD44 ist weitgehend unbekannt, aber es wird nur nach Antigenkontakt auf T-Zellen exprimiert (NAOR et al., 1997). CD62L ist ein Leukozytenadhäsionsmolekül und wird deutlich weniger auf aktivierten Lymphozyten als auf naiven Zellen exprimiert (JANEWAY. & TRAVERS, 1997). CD25 (α -Kette des IL-2 Rezeptors) wird nach Aktivierung von T-Zellen exprimiert und vermittelt die T-Zell Proliferation.

Uninfizierte und infizierte DCs wurden mit OVA-Antigen beladenen und mit OVA-spezifischen CD4⁺ T-Zellen aus einer transgenen Maus im 3-D Kollagengel inkubiert (siehe Kapitel 3.15.). Anschließend wurden die CD4⁺ T-Zellen aus dem Gel isoliert und im FACS auf die Expression der Aktivierungsmarker analysiert. Als Kontrolle dienten naive CD4⁺ T-Zellen, bzw. uninfizierte und infizierte DCs, die nicht mit OVA-Antigen beladen worden waren. Diese CD4⁺ T-Zellen exprimierten die Aktivierungsmarker nur sehr schwach. Bei der FACS-Analyse von CD4⁺ T-Zellen, die mit OVA-Antigen beladenen uninfizierten und infizierten DCs kokultiviert wurden, wurde eine reduzierte Expression von CD62L und eine vermehrte Expression der anderen Aktivierungsmarker gemessen. Die Aktivierung der CD4⁺ T-Zellen war nach Stimulation durch infizierte DCs geringfügig schwächer, aber der Unterschied zu uninfizierten DCs war statistisch nicht signifikant. Diese Ergebnisse zeigen, dass auch infizierte DCs CD4⁺ T-Zellen aktivieren können.

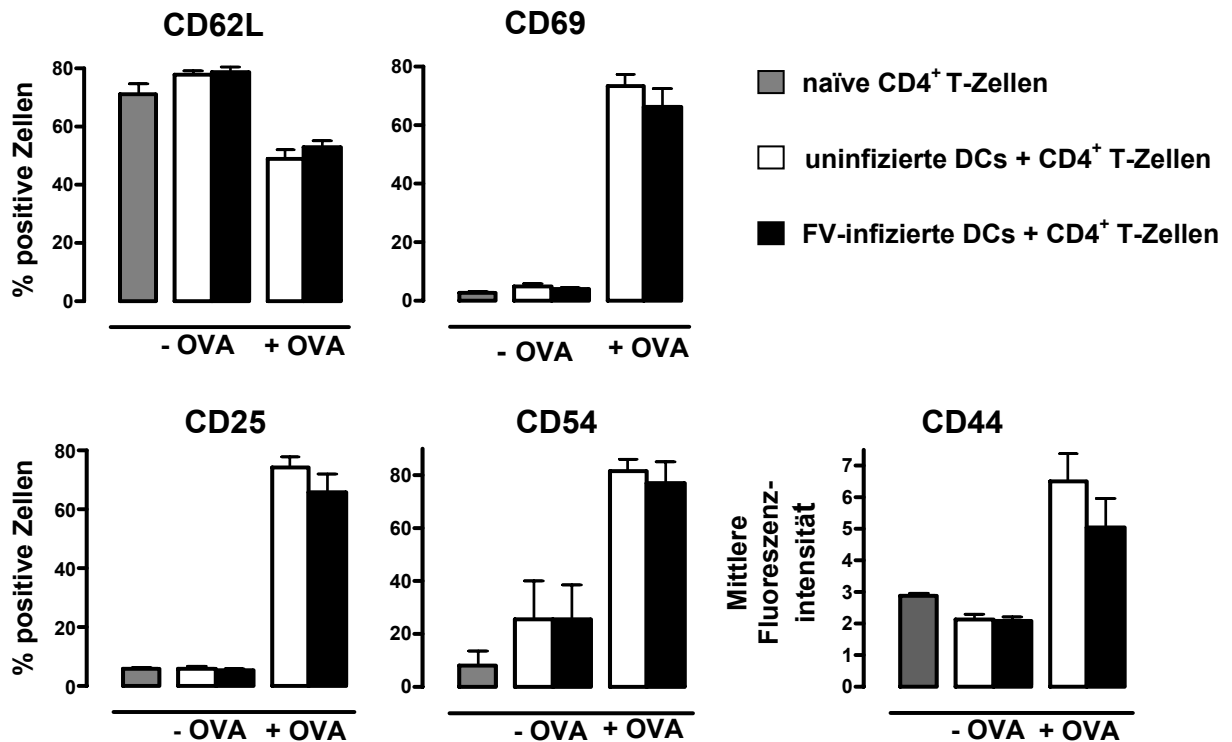


Abbildung 28: Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen durch FV-infizierte und uninfizierte DCs

Naive transgene CD4⁺ T-Zellen von einer DO11.10 Maus wurden mit uninfizierten (weißer Balken) und infizierten (schwarzer Balken) DCs im 3-D Kollagengel inkubiert. Nach 24 Stunden wurden die T-Zellen isoliert und auf die Expression der Aktivierungsmarker CD62L, CD69, CD25, CD54 und CD44 im FACS untersucht. Die Kulturen wurden mit und ohne OVA-Antigen durchgeführt. Naive CD4⁺ T-Zellen ohne DCs sind als graue Balken dargestellt. Die Expression der Aktivierungsmarker ist mit der mittleren Fluoreszenz-Intensität oder als Prozent positiver Zellen von der gesamten CD4⁺ T-Zell-Population angegeben. Gezeigt sind die Mittelwerte von fünf unabhängigen Versuchen.

4.7.9. Einfluss von FV-infizierten DCs auf die Antigen-spezifische CD4⁺ T-Zell-Proliferation

Reife DCs sind wirksame Stimulatoren Antigen-spezifischer T-Zell Proliferation. Der Einfluss von infizierten DCs auf die CD4⁺ T-Zell-Proliferation sollte mittels eines ³H-Thymidin Proliferationstests bestimmt werden. Dabei wurden uninfizierte und infizierte DCs mit OVA-Antigen beladen und mit OVA-spezifischen T-Zell-Rezeptor transgenen CD4⁺ T-Zellen gemischt. Nach 3 Tagen Kultur wurden die Zellen mit radioaktivem ³H-Thymidin gepulst, um die ³H-Thymidin-Aufnahme und damit die Proliferation der T-Zellen zu messen (siehe auch Kapitel 3.12.). Als Negativ-Kontrolle wurden uninfizierte und infizierte DCs mit TCR transgenen CD4⁺ T-Zellen aber ohne

OVA-Antigen Beladung verwendet. Ohne OVA-Antigen konnte keine Proliferation gemessen werden.

Uninfizierte DCs, beladen mit OVA-Antigen, waren dagegen in der Lage, spezifische CD4⁺ T-Zellen zur Proliferation anzuregen, was man an der gemessenen Radioaktivität erkennen kann (siehe Abbildung 29). Dagegen war die Stimulation durch infizierte DCs signifikant reduziert. Um die gleiche Proliferation von CD4⁺ T-Zellen zu erreichen, die durch uninfizierte DCs hervorgerufen wurde, wurde bei FV-infizierten DCs fast die 10fache Anzahl an DCs benötigt.

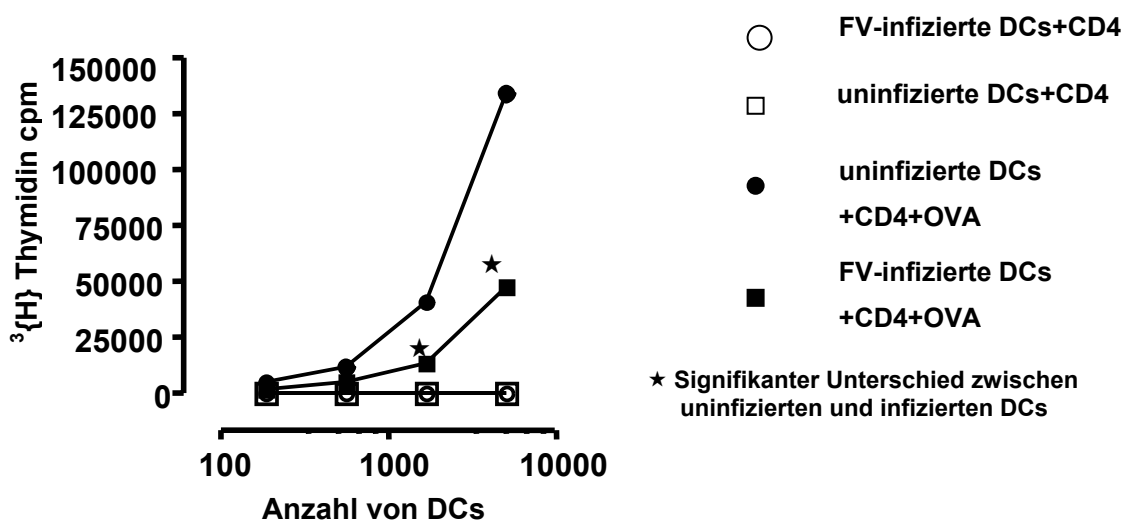


Abbildung 29: Stimulation von CD4⁺ T-Zell-Proliferation durch uninfizierte und FV-infizierte DCs

Uninfizierte und FV-infizierte DCs wurden mit OVA-Antigen beladen und zur Stimulation von OVA-spezifischen TCR transgenen T-Zellen eingesetzt. Nicht beladene DCs dienen als Negativ-Kontrolle. Drei Tage später wurde die Proliferation der T-Zellen an Hand des ³H-Thymidin Einbaus gemessen. Der Test wurde in Dreifachbestimmungen angesetzt und die angegebenen Werte (*counts per minute*, cpm) sind die Mittelwerte der Parallelansätze eines repräsentativen Experiments. Dieses Experiment wurde dreimal wiederholt. Es zeigte sich im ANOVA und Dunnett's Multiple Comparison Test ein statistisch signifikanter Unterschied.

4.7.10. Infizierte DCs induzieren regulatorische T-Zellen

In den vorangegangenen Experimenten wurde gezeigt, dass FV-infizierte DCs naive CD4⁺ T-Zellen zwar aktivieren, aber nicht zur Proliferation *in vitro* anregen können. Auch die Kontaktzeiten zwischen infizierten DCs und CD4⁺ T-Zellen waren deutlich länger als zwischen uninfizierten DCs und CD4⁺ T-Zellen. Diese Unterschiede im

Kontakt zwischen T-Zellen und DCs könnten mit einer veränderten T-Zell Antwort einhergehen. Die FV-Infektion induziert regulatorische T-Zellen in der Maus, die zu einer Immunsuppression führen (HASENKRUG & CHESEBRO, 1997, DITTMER et al., 2004). Infizierte DCs könnten für die Induktion dieser Zellen verantwortlich sein. Um diese Hypothese zu bestätigen, wurde analysiert, ob regulatorische $CD4^+$ T-Zellen durch infizierte DCs *in vitro* induziert werden. Als Treg-Marker wurde der Transkriptions Faktor Foxp3 verwendet. Uninfizierte und infizierte DCs wurden mit OVA-Antigen beladenen und mit transgenen OVA-spezifischen $CD4^+$ T-Zellen im 3-D Kollagengel inkubiert (siehe Kapitel 3.14.). Anschließend wurden die $CD4^+$ T-Zellen aus dem Gel isoliert und die Expression von Foxp3 (siehe Kapitel 3.16.2.) im FACS ermittelt. Als Kontrollen dienten naive $CD4^+$ T-Zellen und $CD4^+$ T-Zellen aus Kulturen mit uninfizierten und infizierten DCs, die aber nicht mit OVA-Antigen beladen wurden. Im Mittel exprimieren 10% der naiven $CD4^+$ T-Zellen den Marker Foxp3. Ungefähr 15% der $CD4^+$ T-Zellen exprimierten Foxp3 nach Kultur mit OVA-Antigen beladenen uninfizierten DCs. Zu einer signifikanten Erhöhung (Student's t-Test) der Foxp3 positiven T-Zellen auf mehr als 25% kam es, wenn OVA-Antigen beladene infizierte DCs mit T-Zellen kokultiviert wurden (siehe Abbildung 30). Alle Foxp3 positiven T-Zellen, die durch infizierte DCs induziert wurden, waren ebenfalls positiv für den Treg-Marker CD25.

$CD4^+$ T-Zellen, die mit uninfizierten oder infizierten DCs aber ohne OVA-Antigen inkubiert wurden, zeigten die gleichen Anteil von ca.10% Foxp3⁺ T-Zellen wie naive $CD4^+$ T-Zellen. Damit konnte gezeigt werden, dass FV-infizierte DCs Antigen spezifisch $CD25^+$ Foxp3⁺ Treg-Zellen induzieren können.

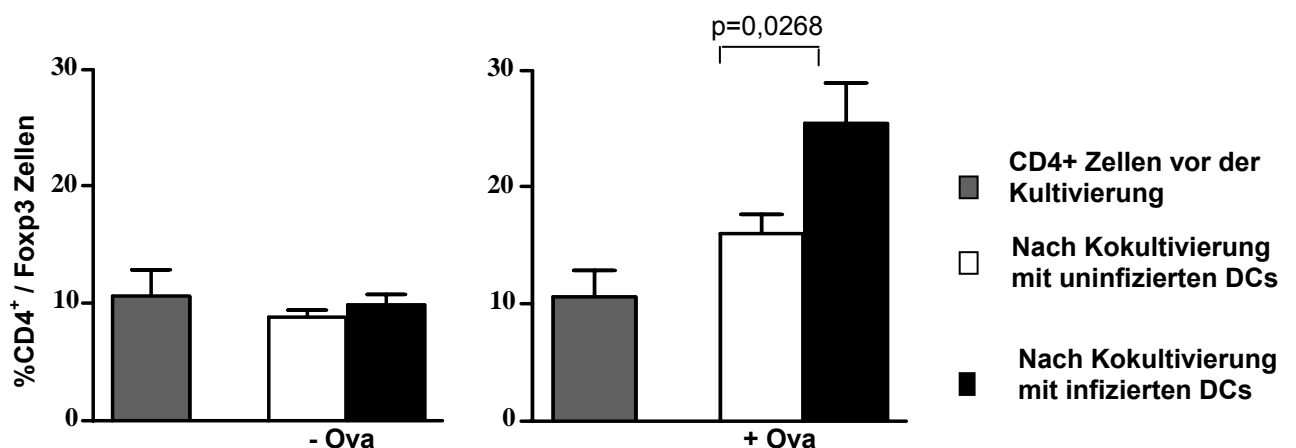


Abbildung 30: Induktion von Foxp3⁺ Treg-Zellen durch FV-infizierte DCs

Naive TCR transgene CD4⁺ T-Zellen von einer DO11.10 Maus wurden mit uninfizierten und infizierten DCs im 3-D-Kollagengel inkubiert. 24 Stunden später wurde die intrazelluläre Expression des Tregzell-Markers Foxp3 im FACS bestimmt. CD4⁺ T-Zellen wurden inkubiert mit uninfizierten DCs (weißer Balken) und mit infizierten DCs (schwarzer Balken). Als Kontrolle dienten DCs beladen mit OVA-Antigen oder ohne OVA-Antigen. Als negative Kontrolle dienten naive CD4⁺ T-Zellen vor der Kultivierung (graue Balken). Dargestellt sind prozentuale Mittelwerte von CD4⁺/Foxp3⁺ T-Zellen an der gesamt CD4⁺ T-Zell Population aus fünf unabhängigen Experimenten und deren Standardabweichungen (Student t-Tests).

4.8. Stimulation von FV-infizierten DCs zur Therapie der FV-induzierten Immunsuppression

In den Arbeiten von KRAFT et al. (2005) und OLBRICH et al. (2003) konnte gezeigt werden, dass eine CpG-Behandlung gegen FV eine effektive Immuntherapie darstellt. Eine mögliche Erklärung konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass CpG noch infizierte DCs zum Ausreifen bringen kann.

4.8.1. Quantitativer Nachweis von TLR-3, -4 und -9 auf uninfizierten und infizierten DCs

Uninfizierte und infizierte DCs zeigten eine unterschiedliche Reaktion auf die Stimulation mit TLR-Liganden (siehe Kapitel 4.7.2. und 4.8.2.). Um zu untersuchen, ob die TLR-Expression auf DCs durch die FV-Infektion verändert wird, wurde die Expression von TLR-3, -4 und -9 quantitativ analysiert.

Für dieses Experiment wurden infizierte DC mit AK 34 und CD11c markiert. Uninfizierte DCs wurden nur mit CD11c markiert. Anschließend wurden die uninfizierten und infizierten DCs mit einem FACS DIVA Sorter mit einer Reinheit von ca. 99% isoliert und aus diesen Zellen die mRNA gewonnen (siehe Kapitel 3.17.).

Es ist deutlich zu erkennen, dass es keinen signifikanten Unterschied bei den untersuchten in TLRs in der Anzahl von RNA-Molekülen zwischen uninfizierten und infizierten DCs gab. Die meiste mRNA Synthese wurde bei sowohl bei uninfizierten und infizierten DCs TLR 3 gefunden. Die FV-Infektion von DCs hat somit keine Auswirkung auf die mRNA Synthese für TLRs.

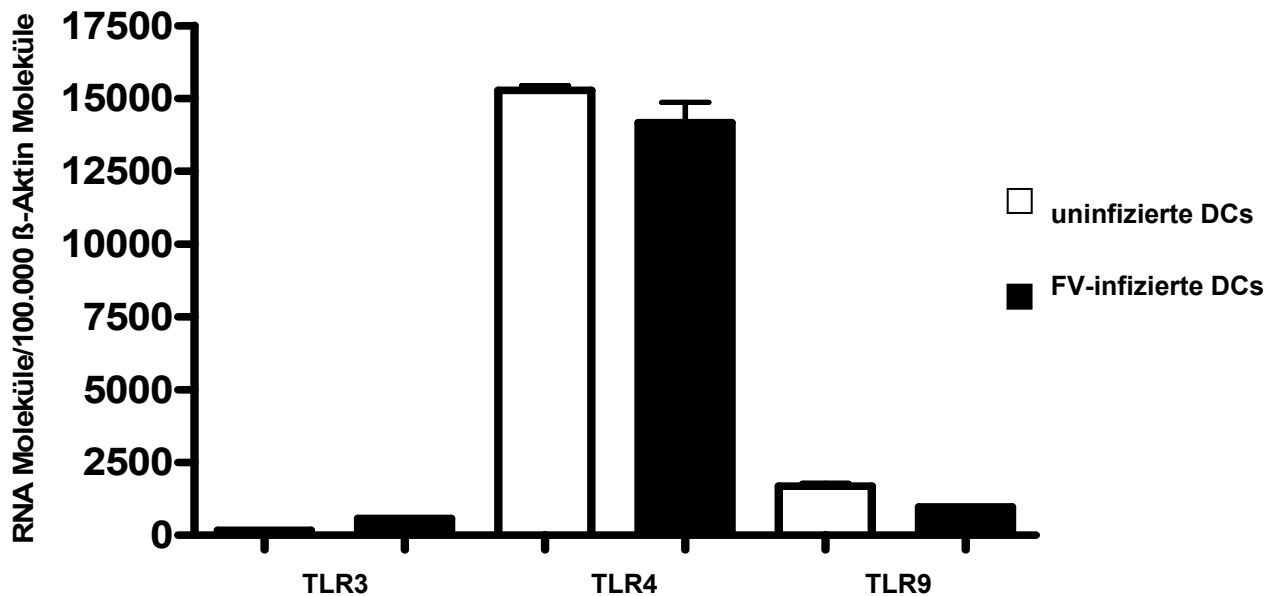


Abbildung 31: Expression von mRNA für Toll-like Rezeptoren in uninfizierten und infizierten DCs

Uninfizierte (weiße Balken) und infizierte DCs (schwarze Balken) wurden im FACS DIVA isoliert und anschließend die mRNA für TLRs mit Hilfe der RT-PCR quantitativ bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten und deren Standardabweichungen

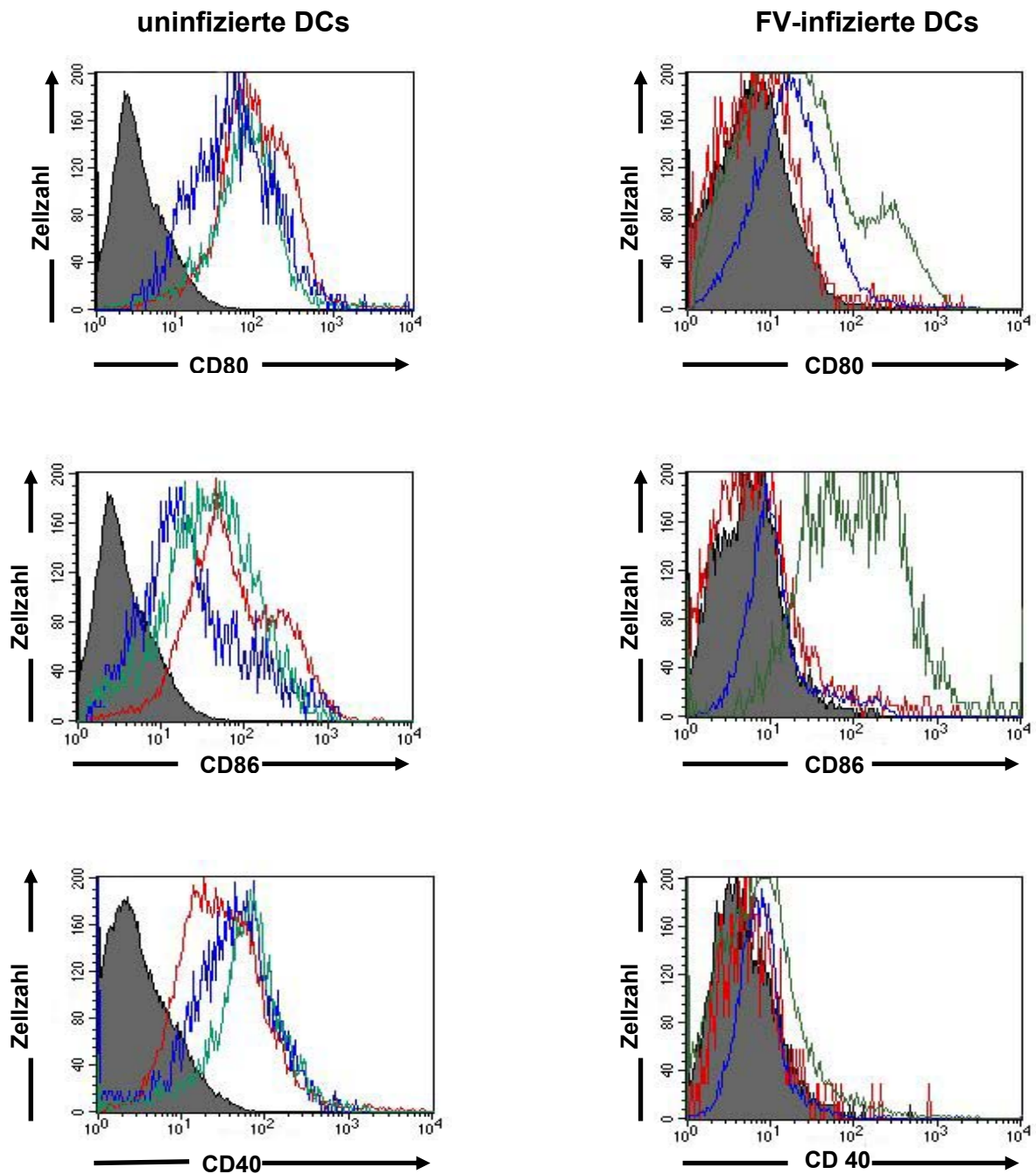
4.8.2. CpG steigert die Expression von kostimulatorischen Molekülen auf FV-infizierten DCs

CpG-DNA bewirkt eine Aktivierung der angeborenen Immunantwort und eine darauf folgende Th1-Polarisierung der spezifischen Immunantwort. Somit könnten diese Substanzen als Therapeutikum bei der Immuntherapie von Infektionen eingesetzt werden.

Infizierte DCs exprimieren kaum kostimulatorische Moleküle nach Stimulation mit Poly(I:C) oder $\text{INF}\alpha$, wie im vorangegangenen Experiment gezeigt wurde (siehe Kapitel 4.7.2.) Im folgenden Experiment sollte getestet werden, ob CpG-ODN infizierte DCs zur Ausreifung bringen kann.

Uninfizierte und infizierte DCs wurden angezchtet und mit Poly(I:C), $\text{INF}\alpha$ und CpG über 24 Stunden stimuliert (siehe Kapitel 3.5.3. und 3.5.5.). Uninfizierte DCs reagierten auf Zugabe dieser Stimuli mit einer starken Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80, CD86 und CD40 (siehe Abbildung 32). Im Gegensatz dazu aktivierte $\text{INF}\alpha$ und Poly(I:C), infizierte DCs so gut wie nicht (Daten wurden im Kapitel 4.7.2. schon beschrieben) (siehe Abbildung 22). Werden

allerdings infizierte DCs mit CpG 1826 stimuliert, kommt es zu einer starken Expression von CD86, ähnlich wie bei uninfizierten DCs. Bei CD80 kommt es auch zu einer Steigerung der Expression, aber im Vergleich nicht so stark wie bei uninfizierten DCs. Dagegen wurde für CD40 nur eine schwache Expression auf infizierten DCs nach CpG Stimulation festgestellt (siehe Abbildung 32). Somit konnte der Reifungsdefekt von infizierten DCs durch Stimulation mit CpG teilweise aufgehoben werden.



Stimulation mit:

■ CpG1826 6µg/ml
 ■ Poly(I:C) 100µg/ml
 ■ INFα 1000U/ml

Abbildung 32: Expression von kostimulatorischen Molekülen auf FV-infizierten DCs nach CpG Stimulation.

Kostimulatorische Moleküle CD80, CD86 und CD40 wurden auf stimulierten uninfizierten und infizierten DCs bestimmt. Die gefüllten Histogramme repräsentieren ungefärbte DCs als Kontrolle. Die verschiedenen Stimuli sind durch Linien in unterschiedlichen Farben dargestellt grün: CpG 1826 (6µg/ml), rot: Poly(I:C)(100µg/ml) und blau: INFα (1000U/ml). Die Daten mit Poly(I:C) und INFα wurden schon im Kapitel 4.7.2. gezeigt. Dargestellt in den Histogrammen ist die Fluoreszenzintensität der einzelnen Färbungen. Ein repräsentatives Ergebnis aus zwei Experimenten ist gezeigt.

4.9. Interaktion von FV-infizierten DCs und CD8⁺ T-Zellen

4.9.1. Einfluss von FV-infizierten DCs auf die FV-spezifische CD8⁺ T-Zell-Proliferation

Im Kapitel 4.7.9. konnte gezeigt werden, dass FV-infizierte DCs keine Proliferation von Antigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen induzieren konnten. Viele Virusinfektionen werden aber durch CD8⁺ T-Zellen (CTL) kontrolliert. In diesem Experiment sollte nun geklärt werden, ob FV-infizierte DCs spezifische CD8⁺ T-Zellen aktivieren können. Für dieses Experiment wurden CD8⁺ T-Zellen aus einer transgenen Maus verwendet. Alle CD8⁺ T-Zellen dieser transgenen Maus sind spezifisch gegen das FV Epitope D^b GagL (OHLEN et al., 2002). DCs wurden mit diesem Peptid beladen und die transgenen CD8⁺ T-Zellen zur Proliferation angeregt. Nach drei Tagen wurde die Proliferationsrate der CD8⁺ T-Zellen mittels FACS bestimmt, indem die Abnahme der CFSE Fluoreszenz Markierung der CD8⁺ T-Zellen (siehe Kapitel 3.13.) analysiert wurde. Die Abbildung 33 zeigt die Verteilung der CFSE Fluoreszenz auf CD8⁺ T-Zellen.

Als Negativ-Kontrollen wurden uninfizierte DCs ohne Antigen bzw. CD8⁺ T-Zellen ohne DCs verwendet. Bei diesen Zellen kam es nach 72 Stunden zu keiner Teilung, das Histogramm zeigte daher einen einheitlichen Peak (siehe Abbildung 33A und B). Dagegen waren bei den CD8⁺ T-Zellen, die mit beladenen uninfizierten DCs kokultiviert wurden, vier weitere Fluoreszenzpeaks zu sehen, die jeweils einer bis vier Zellteilungen entsprachen (siehe Abbildung 33C). Bei den CD8⁺ T-Zellen, die mit

beladenen infizierten DCs kokultiviert wurden, zeigten sich ebenfalls vier weitere Fluoreszenzpeaks. Allerdings war der Ausgangspeak mit der stärksten Fluoreszenz deutlich höher als bei den Kulturen mit uninfizierten DCs (siehe Abbildung 33D). Bei dieser Subpopulation von T-Zellen fand während der dreitägigen Kultur keine Proliferation statt. Antigen-beladene infizierte DCs können $CD8^+$ T-Zellen demnach zur Proliferation anregen, aber nicht so effizient wie uninfizierte DCs.

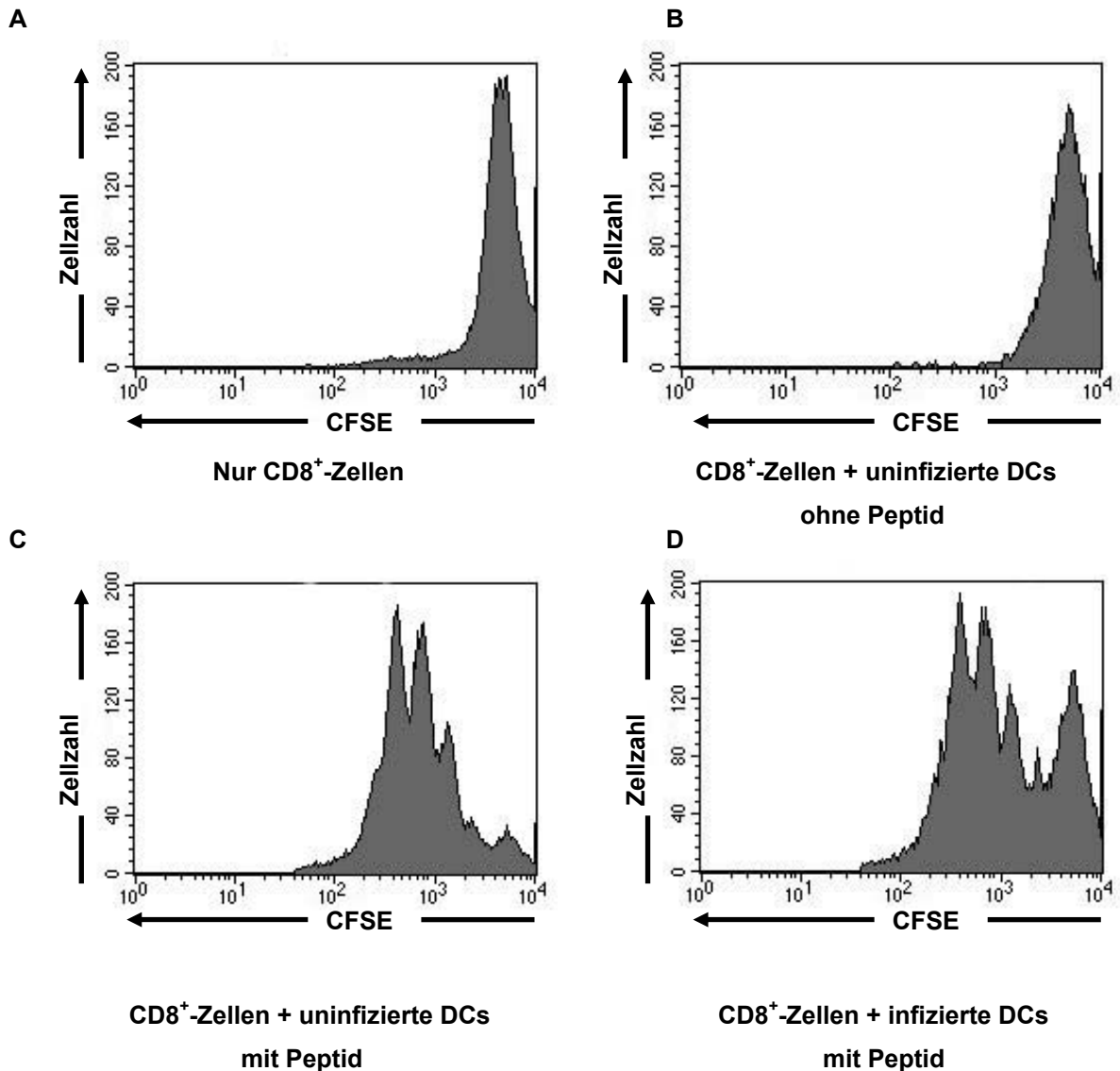


Abbildung 33: $CD8^+$ T-Zell-Proliferation durch uninfizierte und FV-infizierte DCs

Uninfizierte und FV-infizierte DCs wurden mit D^bGagL FV beladen und zur Stimulation von transgenen $CD8^+$ T-Zellen eingesetzt. Nicht beladene DCs sowie $CD8^+$ T-Zellen ohne DCs dienten als Negativ-Kontrollen. Drei Tage später wurde die Proliferationsrate anhand der Abnahme der CFSE-Fluoreszenz ermittelt. Dargestellt sind Histogramme für die Fluoreszenzintensität der CFSE-Färbung. Es wurde auf $CD8^+$ T-Zellen gated. Ein repräsentatives Ergebnis aus zwei Experimenten ist gezeigt.

4.9.2. $\text{INF}\gamma$ Produktion von FV-spezifischen CD8^+ T-Zellen nach Stimulation mit uninfizierten und infizierten DCs

Im vorherigen Versuch konnte gezeigt werden, dass FV-spezifische CD8^+ T-Zellen durch die Stimulation mit infizierten DCs zur Proliferation angeregt wurden. Nun sollte untersucht werden, ob infizierte DCs FV-spezifische CD8^+ T-Zellen noch zur Produktion von $\text{INF}\gamma$ stimulieren können. $\text{INF}\gamma$ ist ein wichtiges Zytokin bei der Th1 Immunantwort und wird von CD8^+ T-Zellen produziert (RAFAEL et al., 2007). Für dieses Experiment wurden wieder FV-spezifische transgene CD8^+ T-Zellen eingesetzt. DCs wurden mit FV Epitope D^bGagL beladen, um transgene CD8^+ T-Zellen zu stimulieren und zur damit sie $\text{INF}\gamma$ -Produktion anzuregen.

Das Zellgemisch wurde drei Tage inkubiert um anschließend im zellfreien Überstand die Konzentration von $\text{INF}\gamma$ zu bestimmen. Dabei wurde festgestellt, dass es keine signifikanter Unterschiede in der Produktion von $\text{INF}\gamma$ gab, wenn die transgenen CD8^+ T-Zellen mit Antigen-beladenen uninfizierten oder infizierten DCs stimuliert wurden (siehe Abbildung 34). Als Negativkontrollen dienten infizierte und uninfizierte DCs, die nicht mit Peptid beladenen wurden. Hier konnte nur eine sehr geringe Produktion von $\text{INF}\gamma$ gemessen werden. Somit ist gezeigt worden, dass FV-infizierte DCs virus-spezifische CD8^+ T-Zellen sowohl zur Proliferation als auch zur Produktion von $\text{INF}\gamma$ anregen können. Im Gegensatz zur gestörten Interaktion von infizierten DCs mit CD4^+ T-Zellen wies die Interaktion von infizierten DCs mit CD8^+ T-Zellen keinen funktionellen Defekt auf.

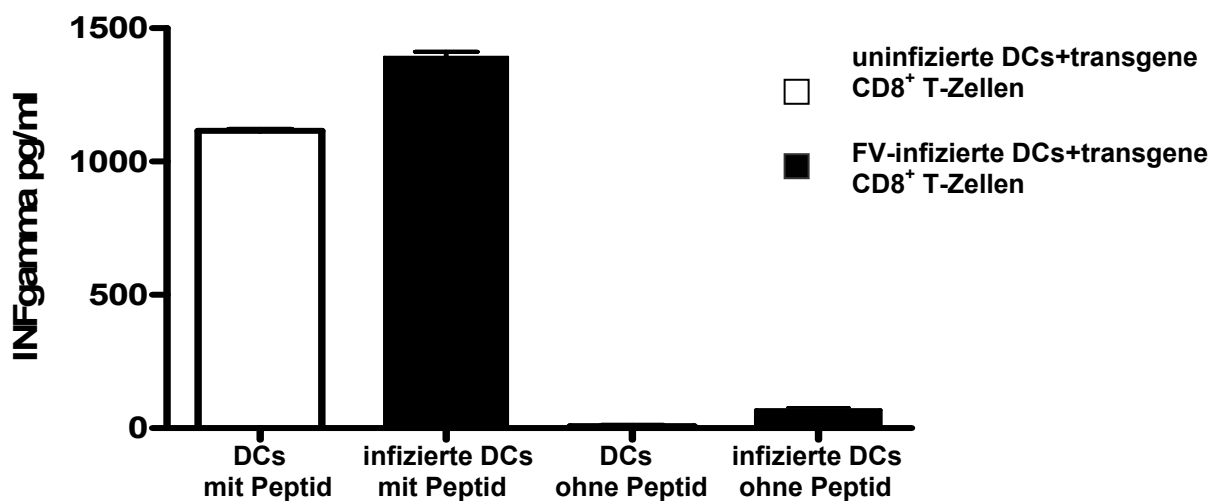


Abbildung 34: INF γ -Produktion von virus-spezifischer CD8⁺ T-Zellen nach Stimulation mit Antigen beladenen uninfizierte und FV-infizierte DCs

Uninfizierte und infizierte DCs wurden mit FV D^bGagL Peptid beladen und mit transgenen CD8⁺ T-Zellen gemischt. Nach drei Tagen wurde der Überstand mit Hilfe eines ELISA auf INF γ untersucht. Als Kontrolle wurden uninfizierte und infizierte DCs ohne Peptid-Beladung verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten und deren Standardabweichungen.

5. Diskussion

5.1. Übersicht über die experimentellen Befunde

Retroviren und viele andere Viren induzieren eine Immunsuppression in ihrem Wirt. Bei der Infektion von Mäusen mit dem FV tritt eine Suppression von wichtigen T-Zellfunktionen während der akuten Infektion auf. In der vorliegenden Arbeit sollte die Rolle infizierter DCs bei der FV-induzierten Immunsuppression untersucht werden. Von besonderem Interesse war dabei die Untersuchung der Interaktion von infizierten DCs mit CD4⁺ T-Zellen.

Zunächst konnte gezeigt werden, dass sich FV-infizierte DCs aus Stammzellen des Knochenmarks infizierter Mäuse generieren lassen. Diese myeloiden DCs waren zu etwa 20% infiziert. Diese Infektion war produktiv und infizierte DCs konnten das Virus *in vitro* und *in vivo* übertragen. FV-infizierte DCs hatten einen unterschiedlichen Phänotyp gegenüber uninfizierten DCs, sie exprimierten so gut wie keine kostimulatorischen Moleküle, während die Expression von MHC Molekülen nicht verändert war. Als Schwerpunkt der Arbeit wurde die Interaktion von infizierten DCs und CD4⁺ T-Zellen untersucht. Dabei wurde ein signifikanter Unterschied in der Kontaktdauer zwischen uninfizierten und infizierten DCs mit CD4⁺ T-Zellen festgestellt. Infizierte DCs konnten CD4⁺ T-Zellen zwar aktivieren, aber nicht mehr zur Proliferation stimulieren. Der veränderte Kontakt von infizierten DCs mit CD4⁺ T-Zellen führte zur Induktion von Treg-Zellen.

Dagegen war die Interaktion von infizierten DCs und CD8⁺ T-Zellen funktionell nicht gestört. Die durch FV-Infektion veränderte Interaktion von CD4⁺ T-Zellen und DCs deutet darauf hin, dass infizierte DCs eine entscheidende Rolle bei der FV-induzierten Immunsuppression spielen.

5.2. FV-Infektion von myeloiden und plasmazytoiden DCs

Um die Frage zu beantworten, ob FV DCs produktiv infiziert, wurden *in vitro* generierte myeloide DCs mit FV inkubiert. An verschiedenen Tagen nach der Infektion wurden die Zellen mit dem spezifischen AK 34, der auf der Oberfläche von infizierten DCs das glykolysierte FV Gag-Protein erkennt, angefärbt. Trotz diverser Versuche hat sich gezeigt, dass eine für Experimente ausreichende Zahl von FV-infizierten DCs mit dieser Methode nicht generiert werden konnte. Allgemein lassen sich Zellen *in vitro* nur schlecht mit FV infizieren. Auch die Indikatorzelllinie *Mus dunni* lässt sich nur mit Hilfe von Polybrene infizieren. Das Polybrene dient dazu, dass das

freie Virus besser an den Rezeptor auf der Zelloberfläche binden kann (TOYOSHIMA & VOGT, 1969). Wie in der Literatur schon beschrieben (FRESNAY et al., 2002) ist Polybrene toxisch für DCs, somit konnten wir diese Substanz nicht einsetzen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher eine neue Methode entwickelt, um FV-infizierte DCs zu generieren. Dabei kam uns die Eigenschaft des FV zu nutze, dass in der akuten Phase der Infektion Knochenmarkstammzellen sehr effizient infiziert werden (STROMNES et al., 2002). Aus diesen infizierten Knochenmarkstammzellen konnte dann nach einem Standardprotokoll von INABA et al. 1992 FV-infizierte myeloide DCs angezüchtet werden (siehe Kapitel 3.5.5.). Der Nachweis des FV in DCs erfolgte sowohl mittels RT-PCR nach STROMNES et al. (2002) als auch durch Auswertung elektronenmikroskopischer Bilder (siehe Abbildung 14), welche eindeutig virale Kapside im Zytoplasma von FV-infizierten DCs erkennen ließen. In dieser Arbeit konnte daher gezeigt werden, dass FV murine myeloide DCs infizieren kann.

Wie für andere Virusinfektionen gezeigt worden ist, kann die Infektion von Viren zur Apoptose von DCs führen. Der Zelltod von DCs kann dann eine Immunsuppression zur Folge haben (BORROW et al., 1995). Die FV-Infektion löste allerdings keine Apoptose in DCs aus. Daher spielt der programmierte Zelltod von DCs bei der FV-induzierten Immunsuppression vermutlich keine Rolle.

In der vorliegenden Studie konnten wir zeigen, dass das FV in unreifen DCs repliziert und sich *in vitro* und *in vivo* effizient auf andere Zellen übertragen lässt. Der Rezeptor für die Infektion von DCs mit dem FV ist wahrscheinlich Pit 1/2, da dieser Rezeptor auch für Monozyten beschrieben worden ist (DITTMER et al., 2002). In der Literatur wurde gezeigt, dass unterschiedliche Viren unterschiedlich gut in DCs replizieren können. HIV repliziert in unreifen und reifen DCs eher schwach, da diesen Zellen der Hauptrezeptor des Virus, das CD4-Molekül, fehlt (WU & KEWALRAMANI, 2006). Dagegen repliziert z.B. das Poliovirus oder das murine Zytomegalovirus produktiv in DCs, da die Zellen, wie auch beim FV, offensichtlich den richtigen Rezeptor für diese Viren exprimieren (MATHYS et al., 2003, WAHID et al., 2005). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie lassen den Schluss zu, dass das FV in den DCs einen vollständigen Replikationszyklus durchläuft. Die FV-Infektion von unreifen DCs eröffnet dem Virus die Möglichkeit, durch Migration der DCs aus der Peripherie in lymphoide Organe vorzudringen. Damit spielen unreife DCs möglicherweise eine wichtige Rolle bei der Verbreitung und Pathogenese von FV in der Maus. Eine solche

Bedeutung von unreifen infizierten DCs ist auch schon bei HIV-1 (CAMERON et al., 1992) und HSV-1 (MIKLOSKA et al., 2001) beschrieben worden.

In weiteren Untersuchungen wurde in der vorliegenden Arbeit die Infektion von plasmazytoiden DCs (pDCs) mit dem FV untersucht. pDCs produzieren große Mengen von antiviralem Typ I Interferon als Reaktion auf Viren, bakterielle DNA, einzelsträngige RNA oder Oligodeosynukleotide mit CpG-Motif. (CpG-ODN). Durch diese Fähigkeit gelten diese Zellen als die Spezialisten bei der Abwehr viraler Infektionen (COLONNA et al., 2004, SIEGAL et al., 1999). Interferon α hat auch eine Bedeutung bei der Therapie einer FV-Infektion (GERLACH et al., 2006).

Die Reduktion der Anzahl von pDCs und der Verlust ihrer Fähigkeit, IFN- α zu produzieren, geht bei einer HIV-Infektion einher mit einer erhöhten Viruslast und einer Zunahme an opportunistischen Infektionen (DONAGHY et al., 2001; SOUMELIS et al., 2001). Bei anderen Viren, wie z.B. bei HBV, HCV und RSV (WANG et al., 2006, ZHANG & WANG, 2005) konnte dieses auch gezeigt werden. Bei der FV-Infektion zeigte sich aber, dass pDCs, die *ex vivo* aus Milzen infizierter Mäuse isoliert wurden, nicht infiziert waren und auch *in vitro* generierte pDCs nur eine sehr geringe Infektionsrate aufwiesen. Mit diesen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass pDCs sich kaum mit FV infizieren lassen und vermutlich keine große Bedeutung bei der Pathogenese dieser Infektion haben. Für die weiteren Untersuchungen wurde der Schwerpunkt daher auf die Untersuchung myeloider DCs gelegt.

5.3. Einfluss der FV-Infektion auf die Funktion von DCs

DCs spielen eine Hauptrolle bei der Initiierung einer antiviralen T-Zellantwort (BANCHEREAU et al., 2000, BANCHEREAU & STEINMANN, 1998). Aufgrund dieser Eigenschaft sind DCs ein prädestiniertes Ziel viraler Immunevasionsstrategien, um einer antiviralen Immunantwort entgegenzuwirken. Dies konnte für HIV, Masern, Vaccinia oder HSV-1 bereits gezeigt werden (RINALDO et al., 2004). Diese Viren haben Mechanismen entwickelt, die der Etablierung einer effizienten antiviralen T-Zellantwort entgegenwirken (KLAGGE & SCHNEIDER-SCHAULIES, 1999, POLLARA et al., 2005). Zu Beginn dieser Arbeit war nicht bekannt, ob auch FV die Infektion von DCs als Strategie der Immunevasion nutzt. Die Ergebnisse zeigten, dass DCs, unabhängig von ihrem Reifegrad, permissiv mit FV infiziert waren. Es stellte sich daher die Frage, ob die FV-Infektion Auswirkungen auf den Phänotyp und die Funktion von DCs hat. Unreife und reife DCs wurden durchflusszytometrisch auf

phänotypische Veränderungen nach Infektion untersucht. FV-infizierte DCs exprimierten keine kostimulatorischen Marker (CD80, CD86 und CD40) und auch der Reifungsmarker (CD83) war herunterreguliert. Die Expression der Antigenpräsentationsmoleküle (MHCI und MHCII) wurde dagegen durch FV nicht beeinflusst (siehe Abbildung 21). Somit liegt bei den DCs, die mit FV infiziert sind, offenbar ein Reifungsdefekt vor.

Durch die verminderte Expression der Oberflächenmoleküle könnte das FV mehrere Eigenschaften von DCs beeinflussen. Durch das Fehlen von kostimulatorischen Markern wird die T-Zell-Aktivierung zum Teil verhindert. Für die Aktivierung von T-Zellen sind 2 Signale notwendig: Die Erkennung des Antigen/MHC Komplexes durch den T-Zell-Rezeptor und ein Kostimulationssignal (COYLE & GUTIERREZ-RAMOS, 2001). Dieses zweite Signal kann beispielsweise die Differenzierung von T-Zellen in eine Effektorzelle auslösen. Fehlt das kostimulatorische Signal, werden die T-Zellen anerg. Dies bedeutet, dass die T-Zellen nicht mehr mit Proliferation auf Antigene reagieren und nicht mehr zu Effektorzellen differenzieren können (CHEN, 2004, GREENWALD et al., 2005).

Die Reduktion des kostimulatorischen Moleküls CD80 auf DCs könnte für FV in zweierlei Hinsicht von Vorteil sein. Es wurde gezeigt, dass Zellen, die kein CD80 auf der Oberfläche exprimieren, der Erkennung und Lyse durch NK-Zellen entgehen können (CHAMBERS et al., 1996). Dagegen begünstigt eine reduzierte Expression von MHC Klasse I Molekülen auf der Oberfläche von Zellen eine NK-Zell-vermittelte Lyse (KARRE & WELSH, 1997). Bei FV-infizierten DCs waren allerdings die MHCI Moleküle nicht reduziert. Des Weiteren kann die fehlende Kostimulation der T-Zellen über CD28 in einer T-Zell-Anergie resultieren (POWELL et al., 1998). Die dadurch fehlende T-Zell Antwort könnte dann eine Persistenz von FV im Wirt zur Folge haben.

Die Bindung des T-Zell-Moleküls CD40-Ligand (CD40L) an CD40 auf DCs bewirkt eine terminale Differenzierung der DCs (SERVET-DELPRAT et al., 2000). Die Interaktion induziert sowohl die Expression der MHCI, MHCII und kostimulatorischen Molekülen auf DCs, als auch die Produktion von Zytokinen (IL-12, TNF- α , IL-8), die für die volle Aktivierung, Differenzierung und Zytokinproduktion von naiven CD4⁺ T-Zellen notwendig sind (SCHLIENGER et al., 2000). Die hier beschriebene Reduktion von CD40 auf FV-infizierten DCs kann somit eine Auswirkung auf die Reifung von DCs und die Induktion einer T-Zell-Antwort haben.

Ein wichtiger Marker von reifen DCs ist CD83 (ZHOU & TEDDY, 1995). Es konnte beobachtet werden, dass die Expression dieses Markers auf FV-infizierten DCs herunterreguliert wurde. Bis heute ist die Funktion und der Ligand von CD83 noch unbekannt. KRUSE et al. (2000) konnten eine verminderte T-Zell-Stimulation durch HSV-1-infizierte DCs nachweisen und identifizierten als Mechanismus eine spezifische lysosomale Degradation von CD83 durch HSV-1, die zu einer starken Verminderung der CD83-Dichte auf der Zelloberfläche führte. Die selektive Expression von CD83 auf reifen DCs, welche die wichtigsten antigenpräsentierenden Zellen des Immunsystems darstellen, deutet auf eine bedeutende Funktion des Moleküls bei der T-Zell-Aktivierung hin. Welche molekularen Folgen die Reduktion der Expression von CD83 auf FV-infizierten DCs hat, müssen weitere Untersuchungen klären.

Der molekulare Mechanismus des Reifungsdefektes von DCs nach einer FV Infektion konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden. LÖWENDORF et al. (2004) berichteten, dass bei dem murinen Zytomegalievirus (MCMV) bestimmte Gene für eine reduzierte Oberflächenexpression von CD86 und CD40 auf DCs verantwortlich sind. Bei der Studie wurden bestimmte MCMV-Deletionsmutanten hergestellt, bei denen jeweils größere Genbereiche mit nicht Strukturgenen fehlten. Bei Screeningverfahren konnten sie ein ca. 12kbp großes virales Gen lokalisieren und identifizieren, das einen negativen Einfluss auf die Zelloberflächenexpression von CD40 und CD86 auf APC hatte. Dieses Verfahren lässt sich leider nicht auf FV übertragen, da sein Genom nur aus drei Strukturgenen besteht, so dass keine Deletionsmutanten hergestellt werden können.

Eine weitere wichtige Funktion von DCs ist die Produktion von Zytokinen. Damit können die Zellen nicht nur die Proliferation von T-Zellen verstärken, sondern auch die Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen in TH₁-TH₂ beeinflussen. Daher war von Interesse, ob die FV-Infektion die Zytokinproduktion verändern kann. IL-12 und IL-10 sind die wichtigsten Zytokine, die von DCs zur Aktivierung und Differenzierung von T-Zellen produziert werden (MOSER & MURPHY, 2000). Nach Stimulation mit CpG ODN konnte eine reduzierte Produktion von IL-12 bei infizierten DCs gemessen werden. Damit wurde gezeigt, dass die FV-Infektion bei bestimmten Stimuli die Sekretion von TH₁-Zytokinen durch DCs inhibiert. Nach der Stimulation mit Poly(I:C) konnte dagegen kein Unterschied zwischen uninfizierten und infizierten DCs festgestellt werden. Die biologische Relevanz der reduzierten IL-12 Produktion von FV-infizierten

DCs nach CpG-Gabe ist allerdings nicht vollständig bekannt. Eine Aktivierung des TLR-9/CpG Signalweges findet während einer FV-Infektion nicht statt, da FV keine TLR-9 Liganden besitzt. Die unveränderte IL-12 Produktion nach Poly(I:C) Gabe scheint dagegen relevanter zu sein, da TLRs von murinen Retroviren TLR-3 Liganden sein können (ABUJAMRA et al., 2006).

In der vorliegenden Arbeit wurde auch die Produktion von dem immunsuppressiven Zytokin IL-10 durch DCs gemessen. In der Literatur ist aber bei anderen Viren schon beschrieben worden, dass IL-10 eine Bedeutung für die induzierte Immunsuppression hat (ROBERTSON & HASENKRUG, 2006). Bei unserer Studie konnte aber keine erhöhte Produktion von IL-10 durch FV-infizierte DCs nachgewiesen werden. Das lässt vermuten, dass IL-10 bei der Immunsuppression im FV-Modell keine Rolle spielt.

Ein Schwerpunkt der Arbeit war die videomikroskopische Beobachtung der Interaktion von FV-infizierten DCs und T-Zellen in einer dreidimensionalen Kollagenmatrix. Es konnte in der Literatur schon gezeigt werden, dass Effektor CD8⁺ T-Zellen bei einem langen Kontakt mit DCs aktiviert werden, während bei kurzen Kontakten eher Toleranz induziert wird (HUGUES et al., 2004). Bisher war aber wenig über den Kontakt zwischen CD4⁺ T-Zellen und DCs bekannt. Ziel der vorliegenden Studie war es, die Kontaktdauer uninfizierter und infizierter DC mit naiven CD4⁺ T-Zellen zu untersuchen.

Dabei wurde festgestellt, dass die Kontakte zwischen FV-infizierten DCs und T-Zellen signifikant länger waren als mit uninfizierten DCs. Besonders die Anzahl von sehr langen Kontakten (>60min) war bei den infizierten DCs signifikant erhöht (siehe Abbildung 27).

Die Kontaktdauer zwischen DCs und T-Zellen kann von verschiedenen Faktoren beeinflusst werden. Einerseits ist die Dauer der Kontakte von der Funktion der eingesetzten Zellen abhängig. Die Kontakte zwischen Effektorzellen und DCs sind nur wenige Minuten lang, dagegen benötigen naive T-Zellen längere Kontakte, um aktiviert zu werden (LEZZI et al., 1999, VAN STIPDONK et al., 2003). In dieser Arbeit wurden videomikroskopische Analysen mit naiven OVA-transgenen CD4⁺ T-Zellen durchgeführt. Bisher ist aber noch nicht eindeutig geklärt, welche Kontaktdauer zu einer guten CD4⁺ T-Zell Aktivierung führt. In der Literatur sind zwei Modellmechanismen zu finden, die den Vorgang der Aktivierung und T Zell-Proliferation erklären: Die statischen langlebigen Kontakte oder die dynamischen kurzlebigen Kontakte.

Bei den statischen langlebigen Kontakten wird eine so genannte Immunologische Synapse gebildet (DELON, 2000). Bei dieser wird eine feste Bindung zwischen APC und T-Zelle eingegangen und es erfolgt ein intensiver Informationsaustausch. Das Modell geht davon aus, dass ein dauerhafter Kontakt von 6-20stündiger Dauer nötig ist, um eine T-Zelle effizient zu aktivieren (DUSTIN et al., 2001).

In der Arbeit von FRIEDL & GUNZER (2002) zeigten sich dynamische Kontakte zwischen APC und CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen. Diese dynamischen Kontakte sind im Wesentlichen durch eine kurze Kontaktzeit und eine aktive Wanderung der T-Zelle auf den APC gekennzeichnet. In 3D-Kollagenkulturen wurden kurzlebige Kalziumströme in T-Zellen als Zeichen ihrer Aktivierung und konsekutive T-Zellproliferation nachgewiesen (GUNZER et al., 2000). Dynamische Kontakte führen nach nur wenigen Minuten (10-20min) zur Lösung der Interaktion und Ausbildung weiterer Interaktionen mit benachbarten APC (GUNZER et al., 2000). Infolge der Beobachtung serieller Kontakte einer T-Zelle zu verschiedenen DCs in kurzer Abfolge wurde die Akkumulation mehrerer kurzer Aktivierungssignale postuliert, die letztlich zu einer optimalen T-Zell Aktivierung führt. Verschiedene Studien geben Hinweise auf eine Koexistenz der beiden Modelle. Es wurden sowohl statische als auch dynamische Kontakte von T-Zellen mit APC beobachtet (MILLER et al., 2002, BOUSSO et al., 2002). MEMPELL et al. (2004) verband dann die beiden Hypothesen zu einem Modell, das drei Phasen beschreibt. In der ersten Phase findet man kurze, dynamische Kontakte und die Expression von Aktivierungsmarkern. In der zweiten Phase ist die Mehrzahl der Kontakte länger als 60 Minuten und die T-Zellen beginnen Zytokine zu produzieren. In einer dritten Phase kommt es dann zur Proliferation der T-Zellen.

In Übereinstimmung mit diesem Modell zeigte sich bei unseren Untersuchungen, bei denen vor allem die frühe Phase der DC-T-Zell Interaktion charakterisiert wurde, viele kurze Kontakte. Dies korrelierte auch mit einer Expression von Aktivierungsmarkern auf den T-Zellen. Allerdings kam es bei FV-infizierten DCs trotz einer größeren Anzahl von längeren Kontakten mit T-Zellen nicht zu einer effizienten Proliferation dieser Zellen. Die dritte Phase der T-Zell-Aktivierung scheint bei FV-infizierten DCs also durch die Infektion gestört zu sein.

5.4. Die Rolle Dendritischer Zellen in der FV-induzierten Immunsuppression

Das angeborene Immunsystem ist in den ersten Tagen nach einer Infektion in der Lage, die Ausbreitung von Erregern einzuschränken. Für eine effiziente Kontrolle einer Virus-Infektion ist jedoch meistens die Induktion einer spezifischen Immunantwort notwendig. Sind Viren nun in der Lage, die Immunantwort gegen sich und andere Pathogene zu unterdrücken, kann dies für den Wirt schwerwiegende Folgen haben. Diese Suppression der Immunantwort gibt dem Virus die Chance, erfolgreich im Wirt zu replizieren, auf neue Wirtsindividuen übertragen zu werden und in einer Wirtspopulation zu persistieren. Um bessere Therapien gegen virale Erkrankungen entwickeln zu können, ist es daher entscheidend, die Mechanismen der viralen-induzierten Immunsuppression zu verstehen.

Ein möglicher Mechanismus sind regulatorische T-Zellen (Treg-Zellen), die schon bei einigen Viren wie z.B. SIV, HBV, HIV, FIV und HTLV-1 beschrieben worden sind (NIXON et al., 2005, HAYASE et al., 2005, ROBERTSON & HASENKRUG, 2006). Während der akuten Phase einer FV-Infektion kommt es zu einem Funktionsverlust von Effektor T-Zellen und damit verbunden zu einer verminderten Antikörperantwort. Als Ursache konnte gezeigt werden, dass induzierte Treg-Zellen diese Immunsuppression auslösen (DITTMER et al., 2004, Iwashiro et al., 2001). Offen ist allerdings, wie das FV die Expansion von induzierten Treg-Zellen beeinflussen kann. In der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass unreife DCs Treg-Zellen induzieren können, nachdem sie Kontakt mit naiven T-Zellen hatten (GAD et al., 2004, LEVINGS et al., 2005). Diese Treg-Induktion ist unabhängig von den Kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 (YAMAZAKI et al., 2006), die auf unreifen DCs nur schwach exprimiert sind. FV-infizierte DCs haben einen Phänotyp, der dem von unreifen DCs teilweise entspricht, was vor allem durch die starke Reduktion der CD80 und CD86 Expression deutlich wird. Die infizierten DCs waren in der Lage, naive CD4⁺ T-Zellen zu aktivieren, aber nicht zur Proliferation anzuregen. Daraus kann man schlussfolgern, dass nach der Stimulation von naiven T-Zellen durch FV-infizierte DCs nicht nur CD4⁺ Helfer T-Zellen entstehen, sondern möglicherweise auch Treg-Zellen. Treg-Zellen können *in vitro* ohne Zugabe von IL-2 nicht proliferieren (SAKAGUCHI et al., 1995, VON BÖHMER, 2005). Außerdem supprimieren sie die Proliferation anderer T-Zellen. Bei der phänotypischen Analyse der T-Zellen aus der Kollagenmatrix wurde dann auch in der vorliegenden Studie eine signifikante

Erhöhung von CD25⁺ Foxp3⁺ T-Zellen nach Inkubation mit FV-infizierten DCs gemessen. Zellen mit diesem Marker werden nach ASANO et al. (1996) als regulatorische T-Zellen bezeichnet.

Virus-infizierte DCs können somit eine Expansion von Treg-Zellen auslösen. Eine solche Expansion von Treg-Zellen ist für die akute FV-Infektion in der Maus (ZELINSKY et al., 2006) und die SIV-Infektion im Affen (ESTES et al., 2006) beschrieben worden. Die induzierten Treg-Zellen supprimieren dann CD8⁺ T-Zellen in der akuten Phase der Infektion, wodurch das Virus nicht eliminiert werden kann und es zu einer chronischen Infektion kommt. Molekulare Mechanismen, die zur Induktion von Tregs führen, sind noch kaum aufgeklärt. Es existieren allerdings eine Vielzahl von Untersuchungsergebnissen, die eine Beteiligung unterschiedlich modifizierter DCs an der Entstehung von CD4⁺CD25⁺ Tregs *in vivo* nahe legen (BACCHETTA et al., 2005). So kann z.B. die HIV-1 Infektion von DCs die Produktion von suppressivem IL-10 erhöhen, was dann zu einer reduzierten CTL-Antwort gegen das Virus führt (MAJUMDER et al., 2005). In diesem Zusammenhang könnten durch IL-10 induzierte Treg-Zellen eine Rolle spielen.

Es ist bekannt, dass Zytokine wie IL-10 und TGF- β eine wichtige Rolle, bei der Induktion von Treg-Zellen spielen (PENG et al., 2004, LEVINGS et al., 2002). Dieses konnte schon bei einigen Viren wie z.B. bei HCV, EBV und HIV gezeigt werden (ROBERTSON & HASENKRUG, 2006). In der vorliegenden Studie konnte allerdings keine erhöhte Produktion von IL-10 durch FV-infizierte DCs festgestellt werden. Ob TGF- β im FV-Modell eine Bedeutung hat, müssen weitere Untersuchungen klären.

Neben der Induktion von Treg-Zellen spielen die Zytokine IL-10 und TGF- β auch bei der Funktion von Treg-Zellen eine Rolle. Es ist in einigen Modellen beschrieben worden, dass Treg-Zellen über IL-10 oder TGF- β ihre suppressive Wirkung ausüben (JONULEIT et al., 2001; HORI et al., 2003). Allerdings konnte in der FV-Infektion bisher kein suppressiver Effekt dieser Zytokine gezeigt werden (DITTMER et al., 2004, ROBERTSON et al., 2006). Viel mehr gibt es Hinweise, dass der Zell-Zell-Kontakt entscheidend ist für die Treg-Zell vermittelte Suppression ist. Dieses wird dadurch gestärkt, das ROBERTSON et al. (2006) im FV-Modell beschreiben hat, das der direkte Zell-Zell-Kontakt zwischen CTL und Treg-Zellen zu einer verminderten Funktion der CTL führt. Welche Oberflächenmoleküle für diesen Zell-Zell-Kontakt verantwortlich sind, ist aber noch völlig unbekannt.

In der Literatur sind Untersuchungen zu Kontaktzeiten zwischen DCs und natürlichen Treg-Zellen bisher nicht veröffentlicht worden. TANG et al. (2006) konnten zeigen, dass der Kontakt zwischen DCs und Treg-Zellen zu einer Hemmung der Proliferation von Effektor $CD4^+$ T-Zellen führt. Es wurde beschrieben, dass eine Treg-Zelle mehrere Effektor $CD4^+$ T-Zellen, die Kontakt zu derselben DCs gehabt haben, ausschalten kann. Dieses lässt vermuten, dass es sich um relativ lange Kontaktzeiten zwischen DCs und Treg-Zellen handeln muss. Bei dem entsprechenden Experiment der vorliegenden Arbeit ist auffallend, dass eine deutliche Korrelation zwischen der Zunahme der Anzahl von Treg-Zellen und den sehr langen Zellkontakten zwischen DCs und T-Zellen bestand, wenn FV-infizierte DCs verwendet wurden. Das kann darauf hindeuten, dass Treg-Zellen möglicherweise längere Kontakte zu DCs aufbauen als andere T-Zellen. Um dieses zu zeigen, haben wir ein Kontrollexperiment durchgeführt, in dem wir die Kontaktzeiten von OVA-beladenen uninfizierten DCs und natürliche Treg-Zellen gemessen haben. So wurden aus naiven transgenen Mäusen $CD4^+ CD25^+$ (natürliche regulatorische T-Zellen) isoliert, mit OVA-beladenen uninfizierten DCs kultiviert und die Zellkontakte über Videomikroskopie aufgezeichnet. Dabei wurde beobachtet, dass die Kontakte zwischen $CD4^+ CD25^+$ Zellen signifikant länger waren als bei der Kontrollgruppe mit $CD4^+ CD25^-$ Zellen. Der signifikante Unterschied resultierte aus einer großen Anzahl von sehr langen Kontakten zwischen $CD4^+ CD25^+$ T-Zellen und DCs. Im Mittel 55% aller Kontakte zwischen DCs und $CD4^+ CD25^+$ T-Zellen dauerten länger als 60min, während nur 30% aller Kontrakte zwischen DCs und $CD4^+ CD25^-$ mehr als 60min lang waren (siehe Abbildung 35B). Damit konnte gezeigt werden, dass auch zwischen natürlichen Treg-Zellen und DCs längere Kontakte stattfinden. Diese Ergebnisse bestätigen, dass sehr lange Kontakte zwischen T-Zellen und DCs wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der Induktion, Expansion oder Funktion von regulatorischen T-Zellen spielen.

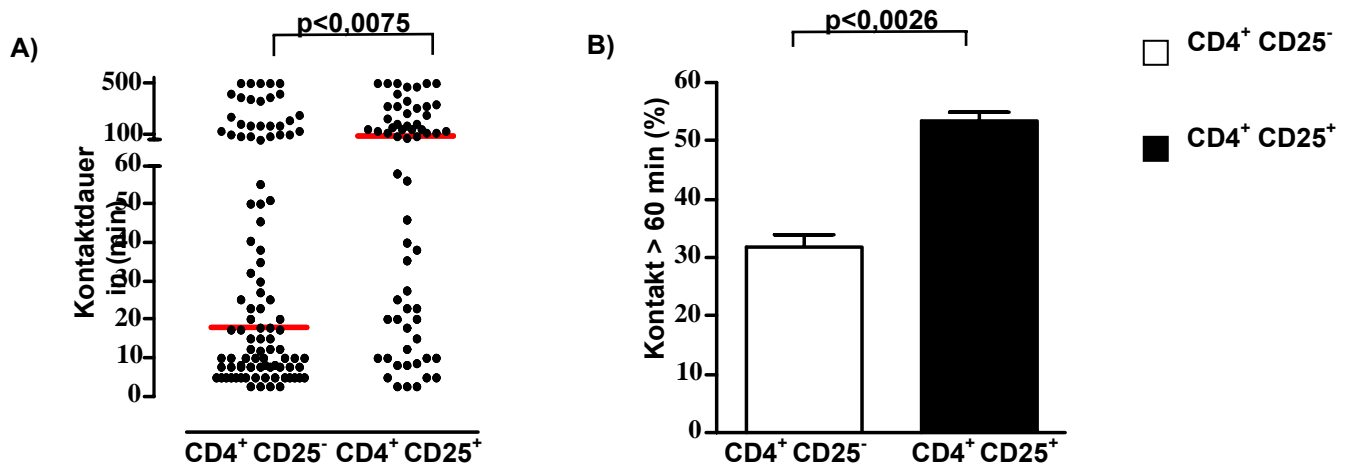
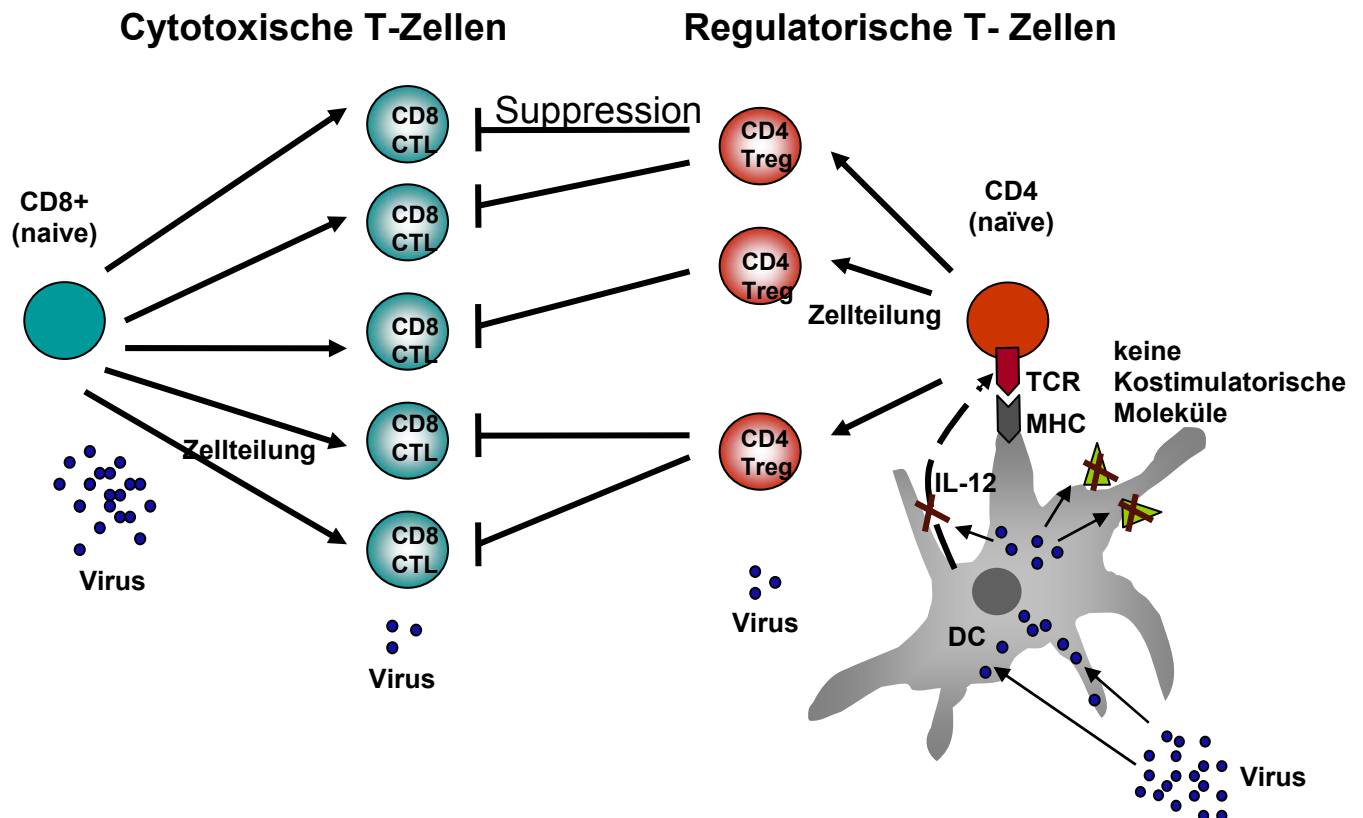


Abbildung 35: Kontaktzeiten zwischen Antigen-beladenen DCs und natürlichen regulatorischen T-Zellen

Der DC-T-Zell Kontakt wurde im 3-D Kollagengel analysiert. DCs wurden mit OVA-Antigen beladen und mit CD4⁺ CD25⁺ (schwarzer Balken) und CD4⁺ CD25⁻ (weißer Balken) gemischt. Im Bild A ist die Kontaktdauer in min zwischen CD4⁺ CD25⁺ bzw. CD4⁺ CD25⁻ und DCs abgebildet. Der rote Balken gibt den Mittelwert aus allen Kontaktzeiten an. Der Unterschied ist statistisch signifikant (p < 0,0075, Student t-Tests). Dargestellt sind die Ergebnisse aus zwei unabhängigen Experimenten. In Bild B sind die Kontakte in Prozent angegeben, die länger als 60min zwischen CD4⁺ CD25⁺ bzw. CD4⁺ CD25⁻ und DCs dauerten. Der Unterschied ist statistisch signifikant (p < 0,0026, Student t-Tests). Dargestellt sind die Ergebnisse aus zwei unabhängigen Experimenten.

Zusammenfassend kann man sagen, dass durch längere Kontakte von FV-infizierten DCs mit T-Zellen Treg-Zellen induziert oder expandiert werden. Durch diese Treg-Zellen wird dann in der akuten FV-Infektion die Funktion von CTL inhibiert, was zu einer chronischen Infektion beitragen kann. Diese Hypothese von der Induktion von regulatorischen T-Zellen durch FV-infizierte DCs ist in der Abbildung 36 schematisch noch einmal zusammengefasst.



(modifiziert nach SCHNEIDER-SCHAULIES & DITTMER, 2006)

Abbildung 36: Modell der Treg Zell Funktion bei einer Virusinfektion.

Nach einer Infektion werden zytotoxische $CD8^+$ T-Zellen (CTL) induziert, die proliferieren um virusinfizierte Zellen abzutöten. Wenn das Virus eliminiert ist, muss das Immunsystem die Funktion der CTL herunterregeln, da sonst das Immunsystem außer Kontrolle geraten könnte und in der Folge Autoimmunerkrankungen entstehen können. Diese Aufgabe übernehmen die so genannten regulatorischen T-Zellen. Diese Zellen starten mit ihrer Proliferation später im Verlauf der Infektion und regeln die Funktion von CTL ab einem gewissen Zeitpunkt herunter. Ein Virus kann die Balance zwischen CTL und regulatorischen T-Zellen über die Infektion von DCs stören.

5.5. Therapeutische Relevanz der Aktivierung von FV-infizierten DCs durch CpG

Ein neues immunstimulatives Agens tritt seit Mitte der 90er Jahre verstärkt in den Blickpunkt des Interesses. Dabei handelt es sich um synthetische Oligodesoxynukleotide mit CpG-Motiv (CpG-ODN). CpG-ODN induzieren *in vivo* eine

"unspezifische" Aktivierung von immunologischen Zellen (z.B. B-Zellen und APC) und ein Th1-dominiertes Zytokinmuster. Somit könnten CpG-ODN als Adjuvants bei Impfungen und therapeutisch in der Immuntherapie von Infektionen, Tumoren und Allergien eingesetzt werden.

KRAFT et al., (2005) haben gezeigt, dass eine CpG-Behandlung in der akuten Phase einer FV-Infektion 74% der Mäuse vor der Entstehung einer Virus-induzierten Leukämie schützt. Dieser CpG vermittelte Effekt führt zu einer Reduktion der Viruslast in der Milz und im Blut der Mäuse. Bei anderen Viren ist dieser antivirale Effekt von CpGs ebenfalls beschrieben worden (KAMSTRUP et al., 2006, MAPLETOFT et al., 2006). Bis heute ist aber nicht genau bekannt, wie die CpGs bei Virusinfektionen wirken. Es konnte im FV Model gezeigt werden, dass unreife FV-infizierte DCs *in vitro* teilweise ausreifen, wenn sie mit CpG behandelt worden sind. Am stärksten wurden die Moleküle, CD80 und CD86 nach Stimulation wieder exprimiert. Diese Ausreifung von FV-infizierten DCs könnte sich in mehrfacher Hinsicht positiv auf das Immunsystem auswirken. So könnte die fehlende Kostimulation zwischen CD80/86 auf DCs und CD28 auf T-Zellen wieder hergestellt werden. Dieses kann dazu führen, dass CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen wieder stimuliert werden und damit die FV-spezifische T-Zell Antwort verstärkt wird. Als weiterer möglicher Mechanismus kommt eine Funktion von CD80 bei der Erkennung von NK-Zellen in Frage. NK-Zellen können CD80 auf DCs erkennen und die Zellen in der Folge lysieren (CHAMBERS et al., 1996). Dadurch könnte sich das Virus mit Hilfe der DCs nicht mehr ausbreiten und die Viruslast würde sinken. Dieses lässt den Schluss zu, dass eine CpG-Behandlung zu einer besseren T-Zell Antwort führt, wie kürzlich auch von KRAFT et al., (2007) gezeigt wurde.

Diese Ergebnisse zeigen neue Strategien auf für eine Behandlung von Virus-induzierter Immunsuppression, die durch einen Funktionsverlust von DCs bedingt ist. In der Zukunft werden wir im FV Modell versuchen, die induzierte Immunsuppression experimentell zu verhindern, um so neue Strategien zur Verhinderung von chronischen Infektionen zu entwickeln.

6. Zusammenfassung

Retroviren haben immunmodulatorische Mechanismen entwickelt, um dem Angriff durch das Immunsystem zu entgehen. Hierbei spielt besonders die generalisierte Immunsuppression bei Retrovirusinfektionen eine wichtige Rolle. Die Grundlagen dieser Immunsuppression sind jedoch noch weitgehend ungeklärt, aber eine entscheidende Rolle könnte dabei den Dendritischen Zellen (DCs) zukommen. DCs sind professionelle antigenpräsentierende Zellen, die für die T-Zell-Aktivierung verantwortlich sind. Sie stellen ein essentielles Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunität dar.

Das murine Friend Virus (FV), welches zur Familie der Retroviren gehört, hat immunmodulatorische Mechanismen entwickelt, um dem Angriff durch das Immunsystem zu entgehen und eine chronische Infektion zu etablieren. So werden bei der akuten Infektion von Mäusen mit dem FV regulatorische T-Zellen gebildet, die für eine Suppression von T-Zellfunktionen verantwortlich sind.

In der vorliegenden Arbeit wurde das FV-Modell verwendet, um die Interaktionen von DCs mit Retroviren zu untersuchen. Dabei wurde die Bedeutung einer FV Infektion von DCs bei der Virus-induzierten Immunsuppression bestimmt.

Es war bekannt, dass FV Knochenmarkstammzellen *in vivo* infizieren kann. Aus dem Knochenmark von akut infizierten Mäusen konnten myeloide DCs generiert werden, die zu ca. 10-20% mit FV infiziert waren, plasmazytoide DCs waren dagegen so gut wie nicht infiziert. Die Infektion myeloider DCs war produktiv und infizierte DCs konnten das Virus *in vitro* und *in vivo* auf andere Zellen übertragen.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde die Funktion und der Phänotyp der FV-infizierten myeloiden DCs untersucht. Die FV-Infektion führte zu einem Reifungsdefekt in DCs. So exprimierten infizierte DCs so gut wie keine kostimulatorische Moleküle (CD80, CD86, CD40) und auch der Reifungsmarker CD83 war deutlich herunterreguliert. Dagegen gab es keine Unterschiede zwischen uninfizierten und infizierten DCs in der Expression der Antigen-präsentierenden Moleküle MHCI und MHCII. Die Produktion der Zytokine IL-12 und IL-10 war bei infizierten DCs vermindert. Um die Funktion von FV-infizierten DCs zu untersuchen, wurde ihre Interaktion mit T-Zellen charakterisiert. Die Kontakte von FV-infizierten DCs mit naiven Antigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen waren signifikant länger als bei uninfizierten DCs. Vor allem sehr lange Kontakte traten häufiger auf. Infizierte DCs konnten zwar CD4⁺ T-Zellen noch aktivieren, aber nicht mehr zur Proliferation

anregen. Dies ließ sich dadurch erklären, dass infizierte DCs regulatorische T-Zellen expandierten, die eine Inhibition der T-Zell Proliferation verursachten.

Die Expansion von regulatorischen T-Zellen durch virus-infizierte DCs ist eine bisher unbekannte Strategie von Retroviren, um der Immunantwort des Wirts zu entgehen. Dieser Mechanismus könnte sowohl zur Virus-vermittelten Immunsuppression als auch zur Etablierung der lebenslangen Viruspersistenz im Wirt beitragen.

Therapeutisch könnte dies eventuell durch eine Behandlung mit immunostimulativen CpG-ODN Molekülen verhindert werden, die in der Lage sind infizierte DCs teilweise wieder ausreifen zu lassen und wie von KRAFT et al. (2005) gezeigt, die FV-induzierte Immunsuppression *in vivo* zu vermindern.

6. Summary

Retroviruses have developed immunomodulatory mechanisms to escape being attacked by the immune system. Thus the generalised immune suppression by retroviral infections plays a particularly important role. Although the basic principles of this immune suppression remain for the most part unqualified, there is evidence that the dendritic cells play a decisive role in the process. DCs are professional antigen-presenting cells, responsible for T-cell activation. They present an essential link between the innate and the adaptive immunity.

The murine Friend virus (FV), which belongs to the family of retroviruses, has developed immunomodulatory mechanisms to escape being attacked by the immune system and to hence establish a chronic infection. Thus, in the acute infection of mice with FV, regulatory T cells are cultivated, which are responsible for the suppression of T cell function.

In the current study, the FV model has been used to examine the interactions of DCs with retroviruses. Thus the significance of a FV infection on DCs could be determined by the virus-induced immune suppression.

It is known that *in vivo* FV bone marrow stem cells are infectious. Myeloid DCs could be generated from the bone marrow of acutely infected mice which were infected with FV up to \pm 10-20%; by comparison, plasmacytoid DCs were virtually uninfected.

The infection of myeloid DCs was productive and infected DCs could transmit the virus both *in vitro* and *in vivo* to other cells.

Further work processes examined the function and phenotype of FV-infected myeloid DCs. The FV infection led to defective maturation in DCs. Thus, the expression of co-stimulatory molecules (CD80, CD86, CD40) in infected DCs was very low, and even the maturity marker, CD83, was significantly down-regulated. In contrast, there were no differences between the infected and uninfected DCs in the expression of the antigen-presenting molecules, MHC I and MHC II. The production of the cytokines IL-12 and IL-10 was reduced in the infected DCs. To examine the function of FV-infected DCs, their interaction with T cells was characterised. The contacts of FV-infected DCs with naïve antigen-specific CD4⁺ T cells were significantly longer than those of uninfected DCs. Above all, very long contacts frequently occurred. Although infected DCs could still activate CD4⁺ T cells, they were unable to proliferate. Thus, this could be explained in that infected DCs expanded regulatory T cells and caused an inhibition of T cell proliferation.

Up to now, the expansion of regulatory T cells by virus-infected DCs has been an unknown strategy to escape the host's immune response. This mechanism could contribute to both the virus-mediated immunosuppression as well as to the establishment of the life-long viral persistence in the host.

Therapeutically speaking, this could possibly be avoided by a treatment of immunostimulatory CpG-ODN molecules that are able to allow infected DCs to partially mature again and, as shown by Kraft et al. (2005), to reduce FV-induced immunosuppression *in vivo*.

7. Literaturverzeichnis

Abbas, A.K., Murphy, K.M. und Sher, A. (1996)

Functional diversity of helper T lymphocytes.

Nature 383: 787-793

Abb J., Abb, H, Deinhardt F. (1983),

Phenotype of human alpha-interferon producing leucocytes identified by monoclonal antibodies.

Clin. Exp. Immunol. 52: 179-84

Abujamra, Al., Spanjaard, RA., Akinsheye, I., Zhao X., Faller, DV., Ghosh, SK. (2006)

Leukemia virus long terminal repeat activates NFkappaB pathway by a TLR3-dependent mechanism.

Virology 345: 390-403

Albert, M.L., Pearce, S.F.A., Francisco L.M., Sauter, B., Roy, P., Silverstein, R.L., Bhardwaj N. (1998)

Immature Dendritic Cells phagocytose apoptotic cells via CD 35 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes.

J. Exp. Med. 188: 1359-1368

Ardavin, C. (2003)

Origin, precursors and differentiation of mouse dendritic cells.

Nat. Rev. Immunol. 3: 582-90

Asano, M., Toda, M., Sakaguchi, N., Sakaguchi, S. (1996)

Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T-cell subpopulation.

J. Exp. Med. 184: 387-96

Asselin-Paturel, C., Boonstra, A., Dialod, M., Durand, I., Yeessaad, N., Dezutter-Dambyant, C., Vicari, A., O' Garra, A., Biron, C., Briere, F., Trinchieri, G. (2001)

Mouse type I IFN-producing cells are immature APC with plasmacytoid morphology.

Nat. Immunol. 12: 1144-50

Bacchetta R., Gregori S., and Roncarolo M.G. (2005).

CD4+ regulatory T cells: mechanisms of induction and effector function.

Autoimmun Rev 4: 491-496.

Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.J., Pulendran, B., Plaucka, K. (2000)

Immunobiology of dendritic cells.

Annu. Rev. Immunol. 18:767-811

Banchereau, J., Steinman R.M. (1998)

Dendritic cells and the control of immunity.

Nature 392, 245-252

Barchet, W., Cella, M., Colonna, M., (2005)

Plasmacytoid dendritic cells-virus experts of immunità.

S. Immunol. 17: 253-261

Barre-Sinoussi F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W. and Montagnier, L. (1983)

Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from patient at a risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS).

Science: 220:868-871.

Beck, K., Meyer-König, U., Weidmann, M., Nern, C., Hufert, F.T. (2003)

Human cytomegalovirus impairs cell function: a novel mechanism of cytomegalovirus immune escape.

Eur. J. Immunol., 33. 1528-1538

Becker, C., Stoll, S., Bopp, T., Schmitt, E., Schmitt, E., Jonuleit, H. (2006)

Regulatory T cells: present facts and future hopes.

Med. Microbiol. Immunol., 195: 113-124

Bell, D., Young W. J., Banchereau J. (1999)

Dendritic cells.

Adv. Immunol. 72: 255-324

Bjorck, P. (2001)

Isolation and characterization of plasmacytoid dendritic cells from FLT3 ligand and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-treated mice.

Blood 98: 3520-6

Blom, B., Ho, S., Antonenko, S., and Liu, Y.J. (2000)

Generation of interferon alpha-producing cell (pre-DC) 2 from human CD34⁺ hematopoietic stem.

J. Exp. Med, 192: 1785-1796

Borrow, P., Evans C. F. and Oldstone M. B. (1995)

Virus-induced immunosuppression: immune system-mediated destruction of virus-infected dendritic cells results in generalized immune suppression.

J. Virol. 69:1059–1070

Bosnjak, L., Jonas A. C., Abendroth, A. and Cunningham, A. (2005)

Dendritic cell Biology in Herpesvirus Infections.

Viral. Immunol. 18: 419-433

Bousso, P., Bhakta, N.R., Lewis, R.S., and Robey, E. (2002)

Dynamics of Thymocyte-Stromal Cell Interactions Visualized by Two-Photon Microscopy.

Science 296: 1876-80

Brawand, P., Fitzpatrick, D.R., Greenfield, B.W., Brasel, K., Maliszewski, C.R., and De Smedt, T. (2002)

Murine plasmacytoid pre-Dendritic cells generated from Flt3 Ligand-supplemented Bone Marrow cultures are immature APC.

J. Immunol., 26: 6712-6719

Bromley S.K., Burack W.R., Johnson KG. (2001)

The immunological synapse.

Annu Rev. Immunol. 19:375-396

Brun-Vezinet, F., Rouzioux, C., Montagnier, L., Chamaret, S., Grues, J., Barre-Sinoussi, F., Geroldi, D., Chermann, J.C., McCormick, J., Mitchell, S. (1984)

Prevalence of antibodies to lymphadenopathy-associated retrovirus in African patients with AIDS.

Science 226:453-456

Cabrera, R., Tu, Z., Xu, Y., Firpi, R.J., Rosen, H.R., Liu, C., Nelson, D.R. (2004)

An immunomodulatory role for CD4⁺ CD25⁺ regulatory T lymphocytes in hepatitis C virus infection.

Hepatology 40: 1062-71

Cameron, P.U., Freudenthal, P.S., Barker, J.M., Gezelter, S., Inaba, K., and Steinman, R.M. (1992).

Dendritic cells exposed to human immunodeficiency virus type-1 transmit a vigorous cytopathic infection to CD4⁺ T cells.

Science 257: 383-387.

Carlos, A. (2003)

Origin, precursors and differentiation of mouse dendritic cells.

Nature Reviews Immunology 3,1-9

Carvalho de Miranda C., Bonnefont-Rebeix, C., Rigal, D., Chabanne, L. (2006)

Dendritic cells in different animal species: an overview

Pathologie Biologie 54: 85-93

Caux, C. (1998)

Pathways of development of human dendritic cells.

Eur. J. Dermatol. 8: 375-384

Caux, C., Ait-Yahia, S., Chemin, K., de Bouteiller, O., Dieu-Nosjean, M.C., Homey, B., Massacrier, C., Vanbervliet, B., Zlotnik, A. and Vicari, A. (2000)

Dendritic cell biology and regulation of dendritic cell trafficking by chemokines.

Semin. Immunopathol, 22: 345-69

Caux, C., Vanbervliet, B., Massacrier, C., Dezutter-Dambuyant, C., de Saint-Vis, B., Jacquet, C., Yoenda, K., Imamura, S., Schmitt, D., Banchereau, J. (1996)

CD 34⁺ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell in response to GM-CSF + TNF α .

J. Exp. Med. 184: 695-706

Carreno, B. M & Collins, M. (2002)

The B7 family of ligands and its receptor: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses.

Annu. Rev. Immunol. 20: 29-53

Cella, M., Jarrossay, D., Facchetti, F., Alebardi, O., Nakajima, H., Lanzavecchia, A., Colonna, M. (1999)

Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon.

Nat. Med. 5: 919-923

Chambers, B.J., Salcedo, M., Ljunggren, H.G. (1996)

Triggering of natural killer cells by the costimulatory molecule CD80 (B7-1)

Immunity 5: 311-7

Chen L. (2004)

Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity.

Nature Rev. Immunol. 4:336-347.

- Chesebro B., Britt W., Evans L., Wehrly K., Nishio J. and Cloyd M. (1983)**
Characterization of monoclonal antibodies reactive with murine leukaemia virus use:
in analysis of strains of Friend MCF and Friend ecotropic murine leukaemia virus.
Virology 127: 134-148
- Chesnut, R.W. & Grey, H.M. (1986)**
Antigen presentation by B cells and its significance in T-B interactions.
Adv. Immunol. 39: 51-94
- Colonna, M., Trinchieri, G., and Liu, Y.J. (2004)**
Plasmacytoid dendritic cells in immunity.
Nat. Immunol 5: 1219-1226
- Coyle, A.J and Gutierrez-Ramos, J.C. (2001)**
The expanding B7 superfamily: increasing complexity in costimulatory signals
regulating T cell function.
Nat. Immunol. 2: 203-209
- Cyster, J.G. (1999)**
Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs.
Science 286: 2098-2102
- D' Andrea A.D. (1992)**
The interaction of the erythropoietin receptor and gp55.
Cancer Surv. 15:19-36
- Diebold, S.S., Montoya, M., Unger, H., Alexopoulou, L., Roy, P., Haswell, L.E.,
Al-Shamkhani, A., Flavell, R., Borrow, P., Reis e Sousa, D. (2003)**
Viral infection switches non-plasmacytoid dendritic cells into high interferon
producers.
Nature 424: 324-8
- Dittmer U, Brooks, D.M. and Hasenkrug, K.J. (1999)**
Requirement for multiple lymphocyte subsets in protection by a live attenuated
vaccine against retroviral infection.
Nat. Med. 5: 189-193
- Dittmer, U. und Hasenkrug, K.J. (2001).**
Cellular and molecular mechanisms of vaccine-induced protection against retroviral
infections.
Curr Mol Med. 1: 431-436.

Dittmer, U. He, H., Messer, R.J., Schimmer, S., Olbrich, A.R., Ohlen, C., Greenberg, P.D., Stromnes, IM., Iwashiro, M., Sakaguchi, S., Evans, L.H., Peterson, K.E., Yang, G., Hasenkrug, K.J. (2004)

Functional impairment of CD 8⁺ T cells by regulatory T cells during persistent retroviral infection.

Immunity 20: 293-303

Dittmer, U., Race, B., Peterson, K.E., Stromnes, I.M., Messer, R.J. and Hasenkrug, K.J. (2002)

Essential roles for CD8⁺ T cells and gamma interferon in protection of mice against retrovirus-induced immunosuppression.

J. Virol. 76: 450-454

Delon, J. (2000)

The Immunological Synapse.

Curr Biol. 10: 214

Donaghy, H., Pozniak A., Gazzard, B., Qazi, N., Gilmour, J., Gotch, F., Patterson, S. (2001).

Loss of blood CD11c (+) myeloid and CD11c(-) plasmacytoid dendritic cells in patients with HIV-1 infection correlates with HIV-1 RNA virus load.

Blood 98: 2574-6.

Dubois, B., Lamy, P. J., Chemin, K., Lachaux, A., and Kaiserlian, D. (2001).

Measles virus exploits dendritic cells to suppress CD4⁺ T-cell proliferation via expression of surface viral glycoproteins independently of T-cell trans-infection.

Cell Immunol 214: 173-183.

Dubsky, P., Ueno, H., Piqueras, B., Connolly, J., Banchereau, J., Palucka, A.K. (2005)

Human Dendritic cell subsets for vaccination.

J. Clin. Immun. 25: 551-572

Dustin, M. L., Allen, P. M. and Shaw, A. S. (2001)

Environmental control of immunological synapse formation and duration.

Trends Immunol. 22: 192-194.

Enders, J.F & Peebles, T.C. (1954)

Propagation in tissue cultures of cytopathogenic agents from patients with measles.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med 86:277-286

Engelmayer, J, Larsoon, M., Subklewe, M., Chahroudi, A., Cox, W.I., Steinman R.M., Bhardwaj, N. (1999)

Vaccinia virus inhibits the maturation of human dendritic cells: a novel mechanism of immune evasion.

J. Immunol. 163: 6762-8

Estes J.D., Li Q., Reynolds M.R., Wietgreffe, S., Duan, L., Schacker, T., Picker, J.T., Watkins, D.I., Lifson, J.D., Reilly, C., Carlis, J., Haase, A.T. (2006)

Premature induction of an immunosuppressive regulatory T-cell response during acute simian immunodeficiency virus infection.

J. Infect Dis. 193: 703-712

Finkelman, F.D., Holmes, J., Katona, I.M., Urban, J.F., Beckmann, M.P., Park, L.S., Schooley, K.A., Coffman R.L., Mosmann, T.R., und Paul, W.E. (1990)

Lymphokine control of in vivo immunoglobulin isotype selection.

Annu Rev. Immunol 8: 303-833

Fresnay S., Chalmers, DE., Ferrand, C., Colombain C., Newton I., Yerly-Motta V., Lienard A., Taily PD., Herve P., Tlberghien P., Saas P. (2002)

Polybrene and interleukin-4: two opposing factors for retroviral transduction of bone-marrow-derived dendritic cells.

J. Gene Med. 4:601-612

Friedl, P. and Gunzer, M. (2001).

Interaction of T cells with APCs: the serial encounter model.

Trends Immunol 22: 187-191.

Friedl, P., Noble, P. B. and Zänker, K.S. (1993)

Lymphocyte Migration in Three-Dimensional Collagen Gels. Comparison of Three Quantitative Methods for Analysing Cell Trajectories.

J Immunol. Meth. 165: 157-65

Friend, C. (1957)

Cell-free transmission in adult Swiss mice of a disease having the character of a leukaemia.

J. Exp. Med. 105: 307

Gad, M., Kristensen, N. N., Kury, E. and Clasesson M. H. (2004)

Characterization of T-regulatory cells, induced by immature dendritic cells, which inhibits enteroantigen-reactive colitis-inducing T-cell responses *in vitro* and *in vivo*.

Immunology 113:499-508

Gallo, R.C. (1986)

HTLV: The family of human T-lymphotropic retroviruses and their role in leukaemia and AIDS.

Med. Oncol. Pharmacother. 3: 265-267

Geijtenbeek, T., B., H., Torensma R. and Vliet S., J. (2000)

Identification of DC-Sign, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses.

Cell 100: 575-585

Gerlach, N., Schimmer, S., Weiss, S., Kalinke, U., Dittmer, U. (2006)

Effects of type I interferons on Friend retrovirus infection.

J. Virol. 80: 3438-44

German, R.N., Castellino, F., Han, R., Reis e Sousa, C., Romagnoli, P., Sadegh-Nasseri, S., Zhong, G.M. 1(1996)

Processing and presentation of endocytically acquired protein antigens by MHC class II and class I molecules.

Immunol Rev. 151: 5-30

Grabbe, S., Kampgen, E., Schuler, G. (2000)

Dendritic cells: multi-lineal and multi-functional.

Immunol Today 21: 431-3

Greaves, M.F., Owe J.J.T., and Raff, M.C. (1973)

T and B Lymphocytes: Origins properties and Roles in Immune Response.

Experpta Medica, Amsterdam

Greenwald R.J., Freeman G.J., Sharpe A.H. (2005)

The B7 family revisited.

Annu. Rev. Immunol. 23:515-548

Geijtenbeek, T. B., Krooshoop, D. J., Bleijs, D. A., van Vliet, S. J., van Duijnhoven, G. C., Grabovsky, V., Alon, R., Figdor, C. G. and van Kooyk, Y. (2000)

DC-SIGN-ICAM-2 interaction mediates dendritic cell trafficking.

Nat. Immunol 1: 353-357.

Geijtenbeek TB, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Adema GJ, van Kooyk Y, Figdor CG (2000)

Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses.

Cell 100: 575-585.

Gunzer, M., A., Schafer, S., Borgmann, S., Grabbe, K.S., Zanker, E., Brocker, B., Kempgen E. and Friedl, P. (2000)

Antigen presentation in extracellular matrix: interactions of T-sells with dendritic cells are dynamic, short lived and sequential.

Immuntiy 13: 323-332

Hayase, H. Ishizu, A., Ikeda, H., Miyatake, Y., Baba, T., Higuchi, M., Abe, A., Tomaru, U., Yoshiki, T. (2005)

Aberrant gene expression by CD25⁺ CD4⁺ immunoregulatory T cells in autoimmune-prone rats carrying the human T cell leukaemia virus type-I gene.

Int. Immunol. 17: 677-84

Hasenkrug, K.J., Brooks, D.M., Robertson, M.N., Srinivas, R.V. und Chesebro B. (1998)

Immunprotctive determinants in friend murine leukaemia virus envelope protein.

Virology 248: 66-73

Hasenkrug, K.J. & Dittmer U. (2007)

Immune Control and Prevention of Chronic Friend Retrovirus Infektion

Frontiers in Bioscience 12:1544-1551

Hasenkrug, K.J., & Chesebro, B. (1997)

Immunity to retroviral infection: The Friend virus model.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 10492-10495

Hoatlin, M.E. & Kabat, D. (1995)

Host-range control of a retroviral disease: Friend erythroleukämie.

Trends Microbiol. 3: 51-57

Hogquist K.A., Tomlinson A.J., Kieper W.C, MCGargill M.A., Hart MC, Naylor S., Jameson S.C. (1997)

Identification of a naturally occurring ligand for thymic positive selection.

Immunity 6:389-99

Hori, S., Nomura, T. and Sakaguchi S. (2003)

Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3.

Science 299: 1057-61

Hornung, V., Rothenfusser, S., Britsch, S., Krug, A., Jahresdorfer, B., Giese, T., Endres, S., Hartmann, G., (2002)

Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides.

J. Immunol. 168:4531-7

Howard, J.C. (1995)

Supply and transport of peptides presented by class I MHC molecules.

Curr. Opin. Immunol. 7: 69-76

Hugues, S., Fetler, L., Bonifaz, L., Helft, J., Ambland, F., Amigorena, S. (2004)

Distinct T cell dynamics in lymph nodes during the induction of tolerance and immunity.

Nat. Immunol. 5: 1235-1242

Hurst S.D., Sitterding S.M., Ji S., and Barrett T. A. (1997)

Differentiation of T cells in the Intestine of T cell receptor transgenic mice.

Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A 94: 3920-5

Iezzi, G., Scotet, E., Scheidegger, D., Lanzavecchia, A. (1999)

The interplay between the duration of TCR and cytokine signaling determines T cell polarization.

Eur. J. Immunol. 29: 4092-101

Inaba, K., Inaba, M., Romani, N., Aya, H., Deduchi, M., Ikehara, S., Muramatsu, S., Steiman, R.M. (1992)

Generation of large number of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor.

J. Exp. Med. 176 1693-1702

Inaba, K., Witmer-Pack, M., Inaba, K.S. Hathcook, H., Sakuta, M., Azuma, H Yagita, K., Okumura, P., Linsly, S., Ikehara, S., Muramatsu, S., Hodes, R.S., Steinmann R.M. (1994)

The tissue distribution of the B7-2 costimulator in mice: abundant expression on dendritic cells in situ and during maturation in vitro.

J. exp. Med. 180: 1849-1860

Iwashiro, M., Messer R.J., Peterson K.E. Stromnes I.M., Sugie T., Hasenkrug K.J. (2001)

Immunsuppression by CD4⁺ regulatory T cells induced by chronic retroviral infection.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 9226-9230

Jarrett, W.F., Martin, W.B., Crichton, G.W., Dalton, R.G. and Stewart M.F. (1964)

Transmission Experiments with Leukemia (Lymphosarkoma).

Nature, 202: 566-567

Janeway, C.A. & Travers, P. (1997)

Die humorale Immunantwort.

In C.A. Janeway und P. Travers: Immunologie

Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, pp 285-338

Jensen, P.E. (1999)

Mechanisms of antigen presentation.

Clin. Chem Lab. Med. 37: 179-86

Jiang, W., Swiggard, W. J., Heufler, C., Peng, M., Mirza, A., Steinman, R. M., and Nussenzweig, M. C. (1995)

The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing.

Nature 375: 151-155.

Jonuleit, H., Schmitt, E. Stassen, A., Tuettenberg, J., Knop and Enk A. H. (2001)

Identification and functional characterization of human CD4⁺CD25⁺ T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood.

J. Exp. Med. 193: 1285-94

Jonuleit, H., Schmitt, E. Stassen, A., Tuettenberg, J., Knop and Enk A. H. (2002)

Infectious tolerance: human CD25(+) regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4 (+) T helper cells.

J. Exp. Med. 196: 255-60

Kabat, D. (1989)

Molecular biology of Friend viral erythroleukemia.

Curr. Top Microbiol Immunol. 148: 1-42

Kadowaki, N., Antonenko, S., Liu, Y.J. (2001)

Distinct CpG DNA and polyinosinic-polycytidylic acid double-stranded RNA, respectively, stimulate CD11c-type 2 dendritic cell precursors and CD11c+ dendritic cells to produce type I IFN.

J. Immunol. 15: 2291-5

Kamstrup, S., Frimann, T.H., Barfoed, A.M. (2006)

Protection of Balb/c mice against infection with FMDV by immunostimulation with CpG oligonucleotides.

Antiviral Res. 72: 42-8

Karre, K., Welsh, R.M. (1997)

Viral decoy vetoes killer cell.

Nature 386: 446-7

Klagge I.M. & Schneider-Schaulies G.(1999)

Virus interactions with dendritic cells.

J. Gen. Virol. 80: 823-833

Klagge, I. M., ter Meulen, V., and Schneider-Schaulies, S. (2000)

Measles virus-induced promotion of dendritic cell maturation by soluble mediators does not overcome the immunosuppressive activity of viral glycoproteins on the cell surface.

Eur J. Immunol 30: 2741-2750.

Knight, S. C., Elsley, W. and Wang H. (1997)

Mechanisms of loss of functional dendritic cells in HIV-1 infection.

J. Leuk. Biology 62: 78-81

Kraft, A.R.M., Arndt T., Hasenkrug, KJ., Dittmer, U. (2005)

Effective treatment of retrovirus-induced suppression of antibody responses with CpG oligodeoxynucleotides.

J. Gen. Virol. 86:3365-8

Kraft, A.R.M., Krux, F., Schimmer, S., Claes, O., Greenberg, P.D., Dittmer, U. (2007)

CpG Oligodeoxynucleotides allow for effective adoptive T-cell therapy in chronic retroviral infection.

Blood in press

Kruse, M., O. Rosorius, F. Kratzer, G. Stelz, C. Kuhnt, G. Schuler, Hauber J. and Steinkasserer A. (2000)

Mature dendritic cells infected with herpes simplex virus type 1 exhibit inhibited T-cell stimulatory capacity.

J. Virol 74: 7127-36.

Langerhans, P. (1868)

Über die Nerven der menschlichen Haut.

Virchows Arch. Anat. 44: 325

Lander, R. & Chattopadhyay S.K., (1984)

A Mus dunni cell line that lacks sequences closely related to endogenous murine leukaemia viruses and can be infected by ectropic, amphotropic, xenotropic, and mink cell focus-forming viruses.

J. Virol. 52: 695-698

Lanzavecchia, A. (1996)

Mechanisms of antigen uptake for presentation.

Curr. Opin. Immunol. 8: 348-54

Lanzavecchia, A. & Sallusto, F. (2000)

Dynamics of T-lymphocyte responses, intermediates, effectors and memory cells.

Science 290: 92-97

Larsen, C.P., Ritchie, S.C., Hendrix, R., Linsly P.S., Hathcock, K.S., Hodes R.J., Lowry P.R., Lowry P., and Pearson T.C. (1994)

Regulation of immunostimulatory function and costimulatory molecule (B7-1 and B7-2) expression on murine dendritic cells.

J. Immunol. 152: 5208-5219

Le Bon, Etchart, N., Rossmann, C., Ashton, M., Hou, S., Gewert, D., Borrow, P., Tough, D.F. (2003)

Cross-priming of CD8⁺ T-cells stimulated by virus-induced type I interferon.

Nat. Immunol. 4: 1009-15

Lehner P.J. and Cresswell, P. (1996)

Processing and delivery presented by MHC class I molecules.

Curr. Opin. Immunol. 8:59-67

Liang, B., Wang, J.Y., und Watson, R.R. (1996)

Murine AIDS, a key to understanding retrovirus-induced immunodeficiency.

Viral Immunol. 9: 225-239

Levings, M.K., Bacchetta, R., Schulz, U., Roncarolo, M.G. (2002)

The role of IL-10 and TGF-beta in the differentiation and effector function of T regulatory cells.

Int. Arch Allergy Immunol. 129: 263-276

Levings, M.K., Gregori, S., Tresoldi, E., Cazzaniga, S., Bovini, C., Roncarolo, M. G. (2005)

Differentiation of Tr1 cells by immature dendritic cells requires IL-10 but not CD25⁺CD4⁺ Treg cells.

Blood 105:1162-1169

Levy, J.A., Hoffmann, A.D., Kramer, S.M., Landis, J.A., Shimabukuro, J.M., and Oshiro, L.S. (1984)

Isolation of lymphocytopathic retrovirus from San Francisco patients with AIDS.

Science 225:840-842

Lezzi, G., Scotet, E., Scheidegger, D., Lanzavecchia, A. (1999)

The interplay between the duration of TCR and cytokine signaling determines T cell polarization.

Eur. J. Immunol. 29: 4092-101

Liu, Y. (2001)

Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity

Cell 106: 259-262

Löwendorf, A., Kruger, C., Borst E.M., Wagner M., Just U., and Messerle M. (2004)

Identification of a Mouse Cytomegalovirus Gene Selectively Targeting CD86 Expression on Antigen-Presenting Cells.

J. Virol. 78: 13062-13071

Lore, K., Sönnernborg, A., Broström, C., Goh, L.E., Perrin, L., McDade, H., Stellbrink H.J., Gazzard, B., Weber, R., Napolitano, A. L., Kooyk Y., and Andersson, J. (2002)

Accumulation of Dendritic cells-SIGN⁺CD40⁺ dendritic cells with reduced CD80 and CD86 expression in lymphoid tissue during acute HIV-1 Infection.

AIDS 16: 683-692

Majumder, B., Janket, M., Schafer, E. A., Schaubert, K., Huang, X.L., Kan-Mitchell, J., Rinaldo, C.R., Jr. & Ayyavoo, V. (2005)

Human immunodeficiency virus type 1 Vpr impairs dendritic cell maturation and T-cell activation: implications for viral immune escape.

J. Virol. 79: 7990-8003

Mapletoft, J.W., Oumouna, M., Townsend, H.G., Gomis, S., Babiuk, L.A., van Drunen Little-van den Hurk s. (2006)

Formulation with CpG oligodeoxynucleotides increases cellular immunity and protection induced by vaccination of calves with formalin-inactivated bovine respiratory syncytial virus.

Virology 30: 316-23

Mahnke, K., Becher, E., Ricciardi-Castagnoli, P., Luger, T. A., Schwarz, T. and Grabbe, S. (1997).

CD14 is expressed by subsets of murine dendritic cells and upregulated by lipopolysaccharide.

Adv. Exp. Med. Biol. 417:145-59.

Majumder, B., Janket M.L., Schafer E.A. Schaubert K., Huang X.L., Kan-Mitchell J., Rinaldo C.R., and Ayyavoo, V. (2005)

Human immunodeficiency virus type 1 Vpr impairs dendritic cell maturation and T-cell activation: implications for viral immune escape.

J. Virol. 79: 7990-8003

Mathys, S., Schröder, T., Ellwart, T., Koszinowski, U.H., Messerle, M., Just, U. (2003)

Dendritic cells under influence of mouse cytomegalovirus have a physiologic dual role: to initiate and to restrict T cell activation.

J. Infect. Dis. 15: 988-99

Medzhitov, R. & Janeway C. Jr. (2000)

The Toll receptor family and microbial recognition.

Trends in Microbio. 10: 452-6

Mellman, I. & Steinman, R.M. (2001)

Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines.

Cell 106: 255-258

Mempel, T. R., Henrickson, S. E., and Von Andrian, U. H. (2004).

T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases.

Nature 427:154-159

Mikloska, Z., Bosnjak, L., and Cunningham, A.L. (2001)

Immature monocyte-derived dendritic cells are productively infected with herpes simplex virus type 1.

J. Virol. 75: 5958-5964.

Miller, M.J., Wei, S.H., Parker, I Cahalan, M.D. (2002)

Two-Photon Imaging of Lymphocyte Motility and Antigen Response in Intact Lymph Node.

Science 296:1869-73

Mittrucker, H.W., Kaufmann, S.H. (2004)

Mini-review: regulatory T cells and infection: suppression revisited.

Eur. J. Immunol. 34: 306-12

Miyazawa, M., Nishio, J., und Chesebro, B. (1988)

Genetic control of T cell responsiveness to the Friend murine leukaemia virus envelope antigen. Identification of class II loci of the H-2 as immune response genes.

J. Exp. Medicine 168:157-1605

Modrow S. & Falke D. (1998).

Molekulare Virologie, Spektrum Verlag

Moser M. & Murphy K.M (2000)

Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development.

Nat. Immunol. 1:199-2005

Mosmann, T.R. & Coffman, R.L. (1989)

TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties.

Annu. Rev. Immunol. 7: 145-173

Murphy K.M. Heimberger A.B., and Loth D.Y. (1990)

Induction by Antigen of Intrathymic Apoptosis of CD4+CD8+TCR α Thymocytes *in vivo*.

Science 250: 1720-3

Nakano, H., Yanagita, M., Gunn, M.D. (2001)

CD11c⁺ B220⁺ Gr-1⁺ cells in mouse lymph nodes and spleen display characteristics of plasmacytoid dendritic cells.

J. Exp. Med. 15:1171-8

Naor, D., Sionov, RV., Ish-Shalom, D. (1997)

CD44: structure, function, and association with the malignant process.

Adv. Cancer Res. 71:241-319

Nicholas, S. W. & Villadangos J.A. (2005)

Regulation of Antigen Presentation and Cross/Presentation in the Dendritic Cell Network: Facts, Hypothesis, and Immunological Implications.

Advances in Immunology 86: 241-305

Nixon, D.F., Aandahl, E.M, und Michaelsson, J. (2005)

CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in HIV infection.

Microbes and Infection 7: 1063-165

Ohlen, C., Kalos, M., Cheng, L.E.; Shur, A.C., Hong, D.J., Carson, B.D., Kokot, N.C., Lerner, C.G., Sather, B.D., Huseby, E.S., and Greenberg, P.D. (2002)

CD8 (+) T cell tolerance to tumor-associated antigen is maintained at the level expansion rather than effector function.

J. Exp. Med. 195: 1407-1418

Olbrich, AR. Schimmer, S., Dittmer, U. (2003)

Preinfection treatment of resistant mice with CpG oligodeoxynucleotides renders them susceptible to friend retrovirus-induced leukaemia.

J. Virol. 77:10658-62

Parnes, J.R. (1989)

Molecular biology and function of CD4 and CD8.

Adv Immunol. 44: 265-311

Patterson, S., English, NR. Longhurst, H., Balfe, P., Helbert, M., Pinching, AJ., Knight, SC. (1998)

Analysis of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) variants and levels of infection in dendritic and T cells from symptomatic HIV-1-infected patients.

J. General Virol. 79: 247-57

Peng, Y., Laouar, Y., Li MO., Green, E.A., Flavell, R.A. (2004)

TGF-beta regulation in vivo expansion of Foxp3-expressing CD4⁺ CD25⁺ regulatory T-cells.

Nat. Acad. Sci. USA 101: 4572-4577

Peterson, K.E., Iwashiro, M., Hasenkrug, K.J. und Chesebro, B. (2000)

Major histocompatibility complex class I gene controls the generation of gamma interferon-producing CD4⁺ and CD8⁺ T cells important for recovery from friend retrovirus-induced leukaemia.

J. Virol. 74: 5363-5367

Pollara, G., Kwan, A., Newton J.P., Handley E.M., Chain M.B., Katz D.R. (2005)

Dendritic cells in viral pathogenesis: protective or defective?

Int. J. Exp. Path. 86: 187-204

Popvic, M., Sarngadharan, M.G., Read, E., und Gallo, R.C. (1984)

Detection, isolation and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS.

Science 224: 497-500

Powell, J.D., Ragheb, J.A., Kitagawa-Sakakida, S., Schwartz, R.H. (1998)

Molecular regulation of interleukin-2 expression by CD28 costimulation and anergy.

Immunol. Rev. 165: 287-300

Quaranta, M.G., Mattioli, B., Giordani, L., and Viora M. (2006)

The immunoregulatory effects of HIV-1 Nef on dendritic cells and the pathogenesis of AIDS.

The FASEB Journal 20: 2198-2208

Rafael R.F., Kelly A.D., Lauren M.T., and Penelope A.M. (2007)

IFN- γ Negatively Regulates CpG-Induced IL-10 in Bone Marrow-Derived Dendritic cells.

J. Immunol. 178: 211-218

Ramsdell, F. (2003)

Foxp3 and natural regulatory T cells: key to a cell lineage?

Immunity 19: 165-8

Rauscher, F. (1962)

A virus-induced disease of mice characterized by erythropoiesis and lymphoid leukaemia.

J. Natl Cancer Inst. 192: 515-543

Reis e Sousa and Austyn, J.M. (1993)

Phagocytosis of antigens by Langerhans cells.

Adv. Exp. Med. Biol. 329:199-204

Rinaldo, C.R., Piazza, J., and Piazza, P. (2004)

Virus infection of dendritic cells: portal for host invasion and host defense.

Trends Microbio. 12: 337-345

Robertson, J. M., Jensen, P.E. and Evavold, B D. (2000):

DO 11.10 and OT-II T Cells Recognize a C-Terminal Ovalbumin 323-339 Epitope.

J. Immunol. 164: 4706-12

Roberson, M., Miyazawa, M., Mori S., Caubhey, B.; Evans, L.H., Hayes, S.F., and Chesebro, B. (1991) Production of monoclonal antibodies reactive with a denaturated form of Friend murine leukaemia virus gp70 envelope protein: use in a focal infectivity assay, immunohistochemical studies, electron microscopy and western blotting.

J. Virol. Meth. 34: 255-271

Robertson, S.T., Hasenkrug, K.J. (2006)

The role of virus-induced regulatory T cells in immunopathology.

Semin. Immune. 28: 51-62

Robertson, S.T., Messer R.J., Camody A.B., Hasenkrug, K.J., (2006)

In vitro suppression of CD8⁺ T-cells function by friend virus-induced regulatory T cells.

J. Immune 176: 3342-3349

Royer, P.J., Tanguy-Royer, F. Ebstein, C., Sapede, T., Simon, I., Barbieux, R., Oger M.G. (2006)

Culture Medium and Protein Supplementation in the Generation and Maturation of Dendritic cells.

Scan. J. Immunol. 63: 401-409

Romani N., Reider D., Heuer M., Ebner S., Kämpgen E., Eibl, B., Niederwieser D., Schuler G. (1996)

Generation of mature dendritic cells from human blood: an improved method with special regard to clinical applicability.

J. Immunol. Meth. 196: 137-151

Rous, P. (1911)

A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells.

J. Exp. Med. 13:397-399

Rouse, B.T., Sarangi, P.P., Suvas, S. (2006)

Regulatory T cells in virus infections.

Immunological Reviews 212: 272-286

Rothoef, T., Balbow, S., Krummen, M., Beissert, S., Varga G., Loser K., Oberbanscheidt, P., Boom van den F., Grabbe, S. (2006)

Structure and duration of contact between dendritic cells and T cells are controlled by T cell activation state.

Eur. J. Immunol 36: 3105-3117

Ruscetti, S.K. (1995)

Erythroleukemia induction by the Friend spleen focus-forming virus.

Baillieres Clin. Haematol. 8: 225-247

Sakaguchi, S., Sakaguchi N., Asano, M., Itoh, M., Toda, M. (1995)

Immunologie self-tolerance maintained by activated T-cells expressing IL-2-receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases.

J. Immunol. 155: 1151-1164

Sakaguchi, S. (2005)

Naturally arising Foxp3 expressing CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non self.

Nat Immunol 6: 345-52

Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C. and Lanzavecchia, A. (1995)

Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products.

J. Exp Med 182: 389-400.

Samuel C.E. (2001)

Antiviral actions of interferons.

Clin. Microbiol. Rev. 14: 778-809

Sancho, D., Gomez, M., Sanchez-Madrid, F. (2005)

CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation.

Trends Immunol. 26:136-40

Schepers, K., Toebes, M., Sotthwes, G., Vyth-Dreese, F. A., Dellelijn T. A. M., Melief C.J.M., Ossendorp, F., and Schumacher T. N. M. (2002)

Differential Kinetics of Antigen-Specific CD4⁺ and CD8⁺ T cell Responses in the Regression of Retrovirus-Induced Sarcomas.

J. Immunol. 169: 3191-3199

Schlienger, K., Craighead, N., Lee, K.P., Levine, B.L., June, C.H. (2000)

Efficient priming of protein antigen-specific human CD4⁺ T-cells by monocyte-derived dendritic cells.

Blood 96: 3490-8

Schneider-Schaulies S. & Dittmer U. (2006)

Silencing T cells or T-cell silencing: concepts in virus-induced immunosuppression.

J. Gen Virol. 87:1423-38

Schumm M., Lang P., Taylor G., Kuci S., Klingebiel T.; Buhning HJ., Geiselhart A., Niethammer D., Handgretinger R. (1999)

Isolation of highly purified autologous and allergenic peripheral CD34⁺ cells using the CliniMACS device.

J. Hematother. 8: 209-218

Seder, R.A. und Paul, W.E. (1994)

Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4⁺ T cells.

Annu Rev Immunol. 12: 635-673

Servet-Delprat, C., Vidalain, P.O., Bausinger, H., Manie, S., Le Deist, F., Azocar, O., Hanau, D., Fischer, A., Roubourdin-Combe, C. (2000)

Measles virus induces abnormal differentiation of CD40 ligand- activated human dendritic cells.

J. Immunol. 164: 1753-60

Shen, Z., Reznikoff, G., Dranoff, G., and Rock, K.L. (1997)

Cloned dendritic cells present exogenous antigens on both MHC class I and class II molecules.

J. Immunol. 158: 2723-2730

Shortman, K. & Naik S.H. (2007)

Steady-state and inflammatory dendritic-cell development.

Nature Rev. Immunol. 7:19-30

Shortman, K. & Liu, Y.J. (2002)

Mouse and human dendritic cell subtypes.

Nature Rev. Immunol 2:151-161

Siegal F.P., Kadowaki, N., Shodell M., Fitzgerald-Bocarsly, PA., Shah, K., Ho, S., Antonenko, S., Liu YJ. (1999)

The nature of the principal type 1 interferonproducing cells in human blood.

Science 284: 1835-7

Sims TN & Dustin ML., (2002)

The immunological synapse: Integrins take the stage.

Immunol. Rev. 186:100-117

Soumelis, V.I., Scott, I., Gheyas, F., Bouhour, D., Cozon, G., Cotte, L., Huang, L., Levy J. A., Liu YJ. (2001). "Depletion of circulating natural type 1

interferonproducing

cells in HIV-infected AIDS patients."

Blood 98: 906-12.

Sourvinos, G., Tsatsanis, C., und Spandidos D.A. (2000)

Mechanisms of retrovirus-induced oncogenesis.

Folia Biol. (Praha) 46: 226-232

Steinman, R.M. (2003)

Some interfaces of dendritic cell biology.

Apmis 111: 675-697

Steinman, RM, Cohn, ZA, (1973)

Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I.

Morphology, quantitation, tissue distribution.

J. Exp. Med. 137: 1142-62

Stoye, J.P. (1998)

Fv1, the mouse retrovirus resistance gene.

Rev. Sci. Tech 17: 269-277

Strommes, M.I., Dittmer, U., Schumacher, T.N.M., Schepers, K., Messner, R.J., Evans, L.E., Peterson, K,E., Race, B., and Hasenkrug, K. (2002)

Temporal Effects of Gamma Interferon Deficiency on the Course of Friend Retrovirus Infection in Mice.

J. Viro. 76: 2225-2232

Suvas, S., Kumaraguru, U., Pack, C.D., Lee, S., Rouse, B.T. (2003)

CD4⁺ CD25⁺ T cells regulate virus-specific primary and memory CD8⁺ T cell responses.

J. Exp. Med. 198: 889-901

Tang, Q., Adams, J.Y., Tooley, A.J., Bi, M., Fife, B.F., Serra, P., Santamaria, P., Locksöey R.M., Krummel, M.F., Blustone, J.H. (2006)

Visualizing regulatory T cell control of autoimmune response in nonobese diabetic mice.

Nat. Immunol. 7: 83-92

Thoulouze Ml., Sol-Foulon N., Blanchet F., Varsat AD., Schwartz O., Alcover, A. (2006)

Human immunodeficiency Virus Type-1 Infection Impairs the Formation of the Immunological Synapse.

Immunity 24:547-561

Toyoshima K & Vogt P.K. (1969)

Enhancement and inhibition of avian sarcoma viruses by polycations and polyanions.

Virology 38: 414-26

Vabulas RM., Pircher H., Lipford GB., Hacker H., Wagner H. (2000)

CpG-DNA activates *in vivo* T cell epitope presentig dendritic cells to trigger protective antiviral cytotoxic T cell responses.

J. Immunol. 146: 2372-2378

Vahlenkamp, T.W., Tompkins, M.B., Tompkins, W.A. (2005)

The role of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in viral infections.

Vet. Immunol. Immunopathol. 108: 219-25

van Stipdonk, M. J., Hardenberg, G., Bijker, M. S., Lemmens, E. E., Droin, N. M., Green, D. R., and Schoenberger, S. P. (2003).

Dynamic programming of CD8⁺ T lymphocyte responses.

Nat. Immunol. 4: 361-365.

von Böhmer, H. (2005)

Mechanisms of suppression by suppressor T-cells.

Nat. Immunol. 6:338-344

Vremec, D., Zorbas, M., Scollay, R., Saunders, D.J., Ardavin, C.F. Wu, L., Shortmann K. (1992)

The Surface Phenotype of Dendritic cells purified from mouse thymus and spleen: Investigation of the CD8 Expression by a Subpopulation of dendritic cells.

J. Exp. Med. 176:47-58

Wahid, R., Cannon JM., and Chow M. (2005)

Dendritic cells and Macrophages are productively infected by poliovirus.

J. Virol. 79: 401-409

Wang H., Peters N., Schwarze J. (2006)

Plasmacytoid dendritic cells limit viral replication, pulmonary inflammation and airway hyperresponsiveness in respiratory syncytial virus infection.

J. Immunol. 177:6263-70

Weiss, L., Donkova-Petrini, V., Caccavelli, L., Balbo, M., Carbonneil, C., Levy, Y., (2004)

Human immunodeficiency virus-driven expansion of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T-cells, which suppress HIV-specific CD4 T-cell responses in HIV-infected patients.

Blood 104: 3249-56

Wing, K., Fehervari, Z., and Sakaguchi, S. (2006)

Emerging possibilities in the development and function of regulatory T cells

Inter. Immunol. 18: 991-1000

Wu, Li and KevalRemani V.N. (2006)

Dendritic-cell interactions with HIV:

Infection and viral dissemination

Nature Reviews 6: 859-868

Yamazaki, S., Inaba, K., Tarbell, K., Steinman R. (2006)

Dendritic cells expand antigen-specific Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells including suppressors of alloreactivity

Immunological Reviews 212:314-329

Yamazaki, S., Patel, M., Harper, A., Bonito, A., Fukuyama, H., Pack, M., Tarbell, K.V., Talmor, K.V., Talmor, M., Ravetsch, J.V., Inaba, K., Steinman, R.M. (2006)

Effective expansion of alloantigen-specific Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells by dendritic cells during the mixed leukocyte reaction.

Proc Natl. Acad. Sci USA 103: 2758-2763

Yoneyama, H., Matsuno, K., Matsushimaa, K. (2005)

Migration of Dendritic cells.

Int. J. Hematology 81:204-7

York, I.A. and Rock K.L. (1996)

Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex

Annu. Rev. Immunol. 14: 369-96

Zelinsky, G., Kraft, A.R., Schimmer, S., Arndt, Dittmer, U. (2006)

Kinetics of CD8 (+) effector T cell responses and induced CD4 (+) regulatory T cell responses during Friend retrovirus infection.

Euro. J. Immunol. 36: 2658-2670

Zhang Z., Wang F.S. (2005)

Plasmacytoid dendritic cells act as the most competent cell type in linking antiviral innate and adaptive immune responses.

Cell Mol. Immunol. 2: 411-7

Zhou, L. J. and T. F. Tedder (1995)

Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily.

J. Immunol. 154: 3821-35.

Zuckermann L.A., Pullen, L., and Miller, J. (1998)

Functional Consequences of Costimulation by ICAM-1 on IL-2 Gene Expression and T Cell Activation.

J. Immunol. 160: 3259-3268

8. Anhang

8.1. Verzeichnis der Abkürzungen

Einheiten wurden mit dem international gebräuchlichen SI-System abgekürzt. Für Aminosäuren und Nukleotide wurde Einbuchstabenkode verwendet. Für die Abkürzung gebräuchlicher Wörter wurde gemäß Duden verfahren.

μ	Mikro
α	Anti
Abb.	Abbildung
AIDS	„acquired immunodeficiency syndrom“
AK	Antikörper
APC	Antigenpräsentierende Zelle oder Allophycocyanin
Aqua dest.	Aqua destillata
B6	C57BL/6
bp	Basenpaar
BSA	Bovine Serumalbumin
bzw.	Beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CCL	Chemokine Ligand
CCR	Chemokine Rezeptor
CD	Oberflächenantigen (<i>cluster of differentiation</i>)
cDNA	Komplementäre DNA
CFSE	5-(6)-Carboxyfluorescein-Diazetat-Succinimidylester
CpG-ODN	Oligodesoxynukleotide mit CpG-Motiv
CTL	Zytotoxische T-Zellen
3D	Dreidimensional
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dest.	Destilliert
DCs	Dendritische Zellen (<i>dendritic cell</i>)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DC-SIGN	DC spezifischer ICAM3
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>

Env	Hüllprotein
EM	Elektronenmikroskop
ER	Endoplasmatisches Reticulum
et al.	und andere = et alii (lat.)
FACS	Fluoreszenzaktivierter Zellsorter, (Durchflusszytometer) (fluorescence activated cell sorter)
Fc, FcR	Fragment kristallin (Fragment crystallizable), Fc-Rezeptor
FCS	Fötales Kälberserum (foetal bovine serum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Flt3-Ligand	Fms-verwandte Tyrosinkinase 3 Ligand
F-MuLV	„Friend murine leukemia virus“
FMR	Friend/Moloney/Rauscher
FSC	Forward scatter light
FV	Friend Virus
g	Gramm
Gag	Gruppenspezifisches Antigen
GM-CSF	Granulozyten Monozyten kloniestimulierender Faktor= Granulocyte Monocyte-Colony Stimulating Factor (engl.)
HIV-1	„Human immunodeficiency virus typ 1“
HIV-2	„Human immunodeficiency virus typ 2“
IL	Interleukin
IPZ	Typ-I Interferon produzierende Zelle
i.v.	Intravenös
INF	Interferon
Kap.	Kapitel
KO	Knock out
LPS	Lipopolysaccharid
mAk	Monoklonaler Antikörper (monoclonal antibody)
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
MFI	Mittelwert der Fluoreszenzintensität
mg	Miligramm
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute

ml	Milliliter
MuLV	Murines Leukämievirus
MV	Masernvirus
MoMSV	Moloney Maus Sarcoma Leukämie Virus Komplex
neg	Negativ
NK	Natürliche Killerzellen
OVA	Hühner-Ovalbumin
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Plymerase Chain Reaktion
pDC	Plasmacytoide Dendritische Zelle
PE	Phyco-Erythrin
PI	Propidiumjodid
p.i.	post infection
pos	Positiv
PRR	Pattern recognition receptor
rmu	Rekombinant murin = <i>recombinant murine</i> (engl.)
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SA	Streptavidin
Tab.	Tabelle
TCR	T-Zell-Rezeptor (<i>T cell receptor</i>) (engl.)
Th	T Helfer Zelle
Th1,Th2	Immunreaktionstyp 1 bzw.2
TLR	Toll ähnlicher Rezeptor= <i>Toll-like receptor</i> (engl.)
TNF-a	Tumor-Nekrose-Faktor α/β
Treg	Regulatorischen T-Zellen
UpM	Umdrehung pro Minute

8.2. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1:	Aufbau von Typ-C Retroviren bei Säugetieren am Beispiel von F-MuLV.
Abbildung 2:	Aufbau von einfachen Retroviren am Beispiel von MuLV.
Abbildung 3:	Einteilung der unterschiedlichen Stadien einer Splenomegalie nach FV-Infektion.
Abbildung 4:	Unterschiedliche Oberflächenmarker von Dendritischen Zellen.
Abbildung 5:	Entwicklung verschiedener DC-Subtypen aus hämatopoietischen CD34 ⁺ Stammzellen des Knochenmarks.
Abbildung 6:	Wichtige Oberflächenmarker von unreifen und reifen murinen DCs
Abbildung 7:	Immunologische Synapse.
Abbildung 8:	Unreife DCs nach sieben Tagen Kultur.
Abbildung 9:	Nachweis von DCs und kontaminierenden Zellen in DC Kulturen.
Abbildung 10:	Expression von Oberflächenmarker auf unreifen DCs.
Abbildung 11:	Expression von Oberflächenmarkern auf reifen DCs.
Abbildung 12:	Nachweis von infizierten DCs mittels FV-spezifischem Antikörper (AK 34).
Abbildung 13:	Infektionsraten von DCs in Kultur zu verschiedenen Zeitpunkten
Abbildung 14:	Elektronenmikroskopische Aufnahme von FV-infzierten DCs
Abbildung 15:	Nachweis von FV-infizierten DCs im Infections Center Assay
Abbildung 16:	Quantitative Bestimmung der FV-Infektion in DCs
Abbildung 17:	Transfer von FV-infizierten DCs in naive Balb/c Mäuse
Abbildung 18:	Nachweis von FV-infizierten DCs <i>ex vivo</i>
Abbildung 19:	Kein Nachweis von FV-infizierten pDCs
Abbildung 20:	FV-Infektion von pDCs <i>in vitro</i>
Abbildung 21:	Expression von kostimulatorischen und Antigen-präsentierenden Molekülen auf FV-infizierten DCs
Abbildung 22:	Expression von kostimulatorischen Molekülen nach Stimulation von FV-infizierten DCs
Abbildung 23:	Endozytose-Aktivität und Antigen-Prozessierung von uninfizierten und FV-infizierten DCs
Abbildung 24:	Die IL-12 Produktion von uninfizierten und infizierten DCs
Abbildung 25:	Die IL-10 Produktion von uninfizierten und infizierten DCs

Abbildung 26	Apoptoserate von uninfizierten und infizierten DCs
Abbildung 27	Kontaktzeiten zwischen Antigen-beladenen DCs und naiven OVA-spezifischen T-Zellen
Abbildung 28	Aktivierung von CD4 ⁺ T-Zellen durch FV-infizierte und uninfizierte DCs
Abbildung 29	Stimulation von CD4 ⁺ T-Zell-Proliferation durch uninfizierte und FV-infizierte DCs
Abbildung 30:	Induktion von Foxp3 ⁺ Treg-Zellen durch FV-infizierte DCs
Abbildung 31:	Expression von mRNA für Toll-like Rezeptoren in uninfizierten und infizierten DCs
Abbildung 32:	Expression von kostimulatorischen Molekülen auf FV-infizierten DCs nach CpG Stimulation
Abbildung 33:	CD8 ⁺ T-Zell-Proliferation durch uninfizierte und FV-infizierte DCs
Abbildung 34:	INF γ -Produktion von virus-spezifischer CD8 ⁺ T-Zellen nach Stimulation mit Antigen beladenen uninfizierte und FV-infizierte DCs
Abbildung 35:	Kontaktzeiten zwischen Antigen-beladenen DCs und natürlichen regulatorischen T-Zellen
Abbildung 36:	Modell der Treg Zell Funktion bei einer Virusinfektion

Tabelle 1:	Taxonomie der <i>Retroviridae</i>
Tabelle 2:	Verteilung von reifen DC-Suptypen im lymphatischen Gewebe der Maus
Tabelle 3:	Funktionale Veränderungen von Monozyten-abgeleiteten DCs nach Infektion mit verschiedenen Viren
Tabelle 4:	Geräteliste
Tabelle 5:	Materialliste
Tabelle 6:	Wachstumsfaktoren
Tabelle 7:	Stimulationsfaktoren
Tabelle 8:	Puffer und Medien
Tabelle 9:	In der hier vorliegenden Arbeit eingesetzte Antikörper.
Tabelle 10:	Charakterisierung der Fluorochrome
Tabelle 11:	Sonstige Antikörper
Tabelle 12:	T-Zell-Epitop
Tabelle 13:	Zelllinien
Tabelle 14:	CpG ODN Sequenzen
Tabelle 15:	Konzentrationen von Stimulationssubstanzen für DCs
Tabelle 16:	Master Mix für die Echtzeit-PCR
Tabelle 17:	Anzahl von infizierten DCs in verschiedenen Mausstämmen
Tabelle 18:	Milzgrößen

8.3. Lebenslauf

Lebenslauf

Name	Frank Krux
Adresse	Putzhagen 16 33334 Gütersloh
Geburtstag	26.07.1971
Geburtsort	Detmold
Familienstand	Ledig Zwei Töchter
Konfession	evangelisch
Schul Ausbildung	
1978-1982	Grundschule Lage
1983	Hauptschule Lage
1983	Hauptschule Blomberg
1988	Abschluss mit dem mittleren Bildungsabschluss
Berufsausbildung	
1988-1992	Eine erfolgreiche Ausbildung zum Biologielaborant im Staatlichen Veterinäruntersuchungsamt Detmold.
Zivildienst	
1992-1993	im Staatlichen Veterinäruntersuchungsamt Detmold.
Zweiter Bildungsweg	
1993-1997	Oberstufenkolleg der Universität Bielefeld Abitur mit Grundstudium Biologie.
Studium	
1997-2002	Studium der Biologie an der Universität Bielefeld, Abschluss als Diplom Biologe.
Berufliche Tätigkeit	
4/2002-4/2003	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie in München im Bereich Parasitologische Diagnostik, Qualitätsmanagement und Akkreditierung.
5/2003	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Virologie, Universitätsklinikum Essen, Dissertation mit dem Thema: „Analyse der Auswirkung einer Infektion von Dendritischen Zellen mit dem murinen Friend Retrovirus“.

8.4. Veröffentlichung

Kraft A.R.M., Krux, F., Schimmer, S., Ohlen, C., Greenberg, P.D., Dittmer, U.
CpG Oligodeoxynucleotides allow for effective adoptive T-cell therapy in chronic
retroviral infection.

In press "blood"

Balkow, S*., Krux, F*., Loser, K., Becker, J., Grabbe S., Dittmer, U.
Friend retrovirus infection of myeloid dendritic cells impairs maturation, prolongs
contact to naive T cells, and favors induction of regulatory T cells.

*Both authors contributed equally to this work.

Manuskript in Vorbereitung

8.5. Danksagung

Ich danke an erster Stelle meinem Doktorvater, Prof. Dr. Ulf Dittmer, für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die hervorragende Betreuung meiner Arbeit. Er hat durch viele nützliche Anregungen und Hinweise maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Bei Prof. Dr. Michael Roggendorf möchte ich mich für die Aufnahme in sein Institut bedanken.

Für die sehr gute Zusammenarbeit bedanke ich mich bei unserer Kooperationspartnerin Sandra Balkow.

Großer Dank gebührt außerdem meinen Kollegen/innen der Arbeitsgruppe Dittmer. Sie sorgten in einem freundschaftlichen Umfeld für einen breiten wissenschaftlichen Austausch und Hilfestellungen bei kleinen und größeren Problemen.

Von ganzem Herzen möchte ich Tanja Fode danken, dass sie mich die letzten Wochen ertragen hat, für alle Geduld und Unterstützung bei der Korrektur der Arbeit. Danke!

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Virologie in Essen für die nette Atmosphäre und Hilfsbereitschaft bedanken.

Mein ganz besonders herzliches Dankschön gilt meinen Eltern, die mir durch ihr Vertrauen und ihre Unterstützung das Studium und somit auch diese Arbeit ermöglicht haben.

Ich danke vielen weiteren Personen, die durch ihre Unterstützung und Freundschaft zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Ihnen allen gilt mein herzlichster Dank.

8.6. Erklärung

Hiermit erkläre ich, gemäß 6 Abs. 2, Nr.7 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Analyse der Auswirkungen einer Infektion von Dendritischen Zellen mit dem murinen Friend Retrovirus“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Herr Frank Krux befürworte.

Essen, den

(Prof. Dr. Ulf Dittmer)

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gemäß 6 Abs. 2 Nr. 6 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den

(Frank Krux)

Erklärung:

Hiermit erkläre der Fachbereiche 6 bis 9 zur erkläre ich, gemäß 6 Abs. 2 Nr. 8 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, den

(Frank Krux)