

Aus dem medizinischen Zentrum für Hygiene und Infektionsbiologie  
der Philipps-Universität Marburg  
Institut für Immunologie  
Direktor: Prof. Dr. S. Bauer  
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

---

**Die Induktion von CCL3, IRF-1, IRF-7 und IL-24  
durch Influenza A Virus-Infektion von Monozyten  
und die Bedeutung eines essentiellen Abschnittes  
im CCL3-Promotor**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der gesamten Humanmedizin (Dr. med.)

dem Fachbereich Humanmedizin der  
Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

**Mike Becker**

aus Saarlouis

Marburg/Lahn 2008

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin  
der Philipps-Universität Marburg am 09.10.2008

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan:	Prof. Dr. Rothmund
Referent:	Prof. Dr. Gemsa
Korreferent:	Prof. Dr. Becker

---

<b>I. Einleitung</b>	1
<b>1. Das Immunsystem</b>	1
<b>2. Monozyten/Makrophagen</b>	2
2.1. Ursprung und Struktur der Monozyten/Makrophagen	2
2.2. Funktionen der mononukleären Phagozyten	5
2.3. Aktivierung von Makrophagen	6
2.4. Sekretorische Produkte von Makrophagen	7
<b>3. Zytokine und Chemokine</b>	8
3.1. Zytokine	8
3.2. IL-24/MDA-7	8
3.3. Chemokine	9
3.3.1. Struktur und Funktion der Chemokine	9
3.3.2. Chemokinrezeptoren	11
3.3.3. Die Rolle von Chemokinen bei der Pathogenese von Krankheiten	14
3.3.4. Das Chemokin CCL3 (MIP-1 $\alpha$ )	15
<b>4. Die Regulation der Transkription</b>	17
4.1. Der Aufbau eukaryontischer Gene	17
4.2. Prinzipien der Transkriptionsregulation	18
4.3. Der Kern-Promotor	19
4.4. Distaler und proximaler Promotorbereich	19
4.5. Die Regulation der Transkription durch Viren	20
4.5.1. Interferone und die <i>Interferon regulatory factors</i> (IRFs)	21
<b>5. Influenza A-Viren</b>	24
5.1. Klassifizierung und Einordnung des Virusstammes A/PR/8	24
5.2. Struktur und Charakterisierung	25
5.3. Vermehrungszyklus	27
5.4. Antigendrift und Antigen shift	29
5.5. Krankheitsbild der Influenza	29

---

5.6. Therapie und Prophylaxe	30
5.7. Interaktionen von Influenza-Viren mit dem Immunsystem	31
5.7.1. Allgemeine Reaktionen des Immunsystems gegen Influenza-Viren	31
5.7.2. Wechselwirkungen zwischen Influenza A-Viren und Monozyten/Makrophagen	32
<b>6. Zielsetzung</b>	<b>34</b>
<b>II. Material und Methoden</b>	<b>36</b>
<b>1. Zellen, Medien und Virusstamm</b>	<b>36</b>
1.1. Zellen	36
1.1.1. Humane Monozyten	36
1.1.2. Mono Mac 6-Zellen	36
1.2. Medien	36
1.3. Viren	37
1.4. Pufferlösungen	37
1.5. Standardbedingungen der Zellkultur	39
1.5.1. Überprüfung der Zellkulturen auf Mykoplasmen	39
1.5.2. Einfrieren und Auftauen von Zellkultur-Zellen	39
<b>2. Methoden</b>	<b>40</b>
2.1. Isolierung und Anreicherung humaner Monozyten	40
2.2. Elutriation („Counter flow-Zentrifugation“)	41
2.3. Zellzahlbestimmung	43
2.4. Kultivierung und Infektion der Zellen	43
2.4.1. Kultivierung humaner Monozyten	43
2.4.2. Stimulation der humanen Monozyten mit LPS	44
2.4.3. Infektion der humanen Monozyten mit Influenza A/PR/8	44
2.4.4. Kultivierung von Mono Mac 6-Zellen	44
2.4.5. Stimulation von Mono Mac 6-Zellen mit LPS	45
2.4.6. Infektion von Mono Mac 6-Zellen mit Influenza A/PR/8	45
2.5. Proteinbestimmung	45

---

2.6. Molekularbiologische Techniken	45
2.6.1. RNA-Präparation	45
2.6.2. cDNA-Synthese	47
2.6.3. Amplifizierung der cDNA durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	47
2.6.3.1. Auswahl der Primer	50
2.6.3.2. Amplifizierungsreaktion	51
2.6.3.3. Elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte	52
2.7. Allgemeines zur Analyse der transkriptionellen Regulation von Genen	52
2.7.1. Der pGL3-Vektor	52
2.8. CCL3-Promotor-Analysen	55
2.8.1. Mutagenese von CCL3-Promotorabschnitten mittels PCR	55
2.8.2. Restriktionsverdau der amplifizierten DNA	57
2.8.3. Schneiden des Vektors	57
2.8.4. Ligation	59
2.8.5. Transformation von <i>E.coli</i> - Bakterien	59
2.8.6. Plasmidpräparation	60
2.8.7. Transiente Transfektion von Mono Mac 6-Zellen	63
2.8.8. Analyse der Promotoraktivität durch Bestimmung der Luciferase-Aktivität	64
2.9. SDS-PAGE und Western-Blot	65
<b>III. Ergebnisse</b>	<b>68</b>
<b>1. Die Induktion von CCL3 durch Influenza A/PR/8 bzw. LPS</b>	<b>64</b>
1.1. Ergebnisse vorangegangener Untersuchungen des CCL3-Promotors	64
1.2. Die Bindungsstellen MNP und ICK-1	66
<b>2. Analysen zur Funktion der Transkriptionsfaktoren MNP und ICK-1 im CCL3-Promotor</b>	<b>68</b>
2.1. Vorversuche zur Transfektion	68

Inhalt	IV
2.1.1. Kontrolle der Basalaktivität nach Transfektion	68
2.1.2. Kontrolle der Luciferase-Aktivität nach Stimulation bzw Infektion	69
2.1.3. Ermittlung der optimalen DEAE-Dextran-Konzentration	71
2.2. Mutation der Bindungsstellen für MNP und ICK-1	72
2.3. Ergebnisse der Transfektion mit den Deletionsmutanten mMNP und mICK	73
<b>3. Induktion von Transkriptionsfaktoren der IRF-Familie in Monozyten nach Influenza A-Infektion</b>	<b>75</b>
3.1. Analyse der Induktion des Gens für <i>Interferon regulatory factor-1</i> (IRF-1) in virusinfizierten Monozyten mittels RT-PCR	76
3.2. Analyse der IRF-1 Proteinexpression nach A/PR/8-Infektion von Monozyten im Western-Blot	77
3.3. Analyse der Induktion des Gens für IRF-7 in virusinfizierten Monozyten mittels RT-PCR	78
3.4. Analyse der IRF-7 Proteinexpression nach A/PR/8-Infektion von Monozyten im Western-Blot	79
<b>4. Induktion des Zytokins mda-7/IL-24 in Monozyten nach Influenza A-Infektion</b>	<b>80</b>
<b>IV. Diskussion</b>	<b>90</b>
<b>1. Regulation des CCL3-Gens durch die Faktoren MNP und ICK-1</b>	<b>93</b>
1.1. Die <i>cis</i> -regulatorische Sequenz ICK-1	95
1.1.1. Die Ähnlichkeit der regulatorischen Sequenzen ICK-1 und NIP	95
1.1.2. Andere Kandidaten für eine Bindung an der ICK-1-Sequenz	99
1.2. Die <i>cis</i> -regulatorische Sequenz MNP	102
1.2.1. MNP als neue <i>cis</i> -regulatorische Sequenz im CCL3-Promotor	102

1.2.2. Bindung von C/EBP $\beta$ an der MNP-Sequenz	104
<b>2. Die Induktion von Transkriptionsfaktoren der IRF-Familie durch eine Infektion mit Influenza A/PR/8</b>	108
<b>3. Die Induktion des Zytokins IL-24/mda-7 durch eine Infektion mit Influenza A/PR/8</b>	112
<b>VI. Zusammenfassung</b>	114
<b>VII. Literaturverzeichnis</b>	116
<b>Anhänge:</b>	
Abkürzungsverzeichnis	VI
Verzeichnis der akademische Lehrer	IX
Erklärung	X

## I. Einleitung

### 1. Das Immunsystem

Das Immunsystem des Menschen ist ein hochdifferenziertes und anpassungsfähiges System, das die Aufgabe hat, den menschlichen Körper vor Mikroorganismen, Fremd- und Schadstoffen, sowie Toxinen und entarteten Zellen zu schützen. Die kollektive und koordinierte Reaktion auf körperfremde Substanzen nennt man Immunantwort. Der daraus resultierende Schutz vor Infektionen heißt Immunität. Das menschliche Immunsystem besteht aus mehr als einer Billion Zellen, die zwischen Blut und Lymphe zirkulieren, in anatomisch definierten Ansammlungen, den lymphoiden Organen, vorkommen oder als vereinzelte Zellen in fast allen Geweben anzutreffen sind. Die Fähigkeit dieser Zellen zu zirkulieren und der ständige Austausch zwischen Blut, Lymphe und Geweben ist von entscheidender Bedeutung für die Erkennung körperfremder Stoffe und deren Elimination.

Das Immunsystem wird traditionell eingeteilt in ein angeborenes (unspezifisches) und ein erworbenes (spezifisches oder adaptives) Immunsystem. Beide erfüllen verschiedene Funktionen bei der Abwehr von Krankheitserregern. Gemeinsam ist beiden die Erkennung sogenannter Antigene. Hierbei handelt es sich um den infektiösen Erreger selbst oder strukturelle Untereinheiten von Erregern. Aber auch Zellbestandteile fremder und eigener Gewebe können unter bestimmten Umständen Antigene sein, d.h. Ziel einer Abwehrmaßnahme des Immunsystems werden.

Charakteristisch für die erworbene Immunität ist die spezifische Erkennung von Antigenen über Rezeptoren auf der Zelloberfläche von Lymphozyten (T- und B-Zellen). Diese Rezeptoren werden während der Entwicklung in jedem Lymphozyten durch sogenannte somatische Rekombination gebildet. Dieser Vorgang stattet jeden Zellklon mit einem strukturell einzigartigen Rezeptor aus, der hochspezifisch „sein“ Antigen erkennt. Durch die Vielzahl der Rekombinationsmöglichkeiten wird eine sehr große Variation dieser Rezeptoren ermöglicht. Die Erkennung von Antigenen durch die spezifischen Rezeptoren führt zur Aktivierung, klonalen Vermehrung (Expansion) und Differenzierung der Lymphozyten. Erst danach sind sie in der Lage, durch die

Produktion von spezifischen Antikörpern oder die Ausbildung spezifischer Abtötungsmechanismen zur Eliminierung von Krankheitserregern beizutragen. Die Antigen-Erkennung durch das angeborene Immunsystem wird demgegenüber durch Rezeptoren vermittelt, die durch Gene der Keimbahn kodiert sind und keiner Modifikation mehr unterliegen. Allein durch den Druck der natürlichen Selektion haben die Rezeptoren der angeborenen Immunität eine Spezifität für infektiöse Mikroorganismen entwickelt. Dabei werden aber nicht einzelne Antigene erkannt, sondern wenige, hochkonservierte Strukturen, die für ganze Gruppen von Mikroorganismen charakteristisch sind. Diese werden unter dem Begriff *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) zusammengefasst und die entsprechenden Rezeptoren als *pattern-recognition receptors* (PRR) bezeichnet.

Die zellulären Elemente des angeborenen Immunsystems sind das Monozyten-Makrophagen-System, die Granulozyten und die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen). Die Zellen des Monozyten-Makrophagen-Systems werden auch als mononukleäres Phagozyten-System (MPS) bezeichnet, da sie in der Lage sind, Krankheitserreger und andere Antigene endozytotisch aufzunehmen und abzubauen. Durch die Präsentation von aufgenommenem Antigen-Material auf der Zelloberfläche kann wiederum das erworbene Immunsystem aktiviert werden (Hume, 2006).

Zum angeborenen Immunsystem zählen aber auch physikalische und chemische Barrieren wie die Epidermis, die von Epithelien produzierten antimikrobiellen Substanzen (Defensine) und eine Kaskade von Proteinen, die bei der Markierung und Abtötung von eingedrungenen Mikroorganismen hilft, das sog. Komplementsystem. Unterstützt wird das Immunsystem durch physiologische Veränderungen des infizierten oder geschädigten Gewebes, die in ihrer Gesamtheit als Entzündung bekannt sind. Diese Reaktion erleichtert es den Immunzellen, zum Ort der Infektion vorzudringen.

## **2. Monozyten/Makrophagen**

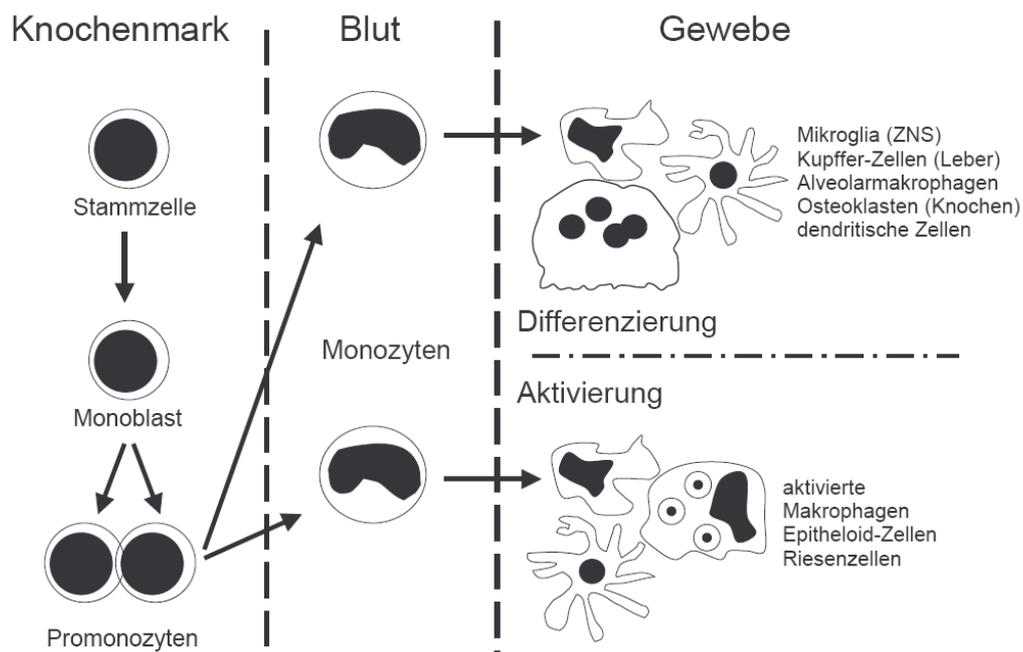
### **2.1. Ursprung und Struktur der Monozyten / Makrophagen**

Durch Phagozytose können die Zellen des mononukleären Phagozyten-Systems (MPS, früher retikuloendotheliales System, RES) körperfremde Strukturen, die Antigene eliminieren. Darüber hinaus sind Zellen des MPS, v.a. dendritische Zellen und Makrophagen in der Lage, den T- und B-Zellen Antigene auf ihrer Zelloberfläche zu präsentieren und damit die spezifische Immunantwort zu initiieren bzw. zu koordinieren. Das MPS besteht aus Promonozyten und deren Vorläufern im Knochenmark, den Monozyten, die im Blut zirkulieren, und den Makrophagen der verschiedenen Körperhöhlen und Gewebe (z.B. den Kupffer-Zellen der Leber, den Mikrogliazellen im zentralen Nervensystem, den Alveolarmakrophagen der Lunge, den Histozyten und Osteoklasten) sowie den dendritischen Zellen (Hume, 2006; Zhou et al., 1996). Diese nehmen eine besondere Stellung im angeborenen Immunsystem ein, da sie sehr effizient eine spezifische Immunantwort initiieren können.

Alle hämatopoetischen Zellpopulationen stammen von pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks ab, die sich wiederum aus dem embryonalen Mesenchym ableiten (Volkman und Gewans, 1965). Unter dem Einfluss von Wachstums- bzw. Differenzierungsfaktoren ("colony-stimulating factors", CSFs), welche die weitere Zellteilung und -differenzierung steuern, entwickeln sich aus den pluripotenten Zellen lymphozytäre und myeloische Stammzellen. Unter dem Einfluß des Faktors Interleukin-3 (IL-3) gliedert sich die myeloische Zellreihe in vier Entwicklungslinien auf: die erythrozytäre Linie, die megakaryozytäre Linie, die Linie der eosinophilen Granulozyten und die granulozytär-monozytäre Linie. Ausgangszellen dieser letzten Linie sind die sogenannten CFU-GMs ("colony-forming unit granulocyte macrophages"). Durch M-CSF (Makrophagen-CSF oder CSF-1) differenzieren diese Vorläuferzellen der granulozytär-monozytären Linie zu Monoblasten. Aus letzteren wiederum gehen die Promonozyten hervor und werden nach der letzten Zellteilung schließlich als Monozyten in die Blutzirkulation entlassen. In der Regel sind Monozyten und Makrophagen nicht mehr teilungsfähig (Gemsa et al., 1997). Es gibt jedoch Hinweise, dass auch in peripheren Organen ein

Pool von mononukleären Zellen existiert, der die Eigenschaft hat, sich selbst zu regenerieren (Pascual et al., 2005).

Im Blut eines Erwachsenen zirkulieren etwa  $1,7 \times 10^9$  Monozyten und repräsentieren damit 2-8 % aller Leukozyten. Monozyten zählen mit einem Durchmesser von etwa 10-15  $\mu\text{m}$  zu den größten Zellen des Blutes. Weitere Merkmale sind eine unregelmäßige Zellbegrenzung, Vakuolen als Zeichen einer gut ausgebildeten Phagozytosefähigkeit, ein meist eingebuchteter, ovaler oder hufeisenförmiger Kern, locker strukturiertes Chromatin und ein Zytoplasma mit azurophilen Granula (Junqueira et al., 1996). Monozyten sind nicht nur Vorläufer der Makrophagen, sondern können selbst gut phagozytieren, entfalten eine zytotoxische Aktivität und sezernieren viele biologisch aktive Mediatoren (Gemsa et al., 1997). Werden Monozyten aus dem Blut isoliert und in ein Kulturgefäß gegeben, adhären sie und breiten sich über die Oberfläche aus.



**Abbildung 1: Schematische Darstellung der Monozyten-Entwicklung.**

Während der Differenzierung von Monozyten entstehen zwei phänotypisch und funktionell unterschiedliche Populationen von Monozyten, die sich zu Gewebsmakrophagen differenzieren oder direkt in entzündete Gewebe auswandern. Modifiziert nach Taylor et al., 2003.

Im menschlichen Blut können die Monozyten aufgrund von Zelloberflächenmolekülen vereinfacht in zwei funktionell und phänotypisch unterschiedliche Populationen eingeteilt werden: Zum einen Monozyten, die bevorzugt in die peripheren Gewebe einwandern und sich dort zu Gewebsmakrophagen differenzieren (ruhende Monozyten/*residential monocytes*, s. Abb. 1), zum anderen Monozyten, die sich vor allem in entzündeten Geweben finden und dort die Immunantwort koordinieren (inflammatorische Monozyten/*inflammatory monocytes*, Taylor und Gordon, 2003; Passlick et al., 1989, Weber et al., 2000). Nach ca. 24 Stunden verlassen die Monozyten die Blutbahn und wandern in das umliegende Gewebe aus, in dem die weitere Differenzierung zu Makrophagen stattfindet. Makrophagen unterscheiden sich von Monozyten in ihrer Enzymaktivität, erhöhter Fähigkeit zur Phagozytose und der Expression von Zelloberflächenmolekülen wie z.B. CD16 und Adhäsionsmolekülen der  $\beta_2$ -Integrinfamilie. Insbesondere der Chemokin-Rezeptor CCR2 (s. 3.3.2), der auf inflammatorischen Monozyten exprimiert wird, nicht aber auf ruhenden Monozyten und für die Auswanderung von Monozyten aus dem Knochenmark wichtig zu sein scheint (Gordon und Taylor, 2005; Rollins, 2006).

## **2.2. Funktionen der mononukleären Phagozyten**

Durch die Fähigkeit zur Phagozytose und die nachfolgenden Verdauungsprozesse sind die Zellen des MPS die erste Instanz der Abwehr gegen körperfremde Substanzen, dienen aber auch der Beseitigung körpereigener Stoffe. Bei einer Infektion mit Viren beispielsweise spielt dieses Abwehrsystem in den ersten Tagen eine wichtige Rolle, bis sich die Antwort des spezifischen Immunsystems ausgebildet hat (Mogensen, 1979).

Von entscheidender Bedeutung ist die Interaktion zwischen den phagozytierenden und Antigen-präsentierenden Zellen mit dem spezifischem Immunsystem. Die Antigenpräsentation und die Sekretion von Monokinen (Monozyten-Zytokinen) durch Monozyten/Makrophagen führt zur Aktivierung von T-Lymphozyten. Diese wiederum setzen Produkte zur B-Lymphozyten- und Makrophagenaktivierung frei (Abbas et al., 2000). Über diesen

Mechanismus besteht eine wechselseitige Regulation des angeborenen und des erworbenen Immunsystems.

Zusammenfassend lassen sich die Hauptfunktionen der Makrophagen wie folgt darstellen (Gemsa et al., 1997):

- 1) Phagozytose von Mikroorganismen (Bakterien, Pilze, Parasiten), geschädigten Zellen, gealterten Erythrozyten und Antigen-Antikörper-Komplexen
- 2) Sekretion einer Vielzahl von Substanzen (s. Tabelle 1)
- 3) Immunregulation (Kooperation mit Lymphozyten über Antigenprozessierung und –präsentation, Expression von regulatorischen Molekülen wie z.B. Adhäsionsmolekülen und Kostimulatoren der T-Zellantwort, Sekretion von Monokinen und unspezifischen Immunsuppressoren)
- 4) Zytotoxizität gegenüber Parasiten, Tumorzellen, transplantierten Zellen und virusinfizierten Zellen.

### **2.3. Aktivierung von Makrophagen**

Während eines Entzündungsprozesses werden sowohl die chemotaktisch angelockten Monozyten, als auch die Gewebsmakrophagen für den Empfang von Aktivierungssignalen sensibilisiert. Der höchste Aktivierungsgrad von Makrophagen wird in der Regel erst durch die Einwirkung von 2 Signalen erreicht (2-Signalthypothese) (Hamilton und Adams, 1987; Gemsa und Kozan, 1984). Das erste Signal („Priming-Signal“) versetzt die Zellen in einen rezeptiven Zustand. Dies wird z.B. durch Lymphokine (Lymphozyten-Zytokine) wie IFN- $\gamma$ , GM-CSF oder verschiedene makrophagenaktivierende Faktoren (MAFs) vermittelt. Durch ein zweites, auslösendes Signal wie z.B. Endotoxin oder eine Kombination aus Interleukin-1 (IL-1) und Tumor-Nekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) werden Makrophagen dazu veranlasst, volle Aktivierung zu zeigen („Trigger-Signal“).

Bei der Regulation der Makrophagenaktivierung spielt das von den Makrophagen selbst produzierte Prostaglandin E<sub>2</sub> eine wesentliche Rolle, indem es die durch IFN- $\gamma$  induzierte Makrophagenaktivierung inhibiert (Taffet und Russell, 1981). Was mit Makrophagen nach ihrer Aktivierung geschieht,

wird kontrovers diskutiert. Zum einen wird eine Deaktivierung der Zellen für möglich gehalten, zum anderen besteht die Annahme, dass einmal aktivierte Makrophagen nach Erfüllung ihrer Aufgabe zu lokalen Lymphknoten wandern und dort sterben (van Furth, 1982). Ob der Zelltod aktivierter Makrophagen genetisch programmiert ist oder auf die von den Zellen selbst sezernierten toxischen Produkte zurückzuführen ist, ist bisher nicht weiter untersucht worden.

#### 2.4. Sekretorische Produkte von Makrophagen

Makrophagen gehören zu den sekretorisch aktivsten Zellpopulationen (Nathan, 1987). Die meisten der sezernierten Moleküle werden nach einer Stimulation und Aktivierung freigesetzt. Die Menge und Art der sezernierten Moleküle sind abhängig vom Grad der Differenzierung und der Gewebelokalisation. Eine Übersicht über die wichtigsten Produkte zeigt Tabelle 1.

**Tabelle 1: Eine Auswahl sekretorischer Makrophagen-Produkte**

<u>Stoffgruppe</u>	<u>Beispiele</u>
<u>Zytokine und Chemokine</u>	Proinflammatorische Zytokine Anti-inflammatorische Zytokine Chemokine Wachstums- und Differenzierungsfaktoren
<u>Enzyme</u>	Lysozym, saure Hydrolasen, Proteasen, Elastase, Kollagenase A
<u>Komplement-Faktoren</u>	Klassischer Aktivierungsweg Alternativer Aktivierungsweg
<u>Gerinnungsfaktoren</u>	Intrinsischer Aktivierungsweg Extrinsischer Aktivierungsweg
<u>Proteine der extrazellulären Matrix</u>	Fibronectin, Proteoglykane
<u>Wachstumsfaktoren</u>	Transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) Platelet-derived growth factor (PDGF) Fibroblast growth factor (FGF) Vascular endothelial growth factor (VEGF)
<u>Arachidonsäure-Derivate</u>	Zyklooxygenase-Weg Lipoxygenase-Weg
<u>Toxische Radikale</u>	Sauerstoff-Radikale Stickstoff-Radikale

### 3. Zytokine und Chemokine

#### 3.1. Zytokine

Als Zytokine bezeichnet man eine Gruppe von Polypeptiden, die regulatorische Signale zwischen Zellen vermitteln. Sie wirken durch Bindung an einen oder mehrere spezifische Rezeptoren auf den Zielzellen. Die dadurch angeschalteten intrazellulären Signalwege beeinflussen die Zellproliferation und –differenzierung, sowie die Regulation der natürlichen und der spezifischen Immunität. Man kann die Zytokine je nach Aspekt z.B. nach den produzierenden Zellen in Monokine (von Makrophagen und Monozyten produziert) und Lymphokine (von Lymphozyten produziert) oder funktionell in pro- und anti-inflammatorische Zytokine unterteilen. Historisch unterscheidet man u.a. die Interleukine (IL-1 bis IL-29), die Tumor-Nekrose-Faktoren (z.B. TNF- $\alpha$ ), die Chemokine (z.B. CCL5), die Interferone (z.B. IFN- $\beta$ ) und die *colony-stimulating factors* (z.B. G-CSF).

Obwohl die Familie der Zytokine eine hohe Diversität aufweist, teilen sie folgende Gemeinsamkeiten (Abbas et al., 2000):

- 1) Zytokine werden sowohl von Zellen des unspezifischen als auch von Zellen des spezifischen Immunsystems produziert und regulieren die Immunantwort.
- 2) Die Sekretion der Zytokine ist selbstlimitierend.
- 3) Zytokine wirken auf viele verschiedene Zellen (Pleiotropismus).
- 4) Die Effekte der Zytokine sind häufig redundant.
- 5) Zytokine beeinflussen die Synthese anderer Zytokine (Zytokinkaskade).
- 6) Zytokine entfalten ihre Wirkung durch die Bindung an einen oder mehrere spezifische Rezeptoren auf den Zielzellen (autokriner, parokriner oder endokriner Mechanismus) und beeinflussen dadurch intrazelluläre Signalwege.

#### 3.2. IL-24/MDA-7

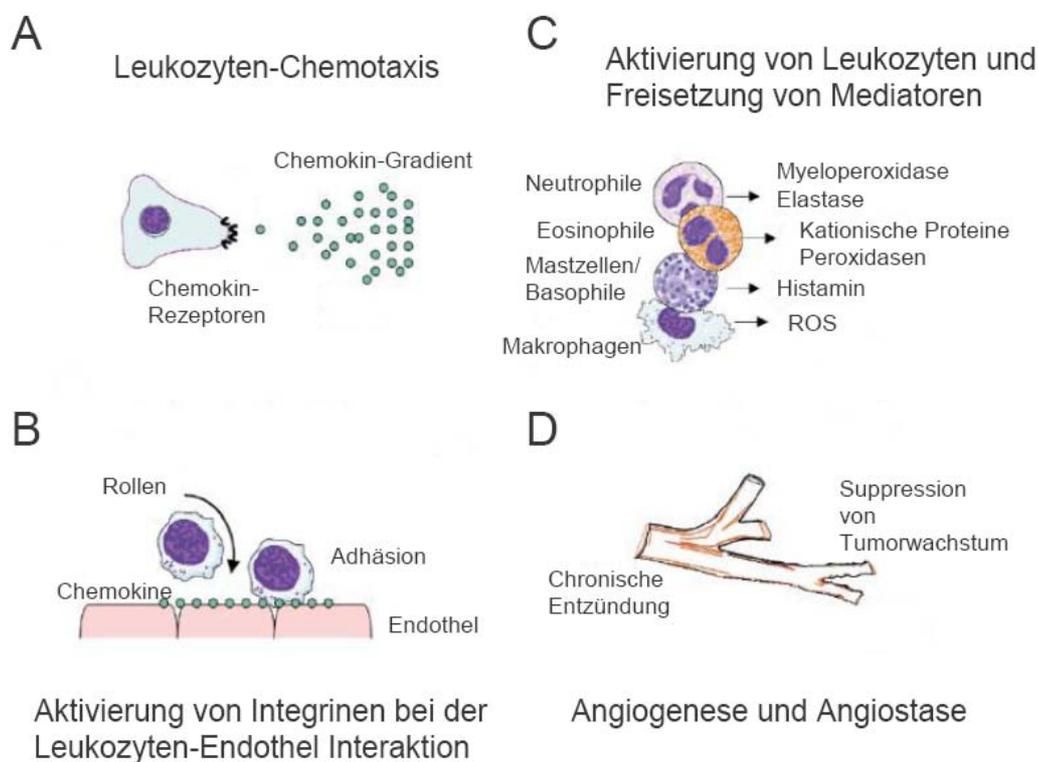
Erst kürzlich wurde das aus humanen Melanomen isolierte *melanoma differentiation-associated gene 7* (MDA-7) in IL-24 umbenannt. Dieses Zytokin ist in der Lage, das Wachstum von Tumorzellen zu hemmen (Jiang et al., 1996). Im Gegensatz zum strukturell verwandten IL-10 hat IL-24 jedoch keinen

hemmenden Effekt auf eine LPS-induzierte TNF- $\alpha$  Produktion von Monozyten (Wang et al., 2002). Experimentell kann IL-24 durch Interferon- $\beta$  und das Terpen Mezerein in Melanom-Zellen induziert werden (Jiang et al., 1996; Madireddi et al., 2000). Neben einer Freisetzung von IL-24 nach Stimulation von Monozyten mit Concanavalin A (ConA) (Wang et al., 2002), ist auch eine Induktion durch LPS gezeigt worden (Caudell et al., 2002; Garn et al., 2002). IL-24 bindet an die heterodimeren Rezeptoren IL-22R1/IL-20R2 und IL-20R1/IL-20R2 und aktiviert dadurch die Signalübertragungsmoleküle STAT1 und STAT3, die als Transkriptionsfaktoren wirken (Wang et al., 2002).

### 3.3. Chemokine

#### 3.3.1. Struktur und Funktion der Chemokine

Die Bezeichnung "Chemokine" leitet sich aus *chemoattractant cytokines* ab. Die charakteristische Funktion dieser Proteinfamilie ist die gerichtete



**Abbildung 2: Vier wichtige biologische Funktionen von Chemokinen.**

A) Chemokine dienen der Chemotaxis von Leukozyten, d.h. der gerichteten Bewegung entlang eines Chemokin-Gradienten. B) Sie vermitteln die Aktivierung von Integrinen auf Leukozyten, die mit dem Endothel interagieren. C) Chemokine stimulieren die Degranulation von Leukozyten und die Freisetzung von Mediatoren. In Makrophagen induzieren sie auch die Bildung von reaktiven Sauerstoff-Verbindungen (ROS). D) Einige Chemokine sind in der Lage, das Wachstum von Gefäßen zu fördern oder zu inhibieren. Diese Eigenschaft könnte auch der Tumor-Suppression durch einige Chemokine zugrunde liegen. Nach Mackay, 2001.

Anlockung von Leukozyten (Chemotaxis). Chemokine werden von den unterschiedlichsten Zellen sezerniert. Insbesondere Monozyten und Makrophagen, aber auch Lymphozyten können eine Reihe von Chemokinen produzieren. Auch in den meisten Gewebezellen sind Chemokine induzierbar (Baggiolini et al., 1994) und bilden im Extrazellulärraum einen Gradienten aus, an dem sich Leukozyten entlangbewegen, um z.B. an den Ort der Entzündung zu gelangen. Dabei sind die Chemokine an Molekülen der extrazellulären Matrix fixiert (Haptotaxis) (Tanaka et al., 1993). Neben ihrer chemotaktischen Funktion, führen Chemokine zur Reorganisation des Zytoskeletts in ihren Zielzellen. Zusätzlich aktivieren sie z.B. Integrine und andere Moleküle, die zur erhöhten Adhäsion von Leukozyten an Endothelzellen und anschließender Migration durch die Gefäßwand führen (Butcher, 1991; Schall, 1994; Imhof et al., 1995). Außerdem können sie Zellen des Immunsystems aktivieren und eine Freisetzung von Mediatoren induzieren (Rossi und Zlotnik, 2000). Chemokine spielen auch eine wichtige Rolle in der Regulation des Wachstums von Blutgefäßen (Angiogenese und Angiostase, Romagnani et al., 2004). Eine Übersicht über die allgemeinen biologischen Funktionen der Chemokine gibt Abbildung 2.

Charakteristisch für die Mitglieder der Chemokin-Familien sind konservierte Cystein-Reste, die durch Bildung von Disulfidbrücken die Tertiärstruktur der Chemokine beeinflussen. Die Einteilung der Chemokine nach ihrer Struktur in vier Familien unterscheidet die Chemokine anhand von Anzahl und Position der Cystein-Reste am Amino-Terminus des Moleküls. Klassischerweise werden die Chemokine in C-, CC-, CXC- und CX<sub>3</sub>C-Chemokine unterteilt (Zlotnik und Yoshie, 2000; Baggiolini et al., 1994).

Einer anderen Einteilung liegt die allgemeine Funktion der Chemokine zugrunde. Hier werden die inflammatorischen und die konstitutiven Chemokine unterschieden. Die Gruppe der inflammatorischen Chemokine wird durch inflammatorische Stimuli induziert, oder vermittelt selbst inflammatorische Signale. Sie spielen eine wichtige Rolle bei entzündlichen Reaktionen. Dazu gehören Chemokine wie CXCL1, CXCL8, CCL2-CCL5, CCL7, CCL8 und CCL13.

Die konstitutiven oder homöostatischen Chemokine werden im Knochenmark, im Thymus oder den sekundären lymphatischen Organen exprimiert und sind verantwortlich für die Kontrolle der Leukozytenmigration und die Koordination der Zell-Zell-Interaktionen im Verlauf der Immunantwort (Yoshie et al., 1997). Vertreter dieser Gruppe sind z.B. CCL21 (SLC, *secondary lymphoid tissue chemokine*), CCL19 (ELC, *EBV-induced molecule 1 ligand chemokine* = MIP-3 $\beta$ ), CCL18 (DC-CK-1, *dendritic cell chemokine 1*), CCL22 (MDC, *macrophage-derived chemokine*) und CCL17 (TARC, *thymus and activation-regulated chemokine*).

### 3.3.2. Chemokinrezeptoren

Chemokine binden an Rezeptoren auf der Oberfläche der Zielzellen, die zur Familie der heptahelikalen (7fach membrandurchspannenden), an G-Proteine gekoppelten Rezeptoren gehören (Rhodopsin-Superfamilie). Die CXC-Chemokine bindenden Chemokinrezeptoren werden als CXCRs, entsprechend die CC-Chemokine bindenden Rezeptoren als CCRs bezeichnet. Es wurden bisher sechs CXC-Rezeptoren und elf CC-Rezeptoren identifiziert. Auf Leukozyten wird generell mehr als ein Rezeptortyp exprimiert. Fast alle Chemokinrezeptoren besitzen eine überlappende Ligandenspezifität. Die Signaltransduktion, die durch Bindung der Chemokine an ihre Rezeptoren aktiviert wird, wird nicht nur über G-Proteine vermittelt (Bokoch, 1995), sondern auch über die Proteine aus der Familie der Janus-Kinasen (JAKs) und *signal transducers and activators of transcription* (STATs) (Rodriguez-Frade et al., 2001). Dabei induziert die Bindung von Chemokinen die Bildung von Rezeptor-Homo- bzw. Heterodimeren mit anschließender Aktivierung eines G $\alpha_i$ - bzw. G $\alpha_{q/11}$ -Proteins und eines JAK-STAT-Signalwegs. Auch die Aktivierung einer Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-K) ist beschrieben (Ward, 2004). Außerdem werden kleine Guanosintriphosphat-bindende Proteine der Ras- und Rho-Familie aktiviert (Laudanna et al., 1996). Diese Rho-Proteine sind an der Zellmobilität über eine Regulation von Aktin-abhängigen Prozessen beteiligt.

**Tabelle 2 (umseitig): Die wichtigsten Mitglieder der humanen Chemokin-Familien (modifiziert nach Luster, 1998; Rossi et Zlotnik, 2000 und Esche et al., 2005). Fettgedruckte Chemokine bzw. Chemokinrezeptoren verweisen auf konstitutive Chemokine.**

<b>CXC Chemokin-Familie</b>		
<i>Chemokin</i>	<i>Synonym/hum. Chemokin</i>	<i>Rezeptor</i>
CXCL1	GRO- $\alpha$ /MGSA- $\alpha$	CXCR2
CXCL2	GRO- $\beta$ /MGSA- $\beta$	CXCR2
CXCL3	GRO- $\gamma$ /MGSA- $\gamma$	CXCR2
CXCL4	PF-4	?
CXCL5	ENA-78	CXCR2
CXCL6	GCP-2	CXCR1/2
CXCL7	NAP-2	CXCR2
CXCL8	Interleukin-8	CXCR1/2
CXCL9	Mig	CXCR3
CXCL10	IP-10	CXCR3
CXCL11	I-TAC	CXCR3
<b>CXCL12</b>	<b>SDF-1<math>\alpha</math>/<math>\beta</math></b>	<b>CXCR4</b>
<b>CXCL13</b>	<b>BLC/BCA-1</b>	<b>CXCR5</b>
CXCL14	BRAK/bolekine	?
CXCL16	SR-PSOX	CXCR6
<b>C Chemokin-Familie</b>		
<i>Chemokin</i>	<i>Synonym/hum. Chemokin</i>	<i>Rezeptor</i>
XCL1	Lymphotactin/SCM-1 $\alpha$ /ATAC	XCR1
XCL2	SCM-1 $\beta$	XCR1
<b>CX<sub>3</sub>C Chemokin-Familie</b>		
<i>Chemokin</i>	<i>Synonym/hum. Chemokin</i>	<i>Rezeptor</i>
CX <sub>3</sub> CL1	Fractalkin	CX <sub>3</sub> CR1
<b>CC Chemokin-Familie</b>		
<i>Chemokin</i>	<i>Synonym/hum. Chemokin</i>	<i>Rezeptor</i>
<b>CCL1</b>	<b>I-309</b>	<b>CCR8</b>
CCL2	MCP-1/MCAF	CCR2
CCL3	MIP-1 $\alpha$	CCR1/5
CCL4	MIP-1 $\beta$	CCR5
CCL5	RANTES	CCR1/3/5
CCL7	MCP-3	CCR1/2/3
CCL8	MCP-2	CCR3
CCL11	Eotaxin	CCR3/5
CCL13	MCP-4	CCR2/3
CCL14	HCC-1	CCR1
CCL15	HCC-2/MIP-1 $\delta$	CCR1/3
CCL16	HCC-4/LEC	CCR1
<b>CCL17</b>	<b>TARC</b>	<b>CCR4</b>
CCL18	DCCK/PARC/AMAC	?
<b>CCL19</b>	<b>MIP-3<math>\beta</math>/ELC</b>	<b>CCR7</b>
<b>CCL20</b>	<b>MIP-3<math>\alpha</math>/LARC/exodus-1</b>	<b>CCR6</b>
<b>CCL21</b>	<b>SLC/6Ckine/exodus-2</b>	<b>CCR7</b>
<b>CCL22</b>	<b>MDC/STCP-1</b>	<b>CCR4</b>
CCL23	MPIF-1	CCR1
CCL24	MPIF-2/Eotaxin-2	CCR3
<b>CCL25</b>	<b>TECK</b>	<b>CCR9</b>
CCL26	Eotaxin-3	CCR3/10
<b>CCL27</b>	<b>CTACK/ILC</b>	<b>CCR10</b>
<b>CCL28</b>	<b>MEC</b>	CCR3/10

### 3.3.3. Die Rolle von Chemokinen bei der Pathogenese von Krankheiten

Ein Einfluss von Chemokinen wurde bei einer Vielzahl von Erkrankungen beschrieben (Gerard und Rollins, 2001). Es ist wahrscheinlich, dass Chemokine bei diesen Krankheiten eine Akkumulation und Aktivierung von Leukozyten in bestimmten Geweben bewirken. Die Möglichkeit, solche Zellbewegungen über einen gezielten Eingriff in den Chemokin- und Chemokinrezeptorkreislauf zu beeinflussen, könnte möglicherweise neue therapeutische Ansätze bieten.

Bei einer Entzündung wird die Art des zellulären Infiltrats im Gewebe unter anderem von der Untergruppe der exprimierten Chemokine bestimmt, die Zellen aus dem Blutkreislauf anlocken. Bei vielen akuten Krankheitsverläufen, wie einer bakteriellen Pneumonie oder einem *acute respiratory distress syndrome* (ARDS), kann eine massive Infiltration neutrophiler Granulozyten beobachtet werden. Die lokale Konzentration potenter Neutrophilen-attrahierender Chemokine, zum Beispiel IL-8, ist bei Patienten mit diesen Krankheitsbildern deutlich erhöht (Miller et al., 1992; Chollet-Martin et al., 1993).

Virale Meningitiden sind gekennzeichnet durch eine massive Infiltration von Monozyten und Lymphozyten. Die Konzentration von Chemokinen, die bevorzugt diese Zellen attrahieren, wie beispielsweise CXCL10 (IP-10, *interferon-induced protein 10*) oder CCL2, ist im Liquor erhöht und korreliert in ihrer Höhe mit der Menge des mononukleären Infiltrats (Sprenger et al., 1996a; Lahrtz et al., 1997).

Bei der Atherosklerose sind Makrophagen und Lymphozyten in den betroffenen Gefäßen die Hauptentzündungszellen. Makrophagen als Vorläufer der lipidbeladenen „*foam cells*“ und als Produzenten zahlreicher Wachstumsfaktoren wird eine zentrale Rolle in der Entstehung der Atherosklerose zugewiesen. In einer Untersuchung wurden Gewebeschnitte der *Arteria carotis* Gesunder und an Atherosklerose erkrankter Patienten untersucht und dabei mRNA für CCL2, ein potentiell Makrophagen-attrahierendes Chemokin, nur in den erkrankten Karotiden nachgewiesen (Nelken et al., 1991). Neben CCL2 werden auch die Chemokine CCL5 und

CX<sub>3</sub>CL als wichtige Mediatoren bei der Atherosklerose diskutiert (Gerard und Rolling, 2001; Bursill et al., 2004).

Bei Asthma, Rhinitis und atopischer Dermatitis kommt es zu einer Akkumulation und Aktivierung von Mastzellen und eosinophilen Granulozyten, deren Mediatoren in der Pathogenese allergischer Erkrankungen eine zentrale Funktion übernehmen (Bousquet et al., 1990). Hohe lokale Konzentrationen von Stoffen, die die Freisetzung von Histamin aus Mastzellen induzieren, die sogenannten *histamine-releasing factors*, spielen hierbei eine wichtige Rolle. So sind CCL11 und die Chemokine CCL2/7/8/13 wichtige *histamine-releasing factors* und lokal in den allergischen Herden nachgewiesen worden (Luster und Rothenberg, 1997). Es finden sich zudem auch erhöhte Spiegel von CXCL8 (Marini et al., 1992).

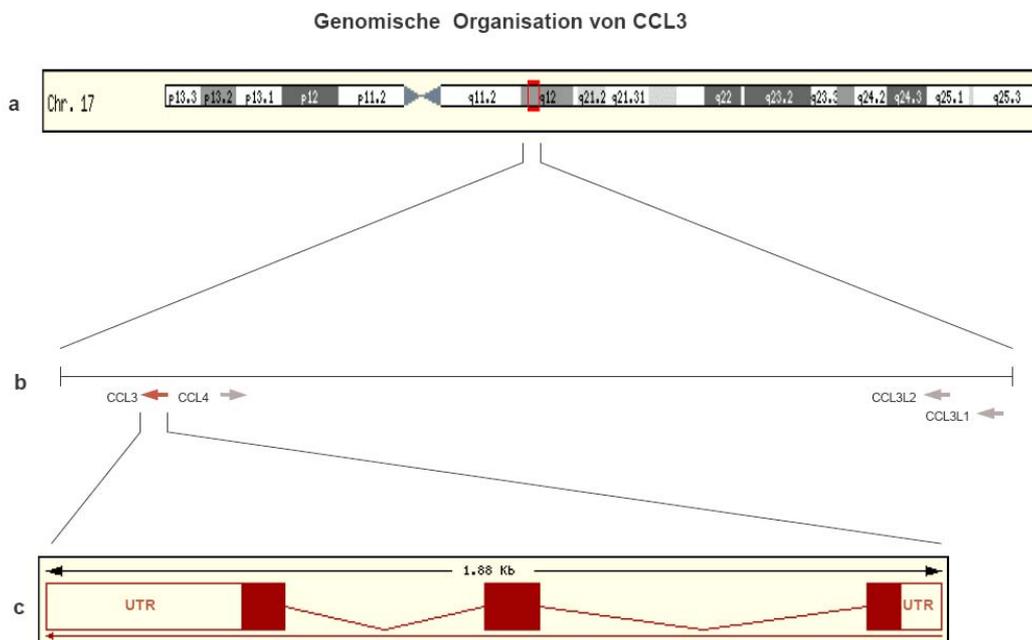
Colitis ulcerosa und Morbus Crohn (Enteritis regionalis Crohn) sind chronische Entzündungen mit wiederkehrenden akuten Entzündungsschüben. Während in der chronischen Phase der Entzündungsherd von Makrophagen und Lymphozyten dominiert wird, bestimmen die neutrophilen Granulozyten das akute Geschehen. Viele Chemokine wurden im betroffenen intestinalen Gewebe in stark erhöhten Konzentrationen nachgewiesen (Reinecker et al., 1995).

#### **3.3.4. Das Chemokin CCL3 (MIP-1 $\alpha$ )**

Das humane Chemokin CCL3 (Maus: MIP-1 $\alpha$ ) wurde ursprünglich aus stimulierten Lymphozyten kloniert und LD78alpha benannt (Forsdyke, 1985; Obaru et al., 1986). In der Nachfolge wurden zwei weitere Gene mit hoher Sequenzhomologie gefunden, die LD78beta (CCL3L1) und LD78gamma (CCL3L2) genannt wurden (Nakao et al., 1990; Irving et al., 1990; Blum et al., 1990). Die Sequenzhomologie für LD78beta beträgt 94 % und das Gen wurde auch in aktivierten Lymphozyten exprimiert, während für LD78gamma ein trunkiertes Pseudogen codiert (Hirashima et al., 1992). Zusätzlich existiert ein weiteres Gen, das eine etwas schwächere Sequenzhomologie aufweist (69 %) und ebenfalls für ein Chemokin (CCL4 oder MIP-1 $\beta$ ) kodiert (Lipes et al., 1988). Die Gene für CCL3, CCL3L1, CCL3L2 und CCL4 liegen alle auf dem

Chromosomenabschnitt 17q12. CCL3 und CCL3L1 sind wahrscheinlich durch Gen-Duplikation entstanden (Hirashima et al., 1992). Das CCL3-Gen besitzt 3 Exons und zwei Introns (s. Abbildung 3).

Das Protein CCL3 besitzt ein Molekulargewicht von ca. 7,8 kDa und besteht aus 70 Aminosäuren. CCL3 kann, wie andere Chemokine auch, an Proteoglykane der extrazellulären Matrix binden (Koopmann et al., 1997). Die meisten hämatopoetischen Zellen sind in der Lage, CCL3 zu bilden und CCL3 wirkt auch auf eine Vielzahl von Zellen (Übersicht in Menten et al., 2002). Ruhende Monozyten und Makrophagen exprimieren wenig CCL3, können aber durch Stimulation mit Zytokinen oder mikrobiellen Bestandteilen (z.B. LPS) zur Produktion von CCL3 angeregt werden (Standiford et al., 1993; Berkman et al., 1995). CCL3 wirkt sehr stark chemotaktisch auf Monozyten (Ugucioni et al., 1995) und führt durch einen Calcium-Influx zu deren Aktivierung (Weber et al., 1996). Vermittelt wird diese Wirkung durch Bindung an die Chemokin-Rezeptoren CCR1 (Neote et al., 1993) und CCR5 (Samson et al., 1996).



**Abbildung 3: Genomische Organisation von CCL3.** a) Lokalisation der Gene für CCL3, CCL3L1, CCL3L2 und CCL4 auf dem Chromosom 17. b) Anordnung der Gene innerhalb des Locus 17q12. c) Intron-/Exon-Struktur des CCL3-Gens. Weitere Erklärungen siehe Text.

Nach NCBI Entrez Genome (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>).

## **4. Die Regulation der Transkription**

### **4.1. Der Aufbau eukaryontischer Gene**

Typische Eukaryontengene zeigen einen modularen Aufbau. Dabei unterscheidet man kodierende und nicht-kodierende Sequenzen. Die kodierenden Sequenzen (Exons) sind in der Regel 50 bis 200 bp groß. Oftmals kodieren Exons für funktionell abgrenzbare Proteindomänen bzw. Sekundärstrukturen. Nicht-kodierende Sequenzen sind die zwischen den Exons liegenden Introns. Auch die vor bzw. hinter den Genen liegenden DNA-Abschnitte, die der Transkriptionsregulation dienen, gehören zu den nicht-kodierenden Sequenzen. Die Länge und Anzahl der Introns kann von Gen zu Gen sehr stark variieren.

In einem als Spleißen bezeichneten Prozess werden die Intron-Sequenzen aus dem Primärtranskript mit Hilfe eines Multienzymkomplexes (Spleißosom) entfernt. Dabei werden konservierte Bereiche im Intron/Exon-Übergang und innerhalb der Introns als Erkennungsstellen benutzt. In den meisten Fällen haben Introns keine weiteren Funktionen, jedoch sind Gene bekannt, deren Introns wiederum komplette, andere Gene enthalten (Levinson et al., 1990). Auch Bindungsstellen für Proteine, die die Transkription regulieren (Transkriptionsfaktoren), können innerhalb der Introns liegen (Sun et al., 1995). Am 5'-Ende und am 3'-Ende des Primärtranskriptes und der mRNA finden sich zusätzlich noch untranslatierte Regionen (UTRs). Spacer-DNA verbindet die einzelnen Bindungsstellen der Transkriptionsfaktoren miteinander, ohne dass eine besondere Funktion bekannt ist. Der modulare Aufbau der eukaryontischen Gene ist evolutionsbiologisch sinnvoll, wenn man bedenkt, dass durch Insertion oder Deletion einzelner Module eine schnelle und effiziente Möglichkeit der regulativen und funktionellen Neuorganisation des Genomes realisierbar war. Dadurch waren Eukaryonten im Laufe der Evolution in der Lage, sich an veränderte Umweltbedingungen durch die Änderung der Expression von Genen auf DNA-Ebene anzupassen.

## 4.2. Prinzipien der Transkriptionsregulation

Die Forschung der letzten Jahre hat gezeigt, dass die Regulation der Proteinsynthese auf allen Stufen der Genexpression erfolgen kann. Sowohl durch Regulation der Transkriptionsrate eines Genes als auch durch Stabilisierung bzw. Abbau von mRNA durch andere RNA-Spezies ist eine effektive Kontrolle der Proteinsynthese möglich (Darnell et al., 1990; Leung and Sharp, 2006). Der Transkriptionsregulation kommt hinsichtlich der Steuerung der Expression in allen Organismen eine besonders wichtige Rolle zu, da nur sie für eine Induktion von Genen sorgen kann und so in mehrzelligen Organismen zur Differenzierung der Zellen und funktionellen Aufgabenteilung beiträgt.

Erste Erkenntnisse über die Regulation der Transkription stammten aus Experimenten mit Prokaryonten, die zeigten, dass Gene durch regulatorische Sequenzen in der Nähe des Transkriptionsstartpunktes kontrolliert werden. Diese relativ kurzen Sequenzen interagieren mit den sogenannten Transkriptionsfaktoren und beeinflussen die Geschwindigkeit und die Häufigkeit der Transkriptionsinitiation. Später wurde gezeigt, dass dies auch für Eukaryonten gilt (Alberts et al., 1997).

Transkriptionsfaktoren enthalten im allgemeinen zwei funktionelle Domänen. Die eine Domäne ist für die Bindung des Transkriptionsfaktors an die DNA verantwortlich, die andere für die Transkriptionsaktivierung (Pthasne, 1988). Nach der Bindung der Faktoren an ihre spezifischen DNA-Sequenzen wechselwirken sie mit dem Transkriptionsinitiationskomplex. Dieser besteht bei Eukaryonten aus einer Reihe von allgemeinen Transkriptionsfaktoren inklusive der Polymerase, die an einem spezifischen, sequenzdeterminierten Ort binden. Dieser Komplex wird als Kern-Promotor bezeichnet (Latchman, 1997).

Die Transkriptionsfaktoren weisen unterschiedliche Struktur motive in ihrer DNA-Bindungsdomäne auf. So lassen sie sich aufgrund ihrer Aminosäurestruktur in mehrere Familien, wie Helix-Turn-Helix, Zinkfinger, Leucin-Zipper und Helix-Loop-Helix einteilen (Latchman, 1998). Eine charakteristische Eigenschaft dabei ist die Bildung von Homo- und Heterodimeren.

### 4.3. Der Kern-Promotor

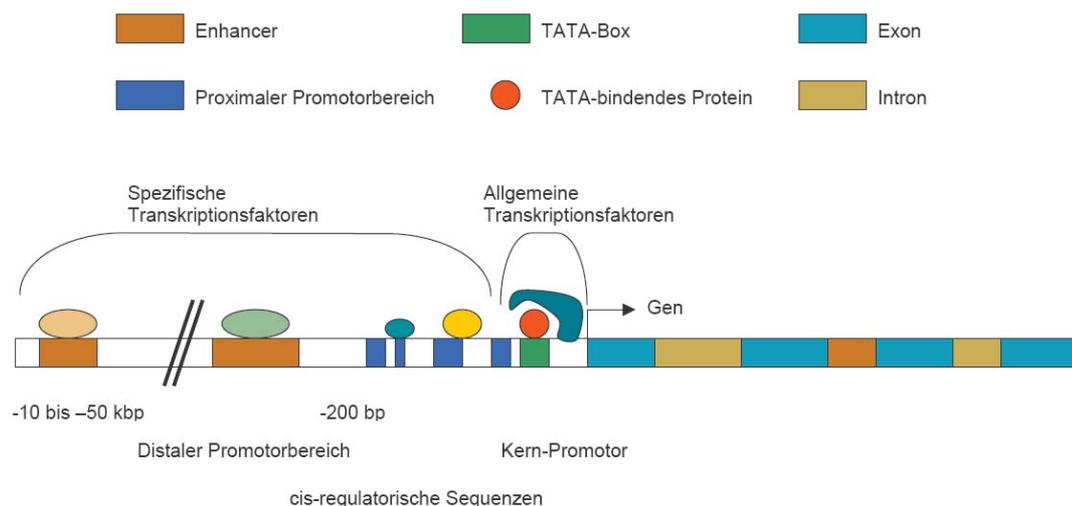
Als man begann, die Promotoren der eukaryontischen Gene zu analysieren, stieß man auf eine AT-reiche Konsensussequenz um die Position -30, die man als TATA-Box bezeichnete. Dieses Element ist eine Komponente der überwiegenden Mehrzahl aller Promotoren, die von der Polymerase II abgelesen werden. Polymerase II ist die einzige der drei menschlichen Polymerasen, welche mRNA für Proteine transkribiert. Polymerase II alleine ist jedoch nicht in der Lage, die Transkription zu initialisieren. Nach und nach wurden weitere Faktoren isoliert, die zusammen mit der Polymerase II für eine basale Transkription von Genen sorgen (Latchman, 1998). Diese basalen Transkriptionsfaktoren binden in einem Bereich von +30 bis -30 bp um den Transkriptionsstart und einer von ihnen ist das TATA-Box-bindende Protein (TBP).

### 4.4. Distaler und proximaler Promotorbereich

Die basale Transkription läuft allerdings *in vivo* ohne die Hilfe spezifischer Transkriptionsfaktoren nur sehr langsam ab. Erst durch die Aktivität spezifischer Transkriptionsfaktoren wird die Ansammlung allgemeiner Transkriptionsfaktoren induziert (oder gehemmt). Diese spezifischen Transkriptionsfaktoren binden nur an bestimmte regulatorische DNA-Sequenzen. Diese Sequenzen werden *cis*-regulatorische (*cis*, lateinisch für: diesseits) Sequenzen genannt, während die daran bindenden Proteine *trans*-aktivierende Faktoren (*trans*, lateinisch für: jenseits) genannt werden.

Die Bindungsstellen für die meisten Transkriptionsfaktoren liegen als sogenannte *upstream promotor elements* stromaufwärts, d.h. vom Transkriptionsstart gesehen in 5'-Richtung. Neben dem Kern-Promotor befindet sich hier auch der sogenannte proximale Promotorbereich von -50 bis -200 bp (s. Abbildung 4). Im proximalen Promotor gibt es sowohl Bindungsstellen für konstitutiv aktive, ubiquitäre Transkriptionsfaktoren, als auch für solche, die durch verschiedene Stimuli aktiviert werden. Bindungsstellen für Stimulus-spezifische Transkriptionsfaktoren werden oft als *response elements* bezeichnet (Brivanlou und Darnell, 2002).

Bindungsstellen für positiv wirkende, d.h. transkriptionsverstärkende Faktoren finden sich auch im distalen Promotorbereich über  $-200$  bp hinaus. Spezielle *cis*-regulatorische Sequenzen sind Enhancer, die sich in großem Abstand zum Transkriptionsstart befinden können (Tuan et al., 1989), sowohl stromaufwärts (in 5'-Richtung) als auch stromabwärts (in 3'-Richtung) (Stamatoyannopoulos et al., 1997). Sie können auch innerhalb von Introns (Sun et al., 1995) liegen und in jeder Orientierung wirksam sein (Mitchell und Tijan, 1989). Die entsprechenden negativ regulierenden Sequenzen werden Silencer genannt. Regulatorische Transkriptionsfaktoren stellen eine Voraussetzung für die differentielle Genexpression dar. Schon geringe Veränderungen in der Menge oder Aktivität dieser Transkriptionsfaktoren können zu einer modifizierten Expression von Genen führen (Nichols und Nimer, 1992).



**Abbildung 4: Regulatorische Regionen eines Eukaryonten-Gens.**

Weitere Erläuterungen siehe Text. Modifiziert nach Alberts et al., 1994.

#### 4.5 Die Regulation der Transkription durch Viren

Die Infektion von eukaryontischen Zellen durch Viren löst eine Vielzahl von intrazellulären Signalen aus. Einige dieser Signale führen – direkt oder indirekt – zu einer Änderung der Genexpression in der infizierten Zelle. So beeinflussen z.B. Adenoviren, Papillomaviren, das Epstein-Barr-Virus und das

humane AIDS-Virus (HIV) über virale Proteine die Transkription der Wirtszellen, um ihre eigene Replikation zu verstärken (Endter und Dobner, 2004; Ishiji, 2000; Marcello et al., 2004). Neben dieser – für die Replikation des Virus vorteilhaften – Aktivierung intrazellulärer Signalwege, werden aber auch zelluläre Abwehrmechanismen aktiviert.

Ein zentraler Punkt in der Abwehr von Infektionserregern durch das Immunsystem ist die Ausschüttung von Zytokinen. Die Expression von Zytokinen und anderen wichtigen Genen des Immunsystems wird unter anderem von dem Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B (*nuclear factor kappa B*) reguliert (Paludan und Mogensen, 2001). Es ist bekannt, dass dieser Transkriptionsfaktor ubiquitär vorkommt und als zentraler Koordinator der menschlichen Immunantwort fungiert (Pahl und Bäuerle, 1997). Die Aktivierung von NF- $\kappa$ B erfolgt u.a. durch die Stimulation der Zelle mit pathogenen Signalen (Pahl, 1999). Zu diesen Signalen gehören virale und bakterielle Infektionen, energiereiche Strahlung (UV-,  $\gamma$ -Strahlung), Zytokine und andere.

#### **4.5.1. Interferone und die *Interferon regulatory factors* (IRFs)**

Interferone (IFNs) sind Zytokine, die bei der Abwehr von viralen Erregern durch das Immunsystem, sowie bei der Aktivierung und Koordinierung der spezifischen Immunantwort eine essentielle Rolle spielen. Die Interferone werden unterteilt in Typ I-Interferone (beim Menschen: IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  und IFN- $\omega$ ) und in das Typ II-Interferon IFN- $\gamma$  (Bogdan, 2000). Dabei sind vor allem die Typ I-Interferone („Virus-Interferone“) für die Bekämpfung einer Virusinfektion verantwortlich und das „Immun-Interferon“ IFN- $\gamma$  hat immunregulatorische Funktionen. Während IFN- $\gamma$  hauptsächlich von Immunzellen produziert wird, können Typ I-Interferone durch eine virale Infektion in fast allen Körperzellen induziert werden. Auch doppelsträngige RNA (dsRNA), die in gesunden Säugerzellen unter normalen Umständen nicht vorkommt, kann Typ I-Interferone induzieren (Kaplan et al., 1999).

Der Mechanismus der Induktion von Typ I-Interferonen konnte in den letzten Jahren teilweise aufgeklärt werden (Taniguchi et Takaoka, 2002). Eine

wichtige Rolle spielen dabei die Faktoren der *Interferon regulatory factor*-Familie (IRF-Familie). Diese Familie von Transkriptionsfaktoren die bisher aus insgesamt zehn Faktoren (IRF-1 bis IRF-10) besteht, spielt außerdem eine wichtige Rolle bei (Mamane et al., 1999; Taniguchi et al., 2001; Taniguchi et Takaoka, 2002):

- der Immunantwort auf Pathogene
- der Modulation der Immunantwort
- der hämatopoetischen Entwicklung und
- der Kontrolle von Zellzyklus und Apoptose.

Die IRFs binden nach ihrer Aktivierung an sogenannte *positive regulatory domains* (PRDs) und *IFN-stimulated response elements* (ISREs), die unter anderem Bestandteil der Promotoren von Typ I Interferonen sind. Während einer viralen Infektion wird die Transkription der Typ I IFNs durch die Aktivierung von zwei Transkriptionsfaktoren der IRF-Familie, IRF-3 und IRF-7, induziert (Marie et al., 1998; Mamane et al., 1999). Dies geschieht durch eine Phosphorylierung der beiden Faktoren. Das Virus-induzierte IFN- $\alpha/\beta$  induziert seinerseits eine Vielzahl von Genen, die als *interferon-stimulated genes* (ISGs) wichtige Funktionen für die Bekämpfung der Virusinfektion wahrnehmen (Darnell et al., 1994; Darnell, 1997; Stark et al., 1998).

Die Bindung von Typ I IFNs an ihren Rezeptor führt zur Aktivierung von Protein-Tyrosinkinase der JAK-Familie und der Bildung von zwei Komplexen aus Transkriptionsfaktoren. Zum einen ein Homodimer aus STAT1 Molekülen, die den sogenannten *alpha-activated factor* (AAF) bilden. Zum anderen ein Komplex, der *IFN-stimulated gene factor 3* (ISGF3) benannt wurde. Dieser besteht aus STAT1, STAT2 und IRF-9 (= p48), einem weiteren Faktor der IRF-Familie.

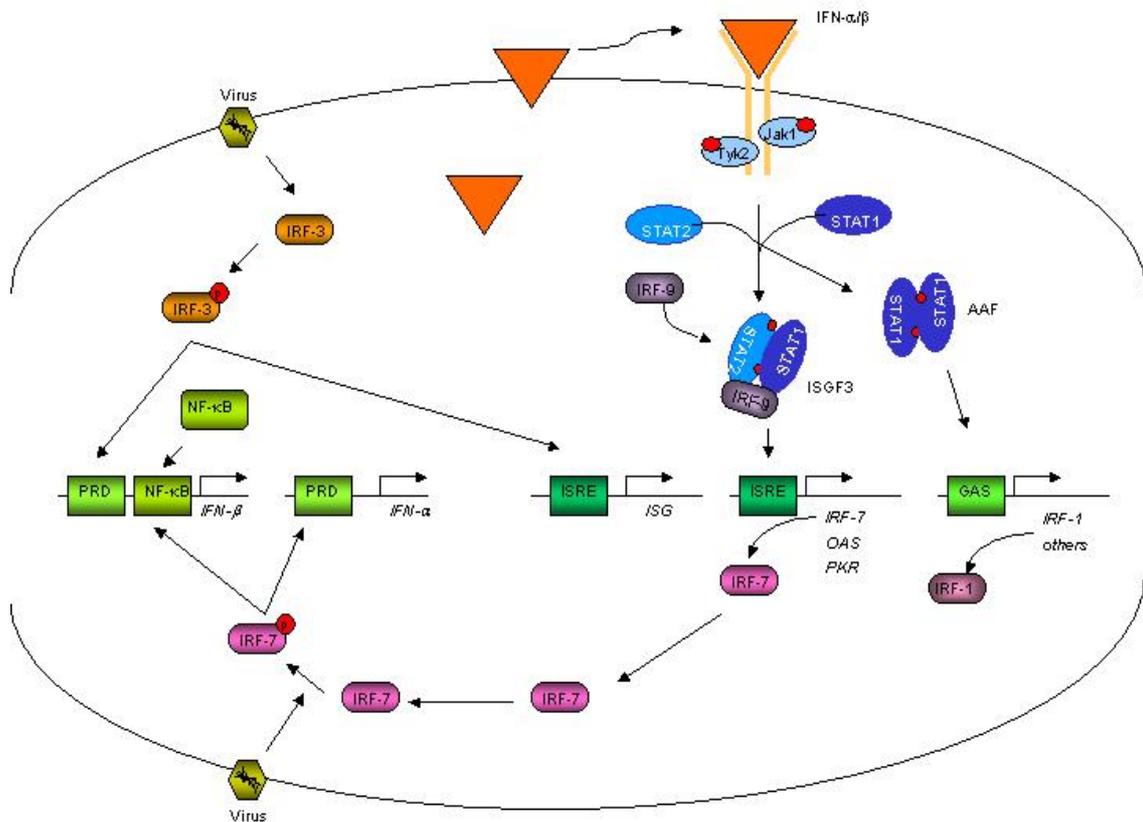
ISGF3 bindet an *cis*-regulatorische ISREs, die häufig im Promotorbereich Interferon-stimulierter Gene zu finden sind und in ihrer Sequenz den PRDs ähneln (Darnell et al., 1994). Auch der Transkriptionsfaktor IRF-7 kann durch ISGF3 induziert werden (Nakaya et al., 2001). Dies führt zu einer positiven Rückkopplung und Verstärkung der Interferon-Antwort, da er zusammen mit

IRF-3 und anderen Transkriptionsfaktoren wie NF- $\kappa$ B Typ I IFN induzieren kann (Marié et al., 1998; Sato et al., 1998).

Der Transkriptionskomplex AAF ist in der Lage, über die Bindung an GAS (*IFN-gamma activated sequences*) die Bildung von IRF-1 zu induzieren, welcher auch an ISREs binden kann (Stevens et al., 1995). IRF-1 ist besonders für das angeborene Immunsystem ein wichtiger Faktor, da er z.B. bei der Aktivierung von Makrophagen und der Induktion des Zytokins IL-12 eine wichtige Rolle spielt (Lohoff et al. 1997, Salkowski et al., 2000 Liu et al., 2003). Diese Aktivierung der Makrophagen umfasst eine Induktion von Elementen des Immunoproteasoms (TAP-1 und LMP-2, Chatterjee-Kishore et al. 1998) und von MHC-Molekülen (Muhlethaler-Mottet et al. 1998), was zu einer verstärkten Präsentation von Peptiden aus dem Zellinneren auf der Zelloberfläche führt (Stark et al., 1998). Ebenso werden Komponenten der *respiratory burst*-Oxidase (p67phox und gp91phox) und die induzierbare NO-Synthase, die beide für die Abtötung intrazellulärer Erreger wichtig sind, von IRF-1 reguliert (Kamijo et al. 1994; Eklund und Kakar, 1999). Nicht zuletzt deshalb wohl spielt der Transkriptionsfaktor auch eine wichtige Rolle bei der Immunantwort auf eine Infektion mit *M. tuberculosis* (Pine, 2002). Darüber hinaus ist IRF-1 zusammen mit IRF-2 als wichtiger Faktor bei der Zellzykluskontrolle und Apoptose in Tumorzellen und in nicht-transfomierten Zellen identifiziert worden (Tanaka et al. 1994, Tamura et al. 1995). Auch der Transkriptionsfaktor IRF-3 ist in der Lage, nach Aktivierung von *pattern recognition receptors*, die Transkription von IL-12 zu verstärken (Goriely et al., 2006).

Zu den *interferon-stimulated genes* (ISGs) zählen auch Gene, die die zelluläre und virale Proteinsynthese herabregulieren. Dies ist u.a. die 2'-5'-Oligo-Adenylatsynthetase (2'-5'-OAS), die durch ihre Produkte (2'-5'-Oligo-As) eine RNaseL zum Verdau von mRNA aktiviert (Samuel, 2001). Auch die RNA-aktivierte Protein-Kinase (PKR), die einen Translationsinitiationsfaktor phosphoryliert und damit inaktiviert, wird von Interferonen induziert. So wird durch die Induktion von Interferonen und die regulatorische Wirkung der IRFs auf vielen Ebenen eine Abwehr der Viren eingeleitet. Abbildung 5 gibt einen

Überblick über die vielfältigen Rollen, die die Mitglieder der IRF-Familie bei einer Virusinfektion und der Induktion von Typ I-Interferonen spielen.



**Abbildung 5: Die regulatorische Rolle der IRFs bei einer Virusinfektion und der Induktion der Typ I-Interferone.** Weitere Erklärungen siehe Text. Verändert nach Taniguchi und Takaoka, 2002.

## 5. Influenza A-Viren

Klinisch sind die Influenza-Viren von großer pathogener Bedeutung. Schon in der Antike wurden Epidemien beobachtet, die retrospektiv Infektionen mit einem Influenza-Virus zugeordnet werden können. Doch erst mit der Isolierung dieser Erreger im Jahre 1933 (Smith et al., 1933) wurde es möglich, systematisch die mit diesen Viren assoziierten Erkrankungen zu analysieren. Zweifellos sind Influenza Viren für weltweite Epidemien verantwortlich, wie z.B. die in den Jahren 1918/19 aufgetretene Pandemie, der schätzungsweise 20 bis 30 Millionen Menschen zum Opfer fielen. Solche weltweiten Pandemien

treten in regelmäßigen Abständen auf, während es fast jährlich zu lokalen Epidemien unterschiedlicher Schwere und Ausbreitung kommt (Dolin, 1997).

### **5.1. Klassifizierung und Einordnung des Virusstammes A/PR/8**

Das Influenza Virus gehört zur Familie der Orthomyxoviridae. Beim Genus Influenza-Virus unterscheidet man drei Typen: Influenza A, B und C. Influenza A ist das wichtigste und am häufigsten auftretende Influenza-Virus. Die Typenklassifizierung erfolgt aufgrund unterschiedlicher Nukleoproteine (NP) und Membranproteine (M). Benannt werden die Subtypen von Influenza nach der Spezies der Erstisolation (diese entfällt beim Menschen), gefolgt von der Typenbezeichnung (A, B oder C), dem Ort der Isolation (z.B. PR für Puerto Rico), der Stammnummer und dem Jahr der Erstisolation. So wurde das Influenza Virus A/PR/8/34 erstmals 1934 in Puerto Rico isoliert.

### **5.2. Struktur und Charakterisierung**

Orthomyxoviren sind negative Einzelstrang-RNA Viren mit pleiomorpher, kugeliger Gestalt, einem Durchmesser von 80-120 nm und helikaler Kapsidsymmetrie. Die Außenhülle des Influenza Virus stammt von der Zellmembran der Wirtszelle und besteht aus einer Lipiddoppelschicht, die bei der Virusreifung übernommen wird. Während die Innenseite der Außenhülle von dem viralen Membran- oder Matrixprotein (M) gebildet wird, finden sich auf der Oberfläche des Viruspartikels die stachelartig angeordneten Glykoproteine (Spikes) Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA). Gemeinsam mit dem Nukleoprotein (NP) bilden die Proteine PB1, PB2 und PA den Nukleoprotein-RNA-Polymerase Komplex. Die Polymerasen bewirken sowohl die Transkription als auch die Replikation der viralen RNA (Fields und Kniepe, 1991).

Das Hämagglutinin liegt als Trimer vor und erkennt Zelloberflächenmoleküle mit Sialinsäureresten. Es ist von entscheidender Bedeutung für die virale Penetration der Zellmembran nach der Endozytose. Voraussetzung dafür ist die proteolytische Spaltung eines jeden HA-Monomers in die Polypeptide HA1

und HA2, die durch eine Disulfidbrücke verbunden bleiben. Findet diese Spaltung nicht statt, ist das Influenza A-Virus nicht infektiös.

Die Neuraminidase besteht aus einer einzigen Polypeptidkette und bewirkt eine Abspaltung terminaler Sialinsäuren von Oligosacchariden auf Zelloberflächen und Glykolipiden. Sie ist verantwortlich für das virale Durchdringen der Schleimschicht auf Epitheloberflächen, verhindert die Selbstaggregation von Viruspartikeln und erleichtert die Virusfreisetzung aus infizierten Zellen. Darüber hinaus tragen die beiden viralen Oberflächenglykoproteine die wichtigen antigenen Determinanten, die zur Bildung spezifischer Antikörper und der Proliferation von spezifischen T-Zellklonen führen. Influenza A besitzt ein segmentiertes Genom. Jedes der 8 Gensegmente ist assoziiert mit einem eigenen Nukleokapsid und eigener Transkriptase. Die Segmente kodieren 10 Proteine und ein zusätzliches 11. entsteht durch Leserahmen-Verschiebung:

**Tabelle 3: Korrelation von RNA-Segmenten und Proteinen des Influenzavirus**

Segment	RNA Länge (nt)	Protein	Protein Länge (Aa)	Anzahl pro Virion	Funktion
1	2341	PB2	759	30-36	Endonuklease, „Cap stealing“ für virale mRNA
2	2341	PB1-F1	757	30-60	RNA Polymerase (Replikase)
	Leserahmen-Verschiebung	PB1-F2	87	30-60	Apoptose-Induktion
3	2233	PA	716	30-60	Unterstützt Synthese genomischer Virus RNA
4	1778	HA	556	500	Hämagglutinin, nach Spaltung in HA1 und HA2 auch Fusionsprotein
5	1565	NP	498	1000	Nukleokapsid-Protein, fördert Transport der RNA-Segmente in den Zellkern, später Synthese und Verpackung der neuen RNA
6	1413	NA	454	100	Neuraminidase für Freisetzung, Zielmolekül für Neuaminidase-Hemmer
7	1027	M1	252	3000	Matrixprotein bildet Schicht innen an der Virus-Hülle
	Splice-Variante	M2	97	20-60	Protonenkanal in Zell- und Virusmembran zur pH-Senkung, Zielmolekül für Medikament Amantadin
8	890	NS1	230	0	Einziges Nicht-Strukturprotein, bindet RNA, fördert Virus-Proteinsynthese durch Bindung an Initiationsfaktor, inhibiert Interferon-Antwort
	Splice-Variante	NS2	121	130-200	Bindet an M1, wirkt auf NS1 Synthese

### 5.3. Vermehrungszyklus

Die Adsorption der Influenza Viren an Wirtszellen erfolgt über eine Bindungsstelle im HA1. Diese erkennt sialinsäurehaltige Proteine oder Lipide auf der Zelloberfläche. Nach rezeptorvermittelter Endozytose gelangt das Virus in ein Endolysosom, in dem das Milieu angesäuert wird (pH 5). Die dadurch verursachte Konformationsänderung des HA2 führt zur Freilegung

unpolarer Aminosäuren am N-Terminus. Nachfolgend können die viralen und zellulären Membranen miteinander verschmelzen. Das Nukleokapsid gelangt daraufhin in das Zytoplasma der Zelle. Unter Mithilfe von M2 wird die RNA freigesetzt (uncoating), indem die Nukleoproteine von ihr abgetrennt werden. Als Negativstrang RNA Virus wird die Transkription des Influenza Virus hauptsächlich durch den viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase-Komplex durchgeführt. Allerdings ist er nicht in der Lage, die mRNA-Synthese zu initiieren oder das 5'-Ende von mRNA-Molekülen durch Capping und Methylierung zu modifizieren. Daher benötigt der initiale Schritt der mRNA-Synthese einen Primer in Form eines 5'-Cap-Endes. Der virale Polymerasekomplex spaltet diese Struktur von wirtseigener, zellulärer mRNA ab und zwar ca. 12 Nukleotide stromaufwärts vom 5'-Cap . Anschließend verwendet er diesen Primer zur Herstellung der viralen mRNA. Die fertige virale mRNA wird in das Zytoplasma transportiert, wo dann an den Ribosomen die Translation erfolgt.

Die ersten Produkte der RNA-Replikation sind komplementäre Kopien aller viralen RNA-Segmente. Diese Positivstrang-Kopien unterscheiden sich von den Positivstrang-Transkripten (mRNAs) durch die Struktur ihrer Enden: Den Kopien fehlt sowohl das Cap als auch der Poly(A)-Schwanz. Sie dienen als Matrizen für die Produktion von Minusstrang-RNA-Segmenten, die identisch sind mit der ursprünglichen viralen RNA.

Die Glykoproteine HA und NA werden am rauhen ER (endoplasmatischen Retikulum) translatiert. Die Glykosylierung findet im Lumen des ER statt und wird im Golgi-Apparat vervollständigt bzw. modifiziert. Wegen des ständigen Membranflusses werden die Golgi-Vesikel in die Zellmembran eingebaut, so dass sich dort Bereiche der entstehenden Virushülle formen. Die übrigen Virusproteine werden im Zytoplasma an freien Ribosomen hergestellt. Das NP wandert in den Zellkern und es kommt zum Zusammenbau des Nukleokapsids (zusammen mit den Retroviren sind die Orthomyxoviren die einzigen RNA Viren, deren Nukleokapsid im Zellkern und nicht im Zytoplasma entsteht). An der Innenseite der Plasmamembran lassen sich die M-Proteine nachweisen, die an die HA-Moleküle gebunden sind. Sie haben die Funktion, beim Zusammenbau des Virions den Kontakt zwischen den viralen Glykoproteinen

in der Membran und dem Nukleokapsid zu vermitteln. In der Regel lagern sich von jedem der 8 Gensegmente je eine Kopie vor der Abschnürung der Virionen zusammen. Die Abknospung der Viruspartikel (*budding*) am apikalen Zellpol wird durch enzymatische Aktivität der NA unterstützt (Fields und Knipe, 1991).

#### **5.4. Antigen drift und Antigen shift**

Influenzaviren des Typs A können wegen ihrer starken Antigen-Variabilität immer wieder Epidemien hervorrufen, indem neu auftretende Virustypen auf eine nicht-immune Bevölkerung treffen. Fortwährend kommt es zu kleineren Antigenveränderungen (Antigen drift), die erklärt werden durch Selektion von Punktmutanten im HA unter immunologischem Druck, zumal nur Antikörper gegen das HA einen vollständigen Infektionsschutz gewährleisten. Größere genetische Veränderungen hingegen resultieren aus dem Antigen shift. Mit diesem Begriff bezeichnet man den Austausch von kompletten RNA-Gensegmenten (*Reassortment*) zwischen verschiedenen Influenzastämmen bei Doppelinfektion einer Zelle. Aufgrund des segmentierten Genoms tritt dieses Ereignis erheblich häufiger auf als eine "klassische" genetische Rekombination.

#### **5.5. Krankheitsbild der Influenza**

Nach zumeist ein- bis dreitägiger Inkubation beginnt die Krankheit plötzlich mit Frösteln, Fieber, Appetitlosigkeit, Kopfschmerzen, Abgeschlagenheit und Muskelschmerzen. Danach kommt es infolge eines Reizzustandes in Rachenraum, Kehlkopf und Luftröhre zu Heiserkeit und einer dunklen Rötung des Rachens sowie Schmerzen hinter dem Brustbein (deszendierende Tracheobronchitis). Der Husten liefert primär meist wenig Auswurf. Der Gipfel der Temperatur (39-40°C) wird meist schon am ersten Krankheitstag erreicht. Nasennebenhöhlen- und Mittelohrentzündung können hinzutreten. Bei Kindern werden Fieberkrämpfe und nicht selten auch gastrointestinale Symptome beobachtet. Zu Beginn ist eine mehr oder weniger ausgeprägte Leukopenie

häufig. An den Lungen ist klinisch meist kein Befund zu erheben, röntgenologisch finden sich oft flüchtige Verschattungen. Histologisch findet man eine Schwellung und Abschilferung des Bronchialepithels sowie ein mononukleäres Infiltrat. Zusätzlich gibt Zeichen einer diffusen Alveolarschädigung (Kim et al., 2002). Die am meisten gefürchteten Verlaufsformen sind der perakute Todesfall bei Jugendlichen und jüngeren Erwachsenen innerhalb weniger Stunden und die primäre Influenzaviruspneumonie. Ansteckungsfähigkeit besteht bei Erwachsenen wahrscheinlich bis zum 5. Tag nach Krankheitsbeginn. Kleinkinder können den Erreger auch länger ausscheiden (Lange et al., 1999).

Die Mehrzahl der Fälle verläuft ohne Komplikationen und klingt nach 4-8 Tagen mit allmählicher Entfieberung ab. Gefürchtet sind perakute Verlaufsformen, die entweder durch akutes Herz-Kreislaufversagen oder infolge einer hämorrhagischen Viruspneumonie innerhalb von 24-48 Stunden zum Tode führen. Die meisten schweren Verläufe werden jedoch durch bakterielle Superinfektionen, am häufigsten anzutreffen sind hier *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* und *Haemophilus influenzae* (Oliveira et al., 2001; Schwarzmann et al., 1971), oder durch eine bestehende Grundkrankheit bedingt. Ältere Personen und Patienten mit einer Einschränkung der Lungenfunktion (z.B. chronische Bronchitis, Emphysem, Bronchiektasen, Asthma bronchiale, Lungen-Tbc, Kyphoskoliose) sind dadurch besonders gefährdet, desgleichen Personen mit angeborenen und erworbenen Herzkrankheiten, vor allem mit Mitralstenose, koronarer Herzkrankheit oder Bluthochdruck.

## **5.6. Therapie und Prophylaxe**

Die Behandlung erfolgt weitgehend symptomatisch. Die Möglichkeiten einer spezifischen Therapie sind begrenzt. Mit Amantadin, dessen Wirkung ausschließlich auf Influenza-Viren des Typs A begrenzt ist und der den M2-Ionenkanal des Influenza-Virus hemmt, können Krankheitsverlauf und -dauer günstig beeinflusst werden. Allerdings muss mit der Medikation spätestens 48 Stunden nach Krankheitsausbruch begonnen werden (Jefferson et al., 2006;

Stiver, 2003). Ähnliches gilt für den verwandten Wirkstoff Rimantadin. Seit einigen Jahren stehen mit den Neuraminidase-Inhibitoren Zanamivir (Relenza®, inhalative Applikation) und Oseltamivir (Tamiflu®, orale Applikation) spezifische Pharmaka zur Verfügung, mit denen sich, bei schneller Behandlung, eine symptomatische Grippe effektiv bessern lässt. Oseltamivir kann – in höheren Dosen – auch zur Prophylaxe verwendet werden (Jefferson et al., 2006; Stiver, 2003.)

Bakterielle Komplikationen werden mit Antibiotika behandelt. Als Prophylaxe steht eine aktive Immunisierung entweder mit einem trivalenten Impfstoff aus inaktivierten Krankheitserregern (Spalt- und Subunitimpfstoffe) oder ein attenuierter Lebendimpfstoff zur Verfügung, die vor Beginn der „Erkältungssaison“ (September, Oktober) verabreicht werden sollten (Greenberg and Piedra, 2004).

## **5.7. Interaktionen von Influenza-Viren mit dem Immunsystem**

### **5.7.1 Allgemeine Reaktionen des Immunsystems gegen Influenza-Viren**

Das Immunsystem reagiert auf die Influenza A-Infektion des Respirationstraktes mit einer komplexen Antwort. Zelluläre und humorale Immunabwehr (Antikörper) sind beide an der Eliminierung des Virus aus dem Körper beteiligt. Vor allem zytotoxische T-Zellen, die Fragmente des viralen NP-Proteins in Kombination mit MHC-I-Molekülen erkennen, sind für eine endgültige Elimination entscheidend. Unterstützt durch T-Helferzellen bilden B-Zellen im Verlauf der Infektion IgM-, IgA- und IgG-Antikörper. Der langanhaltende Schutz vor einer Reinfektion mit demselben Virussubtyp wird dabei durch die IgG- und vor allem IgA-Antikörper gegen das Hämagglutinin (HA) vermittelt. Antikörper gegen Neuraminidase (NA) können immerhin noch die Ausbreitung der Infektion im Organismus eingrenzen. Die ersten Zellen jedoch, die mit dem Influenza-Virus in Kontakt kommen, sind Makrophagen und NK-Zellen. Beide können durch eine Infektion aktiviert werden und über Zytokine wie Interferone, Chemokine und Interleukine andere Zellen des Immunsystems herbeirufen und ihrerseits aktivieren.

### **5.7.2. Wechselwirkungen zwischen Influenza A-Viren und Monozyten/Makrophagen**

Humane Monozyten und Makrophagen sind durch das Influenza A-Virus infizierbar. Obwohl eine kurzzeitige de novo-Proteinsynthese in den Zellen stattfindet, wird nicht einmal der erste Replikationszyklus des Virus vollendet, d.h. es werden nur geringe Mengen infektiöser Viren freigesetzt (Nain et al., 1990). Nach 24-48 Stunden sterben die infizierten Monozyten / Makrophagen durch Apoptose. Davor aber sind sie entscheidend an der Bildung einer zellspezifischen Immunantwort gegen das Virus beteiligt. So werden die Freisetzung von verschiedenen proinflammatorischen Zytokinen, deren verstärkte Transkription, Aktivierung und Translokation verschiedener Transkriptionsfaktoren sowie die selektive Synthese von Chemokinen beobachtet (Hofmann et al., 1997; Kaufmann et al., 2001). Weiterhin beeinträchtigt eine Infektion mit Influenza A verschiedene Effektormechanismen humaner Monozyten, u.a. die Phagozytosefähigkeit und die intrazelluläre Abtötung von *Candida albicans*, während die Zelladhäsion nicht beeinflusst wird (Gardner und Lawton, 1982).

Die Infektion humaner Monozyten mit A/PR/8 induziert neben anderen Zytokinen u.a.  $\text{IFN-}\alpha$  und aktiviert die Transkription der Gene  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$  und  $\text{IL-6}$ . Die Akkumulation der mRNA der zuletzt genannten drei Zytokine kann noch verstärkt werden durch Kostimulation der Zellen mit LPS und GM-CSF. Außerdem triggert die Kombination beider Stimuli eine effiziente Translation und Freisetzung der biologisch aktiven Proteine (Bender et al., 1993). In den letzten Jahren konzentrierten sich die meisten Studien über A/PR/8-bedingte Veränderungen der Zytokinexpression in Monozyten und Makrophagen auf  $\text{TNF-}\alpha$ . Übereinstimmungen zwischen klinischen Symptomen einer Influenza A-Infektion und Wirkungen von  $\text{TNF-}\alpha$  lassen eine Bedeutung dieses Proteins bei der viralen Infektion vermuten. Verschiedene Typen mononukleärer Phagozyten einschließlich der Monozyten antworten innerhalb von 3 bis 9 Stunden nach einer Influenza A-Infektion mit starker  $\text{TNF-}\alpha$  mRNA-Akkumulation, die aber von einer nur geringen  $\text{TNF-}\alpha$ -Produktion begleitet wird. Vermutlich aktiviert eine Infektion mit diesem Virus die Makrophagen erst bei Einwirkung von sekundären, triggernden Signalen

wie z.B. LPS zu einer starken TNF- $\alpha$ -Freisetzung (Gong et al., 1991; Sprenger et al., 1994). TNF- $\alpha$  und IFN- $\alpha$  wiederum sind in der Lage, die Zytokin- und Chemokinproduktion in infizierten Zellen zu verstärken (Veckman et al., 2006). Eine wichtige Rolle in der Antwort gegen Influenza A spielt auch die selektive Freisetzung von Chemokinen aus infizierten Monozyten. Zum einen werden homöostatische Chemokine sezerniert (Rangel-Moreno et al., 2007), zum anderen wird ausschließlich eine verstärkte Expression der auf mononukleäre Zellen wirkenden proinflammatorischen CC-Chemokine beobachtet, während die auf neutrophile Granulozyten wirkenden Chemokine CXCL1 und CXCL8 durch das Virus deutlich supprimiert werden (Sprenger et al., 1996b). Diese differenzierte Induktion könnte verantwortlich dafür sein, dass man im Influenza A-infizierten Lungengewebe überwiegend mononukleäre Leukozyten vorfindet. Schaltet man beispielsweise den Rezeptor für das Chemokin CCL2, so bleibt die frühe Einwanderung von mononukleären Zellen aus und damit auch die pathologischen Reaktionen wie z.B. die Freisetzung von Zytokinen (Dawson et al., 2000).

Insbesondere das Chemokin CCL3 spielt bei der Bekämpfung einer Virusinfektion eine wichtige Rolle wie Experimente mit Zytomegalievirus-infizierten Mäusen gezeigt haben (Salazar-Mather et al. 1998, Salazar-Mather et al. 2000). Die Induktion von CCL3 ist in diesem Modell der kritische Schritt zur Aktivierung von NK-Zellen und zur damit verbundenen Ausschüttung der protektiven Zytokine IFN- $\gamma$  und CXCL9 (Mig, *monokine induced by IFN- $\gamma$* ).

Bei einer Infektion mit dem virulenten Influenza A/H5N1-Stamm kommt es zu einer verstärkten Sekretion von Zytokinen und Chemokinen, die mit einer erhöhten Mortalität verbunden ist (Kobasa et al. 2007; de Jong 2006). Humane Monozyten/Makrophagen sind bei einer Infektion mit Influenza A-Viren auch in der Lage, CCL3 zu produzieren (Sprenger et al., 1996; Hofmann et al., 1997 und Bußfeld et al. 1996). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Virusclearance CCL3-defizienter Mäuse nach einer Influenza A-Infektion deutlich schlechter verläuft als bei Wildtyp-Mäusen (Cook et al., 1995). Darüber hinaus weisen Mäuse, die defizient für einen der CCL3-Rezeptoren (CCR5) sind, eine erhöhte Mortalität bei Influenza-Infektionen auf (Dawson et al., 2000).

## 6. Zielsetzung

Das immunhistologische Bild einer akuten Entzündungsreaktion ist charakterisiert durch die massive Einwanderung von immunregulatorischen Zellen, wie z.B. Monozyten, Lymphozyten und Granulozyten. Wie gezeigt werden konnte, ist für diese Immigration die Induktion von Chemokinen verantwortlich, die gezielt leukozytäre Zellen anlocken und aktivieren. Es konnte auch gezeigt werden, dass eine Reihe von Chemokinen durch eine direkte Influenza A-Infektion von humanen Monozyten/Makrophagen induziert werden können.

Die molekularen Mechanismen dieser Induktion sind jedoch nur teilweise erforscht. Es konnten Elemente im CCL3-Promotor identifiziert werden, die bei der Infektion von monozytären Zellen mit dem Influenza A-Virus bzw. einer Stimulation mit LPS für die Induktion von CCL3 eine wichtige Rolle spielen (Bußfeld, 1997). Durch sequentielle Deletionen des CCL3-Promotors wurde der Bereich von -776 bp bis zur Stelle -41 bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts näher analysiert. In dem Bereich von -123 bp bis -100 bp liegt eine regulatorische DNA-Sequenz, die sowohl für eine Stimulation mit LPS als auch für eine Infektion mit dem Influenza A-Virus eine essentielle Rolle für die Transkription von CCL3 spielt (Bußfeld, 1997).

Ausgehend von diesen Ergebnissen, war es das Ziel dieser Arbeit, weitere Erkenntnisse über die transkriptionelle Regulation der Genexpression bei Influenza A/PR/8-infizierten Zellen zu gewinnen. Insbesondere sollte dabei die Rolle des Promotorabschnittes -123 bis -100 und der dort liegenden *cis*-regulatorischen DNA-Sequenzen näher charakterisiert werden.

Für die Induktion von Chemokinen durch eine virale Infektion spielen die Faktoren der IRF-Familie eine wichtige Rolle, wie u.a. am Beispiel des Chemokins CCL5 gezeigt werden konnte (Lin et al., 1999; Genin et al., 2000). Insbesondere die Faktoren IRF-1 und IRF-7 sind wichtig für eine Aktivierung des Immunsystems bei viralen Infektionen. Deshalb soll auch untersucht werden, wie eine Influenza A-Infektion die Transkription und Expression dieser Transkriptionsfaktoren reguliert und so in die intrazellulären Signalwege der infizierten Zellen eingreift.

---

Durch eine Influenza A-Infektion können aber auch andere Zytokine wie z.B. IL-10 induziert werden (Sarawar und Doherty, 1994). Für IL-10 konnte gezeigt werden, dass es durch Infektion von Mäusen mit Influenza A-Viren induziert werden kann und einen positiven Einfluß auf den Krankheitsverlauf der Mäuse hat (Durbin et al., 2000). Deshalb sollte auch untersucht werden, ob eine Influenza-Infektion auch in der Lage ist, das erst kürzlich entdeckte Zytokin IL-24 zu induzieren, das zur Familie der IL-10-Zytokine gehört (Pestka et al., 2004) und eine Rolle in der Abwehr von Influenza-Viren spielen könnte.

## II. Material und Methoden

### 1. Zellen, Medien und Virusstamm

#### 1.1. Zellen

##### 1.1.1. Humane Monozyten

„Buffy coats“ (siehe 2.1.) gesunder Blutspender wurden vom Zentrum für Transfusionsmedizin der Philipps-Universität Marburg bezogen. Aus diesem Blut erfolgte die Präparation und Isolation humaner Monozyten.

##### 1.1.2. Mono Mac 6-Zellen

Mono Mac 6-Zellen wurden 1985 aus dem Blut eines 64-jährigen Patienten mit einer akuten myeloischen Leukämie (AML FAB M5) isoliert (Ziegler-Heitbrock et al., 1988). Die Zellen ähneln morphologisch Monoblasten bzw. Monozyten und exprimieren eine Vielzahl von charakteristischen Oberflächenmarkern reifer Monozyten. Die Zellen sind in der Lage, reaktive Sauerstoff-Metabolite zu bilden und mit Antikörpern opsonisierte Erythrozyten zu phagozytieren.

#### 1.2. Medien

Soweit nicht besonders vermerkt, wurde in allen Versuchen das Zellkulturmedium RPMI 1640 verwendet, welches mit verschiedenen Zusätzen angereichert wurde. Für die primären Monozyten wurde folgendes Medium verwendet:

##### RPMI<sup>SUP</sup>:

RPMI 1640 (ohne L-Glutamin)	Linaris, Wertheim
L-Glutamin 200 mM (100x)	Biochrom, Berlin
Natriumpyruvat 100 mM (100x)	Biochrom, Berlin
HEPES-Pufferlösung 500 mM (100x)	Biochrom, Berlin
Penicillin (10000 U/mL)/Streptomycin (10000 mg/mL) (100x)	Biochrom, Berlin
nichtessentielle Aminosäuren (100x)	Biochrom, Berlin

humanes AB-Serum (2 %-5 % v/v) Sigma, München

Mono Mac 6-Zellen wurden mit folgendem Medium kultiviert:

RPMI<sup>OPI</sup>:

RPMI 1640 (ohne L-Glutamin)	Linaris, Wertheim
L-Glutamin 200 mM (100x)	Biochrom, Berlin
Oxalacetat-Pyruvat-Insulin (OPI) 500 mM (100x)	Sigma, München
HEPES-Pufferlösung 500 mM (100x)	Biochrom, Berlin
Penicillin (10000 U/mL)/Streptomycin (10000 mg/mL) (100x)	Biochrom, Berlin
nichtessentielle Aminosäuren (100x)	Biochrom, Berlin
foetales Kälberserum (FCS) (10% v/v)	Biochrom, Berlin

### 1.3. Viren

Das verwendete Influenza A Virus Puerto Rico aus der achten Isolierung (A/PR/8) wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. H.-D. Klenk, Institut für Virologie der Philipps-Universität Marburg, zur Verfügung gestellt. Wegen der vielen Passagen kann das ursprünglich 1934 isolierte Virus als adaptiert bezeichnet werden.

### 1.4. Pufferlösungen

PBS <sup>def</sup> : ohne Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> -Ionen	Biochrom, Berlin
PBS <sup>plus</sup> : mit Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> -Ionen	Biochrom, Berlin

10x TBE-Puffer:

890 mM Tris-Base	Roth, Karlsruhe
890 mM Borsäure	Roth, Karlsruhe
20 mM EDTA	Merck, Darmstadt
auf 1L H <sub>2</sub> O	

10x Maleinsäurepuffer:

200 mM Maleinsäure Roth, Karlsruhe  
300 mM NaCl Merck, Darmstadt  
mit NaOH auf pH 7.5 Merck, Darmstadt  
auf 2L H<sub>2</sub>O

10 % Protein-Blockpuffer:

10 % w/v Blocking reagent Roche, Mannheim  
auf 1L 1x Maleinsäurepuffer

Reaktionspuffer:

100 mM NaCl Merck, Darmstadt  
10 mM MgCl<sub>2</sub> Roth, Karlsruhe  
5 mM Tris-HCl Serva, Heidelberg  
100 mM Tris-Base Roth, Karlsruhe  
auf 1L H<sub>2</sub>O

TAE-Puffer:

40 mM Tris-Acetat Serva, Heidelberg  
1 mM EDTA Merck, Darmstadt  
20 mM Essigsäure (Eisessig) Merck, Darmstadt  
auf 1L H<sub>2</sub>O

Ethidiumbromid-Lösung:

50 µL Ethidiumbromid (0,2 % v/v) Sigma, München  
auf 100 mL H<sub>2</sub>O

DNA-Probenpuffer (6x):

0,25 % w/v Bromphenolblau Merck, Darmstadt  
0,25 % w/v Xylencarol Merck, Darmstadt  
gelöst in 30 % w/v Glycerol ICN, Eschwege

### 1.5. Standardbedingungen der Zellkultur

Die Zellkulturen wurden als offenes System in auf 37°C temperierten Brutschränken (CO<sub>2</sub>-Auto-Zero, Fa. Heraeus, Hanau) bei 95 % Luftfeuchtigkeit und einer 5 % CO<sub>2</sub>-haltigen Atmosphäre inkubiert. Alle Zellkulturarbeiten wurden in einer Sterilbank (LaminAir, HLB 2448, Heraeus, Hanau, Deutschland) durchgeführt. Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Zentrifugationsschritte in einer Tischzentrifuge (Hettich-Rotanta RP, Hettich, Tuttlingen, Deutschland) ausgeführt.

#### 1.5.1. Überprüfung der Zellkulturen auf Mykoplasmen

Kontaminationen von Zellkulturen mit Mykoplasmen können zu einer Aktivierung und damit zu einer Mediatorfreisetzung aus den Zellen führen. Deshalb wurden alle verwendeten Zellkulturen auf mögliche Mykoplasmenkontaminationen untersucht.

Zum Nachweis wurde der *Mycoplasma Detection Kit* (Boehringer Mannheim) verwendet. Dieser Kit basiert auf einem sog. Sandwich-ELISA-System und weist kolorimetrisch Mykoplasmenbestandteile nach. Die Auswertung erfolgte über ein Plattenphotometer (MR 7000; Dynatech, Denkendorf). Die Durchführung des Tests erfolgte gemäß dem Protokoll der Herstellerfirma.

#### 1.5.2. Einfrieren und Auftauen der Zellkultur

Zum Einfrieren wurden die Mono Mac 6-Zellen in reinem FCS aufgenommen und auf 10 Millionen Zellen/mL eingestellt. Dann wurde nochmals dasselbe Volumen FCS mit 20 % DMSO (Merck, Darmstadt) zupipettiert, und als Einheit 500 µL (entsprechen 2,5 Millionen Zellen) eingefroren. Die Zellen wurden in speziellen Röhrchen (Biofreeze vial, Costar, Bodenheim) erst eine Stunde bei 4°C gekühlt, dann ca. 1 Tag bei -80°C eingefroren und schließlich in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zum Auftauen wurden je 2,5 Millionen Zellen in ein FALCON-Röhrchen (BD, Heidelberg) mit 12 mL RPMi<sup>OPi</sup> gegeben und zentrifugiert (800 rpm (*rounds per minute*), 4°C, 10 min). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 4

mL frischem Medium mit 20 % FCS aufgenommen und auf 2 Vertiefungen einer 24-well Zellkulturplatte (Costar, Bodenheim) verteilt. Nach einem Tag wurden alle Zellen in eine Zellkulturflasche (Bodenfläche: 25 cm<sup>2</sup>, Costar, Bodenheim) RPMi<sup>OPI</sup> mit 10 % FCS umgesetzt und je nach Versuchsanordnung kultiviert.

## 2. Methoden

### 2.1. Isolierung und Anreicherung humaner Monozyten

Für die Isolierung von Blutmonozyten wurden frische „*buffy coat*“-Präparationen aus peripherem Venenblut gesunder Blutspender aus der Abteilung für Transfusionsmedizin im Klinikum der Philipps-Universität Marburg verwendet. „*Buffy coats*“ entstehen bei der Separation bestimmter Blutzellen (zum Beispiel bei der Herstellung von Erythrozytenkonzentraten) und enthalten neben den Granulozyten auch hochangereichert periphere, mononukleäre Blutzellen (PBMC „*peripheral blood mononuclear cells*“). Die Präparation der PBMC-Fraktion erfolgte nach der Ficoll-Hypaque-Methode, durch die aufgrund von Dichteunterschieden mononukleäre Zellen von anderen Blutzellen getrennt werden (Boyum, 1968). Die PBMC-Fraktion enthält neben Monozyten auch B- und T-Lymphozyten sowie NK-Zellen. Die weitere Aufreinigung der Monozyten erfolgte unter Verwendung der *Counter flow*-Zentrifugation (Elutriation).

Die Aufarbeitung der „*Buffy coats*“ erfolgte in 50 mL Zentrifugationsröhrchen (Greiner, Nürtingen). 13 mL vorgelegtes, 25°C warmes Ficoll (Ficoll-Trennlösung, Dichte 1,077 g/mL; Biochrom, Berlin) wurden vorsichtig mit „*buffy*“-Vollblut überschichtet (Endvolumen ca. 50 mL) und mit 2000 rpm bei Raumtemperatur für 30 min zentrifugiert. Danach hatten sich die Erythrozyten und Granulozyten als Sediment abgesetzt, die mononukleären Zellen in einer Interphase oberhalb des Ficolls angereichert, und die Thrombozyten in dem darüber liegenden Serum ankonzentriert. Um die Ficoll-Lösung sowie restliche Erythrozyten und Thrombozyten zu entfernen, wurde nach Abnahme der oberen Phase die Interphase sorgfältig abpipettiert und mit 4°C kaltem PBS<sup>def</sup> auf 50 mL aufgefüllt. Zur Durchführung der Waschschrte wurden zwei

Zentrifugationen bei 4°C mit 1400 rpm für 7 min durchgeführt. Das Sediment wurde jeweils mit 4°C kaltem PBS<sup>def</sup> vorsichtig resuspendiert, um eine Voraktivierung zu vermeiden, und auf 50 mL mit 4°C kaltem PBS<sup>def</sup> aufgefüllt. Für die anschließende Aufreinigung der Monozyten durch die Elutriationsmethode wurde die PBMC-Fraktion nach der letzten Zentrifugation in insgesamt 30 mL PBS<sup>def</sup> aufgenommen und direkt im Anschluß elutriert (siehe 2.2.).

## **2.2. Elutriation („Counter flow-Zentrifugation“)**

Die Elutriation bietet die Möglichkeit, Zellen aufgrund ihrer Größe und Dichte zu trennen. Dies wird möglich durch die Erzeugung zweier entgegengesetzt wirkender Kräfte. Durch die Rotation der Zentrifuge wird eine Sedimentationskraft hervorgerufen (Zentrifugalkraft), auf die ein von einer Pumpe erzeugter, kontinuierlicher Flüssigkeitsstrom in entgegengesetzter Richtung entgegenwirkt (Zentripetalkraft).

Jede Zelle in der Separationskammer wird in eine Zone wandern, in der ein Gleichgewicht zwischen ihrer Sedimentationsrate und der durch die Fließgeschwindigkeit des Elutriationsmediums erzeugten Zentripetalkraft herrscht. Innerhalb der Separationskammer wird durch ihre spezielle Geometrie ein Fließgeschwindigkeitsgradient erzeugt. Hierdurch wird es möglich, Zellen mit verschiedenen Sedimentationsraten in Suspension zu halten. Durch die schrittweise Erhöhung der Flüssigkeitsrate und der dadurch hervorgerufenen Erhöhung der Fließgeschwindigkeit des Elutriationsmediums oder durch die Verringerung der Rotordrehzahl können nach und nach relativ homogene Zellpopulationen aus der Kammer ausgespült werden. Jede folgende Separation besteht aus größeren Zellen als die vorhergehende Fraktion (Figdor et al., 1983).

Zwischen Flüssigkeitsrate und Rotordrehzahl besteht folgender Zusammenhang (Beckman, *Instruction Manual*):

$$F = X \times D^2 / (\text{rpm} \times 10^{-3})^2$$

F = Flüssigkeitsrate in mL/min

X = spezifischer Kammerfaktor: 0,0511

D = Zelldurchmesser in  $\mu\text{m}$

rpm = Rotorumdrehungen pro min

Bei Verwendung einer konstanten Rotordrehzahl wird es mit Hilfe dieser Formel möglich, die Größe der Zellen zu berechnen, die bei einer bestimmten Fließgeschwindigkeit des Elutriationsmediums aus der Kammer ausgespült werden.

Für die Elutriationsversuche wurde das JE-6B Elutriationssystem mit dazugehörigem Rotor und der Standardseparationskammer verwendet (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA). Die Standardkammer besitzt ein Volumen von 4,2 mL.

Die Durchführung der Elutriation erfolgte bei einer konstanten Rotorgeschwindigkeit von 3000 rpm und 4°C. Zum Separieren der Zellen wurde die Fließgeschwindigkeit des Elutriationsmediums schrittweise erhöht. Als Elutriationsmedium wurde PBS<sup>def</sup> mit 0,1 % AB-Serum (Sigma, München) und 0.01 % EDTA (Merck, Darmstadt) verwendet. Pro Elutriationsschritt wurden 300-500 x 10<sup>6</sup> PBMCs eingesetzt (Kaufmann, 1998).

Für die Aufreinigung der Monozyten wurde die aus „*buffy coats*“ durch Dichtegradientenzentrifugation gewonnene PBMC-Fraktion (siehe 2.1.) mit einer Pumpleistung von 7 mL/min in die Separationskammer eingezogen. Im Anschluß wurde bei 15 mL/min für 5 min gespült, um Thrombozyten und Erythrozyten zu entfernen. Durch die weitere schrittweise Erhöhung der Fließgeschwindigkeit bis zu einer Pumpleistung von 28,5 mL/min wurden die in der PBMC-Fraktion enthaltenen Lymphozyten und NK-Zellen fast vollständig ausgewaschen. Nach der Erhöhung der Pumpleistung auf 36 mL/min wurde die Monozytenfraktion in zwei 50 mL Zentrifugationsröhrchen aufgenommen. Die Zellen wurden anschließend durch einen weiteren Zentrifugationsschritt bei 1400 rpm und 4°C für 7 min pelletiert und das Pellet in 10 mL RPMI<sup>sup</sup> resuspendiert.

### 2.3. Zellzahlbestimmung

Im nächsten Schritt wurde mit Hilfe der CASY1-Apparatur (Model TT, Schärfe System, Reutlingen) die Zellzahl bestimmt. Durch die sogenannte Pulsflächenanalyse, einer Abwandlung des Widerstandsmessprinzips, wurde auf Einzelzellebene die Zellgröße ermittelt. Dabei verdrängt jede Zelle beim Durchfluß durch die Meßkapillare eine bestimmte Menge einer geeichten Elektrolytlösung. Die dadurch entstehende Widerstandserhöhung ist ein Maß für das Volumen der Zelle bzw. die Anzahl der Zellen. Das Gerät wurde auf eine spezielle Standardroutine programmiert, die neben verschiedenen Umrechnungsfaktoren auch eine Mindestgröße detektierbarer Zellen festlegt. Die Apparatur wurde zweimal mit PBS<sup>def</sup> equilibriert. Anschließend wurden in speziellen Meßküvetten 10 mL PBS<sup>def</sup> vorgelegt und aus den 10 mL Zellsuspension (siehe 2.2.) 20 µL zupipettiert (1:500 Verdünnung). In 3 Messungen wurde die Zellzahl und die durchschnittliche Zellgröße ermittelt. Anhand dieser Werte wurde es möglich, die Menge an Monozyten in der Zellsuspension zu ermitteln und mit Hilfe von Größenlimits einen Reinheitsgrad zu bestimmen.

### 2.4. Kultivierung und Infektion der Zellen

#### 2.4.1 Kultivierung humaner Monozyten

Für die Kultivierung der Zellen in Teflongefäßen zur Proteingewinnung wurde die elutrierte Monozytenfraktion auf eine Zellzahl von  $2,5 \times 10^6/\text{mL}$  in RPMI<sup>sup</sup> (s. 1.1.) eingestellt. 2 mL dieser Suspension (=  $5 \times 10^6$  Monozyten) wurden pro Gefäß (Teflongefäße mit 15 ml Inhalt und rundem Innenboden, Savillex Corp., Minnetonka, MN, USA) pipettiert und nach Zugabe von 5 % AB-Serum unter Standardbedingungen bei 37°C inkubiert. Durch die Verwendung der Teflongefäße wurde eine Adhärenz der Monozyten vermieden.

Für die Kultivierung adhärenter Zellen zur Gewinnung der RNA wurde die elutrierte Monozytenfraktion auf eine Zellzahl von  $1,5 \times 10^6/\text{mL}$  in RPMI<sup>sup</sup> eingestellt. 3 mL dieser Suspension (=  $4,5 \times 10^6$  Monozyten) wurden in jede Vertiefung (FALCON primaria 6-well Platten, BD) pipettiert und nach Zugabe von 5 % AB-Serum unter Standardbedingungen bei 37°C für eine Stunde

inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit waren die Zellen adhärent und das Medium konnte abgesaugt werden. Es folgte ein Waschschrift mit 37°C warmen PBS<sup>plus</sup>. Anschließend wurden 4 mL neues Medium mit 2 % AB-Serum hinzugegeben und die Zellen bis zu ihrer weiteren Verwendung unter Standardbedingungen kultiviert.

#### **2.4.2. Stimulation der humanen Monozyten mit LPS**

Die Stimulation der humanen Monozyten wurde direkt im Kulturgefäß durchgeführt. Nach einer Ruhephase von 1 Stunde erfolgte die LPS-Stimulation. Es wurden 10 ng/mL LPS (von E. coli 0127, B8W, Difco, Detroit, MI, USA) verwendet, welches vorher mittels Ultraschall (Elma, Transsonic Digital, T480/H-2, Fremont, CA, USA) bei höchster Stufe für 3 min behandelt wurde. Nach Zusatz des LPS wurde das Kulturgefäß leicht geschwenkt, um ein gleichmäßiges Verteilen des LPS zu gewährleisten.

#### **2.4.3. Infektion humaner Monozyten mit Influenza A/PR/8**

Die humanen Monozyten wurden für eine A/PR/8-Infektion zunächst für 1 h in den Teflongefäßen oder Zellkultur-Platten ohne AB-Serum kultiviert. Anschließend erfolgte die Infektion mit 2 MOI (*multiplicity of infection*) Influenza A/PR/8. Die Virusadsorption erfolgte über einen Zeitraum von 45 Minuten bei 37°C unter Standardbedingungen (Bussfeld 1997). Nach Zugabe von 2 % AB-Serum erfolgte die weitere Kultivierung der Zellen über einen Zeitraum von bis zu 10 Stunden.

#### **2.4.4. Kultivierung von Mono Mac 6-Zellen**

Die Zellen der Zelllinie Mono Mac 6 wurden wie unter Punkt 1.5.2. angegeben aufgetaut und dann in Zellkulturflaschen (Bodenfläche: 25 cm<sup>2</sup> bis 75 cm<sup>2</sup> Fläche, Costar, Bodenheim) unter Standardbedingungen kultiviert. Als Medium wurde RPMI<sup>OPI</sup> unter Zusatz von 10 % FCS verwendet. Nach ca. 24 bis 36 h wurden die Zellen je nach Bedarf 1:3 bis 1:5 passagiert und in neue

Flaschen umgesetzt. Die Zellkulturflaschen wurden dann mit neuem Medium aufgefüllt.

#### **2.4.5. Stimulation von Mono Mac 6-Zellen mit LPS**

Die Stimulation von Mono Mac 6-Zellen erfolgte mit 100 ng/mL LPS unter denselben Bedingungen wie die Stimulation humaner Monozyten.

#### **2.4.6. Infektion von Mono Mac 6-Zellen mit Influenza A/PR/8**

Auch die Infektion von Mono Mac 6-Zellen erfolgte direkt im Kulturgefäß. Die Zellen wurden in ihrem Medium (RPMI 1640 mit 10 % FCS) belassen und mit 5 MOI aktivem Virus infiziert. Bis zum Ende der entsprechenden Inkubationszeit wurden sie unter Standardbedingungen kultiviert (s. 2.4.2.).

### **2.5. Proteinbestimmung**

Die Proteinbestimmung wurde mittels eines Assays der Firma Bio-Rad Laboratories GmbH (München) durchgeführt. Dieser Assay basiert auf der Methode von Bradford (Bradford, 1976), der die Verschiebung des Absorptionsmaximums von Coomassie Brilliant Blau G-250 durch eine Bindung an Protein zugrunde liegt (465 nm -> 595 nm). Zu 10 µL der zu messenden Protein-Lösung wurden 200 µL des zuvor 1:5 mit H<sub>2</sub>O verdünnten Messreagenz hinzugegeben und die Absorption der Proben gegen eine Standard-Reihe bei 570 nm in einem Plattenphotometer (MR 7000; Dynatech, Denkendorf) gemessen.

### **2.6. Molekularbiologische Techniken**

#### **2.6.1. RNA-Präparation**

Ein prinzipielles Problem bei der Isolierung von RNA ist die Tatsache, dass die in Form eines Einzelstrangs vorliegende RNA anfällig gegenüber abbauenden Enzymen (RNasen) ist. Daher ist bei allen Versuchsschritten, als Schutz vor

RNasen, auf Eis zu arbeiten, RNase-freies Wasser zu benutzen und Sorge zu tragen, daß keine exogenen RNase-Kontaminationen, beispielsweise durch unzureichend sterilisierte Gefäße oder Pipettenspitzen, möglich sind.

Für die RNA-Präparation wurden die Zellen in 6 cm Gewebekulturschalen (FALCON-Primaria) mit einer Zellzahl von  $10 \times 10^6$  Zellen pro Ansatz kultiviert. Die Stimulation bzw. Infektion der Zellen erfolgte wie unter 2.4. beschrieben. Im Anschluß an die entsprechende Inkubationszeit wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Monozyten einmal mit PBS<sup>plus</sup> gewaschen. Die Zellen jeder Petrischale wurden mit 1 mL Trizol-Reagenz versetzt und bis zur weiteren Bearbeitung bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert. Das Zellysate wurde mit Hilfe von sterilen Gummischabern aus den Gewebekulturschalen abgelöst und zum Scheren der DNA 6-8 mal durch eine Kanüle (24 G) aufgezogen und in 1,5 mL Eppendorfgefäße überführt.

Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei Raumtemperatur wurden 200  $\mu\text{L}$  Chloroform zugegeben und die Suspension gut geschüttelt. Nach weiteren 10 min Inkubationszeit folgte eine Zentrifugation bei 14000 rpm und  $4^\circ\text{C}$  für 15 min (Biofuge 17 R/S; Heraeus sepatech, Osterode). Dadurch wurde eine Phasentrennung erreicht. Die oberste, wässrige Phase enthielt die RNA. Diese oberste Phase wurde vorsichtig abgenommen und die RNA durch Zugabe der gleichen Menge Isopropanol und einer Inkubation bei  $-20^\circ\text{C}$  über Nacht gefällt. Das bei der anschließenden Zentrifugation (1 h, 10000 rpm,  $4^\circ\text{C}$ ) entstandene Pellet wurde 3 x mit 70 % Ethanol gewaschen, um Salze weitgehend zu entfernen und dann unter Vakuum getrocknet.

Daraufhin wurde das RNA-Pellet in 30  $\mu\text{L}$  RNase-freiem Wasser aufgenommen und die RNA-Menge bestimmt. Dazu wurden die Proben (je 1  $\mu\text{L}$ ) mit 749  $\mu\text{L}$  A. dest. verdünnt und die optische Dichte bei 260 nm bestimmt (Gilford Response II<sup>TM</sup> UV-Vis Spectrophotometer). Die optische Dichte einer Lösung für Licht der Wellenlänge 260 nm ( $\text{OD}_{260}$ ) ist der RNA-Konzentration direkt proportional. Die Konzentration (C) der in der Probe enthaltenen RNA wurde durch folgende Formel berechnet:

$$C (\mu\text{g/mL}) = \text{OD}_{260} \times U \times V$$

U = Umrechnungsfaktor (40 für RNA)

V = Verdünnungsfaktor (750)

Nachdem die erhaltenen RNA-Lösungen auf 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  eingestellt worden waren, wurden sie bei  $-70^\circ\text{C}$  aufbewahrt. Zur qualitativen Kontrolle wurde ein Teil der gewonnenen RNA in einem 1 %igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Hilfe der Ethidiumbromidfärbung detektiert.

### 2.6.2. cDNA-Synthese

Das Enzym *Reverse Transkriptase* kann RNA in DNA umschreiben, Oligo-dT wurden dabei als Primer eingesetzt. Zur cDNA-Synthese wurden 2  $\mu\text{g}$  der isolierten RNA in 12  $\mu\text{L}$  A. dest. aufgenommen und zusammen mit 1  $\mu\text{L}$  Oligo-dT19-24 (Amersham, Freiburg) für 10 min bei  $70^\circ\text{C}$  erhitzt. Sekundär- und Tertiärstrukturen der RNA werden dabei gelöst. Die Oligo-dT-Primer können sich an die Poly-A-Region der mRNA anlagern. Die Proben wurden danach sofort auf Eis gelagert, mit 4  $\mu\text{L}$  Reaktionspuffer (5x; Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe), 2  $\mu\text{L}$  0,1M DTT (Gibco), 1  $\mu\text{L}$  10 mM dNTP-Mix (Promega, Mannheim) und 1  $\mu\text{L}$  SuperScript<sup>TM</sup> (Gibco) vermischt und anschließend 1 h bei  $42^\circ\text{C}$  inkubiert. In dieser Zeit wird der cDNA-Strang synthetisiert. Die Reverse Transkriptase wurde anschließend durch eine 10minütige Inkubation der Proben bei  $70^\circ\text{C}$  denaturiert.

### 2.6.3. Amplifizierung der cDNA durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR (*polymerase chain reaction*) stellt ein *in vitro*-Verfahren zur selektiven Amplifizierung spezifischer DNA-Sequenzen aus einem Gemisch von Nukleinsäuren dar. Man nutzt die Fähigkeit von DNA-Polymerasen, einen Einzelstrang zum Doppelstrang ergänzen zu können, wenn ihnen ein kurzer, doppelsträngiger Bereich zur Verfügung steht. Ähnlich wie bei der natürlichen

Verdopplung der DNA werden bei der PCR-Methode die beiden DNA-Stränge geteilt und dupliziert.

Um ein DNA-Segment (oder RNA nach reverser Transkription in eine cDNA) zu vervielfältigen, synthetisiert man zunächst zwei Oligonukleotide (Primer), die jeweils komplementär zu einem der beiden 3'-Einzelsträngenden des zu amplifizierenden doppelsträngigen Segmentes sind. Primer 1 als *sense* Primer wird vom 5'-Ende in Richtung 3'-Ende des ersten Stranges abgeleitet und Primer 2 entsprechend als *antisense* Primer vom 5'-Ende in Richtung 3'-Ende des Gegenstranges. Durch die Anlagerung der Primer an die komplementäre Sequenz eines Einzelstranges entsteht somit ein kurzes Stück doppelsträngige DNA, welches von der DNA-Polymerase benötigt wird, um die Synthese zu beginnen.

Heute wird hauptsächlich die Taq-DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* verwendet, einem Bakterium, das natürlicherweise in heißen Quellen und Geysiren bei einer Temperatur von 75°C vorkommt. Diese Taq-Polymerase besitzt ein Temperaturoptimum von 70°C und ist auch für kurze Zeit bei 95°C stabil.

Das Prinzip der PCR ist in Abbildung 1 dargestellt, jeder einzelne Zyklus der PCR lässt sich in drei Schritte gliedern:

1. Denaturierung (*denaturation*):

Zu Beginn eines jeden Zyklus wird die doppelsträngige DNA durch Erhitzen auf 95°C wie ein Reißverschluss in ihre beiden Einzelstränge aufgetrennt.

2. *Annealing*/Hybridisierung der Primer:

In diesem Schritt hybridisieren die im Überschuss vorhandenen Primer spezifisch mit den komplementären DNA-Sequenzen. Nach Anlagerung der Primer entstehen zwei kurze Abschnitte doppelsträngiger DNA, die im dritten Schritt als Startblöcke für das Enzym Taq-Polymerase dienen. Die *Annealing*-Temperatur hängt von der Länge und Basenfolge der Primer ab.

3. *Extension*/Polymerisation zum Doppelstrang:

Die hybridisierte Mischung wird bei der optimalen Temperatur der Polymerase (72°C) inkubiert, so dass die stromabwärts der Primer gelegenen DNA-Abschnitte selektiv synthetisiert werden.

Die Dauer der einzelnen Schritte ist abhängig von den zu amplifizierenden Sequenzen. Die Annealing-Temperatur bestimmt entscheidend über die Spezifität der PCR und variiert in Abhängigkeit von den Schmelztemperaturen ( $T_m$ ) der Oligonukleotide. In der Praxis verdoppelt sich die gewünschte Sequenz nach jedem Zyklus, bis die Menge so groß wird, dass die Polymerase in einem Reaktionszyklus nicht mehr alle Primer verlängern kann, von diesem Zeitpunkt an wächst die Menge der zu vermehrenden DNA nicht mehr exponentiell, sondern nur noch linear.

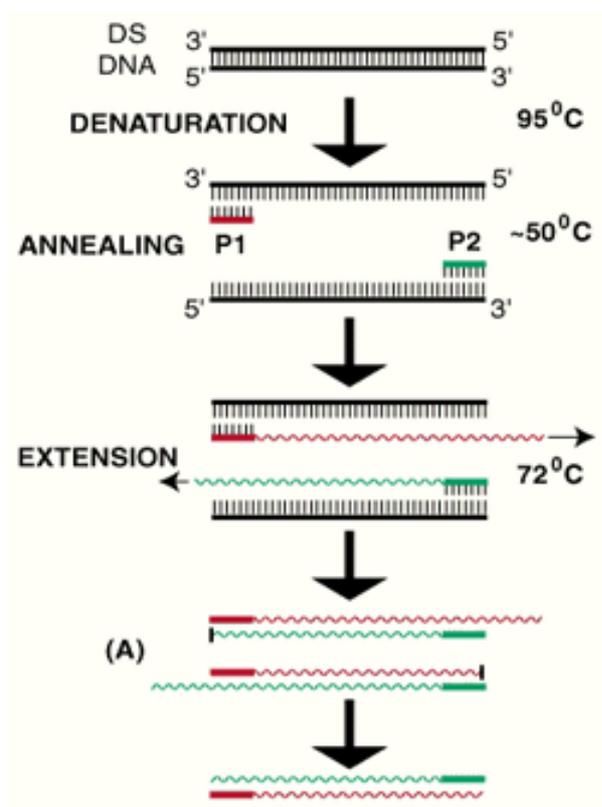
Die DNA-Menge kann theoretisch mit folgender Formel beschrieben werden:

$$N = N_0 \times 2^n$$

$N$  = Zahl der amplifizierten DNA-Moleküle

$N_0$  = anfängliche Zahl der DNA-Moleküle

$n$  = Zahl der Zyklen



**Abbildung 6: Schematische Darstellung des PCR-Zyklus.**

Schmelzen (*denaturation*) bei 95°C. Anlagerung (*annealing*) (Temperatur abhängig von Primerlänge und -sequenz; P1, P2 = Primer). Verlängerung (*extension*) bei 72°C (A) Der erste Zyklus ist komplett. Die beiden erzeugten DNA-Stränge werden zum Ausgangsmaterial für den nächsten Zyklus, wodurch sich die Menge an DNA bei jedem Zyklus verdoppelt.

**2.6.3.1. Auswahl der Primer**

Die DNA-Sequenzen der jeweiligen Gene wurden der *Nucleotide*-Datenbank von PUBMED entnommen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Pubmed/Entrez>):

IRF-1<sup>a)</sup>:

sense-Primer: 5'- ACA GAT GAG GAT GAG GAA GGG AA -3'

antisense-Primer: 5'- GGC CCT GCT ACG GTG CAC AGG GA -3'

IRF-7<sup>b)</sup>:

sense-Primer: 5'- TGC AAG GTG TAC TGG GAG -3'

antisense-Primer: 5'- CTG CTC CAG CTC CAT AAG GAA GCA -3'

IL-24<sup>c)</sup>:

sense-Primer: 5'- AAC TGT GGG AAG CCT TCT GG -3'

antisense-Primer: 5'- TGG CCA GAG TGG AGA ATG AC -3'

GAPDH<sup>d)</sup>:

sense-Primer: 5'- CGT CTT CAC CAC CAT GGA GA -3'

antisense-Primer: 5'- GCT ATA CCA GGA AAT GAG CTT-3'

<sup>a)</sup>Lu et al., 2001 <sup>b)</sup>Yeo et al., 2000 <sup>c,d)</sup>Garn et al., 2002

Für die durchgeführten PCR-Reaktionen wurden folgende Bedingungen gewählt :

**Tabelle 4: Reaktionsbedingungen zur Amplifikation der verschiedenen cDNAs.**

Gen	<i>annealing</i> - Temperatur	Fragmentlänge	Zyklen
IRF-1	60°C	313 bp	27
IRF-7	64°C	383 bp	31
IL-24	58°C	222 bp	35
GAPDH	62°C	300 bp	25

Die o.g. Oligonukleotide (*Primer*) wurden von MWG-Biotech GmbH, Ebersberg synthetisiert. Die Primer wurden in einer Konzentration von 50 pM in der jeweiligen PCR-Reaktion eingesetzt.

### 2.6.3.2. Amplifizierungsreaktion

Die PCR-Reaktion wurde in 500 µL Eppendorfgefäßen durchgeführt. Zu 1 µL der, wie unter 2.6.2. hergestellten cDNA wurden je 25 µL HotStarTaq Master Mix (Qiagen, Hilden) und jeweils 1 µL sense- und antisense Primer (50 pM) zugesetzt und auf ein Endvolumen von 30 µL mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Die Reaktion wurde in einem Eppendorf Cyclyer *gradient* unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

15 min	95°C	} Aktivierung der HotStarTaq-Polymerase	} n Zyklen
5 min	85°C		
1 min	94°C		
1 min	Primer-spezifische Temperatur	}	
1 min	72°C		

Zum Ergänzen von unvollständigen DNA-Doppelsträngen wurde abschließend ein Polymerisationsschritt (7 min bei 72°C) angefügt. Die Anzahl der Amplifizierungszyklen wurde je nach der zu erwartenden PCR-Produktmenge variiert.

### 2.6.3.3 Elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte

Die PCR-Fragmente wurden in 1%-Agarose-Gelen (Agarose 15510-027, Gibco, Life Technologies GmbH, Karlsruhe) elektrophoretisch aufgetrennt (horizontal system for submerged electrophoresis, BRL, USA). Als Laufpuffer wurde TAE-Puffer eingesetzt. 10 µL des jeweiligen PCR-Produkts wurden mit 2 µL 6x DNA-Ladepuffer versetzt und 10 µL davon in die Geltasche aufgetragen. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte bei 7 V/cm Elektrodenabstand. Das Gel wurde anschließend für 20 min in Ethidiumbromidlösung (s. 1.4) gefärbt und die Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht. Die Detektion der DNA-Banden erfolgte mit einem computergestützten Aufnahmesystem (Vilber Lourmat; Fröbel Labortechnik, Wasserburg).

## 2.7. Allgemeines zur Analyse der transkriptionellen Regulation von Genen

Zur Analyse der Transkriptionsregulation eines Gens sind verschiedene Methoden bekannt. Eine der am häufigsten verwendeten Methoden ist der sogenannte *reporter gene assay* (Alam et al., 1990; Schenborn und Groskreutz, 1999). Bei den Reporter genen handelt es sich um „fremde“, d.h. natürlicherweise nicht in der Zelle vorhandene Gene, die in einem Vektor unter die Kontrolle des zu untersuchenden Promotors gebracht werden. Mit diesem Vektor transfiziert man Zellen und untersucht die Aktivität des Reporter gens unter den jeweiligen Versuchsbedingungen. Als Reporter gene verwendet man vor allem Gene, die leicht nachweisbare Enzyme kodieren, wie Chloramphenicol-Acetyl-Transferase (CAT) oder Luciferase aus Glühwürmchen (*Photinus pyralis*, *firefly*).

Folgende Überlegungen sind bei der Auswahl von Reporter genen von Bedeutung (nach Neurath et al., 1997):

- Die Enzymaktivität, die von Reporter genen kodiert wird, muss sich eindeutig von allen anderen intrinsischen Aktivitäten einer Säugerzelle unterscheiden lassen.
- Es sollte zu keiner Wechselwirkung mit oder Beeinflussung durch andere

Zellaktivitäten kommen.

- Der Nachweis der kodierten Enzymaktivität sollte schnell, einfach, sensitiv und reproduzierbar durchzuführen sein.
- Zudem ist es von Vorteil, wenn das Reportergen von einem möglichst kleinen Vektor, beispielsweise von einer bakteriellen Plasmid-DNA exprimierbar ist.

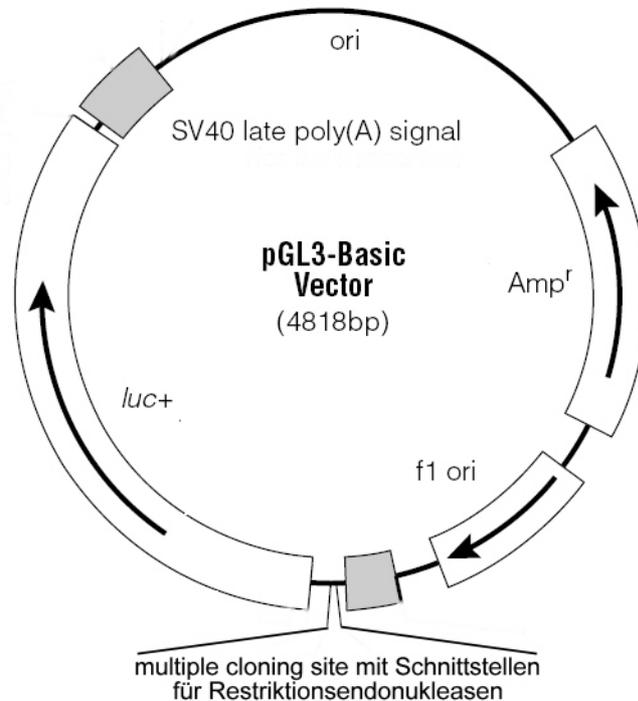
Besonders gut erfüllt werden die gestellten Anforderungen von dem Gen für die Glühwürmchen-Luciferase (de Wet et al., 1987). Von allen bekannten Chemolumineszenz-Reaktionen ist die Lichtproduktion durch die Luciferase die stärkste (Botchan et al., 1980). Außerdem ist die Luciferase ein Protein, das für seine enzymatische Aktivität keine posttranslationale Prozessierung benötigt und daher als genetischer Reporter direkt nach der Translation benutzt werden kann (Hamer et al., 1979; Kato et al., 1986).

Der Promotor, dessen Funktionalität untersucht werden soll, wird dabei vor das Reportergen kloniert und dieses so unter die Kontrolle des Promotors und der daran bindenden Transkriptionsfaktoren gebracht. Durch gezielte Deletionen bzw. Mutationen des Promotors und Messung der damit verbundenen Änderungen der Reportergen-Aktivität ist es möglich, für eine Induktion bzw. Repression des Zielgens wichtige Bindungsstellen innerhalb des Promotors zu analysieren.

### **2.7.1. Der pGL3-Vektor**

Für die Reportergen-Assays in dieser Arbeit wurde der pGL3 basic-Vektor (Promega, Mannheim) benutzt. Dieser 4818 bp große Vektor enthält die kodierende Sequenz für das Luciferase-Protein (*luc+*), jedoch keine Promotor-Elemente. Zusätzlich besitzt der Vektor eine kodierende Region für ein  $\beta$ -Laktamase-Enzym, welches unabhängig von eingebrachten Promotoren transkribiert wird. Dies führt bei erfolgreich transformierten Bakterien zur Resistenz gegen Ampicillin und ermöglicht so deren Selektion. Die zu analysierenden Promotorelemente können in den Vektor über eine sogenannte *multiple cloning site* eingefügt werden, welche mehrere Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen aufweist (s. Abb. 7).

Darüberhinaus besitzt der Vektor Ursprungsstellen für die Replikation in *E. coli* (ori) und einem Bakteriophagen (F1 ori), sowie ein SV40 poly(A) Signal, das die effektive Polyadenylierung der mRNA sicherstellt.

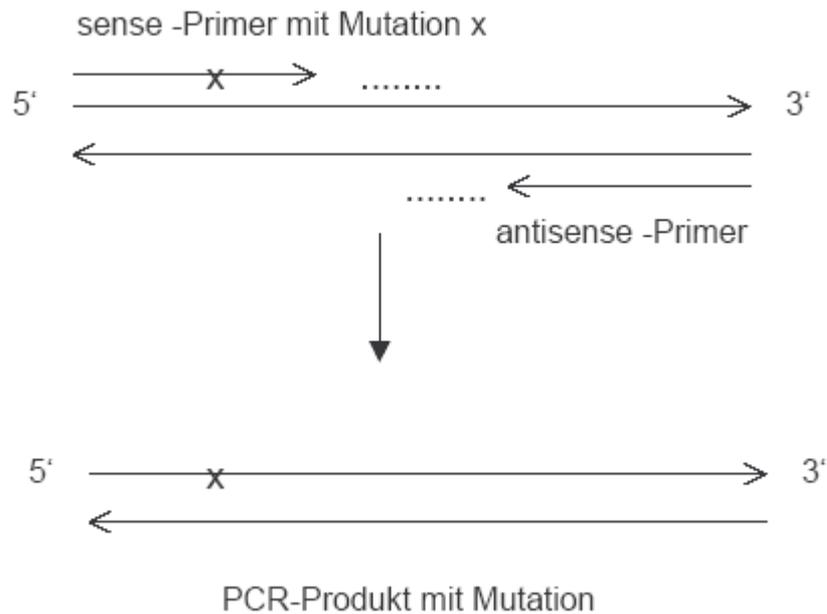


**Abbildung 7: Karte des pGL3-Basic Vektors.** Weitere Erklärungen siehe Text. Modifiziert aus dem Technical Manual (<http://www.promega.com/tbs/tm033/tm033.pdf>).

## 2.8. CCL3-Promotor-Analysen

### 2.8.1. Mutagenese von CCL3-Promotorabschnitten mittels PCR

Neben der Amplifikation von DNA-Sequenzen bietet die Polymerase-Kettenreaktion vielfältige Möglichkeiten zur Modifikation oder Mutation ausgewählter DNA-Sequenzen. Die Modifikation von DNA-Sequenzen wird durch die Verwendung synthetischer Oligonukleotid-Primer möglich, welche zwar mit ihren 3'-Enden zur DNA-Matritze komplementär sein müssen, bei denen jedoch die 5'-Enden spezifische Sequenzveränderungen, wie z.B. Mutationen und/oder Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen, enthalten können (s. Abb. 8). Bei der Anwendung dieser Technik sind allerdings nur Veränderungen an den Randbereichen der zu amplifizierenden DNA-Sequenzen möglich.



**Abbildung 8: Prinzip der PCR-basierten *in vitro* Mutagenese.**

Mit Hilfe von *sense-Primern*, die die gewünschte Mutation enthalten, wird diese auch in das PCR-Produkt eingeführt.

Als DNA-Matrize (*template*) wurde in diesem Fall das Deletionskonstrukt -123 verwendet (Bußfeld 1997). Dieses enthält den 123 bp großen in 5'-Richtung gelegenen Abschnitt des CCL3-Promotors (Wt) samt Transkriptionsstart und wurde mit Hilfe von zwei Restriktionsenzymen gerichtet in den pGL3 basic-Vektor inkloniert. Mittels PCR-basierter Mutagenese wurden von diesem Konstrukt zwei Mutationen, mMNP und mICK, hergestellt (mutierte Basenpaare sind fettgedruckt):

123 (Wt CCL3)	5'-CTGAGTTGTGCAACTTAGCATGACAGCATCACTA-3'
mMNP	5'-CTGAGTT <b>TTT</b> <b>TAAA</b> ATTAGCATGACAGCATCACTA-3'
mICK	5'-CTGAGTTGTGCAACTTAGCATGAC <b>CGAAT</b> <b>AAA</b> ATA-3'

Für die PCR-Reaktion wurden folgende *Primer* verwendet:

mMNP:

*sense-Primer*: 5'- TTG AGC TCT GAG TTT TTA AAA TTA GC -3'

mICK

*sense-Primer*: 5'- ACC GAG CTC TGA GTT GTG CAA CTT AGC ATG ACC  
GAA TAA ATA CGC TTA AAA –3'

gemeinsamer *antisense-Primer*:

5'- TTA AGC TTC TGA AGT CTG AAA CCA G –3'

Die *Primer* enthielten je eine unterschiedliche Schnittstelle für Restriktionsendonukleasen, um eine gerichtete Klonierung in den pGL3 basic-Vektor zu ermöglichen (unterstrichen: innerhalb der *sense-Primer*: SstI-Schnittstelle GAG CTC; innerhalb des *antisense-Primers*: HindIII-Schnittstelle AAG CTT).

Die PCR-Reaktion wurde in 500 µL Eppendorfgefäßen durchgeführt. Zu 1 µL (0,05 ng) des *template* (Deletionskonstrukt S123 in pGL3 basic-Vektor) wurden je 5 µL 10x Taq-Reaktionspuffer (Perkin Elmer), 1 µL Taq-Polymerase (Perkin Elmer) und 1 µL dNTP-Mix (je 10 mM), sowie jeweils 1 µL der entsprechenden *sense*- und *antisense Primer* (50 pM) zugesetzt und auf ein Endvolumen von 50 µL mit A. dest. aufgefüllt. Die Reaktion wurde in einem Eppendorf *Cycler gradient* unter den in 2.6.3.2. beschriebenen Bedingungen durchgeführt.

**Tabelle 5: Reaktionsbedingungen der Amplifikation der mutierten Deletionskonstrukte.**

Gen	<i>annealing</i> - Temperatur	Fragmentlänge	Zyklen
mMNP (=62M1)	62°C	135 bp	35
mICK	60°C	135 bp	35

Zum Ergänzen von unvollständigen DNA-Doppelsträngen wurde abschließend ein Polymerisationsschritt (7 min bei 72°C) angefügt.

### 2.8.2. Restriktionsverdau der amplifizierten DNA

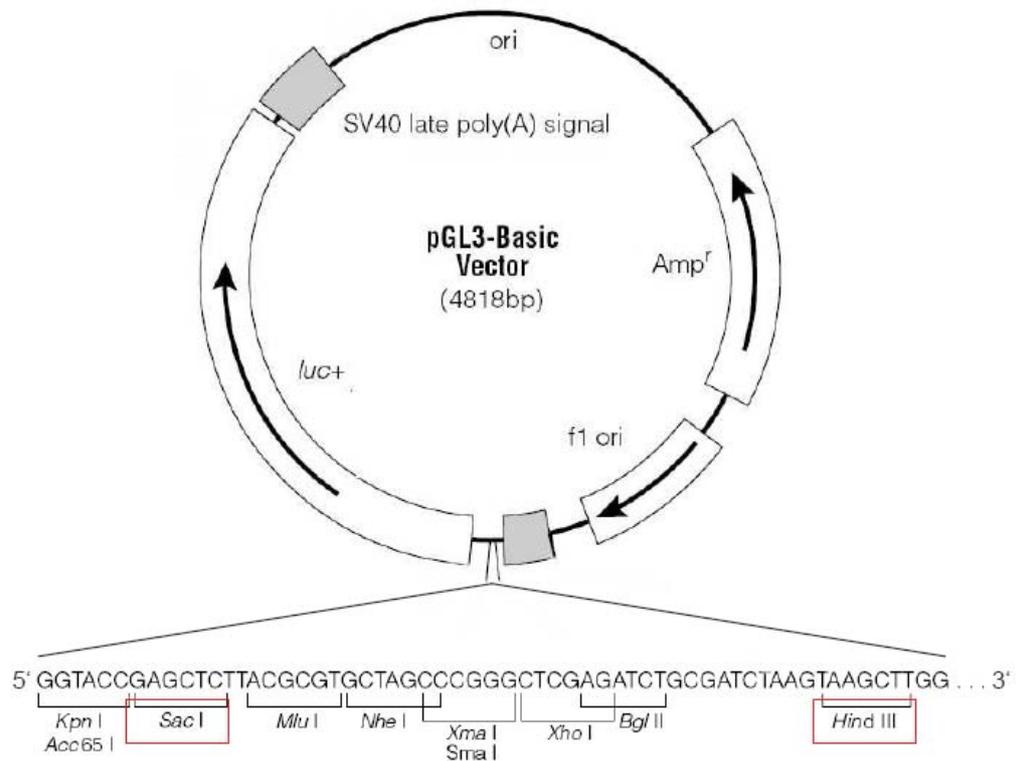
Die in der PCR-Reaktion amplifizierten DNA-Fragmente wurden anschließend mit Endonukleasen geschnitten, um sie in der richtigen Orientierung in den pGL3 basic-Vektor einfügen zu können. Dazu wurden die in den Primern integrierten Schnittstellen genutzt. Der Restriktionsansatz wurde wie folgt zusammen gestellt:

60 µL H <sub>2</sub> O	
20 µL amplifizierte DNA	
10 µL 10x Puffer REACT2	(Gibco, Karlsruhe)
5 µL Hind III (50 U)	(Gibco, Karlsruhe)
5 µL Sst I (50 U)	(Gibco, Karlsruhe)

Der Ansatz wurde 1,5 h bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend erfolgte die Aufreinigung der DNA mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits (Qiagen GmbH, Hilden) entsprechend den Angaben des Herstellers. Die aufgereinigte DNA wurde mit 30 µL EB-Puffer (Qiagen, Hilden) von der Säule eluiert.

### 2.8.3. Schneiden des Vektors

Die Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen HindIII und SstI, die zur gerichteten Insertion der Mutationen der Deletionskonstrukte verwendet wurden, befinden sich innerhalb der *multiple cloning site* des Vektors (s. Abb. 9)



**Abbildung 9: Karte des pGL3 basic-Vektors mit Vergrößerung der *multiple cloning site*.**

Die Schnittstellen für SstI (Isoenzym zu SacI) und HindIII sind rot umrahmt. Weitere Erklärungen siehe Text und Abschnitt 2.7.1. Modifiziert nach dem Technical Manual (s. Abb. 7).

Der pGL3 basic-Vektor wurde, wie die amplifizierten DNA-Fragmente, mit den Endonukleasen HindIII und SstI 1,5 h bei 37°C inkubiert:

75 µL	H <sub>2</sub> O	
5 µL	pGL3 basic-Vektor (1µg/µL)	(Promega, Mannheim)
10 µL	10x Puffer REACT2	(Gibco, Karlsruhe)
5 µL	HindIII (50 U)	(Gibco, Karlsruhe)
5 µL	SstI (50 U)	(Gibco, Karlsruhe)

Anschließend wurde dieser Ansatz noch 1h bei 37°C mit alkalischer Shrimp-Phosphatase (1U, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) inkubiert, um eine Religation des Vektors ohne Insert zu vermeiden. Da die geschnittenen Enden

der Deletionskonstrukte noch Phosphatreste besitzen, können diese in den Vektor ligiert werden. Der geschnittene Vektor wurde ebenfalls mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits (Qiagen GmbH, Hilden) aufgereinigt und mit 30  $\mu\text{L}$  EB-Puffer von der Säule eluiert.

#### 2.8.4. Ligation

Die folgende Ligationsreaktion wurde benutzt, um die Promotormutanten in den vorbehandelten Vektor zu integrieren:

3,5 $\mu\text{L}$	$\text{H}_2\text{O}$	
3,0 $\mu\text{L}$	aufgereinigte Promotormutationen	
0,5 $\mu\text{L}$	pGL3 basic-Vektor	
1,0 $\mu\text{L}$	10x Ligase-Puffer	(Gibco, Karlsruhe)
1,0 $\mu\text{L}$	T4 DNA-Ligase HC	(Gibco, Karlsruhe)
1,0 $\mu\text{L}$	dATP 100 $\mu\text{M}$	(Promega, Mannheim)

Die Ligation erfolgte bei 16°C über Nacht.

#### 2.8.5. Transformation von *E.coli* - Bakterien

Die kompetenten Bakterien TOP10F' (Invitrogen, Groningen, Niederlande) wurde auf Eis aufgetaut. Pro Transformationsansatz wurden 40  $\mu\text{L}$  Bakteriensuspension in ein 1,5 mL-tube (Eppendorf, Hamburg) vorgelegt und mit 0,7  $\mu\text{L}$   $\beta$ -Mercaptoethanol (0,25 mM) versetzt. Dieser Ansatz wurde 10 min auf Eis inkubiert und anschließend 2  $\mu\text{L}$  des Ligationsproduktes hinzugefügt. Nach vorsichtigem Vermischen schloß sich eine 30-minütige Inkubation auf Eis an. Anschließend wurden die Zellen ohne Schütteln exakt für 45 s einem Hitzeschock von 42°C ausgesetzt und dann 2 min lang auf Eis gestellt. Es folgte eine Zugabe von 360  $\mu\text{L}$  S.O.C.-Medium (Gibco, Life Technologies GmbH, Karlsruhe). Die Bakterien wurden für ca. 45 min bei 37°C mit 180 rpm in einem Schüttler inkubiert. Je 100  $\mu\text{L}$  der transformierten Bakterien wurden auf eine LB-Agarplatte (Luria Broth Base, Gibco, Life Technologies GmbH,

Karlsruhe) mit 100 µg/mL Ampicillin (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) ausgestrichen und für 16-20 h bei 37°C inkubiert.

### 2.8.6. Plasmidpräparation

Aufgrund des im pGL3 basic-Vektor enthaltenen Ampicillin-Resistenzgens, sollten nur Klone wachsen, die auch ein Plasmid aufgenommen haben. Die erste Überprüfung der gewachsenen Klone erfolgte mittels Kolonie-PCR. Dazu wurden einzelne Klone gepickt und jeweils in 400 µL S.O.C.-Medium (Gibco, Life Technologies GmbH, Karlsruhe) ca. 4-5 h in Falcon Rundboden Röhrrchen (Nr. 352059, Becton Dickinson Labware Europe, Le Pont De Claix, Frankreich) hochgezogen. Dann wurden 200 µL abgenommen und in ein 500 µL-tube (Eppendorf, Hamburg) überführt. Die Bakterienzellen wurden 10 min bei 6000 rpm und Raumtemperatur pelletiert (*Centrifuge 5415*, Eppendorf GmbH, Hamburg). Nach Resuspendierung in 50 µL H<sub>2</sub>O zur hypotonen Lyse der Bakterien, schloß sich eine Inkubation bei 95°C für 10 min an (PCR-Block, *Mastercycler gradient*, Eppendorf Hamburg). Die denaturierten Proteine und Reste der Zellmembran wurden durch eine weitere Zentrifugation bei 13.000 rpm (*Centrifuge 5415*, s.o.) für 10 min pelletiert. Der Überstand sollte neben der bakteriellen DNA auch die eingebrachte Vektor-DNA enthalten. Die im Vektor enthaltene CCL3-Promotor-DNA wurde anschließend durch folgende PCR-Reaktion amplifiziert:

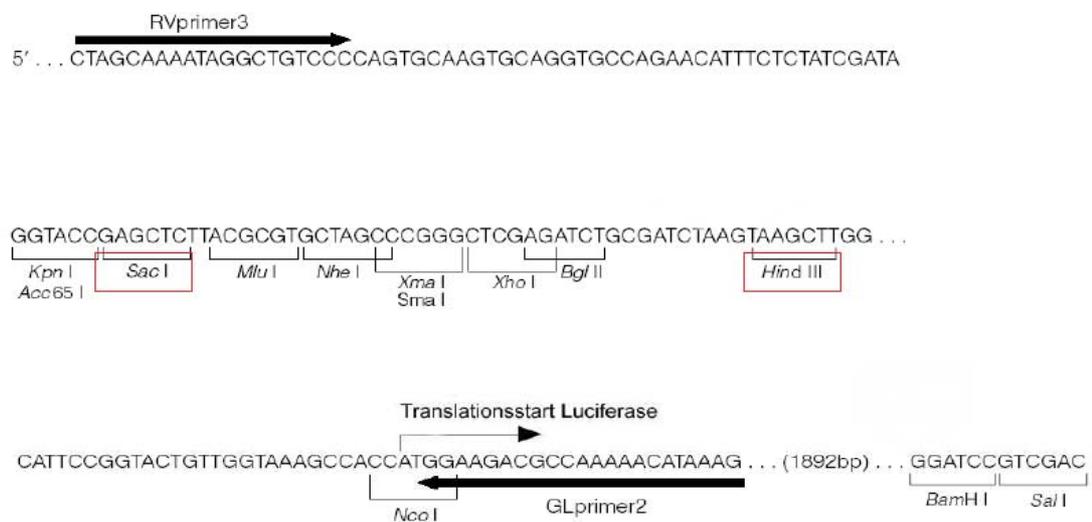
1 µL DNA-Lösung der lysierten Bakterien	
1 µL Primer RVprimer3	(MWG-Biotech AG, Ebersberg)
1 µL Primer GLprimer2	(MWG-Biotech AG, Ebersberg)
5 µL 10x Puffer GeneAmp	(Applied Biosystems, Foster City, USA)
1 µL AmpliTaq Polymerase	(Applied Biosystems, Foster City, USA)
1 µL dNTP-Mix 10 mM	(Promega, Mannheim)
40 µL H <sub>2</sub> O	

Sequenzen der Kolonie-PCR-Primer:

RVprimer3	5'- CTA GCA AAA TAG GCT GTC CC -3'
GLprimer2	5'- CTT TAT GTT TTT GGC GTC TTC CA -3'

Die Reaktion wurde in einem Eppendorf Cyler *gradient* unter den unter 2.6.3.2 beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Die Zyklenanzahl lag bei 35 und die Annealing-Temperatur bei 57°C.

Zum Ergänzen von unvollständigen DNA-Doppelsträngen wurde abschließend ein Polymerisationsschritt (7 min bei 72°C) angefügt.



**Abbildung 10: Lage der in der Kolonie-PCR verwendeten Primer Rvprimer3 und GLprimer2 in Relation zur *multiple cloning site* des pGL3 basic-Vektors.**

Die Restriktionsschnittstellen für die Deletionskonstrukte sind rot umrahmt. Modifiziert nach dem Technical Manual (s. Abb. 7).

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden anschließend in einem 1 %-igen Agarose-Gel aufgetrennt. Durch die Lage der Primer RVprimer3 und GLprimer2 in Relation zur *multiple cloning site* des pGL3 basic-Vektors (s. Abb. 10) konnte anhand der Größe des PCR-Produkts festgestellt werden, ob ein Insert enthalten ist. Die erwartete Größe der PCR-Produkte betrug für den pGL3 basic-Vektor ohne Insert 169 bp, für das mMNP-Insert bzw. mICK-Insert jeweils 249 bp. Von den positiven Klonen, d.h. Klonen mit einem *insert*,

wurden die verbliebenen 200  $\mu\text{L}$  der Über-Nacht-Kultur in 4 mL LB-Medium mit 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Ampicillin (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) aufgenommen. Aus dieser Kultur wurde zunächst eine Glycerinkultur angesetzt. Hierzu wurden 750  $\mu\text{L}$  der Bakterienkultur mit 250  $\mu\text{L}$  reinem Glycerin vermischt und bei  $-20^\circ\text{C}$  aufbewahrt. Der Rest der Kultur wurde für eine Plasmidpräparation verwendet. Die Präparation erfolgte mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen GmbH, Hilden) entsprechend den Angaben des Herstellers. Die Plasmid-DNA wurde mit 50  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$  von der Säule eluiert und anschließend die DNA-Konzentration gemessen. Dazu wurden die Proben (je 1  $\mu\text{L}$ ) mit 749  $\mu\text{L}$  A. dest. verdünnt und die optische Dichte bei 260 nm bestimmt (Gilford Response II<sup>TM</sup> UV-Vis Spectrophotometer). Die optische Dichte einer Lösung für Licht der Wellenlänge 260 nm ( $\text{OD}_{260}$ ) ist der DNA-Konzentration direkt proportional. Die Konzentration (C) der in der Probe enthaltenen DNA wurde durch folgende Formel berechnet:

$$C (\mu\text{g}/\text{mL}) = \text{OD}_{260} \times U \times V$$

U = Umrechnungsfaktor (50 für dsDNA)

V = Verdünnungsfaktor (750)

Nachdem die erhaltene DNA-Lösungen auf 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  eingestellt worden waren, wurden sie bei  $-70^\circ\text{C}$  aufbewahrt.

Zur weiteren Überprüfung der Klone erfolgte anschließend eine Sequenzierung durch einen kommerziellen Anbieter ("Hot Shot"-Sequenzierung durch Sequence Laboratories Göttingen GmbH, Göttingen). Dazu wurden in einem 200  $\mu\text{L}$ -tube 0,5  $\mu\text{g}$  Plasmid und 20 pmol Primer RVprimer3 gemischt und mit 10 mM Tris (pH 8.5) auf 7  $\mu\text{L}$  aufgefüllt. In den folgenden Transfektionsexperimenten wurden nur Klone eingesetzt, bei denen die Sequenz des Inserts die gewünschte Mutation (mMNP oder mICK) enthielt.

Die Plasmide, die für die Transfektion eingesetzt werden sollten, wurden mit dem EndoFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen GmbH, Hilden) präpariert. Dazu wurden 500  $\mu\text{L}$  der Glycerinkulturen in 100 mL LB-Medium mit 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Ampicillin (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) aufgenommen und für

12-16 h bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Die Endotoxin (LPS)-freie Präparation der Plasmide aus dieser Kultur erfolgte anschließend nach den Angaben des Herstellers. Die eluierte Plasmid-DNA wurde zunächst in 600 µL TE-Puffer eluiert, die DNA-Konzentration bestimmt und anschließend mit TE-Puffer auf 0,5 µg/µL eingestellt.

### **2.8.7. Transiente Transfektion von Mono Mac 6-Zellen**

Mit dem Begriff "Transfektion" wird die Einführung von Fremd-DNA in Eukaryontenzellen bezeichnet. Mittlerweile sind diverse Methoden zur Transfektion entwickelt worden. Eine immer noch gebräuchliche Technik ist die erstmals von McCutchan und Pagano (1968) beschriebene DEAE (Diethylaminoethyl)-Dextran vermittelte Transfektion. Sie ist auf transiente Expressionsstudien beschränkt und für stabile Transfektionen ungeeignet (Gluzman, 1981). Die DEAE-Dextran Behandlung scheint die DNA-Bindung an die Zellmembran zu fördern. Je nach Zelltyp kann die Transfektionseffizienz durch zusätzliche Behandlung mit DMSO (Dimethylsulfoxid) verstärkt werden (Lowy et al., 1978; Lewis et al., 1980; Lopata et al., 1984). Der exakte Wirkmechanismus ist unbekannt. Vermutlich modifiziert diese Behandlung die Struktur der Zellmembran derart, daß vermehrt DNA aufgenommen werden kann. Da sowohl DEAE-Dextran als auch DMSO für die Zellen toxisch sind, müssen die Transfektionsbedingungen bezüglich deren Konzentration und Expositionszeit sorgfältig für das jeweilige Zellsystem optimiert werden.

Verwendetes Transfektionsmedium:

	RPMI 1640	(Linaris, Wertheim)
mit	2 mM L-Glutamin (Endkonz.)	(Gibco, Karlsruhe)

Für die Transfektion wurde folgendes optimiertes Standardprotokoll verwendet, das in einer Reihe von Vorversuchen ermittelt wurde: 24 h vor Beginn der Transfektion wurden die Mono Mac 6-Zellen in neues Medium mit 10 % FCS 1:1,5 umgesetzt, um sie in der logarithmischen Wachstumsphase zu halten.  $5 \times 10^6$  Zellen und 5 µg Plasmid der jeweiligen Promotormutation

wurden pro Transfektionszeitpunkt verwendet. Zur Transfektion wurden die Zellen einmal mit Transfektionsmedium gewaschen, gezählt (Cellcounter CASY1 Modell TT, Schärfe System GmbH, Reutlingen) und anschließend nochmals bei 400 g sedimentiert. Die Transfektionreaktion erfolgte in Doppelbestimmung. Dazu wurde die entsprechende Plasmid-Menge (10 µg) in die Rundboden-Röhrchen vorgelegt. Die Zellen wurden pro Ansatz ( $10 \times 10^6$  Zellen) in 1 mL Transfektionsmedium mit 80 µg/mL DEAE-Dextran (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) resuspendiert und auf die vorgelegte Plasmid-Lösung pipettiert. Die anschließende Inkubationszeit betrug 90 min bei 37°C. Nach 30 und 60 min wurde das Zellsediment vorsichtig aufgeschüttelt.

Nach Ablauf der Inkubation wurde zu jeder Zellsuspension für 2-3 min 10 % v/v (100 µL) DMSO (Merck, Darmstadt) unter Schütteln hinzugegeben. Im Anschluß an diese Behandlung musste das zelltoxische DMSO rasch entfernt werden. Dazu wurden die Zellsuspensionen auf 12 mL mit Transfektionsmedium aufgefüllt und anschließend für 5 min bei 400 g sedimentiert, der Überstand dekantiert und das Pellet in 8 mL Mono Mac 6-Vollmedium mit 10 % FCS aufgenommen. Das Ausplattieren der transfizierten Zellen erfolgte in 24-Lochplatten (Costar, Bodenheim) mit 2 mL Zellsuspension pro Vertiefung. Nach der Transfektion wurden die Zellen für weitere 19 h unter Standardbedingungen kultiviert.

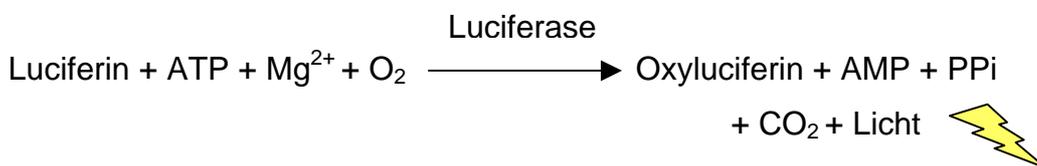
#### **2.8.8. Analyse der Promotoraktivität durch Bestimmung der Luciferase-Aktivität**

Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen aus 2 Vertiefungen resuspendiert und in ein 15 mL-FALCON-Röhrchen (BD, Heidelberg) überführt. Die Zellen wurden einmal mit 4°C kaltem PBS<sup>def</sup> gewaschen (Zentrifugation bei 400 g, 5 min, 4°C) und anschließend in 100 µL RLB-Lysis-Puffer (Promega, Mannheim) resuspendiert. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Zelllysate bei -70°C eingefroren und kurz darauf wieder im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, um alle Zellen vollständig zu lysieren und die Luciferase freizusetzen. Durch eine Zentrifugation bei

10.000 g und 4°C für 5 min wurden die Reste der Zellmembranen pelletiert. Der Überstand mit den Zell-Proteinen und der Luciferase wurde abpipettiert und bis zur Messung der Luciferase-Aktivität bei -20°C gelagert.

Vor der Messung der Luciferase-Aktivität wurden die Proben auf eine einheitliche Protein-Konzentration eingestellt. Dies geschah mit Hilfe eines modifizierten Bradford-Assays der Fa. Bio-RAD (siehe Abschnitt 2.5).

Die Messung der Reporter-Genaktivität erfolgte in einem Luminometer (LumiStar, Fa. BMG, Offenburg). Zu jeder Probe wurden 100 µL eines Substrates (Promega, Mannheim), welches Glühwürmchen-Luciferin, ATP und Mg<sup>2+</sup> enthält zugegeben und in einer biochemischen Reaktion unter Verbrauch von Sauerstoff wie folgt umgesetzt:



Das dabei entstehende Licht wurde durch Messung der Absorption bei 595 nm für 25 s erfasst und ein Integral über die Zeit errechnet. Die Werte wurden mit einer Probe verglichen, die keine Luciferase enthielt und als relative Lichteinheiten angegeben.

## 2.9. SDS-PAGE und Western-Blot

Für die Proteingewinnung wurden 10 Millionen Mono Mac 6-Zellen in 7,5 mL Medium entsprechend den oben angegebenen Bedingungen (s. Abschnitt 2.4.2) kultiviert und anschließend stimuliert bzw. infiziert. Nach 8 bzw. 16h wurden die Zellen in ein FALCON-Röhrchen überführt und durch einen Zentrifugationsschritt bei 800 rpm und 4°C für 7 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 100 µL M-PER (Mammalian Protein Extraction Kit, PIERCE, Rockford, USA) resuspendiert. Zu je 10 mL des Lysepuffers wurde zuvor eine Tablette Proteinase-Inhibitor (Complete™ Proteinase Inhibitor Cocktail; Roche, Mannheim) gegeben. Das Zelllysat wurde 10 min auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation (13.000 rpm, 10 min, 20°C; *Centrifuge 5415*, Eppendorf, Hamburg) wurde der Überstand mit den

zytoplasmatischen Proteinen aliquotiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Vor der Gelelektrophorese wurde eine Proteinbestimmung mit einem modifizierten Bradford-Assay durchgeführt (s. Abschnitt 2.5) und die Proben auf eine einheitliche Proteinkonzentration eingestellt.

Für die SDS-PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese) unter reduzierenden Bedingungen wurden  $30\ \mu\text{g}$  Protein eingesetzt und auf ein Volumen von  $13\ \mu\text{L}$  mit Lysepuffer ergänzt. Dazu wurden  $5\ \mu\text{L}$  des auf  $37^{\circ}\text{C}$  vorgewärmten *4x sample buffers* (NuPAGE; NOVEX, San Diego, CA) und  $2\ \mu\text{L}$  *10x reducing agent* (NuPAGE; NOVEX, San Diego, CA) pipettiert. Anschließend wurden die Proben für 20 min bei  $70^{\circ}\text{C}$  in einem PCR-Block (Mastercycler *gradient*, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg) denaturiert.

Als Gel wurde ein 4-12 %-iges Polyacrylamid-Gradientengel (NuPAGE 4-12 % Bis-Tris; NOVEX, San Diego, CA) verwendet. Als Laufpuffer diente ein MES SDS-*running buffer* (NuPAGE; NOVEX, San Diego) mit 0,25 % v/v Antioxidant (NuPAGE; NOVEX, San Diego, CA). Die Laufzeit betrug 35 min bei einer angelegten Spannung von 200 V. In der Zwischenzeit wurde die PVDF-Membran (Immobilon-P  $0,45\ \mu\text{m}$ ; Millipore, Bedford, MA, USA) 20 sec in Methanol (Merck, Darmstadt), dann 2 min in  $\text{H}_2\text{O}$  und schließlich 5 min im *transfer buffer* (NuPAGE; NOVEX, San Diego) äquilibriert.

Danach wurden die aufgetrennten Proteine aus dem Gel mit Hilfe eines Elektro-Blot-Verfahrens (NuPAGE; NOVEX, San Diego) auf die PVDF-Membran übertragen (1 h bei einer Spannung von 25 V). Nach dem Blotten wurde die Membran kurz in  $\text{H}_2\text{O}$  geschwenkt, für 10-15 s in Methanol (Merck, Darmstadt) inkubiert und anschließend getrocknet.

Die Membran wurde in 20 mL 2 %-igem (w/v) Protein-Blockpuffer über Nacht inkubiert. Dann wurde sie einmal in  $\text{PBS}^{\text{plus}}$  mit 0,05 % Tween gewaschen und mit dem ersten Antikörper ( $\alpha$ -IRF-1: ; $\alpha$ -IRF-7: H-246, rabbit polyclonal; SantaCruz, USA) in 2 %-igem (w/v) Protein-Blockpuffer inkubiert. Dazu wurde dieser 1:500 verdünnt (d.h.  $20\ \mu\text{L}$  auf 10 mL Protein-Blockpuffer). Nach 1,5 h Inkubation mit dem ersten Antikörper wurde die Membran dreimal für je 10 min in  $\text{PBS}^{\text{plus}}$  mit 0,05% w/v Tween gewaschen. Der zweite Antikörper ( $\alpha$ -rabbit IgG, AP-konjugiert; Chemicon, Temecula, USA) wurde in 20 mL 1x Roti-Blocklösung (Roth, Karlsruhe) 1:2000 verdünnt ( $10\ \mu\text{L}$  auf 20 mL) und die

Membran mit dieser Lösung für 1 h inkubiert. Danach wurde die Membran 4x je 10 min in TBS mit 0,1 % w/v Tween gewaschen.

Die Detektion erfolgte über eine chromogene Reaktion. Hierzu wurde eine Tablette Substrat (Fast BCIP/NBT; Sigma, München) in 10 mL H<sub>2</sub>O gelöst und auf die Membran gegeben. Nach 15-20 min bildete sich durch die Einwirkung der alkalischen Phosphatase des zweiten Antikörpers ein blau-violettes Präzipitat. Durch Abschütten des Substrates und Waschen der Membran mit H<sub>2</sub>O wurde die Reaktion abgestoppt. Die Membranen wurden anschließend eingescannt und visuell ausgewertet.

### **III. Ergebnisse**

#### **1. Die Induktion von CCL3 durch Influenza A/PR/8 bzw. LPS**

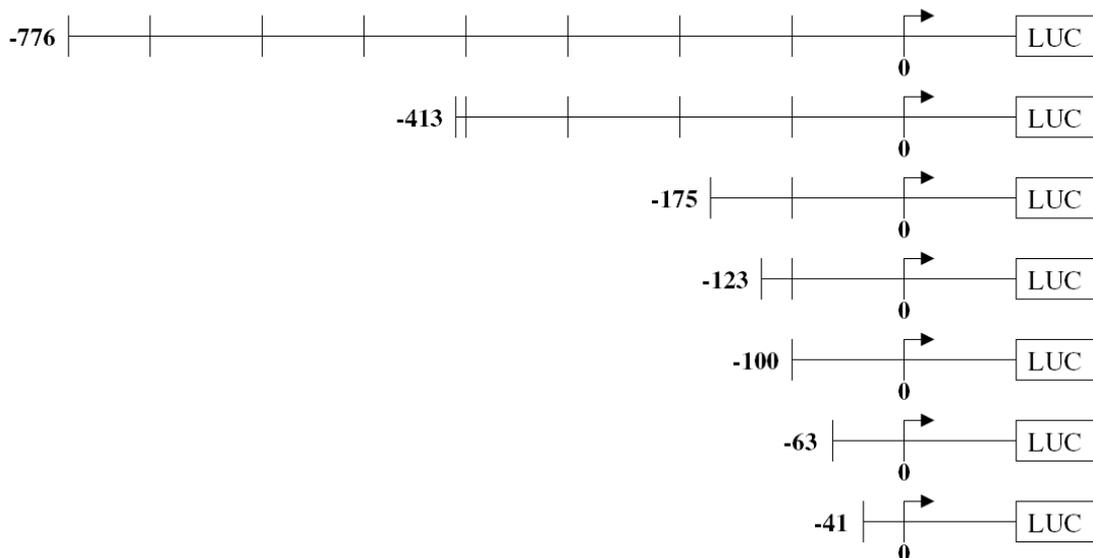
Eine Reihe von Untersuchungen weisen darauf hin, dass das Chemokin CCL3 nicht nur bei viralen Infektionen im allgemeinen, sondern auch speziell bei einer Influenza-Infektion von Mäusen und Menschen vermehrt gebildet wird (s. Einleitung). Dieser erhöhten Produktion bzw. Sekretion des Chemokins kommt zumindest bei Mäusen eine protektive Rolle zu. Die molekularen Mechanismen der Induktion des CCL3-Gens durch eine Infektion mit Influenza A-Viren oder eine Stimulation mit LPS in humanen Monozyten/Makrophagen sind jedoch nur ungenügend erforscht. Das Ziel der Untersuchungen meiner Dissertation war es deshalb, die Transkriptionsfaktoren, die für die Induktion dieses Chemokins nach einer Infektion mit dem Influenza A-Virus von Bedeutung sind, zu identifizieren und zu charakterisieren.

#### **1.1. Ergebnisse vorangegangener Untersuchungen des CCL3-Promotors**

Um wichtige Promotor-Abschnitte für die Transkription von CCL3 zu identifizieren, wurden in vorangegangenen Untersuchungen verschiedene Abschnitte des Promotors mittels PCR amplifiziert und in den pGL3 basic-Vektor kloniert (Bußfeld, 1997). Der pGL3 basic-Vektor enthält keinen eigenen Promotor, so dass die Expression des enthaltenen Luciferase-Gens jeweils von den eingebrachten CCL3-Promotorabschnitten kontrolliert wird (s. Material und Methoden). Durch die Messung der Aktivität des Reporter-Genproduktes Luciferase kann dadurch die Funktionalität des klonierten CCL3-Promotorabschnittes überprüft werden. Diese Methode erlaubt Rückschlüsse auf die regulatorische Aktivität der entsprechenden Promotorbereiche für die Induktion von CCL3.

Um die *cis*-regulatorischen DNA-Elemente zu identifizieren, die eine Induktion des CCL3-Gens nach einer Stimulation mit LPS bzw. einer Infektion mit Influenza A-Virus in humanen Monozyten vermitteln, wurden insgesamt sieben 5'-Deletionskonstrukte hergestellt, deren 3'-Ende den Transkriptionsstart

umfasste (s. Abb. 11). Mit diesen Deletionskonstrukten wurde anschließend Zellen der humanen Monozyten-Zelllinie Mono Mac 6 transfiziert und die Luciferase-Aktivität nach einer Stimulation mit LPS bzw. einer Infektion mit Influenza A-Virus bestimmt.



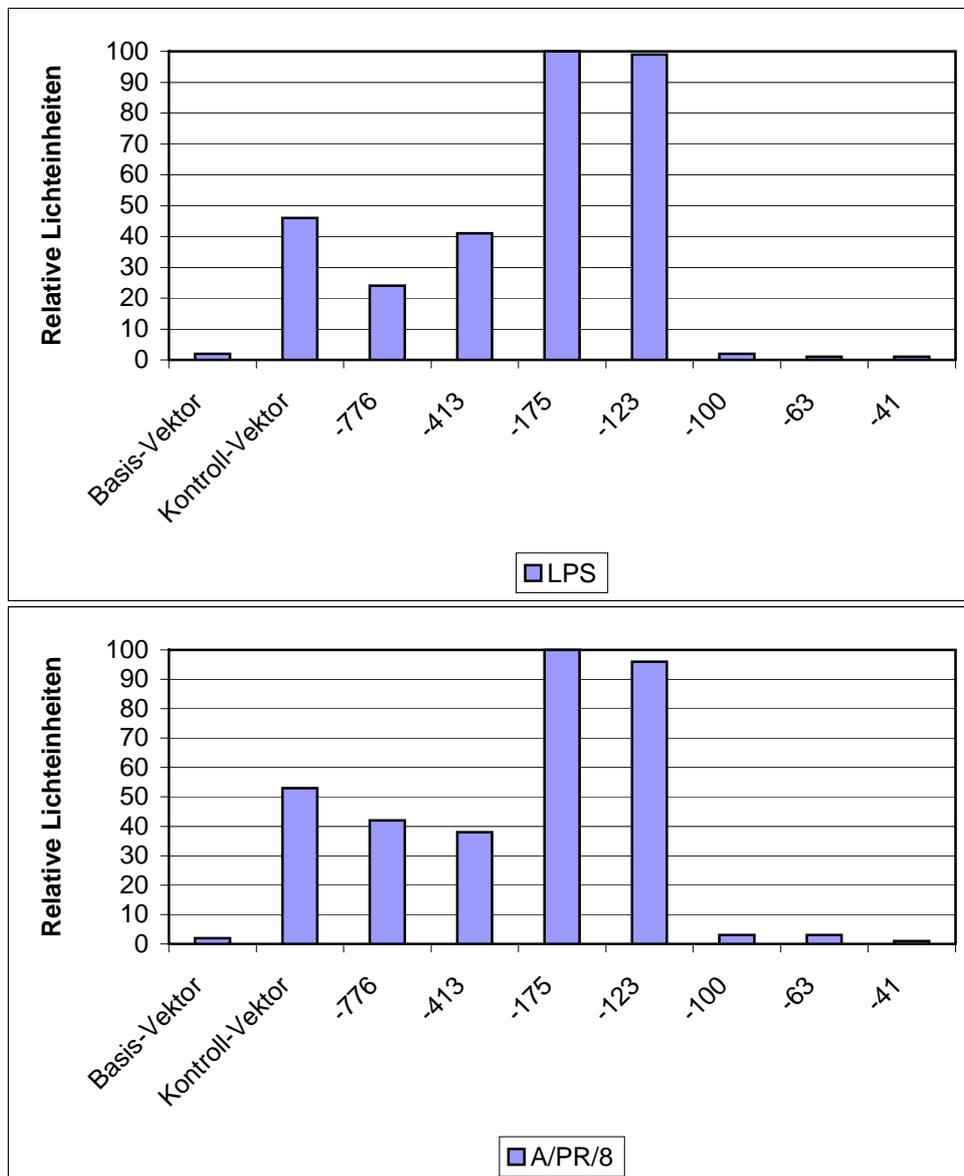
**Abbildung 11: Schematische Darstellung der 5'-Deletionskonstrukte des CCL3-Promotors.**

Die Nukleotidposition des 5'-Endes der Deletionskonstrukte ist für alle Deletionskonstrukte jeweils angegeben. Das gemeinsame 3'-Ende liegt bei +3 (alle Angaben beziehen sich auf den Transkriptionsstart). LUC: Luciferase-Gen. Nach: Bußfeld 1997.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen mit den Deletionskonstrukten sind in Abb. 12 gezeigt (aus: Bußfeld, 1997). Für die Induktion von CCL3 durch eine Stimulation mit LPS bzw. eine Infektion mit dem Influenza A-Virus ließen sich zwei deutliche Veränderungen der Luciferase-Aktivität nach schrittweiser Deletion einzelner des Promotorbereiche nachweisen:

- 1) In Zellen, die mit den Deletionskonstrukten -175 und -123 transfiziert worden waren, wurden deutlich höhere Luciferase-Aktivitäten gemessen, als in den Zellen, die mit vollständigeren Promotoren d.h. längeren Deletionskonstrukten (-776 und -413) transfiziert wurden. Dieser Anstieg der Luciferase-Aktivität nach der Deletion des Abschnittes -413 bis -175 lässt auf inhibitorisch wirksame DNA-Sequenzen in diesem Bereich schließen.

- 2) Nach der Transfektion der Deletionskonstrukte -100, -63 und -41 wurde keine Luciferase-Aktivität in den transfizierten Zellen mehr gemessen bzw. die gemessenen Werte entsprachen denen unstimulierter Zellen. Diese drastische Reduktion der Luciferase-Aktivität nach Deletion des Abschnittes -123 bis -100 lässt vermuten, dass sich in diesem Bereich eine positiv regulatorische DNA-Sequenz befindet. Es liegt nahe, dass die DNA-Sequenz zwischen -123 und -100 eine entscheidende Rolle bei der Stimulus-spezifischen Induktion von CCL3 durch LPS bzw. Influenza A spielt. Sie muss demzufolge essentielle Bindungsstellen für einen oder mehrere Transkriptionsfaktoren enthalten, die durch eine Stimulation mit LPS bzw. eine Infektion mit dem Influenza A-Virus aktiviert werden.



**Abbildung 12 (umseitig): Transkriptionelle Aktivität der verschiedenen 5'-Deletionskonstrukte des CCL3-Promotors (aus Bußfeld 1997).**

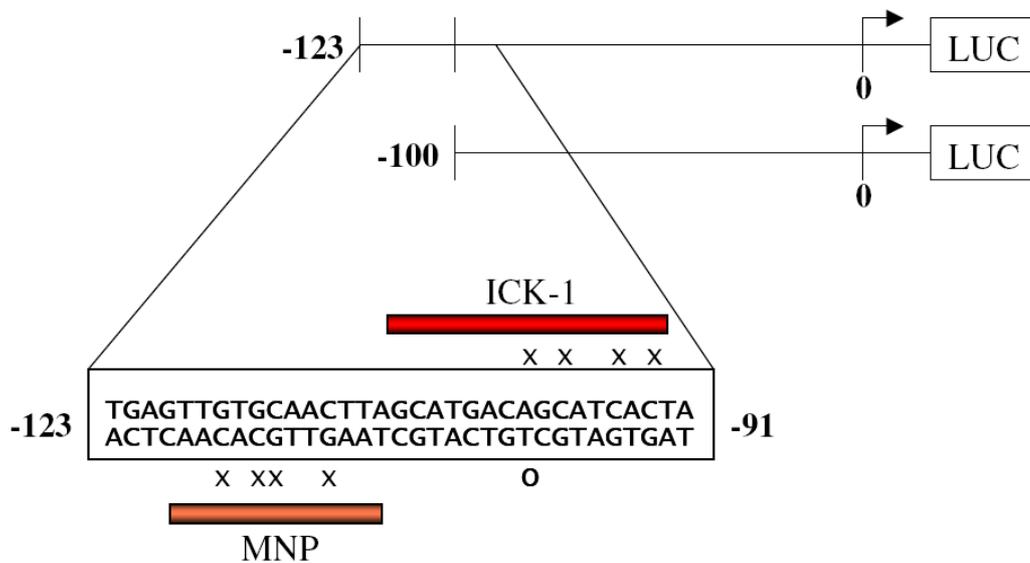
Mono Mac 6-Zellen wurden mit den entsprechenden Deletionskonstrukten transfiziert und mit 100 ng/mL LPS stimuliert bzw. mit 5 MOI Influenza A/PR/8 infiziert. Anschließend wurden die Zellen geerntet, lysiert und der Luciferase-Gehalt in den Proben mit Hilfe eines luminometrischen Verfahrens gemessen. Die Positionsangaben beziehen sich auf den Transkriptionsstart. Angegeben ist die relative Luciferase-Aktivität in bezug auf den höchsten gemessenen Wert bei der Induktion des CCL3-Gens.

Basis-Vektor = pGL3 basis-Vektor ohne Promotor

Kontroll-Vektor = pGL3 control-Vektor mit SV40-Promotor.

**1.2. Die Bindungsstellen MNP und ICK-1**

Die regulatorische DNA-Sequenz im Promotorbereich -123 bis -100 bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts wurde von anderen Arbeitsgruppen untersucht und es wurden darin zwei mögliche Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren identifiziert (Nomiyama et al. 1993 und Ritter et al. 1995): die Bindungsstellen für die Faktoren MNP (steht für *MIP-1 $\alpha$  nuclear protein*) bzw. ICK-1 (steht für *inhibitory cytokine-1*) (s. Abb. 13). Durch die Deletion dieses Promotorabschnittes in den in Abschnitt 1.1 beschriebenen Versuchen wurden die Bindungsstellen dieser Faktoren ganz (MNP) oder teilweise (ICK-1) entfernt. Beide *cis*-regulatorischen DNA-Elemente sind somit Kandidaten für die stimulus-abhängige Regulation der CCL3-Transkription nach LPS-Stimulation bzw. Influenza A/PR/8-Infektion. An beiden Bindungsstellen können jedoch mehrere unterschiedliche Faktoren binden (MNP-1, MNP-2, MNP-3 bzw. ICK-1A, ICK-1B, ICK-1C). In Abhängigkeit des verwendeten Zelltyps zeigen diese Faktoren eine unterschiedliche regulatorische Funktion: einige Faktoren können sowohl eine vermehrte als auch eine verringerte Transkription bewirken. Ein Ziel dieser Arbeit war deshalb die Analyse der Funktion dieser beiden DNA-Bindungsstellen in der humanen Monozyten-Zelllinie Mono Mac 6 nach einer Stimulation der Zellen mit LPS bzw. einer Infektion mit dem Influenza A/PR/8-Virus.



**Abbildung 13: 5'-Deletionskonstrukte des CCL3-Promotors und die Lage der MNP- und ICK-1-Bindungsstellen.**

Die Lage der MNP- und ICK-1-Bindungsstellen innerhalb des Deletionskonstruktes  $-123$  ist angegeben. Die Kreuze kennzeichnen essentielle Bindungsstellen der Faktoren an der DNA (nach Sharma et al. 1998).  $\circ$  markiert das Nukleotid  $-100$ . Alle Angaben beziehen sich auf den Transkriptionsstart. LUC: Luciferase-Gen.

## 2. Analysen zur Funktion der Transkriptionsfaktoren MNP und ICK-1 im CCL3-Promotor

### 2.1. Vorversuche zur Transfektion

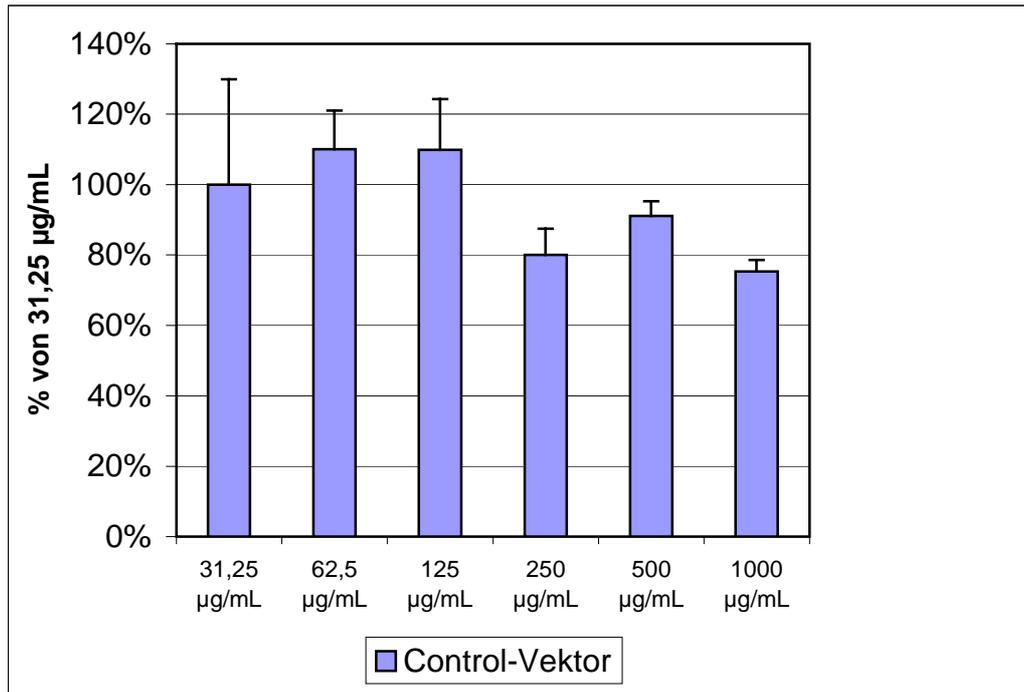
Um die optimalen Bedingungen für eine Transfektion und anschließende Stimulation bzw. Infektion der Mono Mac 6-Zellen zu ermitteln, wurden verschiedene Vorversuche – in Anlehnung an das Protokoll von Bußfeld (Bußfeld, 1997) - durchgeführt. Zum einen wurde die optimale Konzentration des für die Transfektion verwendeten DEAE-Dextrans ermittelt. Da DEAE-Dextran für Zellen toxisch wirkt, muss mit möglichst geringen Konzentration gearbeitet werden, allerdings ohne die Transfektionseffizienz zu verringern. Weiterhin wurde der optimale Zeitpunkt nach der Transfektion ermittelt, an dem die Zellen sich vom „Stress“ der Transfektion erholt haben und wieder in der Lage sind, Luciferase zu produzieren. Der Zeitpunkt der Stimulation bzw. Infektion sollte später so gewählt werden, dass die Zellen einerseits nicht zu viel Luciferase als Basalaktivität produzieren, aber andererseits in der Lage

sind, nach einer Stimulation bzw. Infektion das Reporter-gen zu induzieren. Weiterhin wurde der optimale Zeitpunkt für die Lyse der Zellen nach Stimulation bzw. Infektion ermittelt, zu dem die Zellen gut messbare Mengen an Luciferase produziert haben. Diese Vorversuche wurden mit Plasmiden des Deletionskonstruktes -123 bzw. mit dem pGL3 control-Vektor durchgeführt, da durch beide Plasmide eine hohe Luciferase-Aktivität nach Transfektion von Mono Mac 6-Zellen und Stimulation mit LPS bzw. Infektion mit Influenza A erreicht wird (s. oben). Der pGL3 control-Vektor enthält einen SV40-Promotor, der eine konstitutive Expression des Luciferase-Gens in Säugerzellen bewirkt.

### **2.1.1. Ermittlung der optimalen DEAE-Dextran-Konzentration**

In einem ersten Vorversuch wurde die optimale Konzentration an DEAE-Dextran ermittelt, um einerseits eine effiziente Transfektion zu gewährleisten, die Zellen aber andererseits nicht zu hohen Konzentrationen dieser zelltoxischen Substanz auszusetzen. Ausgehend von der verwendeten Konzentration an DEAE-Dextran in früheren Protokollen (Bußfeld 1997: 31,25 µg/mL, Kastenbauer und Ziegler-Heitbrock 1999: 61,5 µg/mL) wurden je  $5 \times 10^6$  Mono Mac 6-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen DEAE-Dextrans (31,25 µg, 62,5 µg, 125 µg, 250 µg, 500 µg und 1000 µg) und 5 µg pGL3 control-Vektor transfiziert. Nach 24 h Inkubationszeit ohne zusätzliche Stimulation oder Infektion wurden die Zellen lysiert und die Luciferase-Aktivität von je  $10 \times 10^6$  Zellen gemessen.

Wie die Abbildung 14 zeigt, war die Luciferase-Aktivität bei Transfektionen mit einer DEAE-Dextran-Konzentration von 62,5 µg/mL bzw. 125 µg/mL geringfügig höher als bei einer Konzentration von 31,25 µg/mL. Noch höhere Konzentrationen (250, 500 und 1000 µg/mL DEAE-Dextran) führten jedoch zu einer bis zu 20% reduzierten Luciferase-Aktivität der transfizierten Zellen. Daraus lässt sich schließen, dass die optimale Konzentration an DEAE-Dextran zur Transfektion der Zellen zwischen 62,5 µg/mL und 125 µg/mL liegt. Für die folgenden Versuche wurde eine DEAE-Dextran-Konzentration von 80 µg/mL eingesetzt.

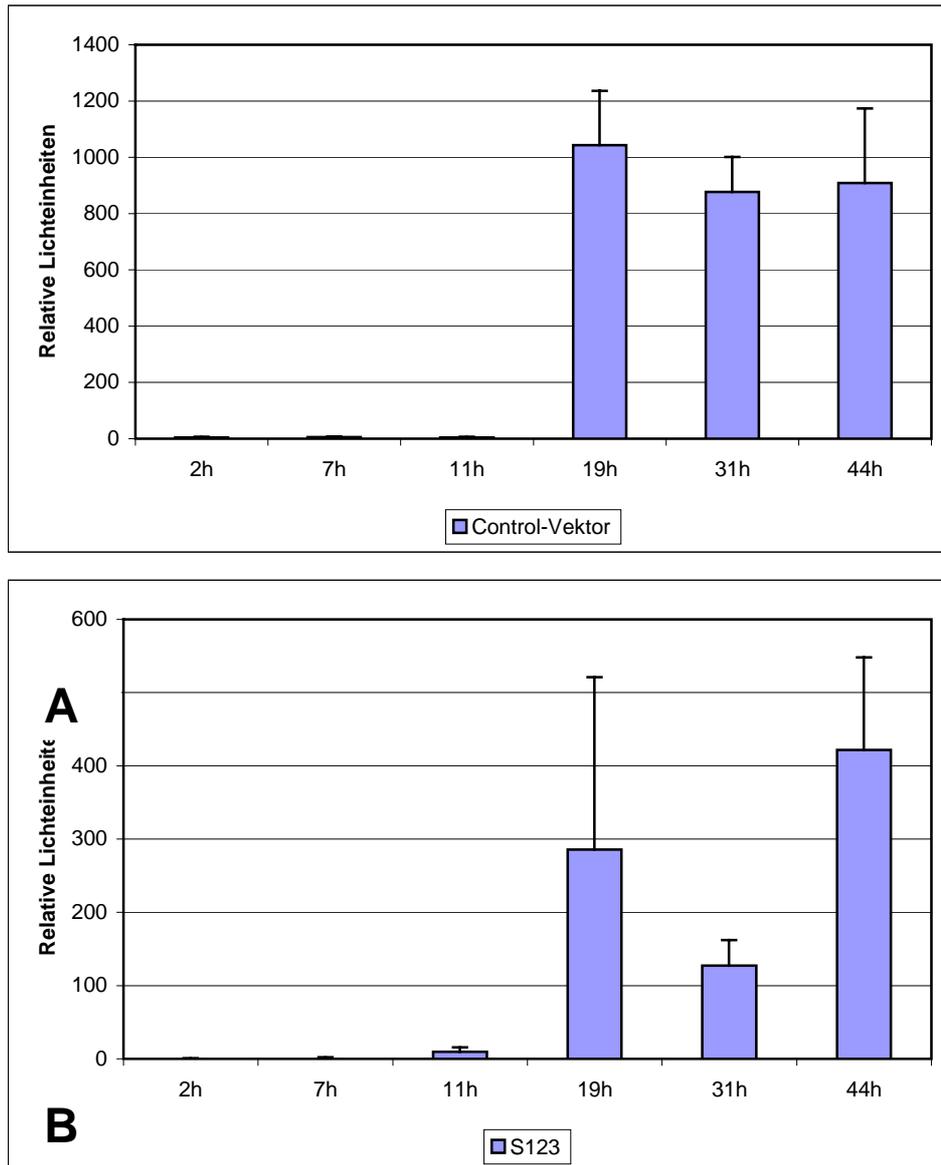


**Abbildung 14: Ermittlung der optimalen DEAE-Dextran-Konzentration.**

Mono Mac 6-Zellen wurden mit 5 µg des pGL3 control-Vektors und den angegebenen DEAE-Dextran-Konzentrationen für je  $5 \times 10^6$  Zellen transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen lysiert und die Luciferase-Aktivität von je  $10 \times 10^6$  Zellen gemessen. Für diese Auswertung wurde die Aktivität der induzierten Luciferase bezogen auf die Transfektion mit 31,25 µg/mL DEAE-Dextran dargestellt. Gezeigt ist der Mittelwert und die Standard-Abweichung als repräsentatives Ergebnis aus zwei unabhängigen Versuchen.

### **2.1.2 Kontrolle der Basalaktivität nach Transfektion**

Dieser Vorversuch sollte zeigen, zu welchem Zeitpunkt nach der Transfektion die Zellen sich soweit vom „Stress“ der Transfektion erholt haben, dass sie wieder mit der Transkription von Genen beginnen. Für diesen Vorversuch wurden je  $5 \times 10^6$  Zellen mit 80  $\mu\text{g/mL}$  DEAE-Dextran und 5  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA in einem Volumen von 1 mL Medium transfiziert (s. auch Methoden Abschnitt 2.8.7.) und ohne zusätzliche Infektion oder Stimulation inkubiert. Zu den angegebenen Zeiten wurden die Zellen lysiert und die Luciferase-Aktivitäten von je  $10 \times 10^6$  Zellen luminometrisch gemessen. Für dieses Experiment wurde der pGL3 control-Vektor (Abb. 15A) bzw. das Deletionskonstrukt –123 (Abb. 15B) verwendet. Es zeigte sich, dass bis 11 Stunden nach Transfektion noch keine Luciferase-Aktivitäten messbar waren. Erst nach 19 Stunden Ruhezeit konnte eine Aktivität detektiert werden (s. Abb. 15). Nach 31 und 44 Stunden war keine Zunahme der Luciferase-Aktivität zu beobachten. Damit ist davon auszugehen, dass sich die Zellen 19 Stunden nach Transfektion ausreichend vom „Stress“ erholt haben und die Transkription von Genen wieder begonnen hat. Für die folgenden Experimente wurde deshalb eine Ruhezeit von 19 Stunden eingehalten.



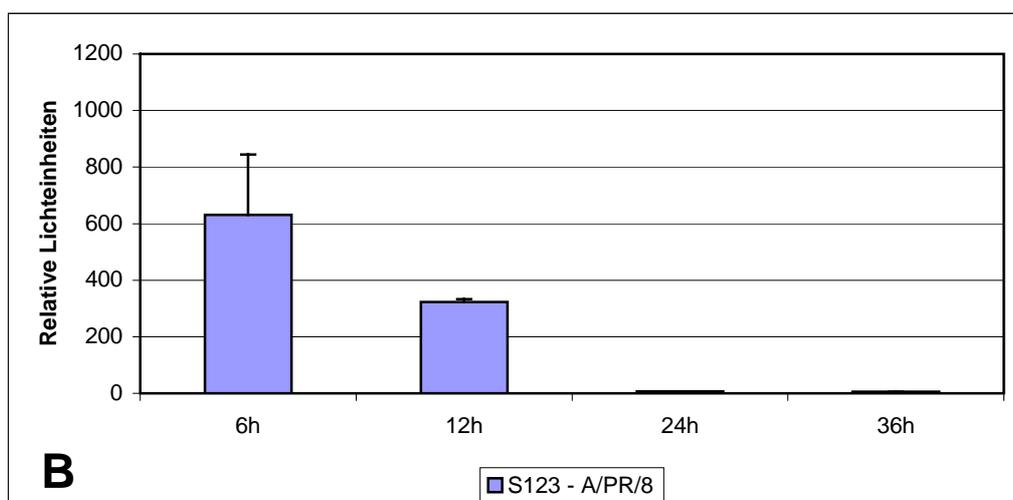
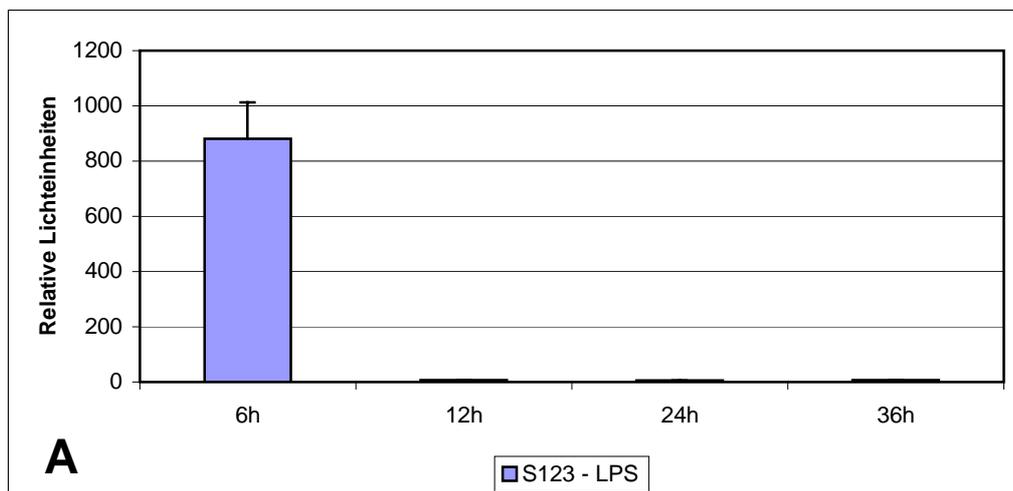
**Abbildung 15: Kontrolle der Basalaktivitäten nach Transfektion.**

Je  $5 \times 10^6$  Mono Mac 6-Zellen wurden ohne DNA bzw. mit jeweils  $5 \mu\text{g}$  Plasmid-DNA des pGL3 control-Vektors (control-Vektor, **A**) bzw. des Deletionskonstruktes -123 (**B**) transfiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen lysiert und die Luciferase-Aktivität von je  $10 \times 10^6$  Zellen gemessen. Dargestellt sind Mittelwert und Standard-Abweichung als repräsentatives Ergebnis aus zwei unabhängigen Versuchen.

### 2.1.3 Kontrolle der Luciferase-Aktivität nach Stimulation bzw. Infektion

In einem weiteren Vorversuch wurde die optimale Zeitdauer zwischen Stimulation bzw. Infektion einerseits und der Lyse der Zellen andererseits ermittelt. Es sollte sichergestellt werden, dass die Zellen zum Zeitpunkt der

Lyse eine ausreichend hohe, d.h. messbare, Luciferasemenge produzieren. Dazu wurden die Zellen transfiziert und nach einer Ruhephase von Stunden stimuliert bzw. infiziert. Es wurden je  $5 \times 10^6$  Zellen mit 80  $\mu\text{g}$  DEAE-Dextran und 5  $\mu\text{g}$  Plasmid transfiziert und nach einer Ruhezeit von 19 Stunden wurden die Zellen mit 100 ng/mL LPS stimuliert (Abb. 16A) oder mit 5 MOI A/PR/8 infiziert (Abb. 16B). Nach einer weiteren Inkubationszeit von 6, 12, 24 oder 36 Stunden wurden die Zellen lysiert und die Aktivität der Luciferase von jeweils  $10 \times 10^6$  Zellen durch Zugabe des Substrates und Messung der Lichtfreisetzung im Luminometer bestimmt. Dieser Versuch wurde mit dem Deletionskonstrukt -123 durchgeführt, da dieses anschließend als Referenz für andere Deletionskonstrukte verwendet werden sollte.

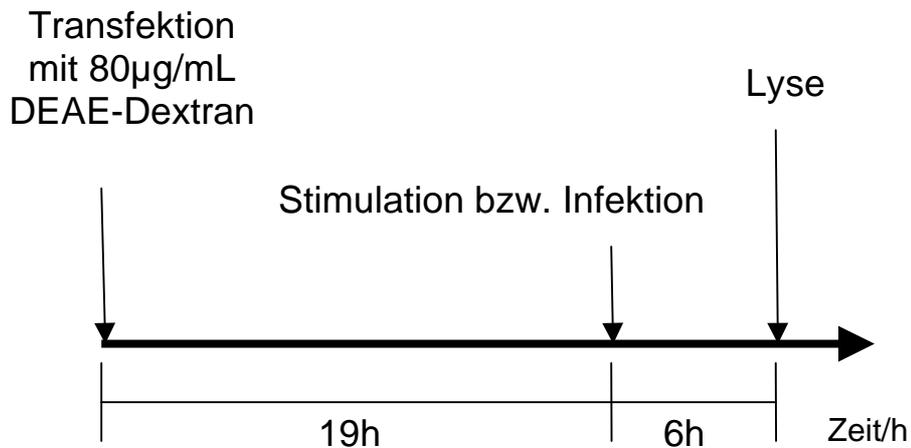


**Abbildung 16 (umseitig): Vergleich der Luciferase-Aktivitäten zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Stimulation bzw. Infektion der Zellen.**

Die Mono Mac 6-Zellen wurden mit dem Deletionskonstrukt -123 (5 µg DNA für je  $5 \times 10^6$  Zellen) nach der DEAE-Dextran-Methode transfiziert. Nach 19 h wurden die Zellen mit 100 ng/mL LPS stimuliert (**A**) bzw. mit 5 MOI A/PR/8 infiziert (**B**). Zu den angegebenen Zeitpunkten (6 h, 12 h, 24 h und 36 h) nach Stimulation bzw. Infektion wurden die Zellen lysiert und die Luciferase-Aktivität von je  $10 \times 10^6$  Zellen gemessen. Dargestellt sind Mittelwert und Standard-Abweichung als repräsentatives Ergebnis aus zwei unabhängigen Versuchen.

In diesem Modell ist die Luciferase-Aktivität ein Maß für die durch den Promotor induzierten Luciferase-Transkription. Es zeigte sich, dass bei der Stimulation mit LPS nur 6 h nach Stimulation eine Luciferase-Aktivität gemessen werden konnte (Abb. 16A). Bei der Infektion mit Influenza A-Virus war die Aktivität zum Zeitpunkt 6 h nach Infektion am höchsten, aber auch zum Zeitpunkt 12 h war noch eine messbare Aktivität vorhanden (Abb. 16B). Bei den folgenden Versuchen wurden die Zellen aufgrund dieser Ergebnisse 6 h nach Stimulation bzw. Infektion lysiert.

In Anbetracht der Ergebnisse der Vorversuche wurde das von Bußfeld verwendete Protokoll leicht abgeändert. Zusammenfassend wurden folgende Parameter für die folgenden Versuche angewendet: Die DEAE-Dextran-Transfektionen wurden mit einer Konzentration von 80 µg/mL durchgeführt. Vor der Stimulation mit LPS bzw. Infektion mit Influenza A/PR/8 wurde eine Ruhezeit von 19 h eingehalten. Die Lyse der Zellen erfolgte weitere 6 h nach der Stimulation bzw. Infektion der Zellen (s. Abb. 17).

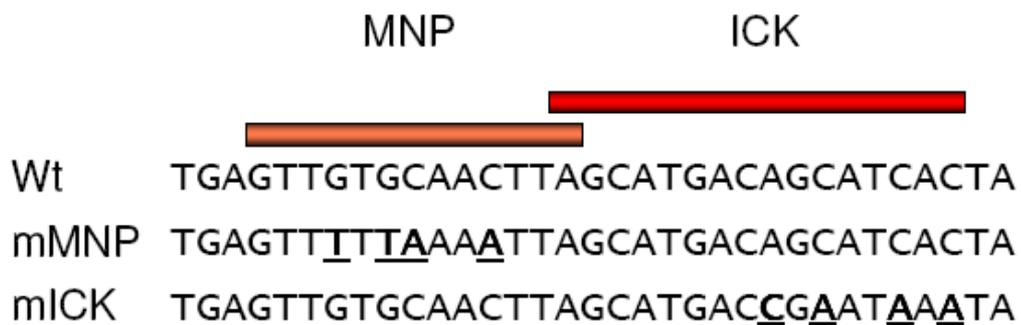


**Abbildung 17: Schematische Darstellung des Ablaufs der Transfektionsversuche.**

Die Mono Mac 6-Zellen werden mit den entsprechenden Plasmiden nach der DEAE-Dextran-Methode (80 µg/mL) transfiziert. Nach 19 h wurden die Zellen mit LPS stimuliert bzw. A/PR/8 infiziert. 6h danach werden sie lysiert und die Luciferase-Aktivität gemessen.

## 2.2. Mutation der Bindungsstellen für MNP und ICK-1

Um die Rolle der beiden Bindungsstellen MNP und ICK-1 bei der transkriptionellen Regulation des CCL3-Gens zu untersuchen, wurden zwei weitere Deletionskonstrukte (ausgehend von dem Konstrukt -123) erzeugt, bei denen die Basenpaare der Bindungsstellen des Transkriptionsfaktors MNP (mMNP) oder des Transkriptionsfaktors ICK-1 (mICK) mutiert waren, um so eine Bindung dieser Faktoren zu verhindern (s. Abb. 18). Mit Hilfe der so veränderten Konstrukte wurde anschließend untersucht, in welcher Weise die beiden *cis*-regulatorischen DNA-Sequenzen MNP und ICK-1 an der Regulation der Transkription des CCL3-Gens beteiligt sind.



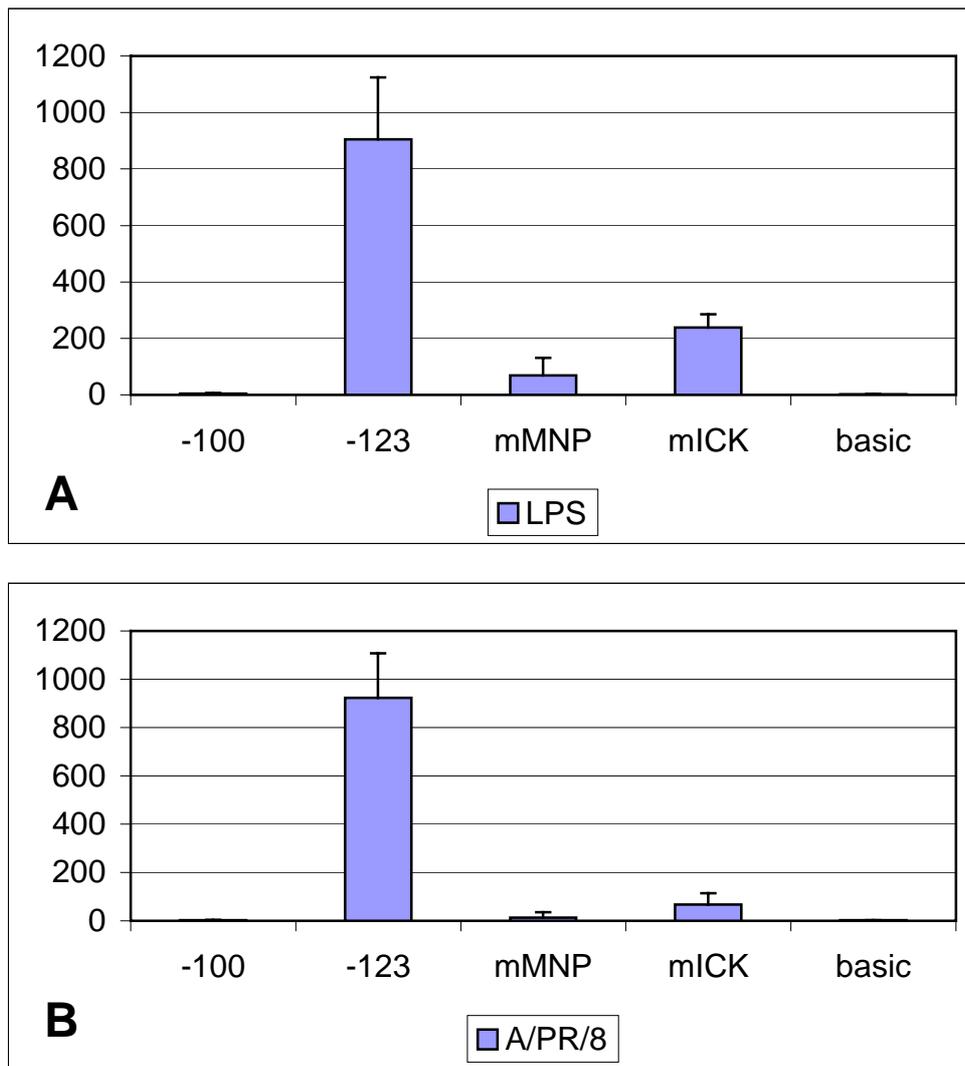
**Abbildung 18: Mutation der MNP- und ICK-1-Bindungsstellen.**

Die Bereiche, in denen die Faktoren MNP und ICK-1 binden, sind angegeben. Die Mutationen in den Konstrukten mMNP und mICK sind fettgedruckt und unterstrichen.

### 2.3. Ergebnisse der Transfektion mit den Deletionsmutanten mMNP und mICK

Mono Mac 6-Zellen wurden mit den Promotorkonstrukten -100 und -123, sowie den Konstrukten mMNP und mICK transfiziert. Die Konstrukte -100 und -123 enthalten den unveränderten CCL3-Promotorbereich, während die Konstrukte mMNP und mICK Punktmutationen beinhalten, die dazu führen, dass der entsprechende Faktor nicht mehr binden kann (Sharma et al., 1998). Als Kontrolle wurde der pGL3 basic-Vektor verwendet. Da dieser keinen Promotor vor dem Luciferase-Gen besitzt, sollte bei Transfektionen mit diesem Vektor keine Luciferase-Aktivität detektierbar sein.

Für diese Versuche wurden  $5 \times 10^6$  Mono Mac 6-Zellen mit 80 µg/mL DEAE-Dextran und 5 µg des entsprechenden Plasmids (-100,-123, mMNP, mICK oder des pGL3 basic-Vektors) transfiziert und für 19 h unter Standardbedingungen kultiviert. Anschließend wurden die Zellen für 6 h mit 100 ng/mL LPS stimuliert bzw. mit 5 MOI Influenza A/PR/8 infiziert. Im Anschluß an die Inkubationszeit wurden die Zellen lysiert und die Luciferase-Aktivität im Zelllysate gemessen. Die Luciferase-Aktivitäten der einzelnen Transfektions-Ansätze wurden auf den Proteingehalt des Zelllysats normiert.



**Abbildung 19: Transfektion mit den Konstrukten -100, -123, mMNP und mICK.**

Mono Mac 6-Zellen wurden mit dem pGL3 basic-Vektor (basic; Negativkontrolle) oder den Promotorkonstrukten -100, -123, mMNP und mICK mit 5 µg DNA für je  $5 \times 10^6$  Zellen transfiziert. Nach 19 h wurden die Zellen mit 100 ng/mL LPS stimuliert (A) bzw. mit 5 MOI A/PR/8 infiziert (B). Nach weiteren 6 h Inkubationszeit wurden die Zellen lysiert. Die Luciferase-Aktivitäten von je  $10 \times 10^6$  Zellen wurden gemessen und dem Proteingehalt der Lysate der Zellen entsprechend angeglichen. Dargestellt sind Mittelwert und Standard-Abweichung einer Dreifachbestimmung. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung als repräsentatives Ergebnis eines von vier unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

Die Abbildung 19 zeigt, dass die Induktion der Luciferase-Aktivität sowohl nach einer LPS-Stimulation als auch nach einer Infektion mit dem Influenza A-Virus von dem Vorhandensein der beiden intakten Bindungsstellen für MNP und ICK-1 abhängig ist. Bei Mutation der Bindungsstelle für MNP ist, sowohl

nach einer Stimulation mit LPS als auch einer Infektion mit Influenza A, im Vergleich zur Transfektion des Konstrukts -123 eine starke Reduktion der Luciferase-Aktivität zu sehen. Die Aktivität geht fast vollständig zurück. Auch die Mutation der ICK-1-Bindungsstelle führt zu einer starken Reduktion der Luciferase-Aktivität nach LPS-Stimulation oder Influenza A-Infektion. Diese ist jedoch weniger ausgeprägt als bei der Mutation der MNP-Bindungsstelle. Die Luciferase-Aktivität des mICK-Konstruktes nach LPS-Stimulation fällt auf unter 30% gegenüber dem Wildtyp-Promotor (im Deletionskonstrukt -123), bei Infektion mit Influenza A werden sogar nur weniger als 10% der Aktivität des Wildtyp-Promotors gemessen. Die Deletion beider Bindungsstellen im Deletionskonstrukt -100 führt zu keinerlei messbaren Luciferase-Aktivitäten. Wie erwartet zeigt sich auch in den Negativkontrollen keinerlei messbare Aktivität.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Mutationen der MNP- und ICK-1-Bindungsstellen eine starke Reduktion der Luciferase-Aktivität zur Folge hat. Dies lässt darauf schließen, dass die Faktoren, die an diesen beiden Bindungsstellen binden, synergistisch für die CCL3-Transkription wirken und beide Faktoren für eine optimale Induktion von CCL3 durch LPS oder das Influenza A-Virus essentiell sind.

### **3. Induktion von Transkriptionsfaktoren der IRF-Familie in Monozyten nach Influenza A-Infektion**

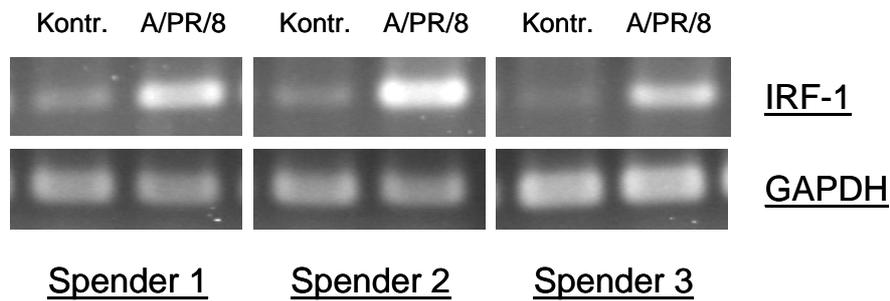
Für verschiedene Infektionsmodelle konnte bereits eine Beteiligung der Transkriptionsfaktoren der *Interferon regulatory factor*-Familie (IRF-Familie) nachgewiesen werden (Mamane et al., 1999; Taniguchi et al., 2002). Wie gezeigt werden konnte, spielen diese Faktoren eine zentrale Rolle bei der Aktivierung des Interferon-Systems und sind somit von essentieller Bedeutung für die Induktion und Koordinierung der folgenden Immunantwort. Der zuerst entdeckte Vertreter der IRF-Familie, IRF-1, ist nicht nur an der Induktion von Typ I-Interferonen beteiligt, sondern spielt auch eine wichtige Rolle bei der Regulation einer T<sub>H</sub>1-Antwort, u.a. über die Induktion des Zytokins IL-12 (Lohoff et al. 1997 und Salkowski et al. 2000). Darüber hinaus ist IRF-1 als

wichtiger Faktor bei der Zellzykluskontrolle und Apoptose in Tumorzellen und nicht-transformierten Zellen identifiziert worden (Kano et al. 1999 und Liebermann et al. 2002). Die Transkriptionsfaktoren IRF-3 und IRF-7 dagegen sind in ihrer Funktion mehr auf die Abwehr von Erregern beschränkt. Beide sind essentiell für die Induktion von Typ I-Interferonen (Sato et al. 2000) und IRF-3 ist zusätzlich an der Signaltransduktion über den *toll-like receptor 4* (TLR 4) beteiligt (Shinobu et al. 2002). Während die Faktoren IRF-1 und IRF-7 als Reaktion auf die Virusinfektion der Zelle auf mRNA- und Proteinebene induziert werden, wird IRF-3 hauptsächlich über seinen Phosphorylierungsstatus reguliert. In den folgenden Versuchen sollte die Induktion der Transkriptionsfaktoren IRF-1 und IRF-7 nach einer Infektion mit dem Influenza A-Virus in humanen Monozyten untersucht werden.

### **3.1. Analyse der Induktion des Gens für *Interferon regulatory factor-1* (IRF-1) in virusinfizierten Monozyten mittels RT-PCR**

Die Induktion von IRF-1 nach einer Influenza A-Infektion wurde mittels RT-PCR an primären Monozyten verschiedener Spender untersucht. Dazu wurde die RNA aus Influenza A/PR/8-infizierten Zellen isoliert und in cDNA umgeschrieben. Nicht infizierte Zellen dienten als Kontrolle. Das IRF-1-Fragment wurde mit einem spezifischen Primerpaar in einer PCR-Reaktion amplifiziert und nach elektrophoretischer Auftrennung im Agarosegel mit Hilfe einer Ethidiumbromidfärbung sichtbar gemacht.

Wie in Abbildung 20 dargestellt, zeigten die infizierten Monozyten einen erhöhten Gehalt an IRF-1-mRNA gegenüber den nicht infizierten Kontrollzellen. Von acht getesteten Spendern reagierten sieben in der dargestellten Weise positiv, d.h. zeigten eine Erhöhung der IRF-1-mRNA-Expression nach Influenza A-Infektion. Die Zellen von einem Spender reagierten mit einer Repression der IRF-1-mRNA gegenüber den nicht-infizierten Zellen (nicht gezeigt).



**Abbildung 20: Darstellung der mRNA von IRF-1 in humanen Monozyten nach Infektion mit Influenza A/PR/8.**

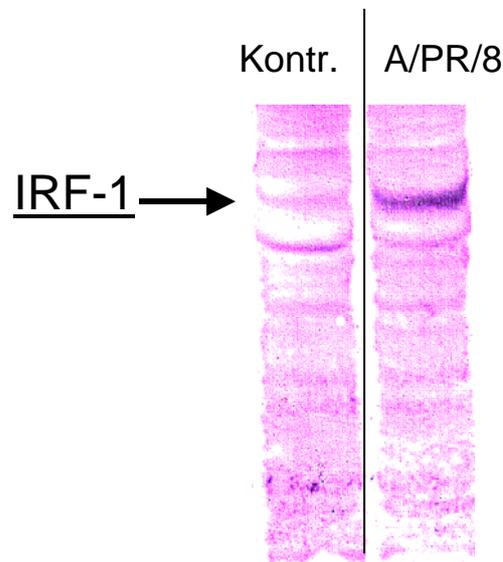
Humane Monozyten wurden mit Hilfe der *counter-flow*-Methode isoliert und in Teflongefäßen in RPMI<sup>sup</sup>-Medium kultiviert. Nach 1h wurden die Zellen mit 2 MOI Influenza A/PR/8 infiziert. 45 min nach der Infektion wurden 2 % AB-Serum zugegeben. Nach weiteren 8 h wurden die Zellen aus den Kulturgefäßen entnommen, lysiert und die Gesamt-RNA isoliert. 2 µg der RNA wurden in cDNA umgeschrieben und in einer PCR-Reaktion als *template* eingesetzt. Das durch die Verwendung spezifischer Primer amplifizierte IRF-1-Fragment (27 Zyklen PCR) wurde in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und durch eine Färbung mit Ethidiumbromid dargestellt. Zur Kontrolle der eingesetzten cDNA-Menge wurde auch das konstitutiv exprimierte GAPDH-Gen in einer weiteren PCR-Reaktion mit spezifischen Primern amplifiziert. Gezeigt ist das Ergebnis dreier repräsentativer Spender von insgesamt acht durchgeführten Untersuchungen.

**3.2. Analyse der IRF-1 Proteinexpression nach A/PR/8-Infektion von Monozyten im Western-Blot**

Um die mRNA-Daten der RT-PCR weiter zu verifizieren, wurde weiterhin der IRF-1-Gehalt von A/PR/8-infizierten Zellen der Zelllinie Mono Mac 6 mittels Western-Blot analysiert. Die Mono Mac 6-Zellen wurden dazu für 16 h mit 5 MOI A/PR/8 infiziert und anschließend lysiert. 30 µg des isolierten Gesamt-Proteins der Zellen wurden in einem Polyacrylamid-Gradientengel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Über ein System aus Erst- und Zweitantikörpern und eine anschließende chromogene Reaktion wurde die spezifische Bande des IRF-1 Proteins auf der Membran sichtbar gemacht.

Wie in Abbildung 20 gezeigt, konnte auch auf Proteinebene eine erhöhte IRF-1-Expression in den Influenza A-infizierten Zellen gegenüber den nicht-

infizierten Kontrollzellen nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis korreliert mit den Daten der primären Monozyten, die auf mRNA-Ebene eine verstärkte Expression von IRF-1 nach Influenza-Infektion zeigten.



**Abbildung 21: Darstellung des IRF-1-Proteingehalts in Mono Mac 6-Zellen nach Infektion mit Influenza A/PR/8.**

Die Mono Mac 6-Zellen wurden in RPMI<sup>OPI</sup>-Medium mit 10% FCS kultiviert und mit 5 MOI Influenza A/PR/8 infiziert. Nach einer Inkubationszeit von 16 h wurden die Zellen aus den Kulturgefäßen entnommen, lysiert und das Gesamtprotein mit einer Extraktionslösung isoliert. 30 µg Protein wurden in einem Polyacrylamid-Gradientengel aufgetrennt und mittels Elektroblothing auf eine PVDF-Membran übertragen. Die spezifische Bande wurde über einen monoklonalen Antikörper, einen Enzym-gekoppelten 2. Antikörper und eine anschließende chromogene Reaktion dargestellt.

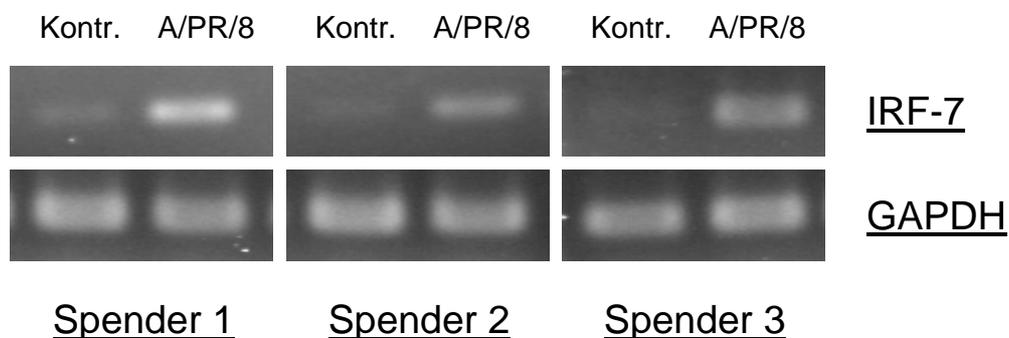
**3.3. Analyse der Induktion des Gens für IRF-7 in virusinfizierten Monozyten mittels RT-PCR**

Neben IRF-1 ist IRF-7 einer der wichtigsten Mitglieder der IRF-Familie bei der Vermittlung einer zellulären Reaktion auf Virusinfektion. Daher sollte überprüft werden, ob auch IRF-7 durch das Influenza A/PR/8-Virus in Monozyten induziert werden kann.

Die Kultivierung und Infektion der Zellen, sowie die anschließende Isolation der mRNA erfolgte wie unter Methoden (2.6.1.) beschrieben. Die mit

spezifischen Primern amplifizierte Bande wurde dann in einem 1%-igen Agarosegel aufgetrennt und mit einer Ethidiumbromid-Färbung sichtbar gemacht.

IRF-7, das zeigt die Abbildung 22, wird ebenso wie IRF-1 durch das Influenza A-Virus induziert. Gezeigt sind drei repräsentative Ergebnisse von insgesamt acht untersuchten Spendern. Die Zellen des Spenders, der schon für IRF-1 eine Repression zeigte, verhielten sich auch bei der Analyse der IRF-7-mRNA entsprechend: gegenüber den nicht-infizierten Kontrollzellen war eine Abnahme an IRF-7-mRNA zu sehen.



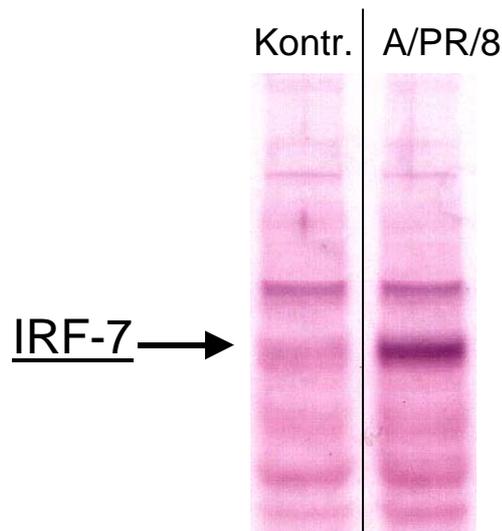
**Abbildung 22: Darstellung der mRNA von IRF-7 in humanen Monozyten nach Infektion mit Influenza A/PR/8.**

Mit Hilfe der *counter-flow*-Methode wurden humane Monozyten isoliert. Diese wurden in RPMI<sup>sup</sup>-Medium in Teflongefäßen inkubiert und nach 1 h für 45 min mit 2 MOI Influenza A/PR/8 infiziert. Anschließend wurden 2 % AB-Serum zugegeben und die Zellen für weitere 8 h inkubiert. Dann wurden sie aus den Kulturgefäßen entnommen, lysiert und die Gesamt-RNA isoliert. 2 µg der RNA wurden in cDNA umgeschrieben und dienten in einer nachfolgenden PCR-Reaktion als template. Das durch die Verwendung spezifischer Primer in 31 Zyklen amplifizierte IRF-7-Fragment wurde in einem 1%-igen Agarosegel aufgetrennt und durch eine Färbung mit Ethidiumbromid dargestellt. Zur Kontrolle der eingesetzten cDNA-Menge wurde auch das konstitutiv exprimierte GAPDH-Gen in einer weiteren PCR-Reaktion mit spezifischen Primern amplifiziert und in einem Agarosegel dargestellt. Gezeigt sind die repräsentativen Ergebnisse von drei von insgesamt acht untersuchten Spendern.

### 3.4. Analyse der IRF-7 Proteinexpression nach A/PR/8-Infektion von Monozyten im Western-Blot

Da die Menge an mRNA eines bestimmten Proteins in der Zelle nicht notwendigerweise direkt proportional zu der Menge des Proteins ist, wurde als Ergänzung zu den mRNA-Daten der RT-PCR ein Western-Blot mit Protein aus Mono Mac 6-Zellen durchgeführt. Die Kultivierung und Infektion der Zellen erfolgte wie unter 2.4. beschrieben. Ebenso die Isolation des Gesamtproteins der Zellen und die Auftrennung in einem Polyacrylamid-Gradientengel. Die spezifische Bande wurde dann mit Hilfe eines IRF-7- spezifischen monoklonalen Antikörpers und einer anschließenden enzymatischen chromogenen Reaktion dargestellt.

Wie Abbildung 23 zeigt, ist nur bei den mit Influenza A/PR/8 infizierten Zellen eine deutliche Bande auf dem Western-Blot zu sehen. Das heißt, dass der Transkriptionsfaktor IRF-7 auch auf Proteinebene durch eine Influenza-Infektion von Monozyten induziert wird.



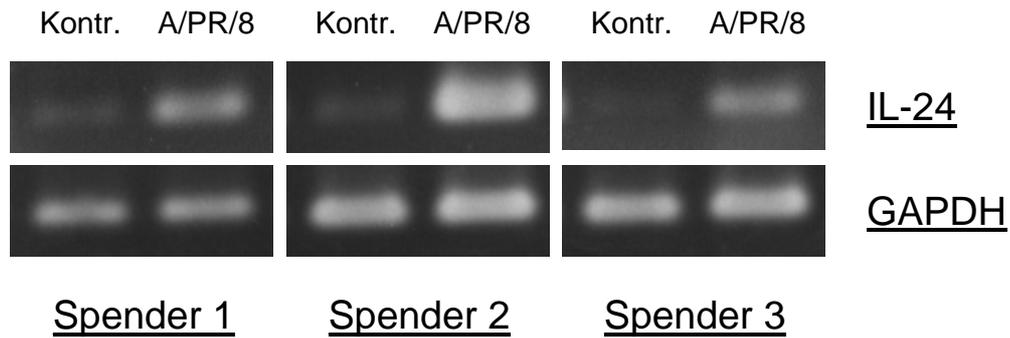
**Abbildung 23: Darstellung des IRF-7-Proteingehalts in Mono Mac 6-Zellen nach Infektion mit Influenza A/PR/8.**

Nach Kultivierung von Mono Mac 6-Zellen mit 10% FCS kultiviert wurden diese für 16 h mit 5 MOI Influenza A/PR/8 infiziert. Im Anschluß wurden die Zellen aus den Kulturgefäßen entnommen, lysiert und das gesamte Protein mittels einer Extraktionslösung isoliert. Je Versuchsansatz wurden 30 µg Protein in einem Polyacrylamid-Gradientengel aufgetrennt und im Elektroblob-Verfahren auf eine PVDF-Membran übertragen. Die spezifische Bande wurde über einen monoklonalen Antikörper, einen Enzym-gekoppelten 2. Antikörper und eine anschließende enzymatische chromogene Reaktion dargestellt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die beiden Transkriptionsfaktoren IRF-1 und IRF-7, von denen bekannt war, dass sie durch andere Virusinfektionen induziert werden, auch durch eine Influenza A/PR/8-Infektion induzierbar sind. Eine Induktion konnte sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Protein-Ebene gezeigt werden.

#### **4. Induktion des Zytokins mda-7/IL-24 in Monozyten nach Influenza A-Infektion**

Das Zytokin Interleukin-10 (IL-10) ist eines der wichtigsten regulatorischen Zytokine und übt hauptsächlich anti-inflammatorische Funktionen aus (Moore et al. 2001). Inzwischen ist eine Reihe von Molekülen entdeckt worden, die auf DNA- und Proteinebene große Homologien zu IL-10 aufweisen (Fickenscher et al. 2002). Eines dieser Moleküle ist das Zytokin IL-24, das als *melanoma differentiation-associated antigene-7* (mda-7) aus einer Melanom-Zelllinie isoliert wurde. Es inhibiert nicht nur das Wachstum und fördert die Apoptose von Tumorzellen (Su et al. 1998 und Pataer et al. 2002), sondern bewirkt bei humanen mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut (PBMCs) auch eine Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen wie IL-6, TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  (Caudell et al. 2002). Eine verstärkte Freisetzung von IL-24 aus PBMCs konnte auch nach Stimulation dieser Zellen mit LPS beobachtet werden. Insbesondere die Tatsache, dass IL-24 durch eine IFN- $\beta$ -Stimulation in Fibroblasten induziert werden kann (Madireddi et al. 2000), legte die Vermutung nahe, dass auch eine Virusinfektion dieses Zytokin induzieren könnte. Deshalb wurde die Induktion von IL-24-mRNA nach einer Influenza A-Infektion von Monozyten untersucht. Die Kultivierung und Infektion der Zellen, sowie die anschließende Isolation der mRNA erfolgte wie unter Methoden (2.4.6. und 2.6.1.) beschrieben. Die mit spezifischen Primern amplifizierte Bande der IL-24-mRNA wurde in einem 1%-igen Agarosegel aufgetrennt und mit einer Ethidiumbromid-Färbung sichtbar gemacht.



**Abbildung 24: Darstellung der mRNA von IL-24 in humanen Monozyten nach Infektion mit Influenza A/PR/8.**

Humane Monozyten wurden mit Hilfe der *counter-flow*-Methode isoliert und in nach Elutriation in RPMI<sup>sup</sup>-Medium inkubiert. Nach 1 h Kulturdauer wurden die Zellen für 45 min mit 2 MOI Influenza A/PR/8 infiziert. Anschließend wurden 2 % AB-Serum zugegeben. Nach weiteren 8 h wurden die Zellen aus den Kulturgefäßen entnommen, lysiert und die Gesamt-RNA isoliert. Von dieser RNA wurden 2 µg in cDNA umgeschrieben und in einer PCR-Reaktion als *template* eingesetzt. Unter Verwendung spezifischer Primer wurde das IL-24-Fragment amplifiziert und in einem 1%-igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Banden wurden durch eine Färbung mit Ethidiumbromid dargestellt. Zur Kontrolle der eingesetzten cDNA-Menge wurde auch das konstitutiv exprimierte GAPDH-Gen in einer weiteren PCR-Reaktion mit spezifischen Primern amplifiziert und in einem Agarosegel dargestellt. Gezeigt sind die repräsentativen Resultate für drei von acht untersuchten Spendern.

Die Ergebnisse der durchgeführten Versuche bestätigten die Erwartungen: Wie in Abb. 24 dargestellt, induziert die Infektion von Monozyten mit dem Influenza A-Virus eine vermehrte Produktion von IL-24-mRNA. Im Vergleich zu den nicht infizierten Zellen, die nur eine geringe Menge an IL-24 mRNA aufweisen, kam es acht Stunden nach A/PR/8-Infektion in primären Monozyten zu einer deutlichen Zunahme der transkribierten IL-24 mRNA-Menge.

## IV. Diskussion

Zur Bekämpfung und Elimination von Mikroorganismen setzt das angeborene Immunsystem phagozytierende Zellen und lösliche Serumproteine ein. Dabei hat das mononukleäre Phagozyten-System zwei wichtige Funktionen: Zum einen werden Antigene durch Phagozytose und Endozytose eliminiert, zum anderen wird durch die Prozessierung und Präsentation dieser Antigene auf der Zelloberfläche das erworbene Immunsystem aktiviert. Bei einer Infektion mit dem Influenza A-Virus bindet das Virus vor allem an Typ II Pneumozyten, das Epithel der terminalen Bronchioli, und an Alveolarmakrophagen (van Riel et al., 2006). Im Verlauf kommt es zu einem mononukleären Infiltrat und damit zu einem großen Einstrom von neuen Monozyten/Makrophagen (Davidson et al., 2005). Auch primäre Monozyten werden von Influenza A-Viren schnell infiziert (Bußfeld et al., 1996; Bußfeld et al., 1997; Sareneva et al., 1998; Pirhonen et al., 1999). In den infizierten Zellen kontrollieren die Viren die zelluläre Genexpression, was zu einer bevorzugten Expression viraler Proteine führt (Huarte et al., 2001). Die infizierten humanen Monozyten und Makrophagen sterben zwar nach 24-48 Stunden durch Apoptose (Nain et al., 1990; Fesq et al., 1994), aber vorher wird durch eine verstärkte Produktion und Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen das Immunsystem aktiviert (Julkunen et al., 2001; Kaufmann et al., 2001, Kobasa et al. 2007; de Jong 2006). Diese verstärkte Transkription von Chemokinen wurde auch bei Influenza A-infizierten Mäusen beobachtet (Wareing et al., 2004). Neben IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$  werden vor allem Chemokine sezerniert und spielen als regulatorische Signale der Immunantwort eine zentrale Rolle (Bußfeld et al., 1997; Sprenger et al., 1996). Deshalb kommt infizierten Monozyten und Makrophagen eine besondere Rolle zu: sie dienen als Verstärker der Immunantwort.

Auffällig ist, dass infizierte Monozyten Chemokine nur selektiv freisetzen. Es werden ausschließlich die auf mononukleäre Zellen wirkenden CC-Chemokine verstärkt sezerniert, während die Sekretion von Chemokinen, die auf neutrophile Granulozyten wirken (CXCL1 und CXCL8) durch das Virus deutlich supprimiert wird (Sprenger et al., 1996). Diese differenzierte Induktion könnte dafür verantwortlich sein, dass man im Influenza A-infizierten Lungengewebe überwiegend mononukleäre Leukozyten vorfindet (Kaufmann et al., 2001). Bei

infizierten dendritischen Zellen gibt es Hinweise auf eine zeitliche Abfolge der Chemokinsekretion, die zuerst CXC-Chemokine (v.a. CXCL8, CXCL16) und dann im weiteren Verlauf erst CC-Chemokine (v.a. CCL3, CCL4) umfasst (Piqueras et al., 2006).

Die beiden CC-Chemokine CCL2 und CCL3 spielen dabei unterschiedliche Rollen. Genetisch veränderte Knock-out Mäuse, denen der Rezeptor für CCL2 (CCR2) fehlt, scheinen bei einer Influenza A-Infektion durch die fehlende Einwanderung von Monozyten und Makrophagen vor einer zu hohen oder schädlichen Zytokinausschüttung geschützt zu sein (Dawson et al., 2000). Eine Ursache dafür könnte sein, dass Monozyten ohne den CCR2-Rezeptor das Knochenmark nicht verlassen können (Rollins, 2006). Eine unkontrollierte Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen könnte auch eine Ursache für die hohe Virulenz einiger Influenza-Stämme, wie z.B. dem der sogenannten „spanischen Grippe“ 1918 (H5N1) und des Ausbruchs in Hong Kong von 1997 (A/Hong Kong/483/97; H5N1) sein (Cheung et al., 2002, Kobasa et al. 2007; de Jong 2006). Zudem zeigen Monozyten/Makrophagen aus Erwachsenen im Vergleich zu Neugeborenen eine erhöhte Sekretion von CCL3, wenn sie mit dem virulenten Influenza H5N1-Stamm infiziert werden (Zhou et al., 2006). In Korrelation dazu zeigten Erwachsene beim Ausbruch der Hong Kong-Grippe 1997 eine höhere Mortalität als Kinder und Kleinkinder (Yuen et al., 1998). Aber auch für die durch Influenza verursachte Bronchiolitis bei Kindern gilt: eine höhere CCL3-Konzentration im Nasopharyngealsekret der Kinder ist assoziiert mit einer schwereren Verlaufsform und ausgeprägterer Hypoxie (Garofalo et al., 2005). Eine experimentelle Infektion von Mäusen mit dem hochvirulenten, genetisch rekonstruierten Influenza A H1N1 der Pandemie von 1918 (1918 HA/NA:Tx/91) zeigte eine deutlich höhere CCL3-Produktion als das ursprüngliche Influenza A/Texas/36/91 Virus, das als genetischer Hintergrund diente (Tumpey et al., 2005).

Wird dagegen das Gen für den CCL3/CCL5-Rezeptor CCR5 ausgeschaltet, so zeigen die knock-out-Mäuse eine schwerere Verlaufsform der Infektion mit erhöhter Mortalität (Dawson et al., 2000). Ein Grund dafür könnte sein, dass CD4<sup>+</sup> T-Zellen zumindest vorübergehend den Chemokin-Rezeptor CCR5 exprimieren und so zum Ort der Infektion geleitet werden (Roman et al., 2002). Es gibt auch Hinweise darauf, dass CCL3 für eine effektive zytotoxische

Immunantwort durch CD8<sup>+</sup> T-Zellen benötigt wird (Jones et al., 2003). Insbesondere das Zusammenspiel von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen wird durch die Chemokine CCL3 und CCL4 koordiniert und eine experimentelle Blockierung dieser Chemokine führt zu einer deutlich reduzierten Anzahl und Effektivität von CD8<sup>+</sup> Gedächtnis-T-Zellen (Castellino et al., 2006).

Aber nicht nur für Influenza-Infektionen hat das Chemokin CCL3 eine große Bedeutung. Für eine Infektion von Mäusen mit dem murinen Zytomegalievirus (CMV) konnte gezeigt werden, dass CCL3 als wichtiger Faktor sowohl an der Chemotaxis und Aktivierung von NK-Zellen als auch an der Elimination des Virus beteiligt ist (Salazar-Mather et al., 1998). Im CMV-Modell ist CCL3 in eine Chemokin-Zytokin-Chemokin-Kaskade eingebunden, die über eine CCL3 vermittelte IFN- $\gamma$ -Freisetzung das zur antiviralen Abwehr benötigte Chemokin CXCL9 induziert (Salazar-Mather et al., 2000).

Bei einer viralen Infektion von Zellen, z.B. mit dem Influenza A-Virus, werden intrazelluläre Signalwege und Transkriptionsfaktoren aktiviert oder inhibiert und so verschiedenste Abläufe in den infizierten Zellen beeinflusst. Studien fanden heraus, dass bei einer Infektion von primären Zellen oder Zelllinien mit replikationsfähigen Influenza-Viren einige Stunden nach Infektion mehr als 300 Gene induziert oder supprimiert wurden (Geiss et al., 2001), unter denen sich auch CCL3 und die entsprechenden Chemokinrezeptoren CCR2 und CCR5 befanden (Salentin et al., 2003). Die *de novo*-Synthese von Proteinen wie Zytokinen und Chemokinen hängt dabei, neben Regulationsmechanismen auf mRNA-Ebene, stark von der Transkription und Translation ihrer Gene ab. Die genauen Mechanismen und Signalwege, die bei einer Infektion von Zellen mit dem Influenza A-Virus zur verstärkten Produktion und Sekretion von Zytokinen und Chemokinen führen, sind nur teilweise erforscht. Mehrere bekannte Transkriptionsfaktoren werden durch eine Influenza A-Infektion aktiviert oder neu synthetisiert. So kann beispielsweise der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B, der für die Transkription mehrerer Zytokine und Chemokine eine wichtige Rolle spielt, durch Influenza A oder die Expression eines Influenza A-Proteins aktiviert werden (Pahl und Bäumler, 1995; Matikainen et al., 2000; Flory et al., 2000). Neben NF- $\kappa$ B scheint C/EBP $\beta$  ein Transkriptionsfaktor zu sein, der durch viele infektiöse Stimuli aktivierbar ist und daraufhin die Transkription mehrerer Zytokingene reguliert (Ramji und Foka 2002). Insbesondere bei einer viralen

Infektion werden, neben den Transkriptionsfaktoren der IRF-Familie, auch die Gene der Transkriptionsfaktoren AP-1 und C/EBP $\beta$  aktiviert bzw. findet eine verstärkte Neusynthese dieser Proteine statt (Choi et al., 1996; Wang et al., 2000; Ludwig et al., 2001; Kalden, 2002).

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der molekularen Mechanismen, die bei einer Infektion von Monozyten mit dem Influenza A-Virus zur Induktion von Zytokinen und Chemokinen führen. Von besonderem Interesse war dabei das Chemokin CCL3 und die Faktoren, die seine Transkription regulieren. Darüber hinaus sollte auch die Induktion von Faktoren der IRF-Familie untersucht werden. Diese spielen bei viralen Infektionen eine wichtige Rolle in der Aktivierung des Immunsystems, wie am Beispiel des Chemokins CCL5 gezeigt werden konnte (Lin et al., 1999; Genin et al., 2000).

### **1. Regulation des CCL3-Gens durch die Faktoren MNP und ICK-1**

Bußfeld hatte die Regulation von CCL3 nach einer Stimulation mit LPS und für eine Infektion mit dem Influenza A-Virus bereits teilweise untersucht (Bußfeld, 1997). Bei diesen Arbeiten mit sequentiellen Deletionen des CCL3-Promotors wurde der Promotorabschnitt von -776 bp bis zur Stelle -41 bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts näher analysiert. Es zeigte sich, dass sowohl für eine Stimulation mit LPS als auch für eine Infektion mit dem Influenza A-Virus der Promotorabschnitt -123 bp bis -100 bp eine essentielle Rolle für die Transkription des CCL3-Gens spielt (Bußfeld, 1997). Dieser Promotorabschnitt muss demzufolge Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren besitzen, die an dieser Regulation beteiligt sind. Dies wird durch die Tatsache unterstrichen, dass die proximalen Promotorsequenzen des CCL3-Gens (bis zu -350 bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts) bei Mensch und Maus hoch konserviert sind (Grove et al., 1990; Nakao et al., 1990; Widmer et al., 1991).

Ausgehend von diesen Ergebnissen, war es ein Ziel dieser Arbeit, weitere Erkenntnisse über die transkriptionelle Regulation der Genexpression bei Influenza A/PR/8-infizierten Zellen zu gewinnen. Insbesondere sollte dabei die Rolle des Promotorabschnittes -123 bis -100 genauer untersucht werden. In diesem Abschnitt wurden die *cis*-regulatorischen DNA-Sequenzen MNP (steht für *MIP-1 $\alpha$  nuclear protein*) und ICK-1 (*inhibitory cytokine-1*) identifiziert, welche

mögliche Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren für Transkriptionsfaktoren darstellen (Nomiyama et al. 1993 und Ritter et al. 1995). Durch die Deletion dieses Promotorabschnittes wurden die Bindungsstellen dieser Faktoren ganz (MNP) oder teilweise (ICK-1) entfernt. Beide *cis*-regulatorischen DNA-Elemente waren somit Kandidaten für die Stimulus-abhängige Regulation der CCL3-Transkription nach LPS-Stimulation bzw. Influenza A/PR/8-Infektion.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit in bezug auf die Promotorkonstrukte mMNP und mICK, welche Mutationen in den DNA-Sequenzen der Bindungsstellen MNP und ICK-1 enthalten, haben gezeigt, dass diese beiden *cis*-regulatorischen Sequenzen synergistisch zur Induktion von MIP-1alpha beitragen (s. Ergebnisse 2.3.). Zwar hat die Mutation der MNP-Sequenz einen stärkeren Abfall der Luciferase-Aktivität zur Folge als die Mutation von ICK-1, der Unterschied ist aber nur gering. Im Vergleich zu dem Promotorkonstrukt -123, welches die beiden intakten Sequenzen MNP und ICK-1 enthält, führt die Mutation einer der beiden Bindungsstellen jeweils zu einer starken Reduktion der Luciferase-Aktivität. Dies trifft sowohl für die LPS-Stimulation als auch für die Influenza A-Virusinfektion zu. In beiden Fällen wirkten die an den jeweiligen Sequenzen bindenden Transkriptionsfaktoren synergistisch für eine Transkription des CCL3-Gens, d.h. beide Faktoren sind für eine optimale Transkription des Gens notwendig. Die Tatsache, dass beide Sequenzen sowohl nach einer LPS-Stimulation als auch nach einer Infektion mit dem Influenza A-Virus regulatorisch aktiv sind, legt nahe, dass diese PAMPs (*pathogen associated molecular patterns*) zu einer allgemeinen Aktivierung von Monozyten/Makrophagen führen, zu der auch die Induktion des Chemokins CCL3 gehört. Für dendritische Zellen wurde bereits durch eine globale Analyse von transkribierten Genen gezeigt, dass eine Stimulation mit LPS oder Candida-Hefen oder eine Infektion mit Influenza A-Viren einerseits immer eine Gruppe bestimmter Gene aktiviert, andererseits bestimmte andere Gene aber nur durch eine dieser Stimuli induziert werden (Huang et al. 2001). Diejenigen Gene, die in allen drei Fällen der Infektion bzw. Stimulation induziert werden, wurden von den Autoren zur sogenannten Kernantwort (*core response*) gezählt.

Auch die Faktoren, welche an der transkriptionellen Regulation des CCL3-Gens im Bereich der Sequenzen MNP und ICK-1 beteiligt sind, scheinen im Rahmen einer solchen Kernantwort aktiviert zu werden. An beiden Sequenzen binden

Faktoren, die eine essentielle Rolle für die Induktion von CCL3 nach einer LPS-Stimulation oder einer Influenza A-Infektion spielen. Diese Faktoren sind aber noch nicht identifiziert worden. Für eine definitive Identifizierung der bindenden Faktoren müssten weitere Experimente durchgeführt werden, wie z.B. Supershifts oder Chip-Assays, die die Identität der beteiligten Faktoren über Antikörper nachweisen können. Es gibt jedoch Hinweise auf Transkriptionsfaktoren wie C/EBP $\beta$  (*CCAAT-enhancer binding protein  $\beta$* ) und YY-1 (*Yin-Yang-1*), die an diesen Sequenzen binden könnten.

### 1.1. Die *cis*-regulatorische Sequenz ICK-1

#### 1.1.1. Die Ähnlichkeit der regulatorischen Sequenzen ICK-1 und NIP

In der vorliegenden Arbeit wird die Bedeutung der ICK-1-Sequenz für die transkriptionelle Regulation des CCL3-Gens klar: eine Deletion dieser *cis*-regulatorischen Sequenz innerhalb des CCL3-Promotors führt zu einer drastischen Reduktion der transkriptionellen Aktivität der Reportergenkonstrukte. Es ist jedoch noch unklar, welche Faktoren an der ICK-1-Sequenz binden können. Schon in der ersten Arbeit zur transkriptionellen Regulation des CCL3-Gens wurden mit Hilfe von Promotorstudien mittels Deletionskonstrukten, DNaseI footprints, Gelshifts und Methylierungs-Interferenz-Assays regulatorische DNA-Sequenzen identifiziert, die für die Transkription des Gens nach einer Stimulation mit Mitogenen von Bedeutung sind (Nomiyama et al. 1993). Eine dieser Sequenzen, die die Autoren ICK-1 (*inhibitory cytokine-1*) nannten, wies eine im DNaseI footprint geschützte Sequenz auf (5'-AGCATGACAGCAT-3'), die starke Ähnlichkeit mit einer NIP (*nuclear inhibitory protein*) genannten Sequenz (5'-AGCATGGCAGCAG-3') im IL-3-Promotor hat. Die NIP-Sequenz war von Mathey-Prevot et al. als starker Repressor der IL-3-Transkription identifiziert worden (Mathey-Prevot et al., 1990). Die ICK-1-Sequenz kommt ebenfalls – allerdings weniger stark homolog als bei NIP – im Promotor des murinen GM-CSF vor (5'-ACCATTA\*ATCAT-3') (s. Abbildung 25). Zum damaligen Zeitpunkt waren jedoch keine Transkriptionsfaktoren identifiziert worden, die an diese *cis*-regulatorische Sequenzen binden und deshalb möglicherweise auch als Transkriptionsfaktoren an der ICK-1-Sequenz des CCL3-Gens regulatorisch aktiv sein könnten.

An der ICK-1-Sequenz im CCL3-Promotor wiesen Nomiyama et al. im Gelshift die Bindung von drei spezifischen Protein-DNA-Komplexen (ICK-1A bis C) nach (Nomiyama et al., 1993). Während ICK-1B als positiv regulierender Faktor wirkt, wird ICK-1A eine repressorische Aktivität zugeschrieben. Dies kann entweder durch Kompetition mit den positiv regulierenden Faktoren an der ICK-1 Stelle geschehen oder durch Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren. Über ICK-1C, den dritten Protein-DNA-Komplex, der an der ICK-Sequenz gebildet werden kann, konnte bisher keine Aussage bezüglich seiner Funktion gemacht werden. Die Tatsache, dass im Gelshift von den drei Komplexen nur ICK-1A und NIP im IL-3-Promotor auf derselben Höhe laufen, legt nahe, dass es sich bei den NIP und ICK-1A benannten Faktoren um dasselbe inhibitorische Protein handeln könnte. Zudem zeigten die Methylierungs-Interferenz-Analysen der NIP-Sequenz des IL-3-Promotors und der ICK-1-Sequenz des CCL3-Gens, dass die DNA-Kontaktpunkte bei beiden Stellen identisch sind (NIP: 5'-AGCATGGCAGCA-3', CCL3: 5'-AGCATGACAGCA-3'). Obwohl also die Faktoren, die die Komplexe ICK-1A und NIP bilden, Repressoraktivität besitzen, sind sie wahrscheinliche Kandidaten für eine Bindung an die ICK-1-Sequenz im CCL3-Gen. Die unterschiedliche Funktion der *cis*-regulatorischen Sequenz ICK-1 in den Experimenten von Nomiyama und Mathey-Prevot (negativ regulatorisch) und den in dieser Arbeit vorliegenden Resultaten (positiv regulatorisch) könnte erklärt werden, wenn man in Betracht zieht, dass sowohl unterschiedliche Stimuli als auch unterschiedliche Zellen für diese Experimente verwendet wurden. Bei Stimulation von Monozyten mit LPS oder einer Infektion von Monozyten mit dem Influenza A-Virus könnten andere Transkriptionsfaktoren aktiviert werden, als bei der Stimulation der nicht-myelozytären Zelllinien K562, Jurkat und MLA 144 mit Mitogenen wie bei Nomiyama et al. bzw. bei Mathey-Prevot et al. Hier könnten Stimulus- und Zelltyp-spezifische Unterschiede in der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren die Induktion des CCL3-Gens und die Funktion der ICK-1-Sequenz beeinflussen.

ICK



CCL3	TGAGTTGTGCAACTT <u>AGCATGACAGCAT</u> CACTA
IL3-NIP	<u>AGCATGGCAGCAG</u>
muGM-CSF	<u>ACCATTA</u> * <u>ATCAT</u>

**Abbildung 25: Vergleich der homologen Sequenzen von CCL3, IL-3 und dem murinen GM-CSF.**

Dargestellt ist der Bereich –123 bis –91 des CCL3-Promotors. Die homologen Sequenzen im IL-3-Promotor (NIP-Sequenz) und im murinen GM-CSF-Promotor sind eingezeichnet. Übereinstimmende Sequenzen sind unterstrichen. Im murinen GM-CSF-Promotor ist das Motiv um eine Base verkürzt (\*).

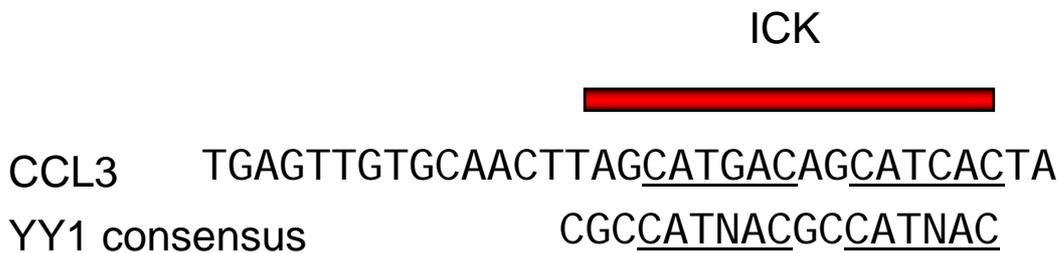
Engeland et al. führten Gelshifts durch, um die Identität der an der ICK-1-Sequenz bindenden Proteine bzw. des Proteinkomplexes aufzuklären (Engeland et al., 1995). Dabei wurden zwei Protein-DNA-Komplexe identifiziert, von denen einer zur USF (*upstream stimulating factor*) Familie gehören könnte, da sich mit einem entsprechenden Antikörper ein schwacher Supershift ergab. Gerade dieser Komplex war jedoch nicht für die NIP und ICK-1A zugeschriebene Repressoraktivität verantwortlich und scheint deshalb auch als regulatorischer Transkriptionsfaktor für das CCL3-Gen auszuschließen. Auch hier könnte aber eine kompetitive Bindung dieser zwei Komplexe oder der Einfluß weiterer Transkriptionsfaktoren die Bindung an die NIP-Sequenz beeinflussen und so eine Kontrolle der Transkription bewirken.

Weitere Experimente mit dem IL-3-Promotor von Ye et al. gingen von Vorergebnissen über ein *silencer element* aus dem IFN- $\gamma$  Promotor aus (Ye et al., 1996): Dort war gezeigt worden, dass der ubiquitäre Transkriptionsfaktor YY1 (Yin-Yang 1) und ein Protein, welches AP-2 ähnliche Sequenzen erkennt, zusammen die mRNA-Synthese von IFN- $\gamma$  regulieren. Da die Ähnlichkeit der NIP-Sequenz des IL-3-Promotors (5'-TGCTGCCATGCTT-3') zur AP-2

Konsensussequenz (5'-CCCAGGCT-3') auffallend groß war, wandten sich Ye et al. dem NIP-Element des IL-3-Promoters zu (Ye et al., 1999). In diesen Experimenten konnten zwei Protein-DNA-Komplexe identifiziert werden (A und B), die sich nach Stimulation von Jurkat-Zellen mit Mitogenen am NIP-Element bildeten. Obwohl der Komplex A mit ungelabeltem NIP-Oligonukleotid und einem AP-2 Konsensus-Oligonukleotid kompetitiv verdrängt werden konnte, war ein Supershift mit einem AP-2 Antikörper nicht möglich. Eine Mutation, die die Bildung dieses Komplexes A verhinderte, zeigte einen Verlust der NIP-Repressoraktivität und legt deshalb nahe, dass es sich bei diesem Komplex A um den Repressor ICK-1A/NIP handeln könnte.

Der zweite Komplex (B) zeigte einen Supershift mit einem YY1-Antikörper und eine Mutation der YY1-Sequenz brachte diesen Komplex zum Verschwinden. In einem Reportergen-Assay war durch diese Mutation eine Verstärkung des Repressor-Effektes der NIP-Sequenz zu verzeichnen. Daraus folgerten die Autoren, dass wie beim IFN- $\gamma$ -Promotor, YY1 und ein AP-2 ähnlicher Repressor kompetitiv über die Bindung an der NIP-Sequenz die Transkription des IL-3-Gens regulieren.

Dieses Modell lässt sich nur bedingt auf den in dieser Arbeit untersuchten CCL3-Promotor übertragen, da unterschiedliche Zelltypen und Stimuli verwendet wurden. Dies schließt aber nicht aus, dass es sich bei dem Komplex ICK-1A, der wahrscheinlich an der ICK-1-Sequenz des CCL3-Promoters bindet, um YY1 oder einen AP-2 ähnlichen Faktor handelt. Immerhin weist die ICK-Sequenz (5'-TAGCATGACAGCATCAC-3') eine große Ähnlichkeit mit einer duplizierten Konsensussequenz für YY1 (5'-CGCCATNAC-3', N = beliebiges Nukleotid; nach Shi et al., 1997) auf (s. Abb. 26). Darüber hinaus spricht die große Ähnlichkeit, die das NIP-Element und das ICK-1-Element aufweisen dafür, dass dort die gleichen Faktoren binden. Diese Proteine konnten bisher allerdings noch nicht identifiziert werden. Im Gegensatz zu NIP jedoch, ist die Funktion der ICK-1-Sequenz bei der transkriptionellen Regulation von CCL3 in Monozyten/Makrophagen, die mit LPS stimuliert bzw. mit dem Influenza A-Virus infiziert wurden, eindeutig positiv regulatorisch. Es ist überdies auch möglich, dass eine kompetitive Bindung des positiv regulatorischen Faktors ICK-1C die Transkriptionsaktivität an dieser Stelle reguliert.



**Abbildung 26: Vergleich der homologen Sequenzen von CCL3 und der YY1 Konsensussequenz.**

Dargestellt ist der Bereich –123 bis –91 des CCL3-Promotors. Die homologen Sequenzen der YY1 Konsensussequenz (consensus) sind eingezeichnet (nach Shi et al., 1997). Übereinstimmende Sequenzen sind unterstrichen.

**1.1.2. Andere Kandidaten für eine Bindung an der ICK-1-Sequenz**

Auf die mögliche Rolle von Mitgliedern der AP-Familie bei der transkriptionellen Regulation von Chemokin-Genen verweisen auch andere Arbeiten. So wurde bei Mäusen ein LPS-responsives Element in den Promotoren von CCL5 und CXCL10, sowie ein Virus-responsives Element im CCL5-Promotor beschrieben. Diese weisen eine große Ähnlichkeit zum humanen CCL3-Promotor auf. Für das Motiv TCAYR (Y = Pyrimidin [C oder T]; R = Purin [A oder G]) konnte bei der murinen Makrophagen-Zelllinie RAW 264.7 gezeigt werden, dass es ein essentielles Element für die Induktion von CCL5 und CXCL10 nach LPS-Stimulation ist (Shin et al., 1994). Auffallend ist, dass diese Sequenz teilweise der AP-1 Konsensus-Sequenz entspricht (Curran und Franza, 1988) und eine Ähnlichkeit zum humanen CCL3-Promotor (5'-GTCATG-3') aufweist. Ein Vergleich der entsprechenden Elemente des murinen CCL5- und CXCL10-Promotors mit einem Teil des ICK-1-Elements des CCL3-Promotors ergibt für das murine CCL5-Gen eine vollständige und für das CXCL10-Gen eine fast vollständige Übereinstimmung. Diese starke Homologie der Sequenzen unterstreicht die Bedeutung des Motivs für eine Induktion dieser Gene durch LPS. Dieses Motiv, dass bei einer Induktion von CCL3 durch LPS (zusammen

mit der MNP-Sequenz) eine essentielle Rolle spielt, scheint also eine generelle Induktion von Chemokinen nach LPS-Stimulation zu vermitteln.

### ICK



CCL3 5' -TGAGTTGTGCAACTTAGCATGACAGCATCACTA-3'  
 3' -ACTCAACACGTTGAATCGTACTGTCGTAGTGAT-5'

muCCL5 3' -RYACTG-5'

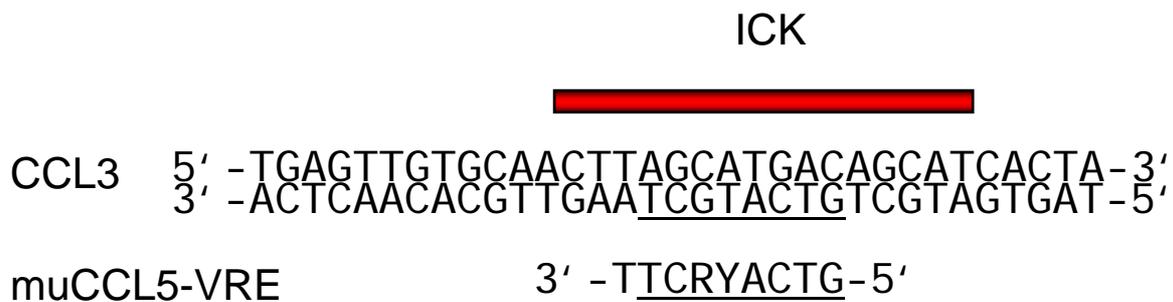
muCXCL10 3' -RYACTC-5'

#### Abbildung 27: Vergleich der homologen Sequenzen von CCL3 und den murinen Chemokinen CCL5 und CXCL10.

Dargestellt ist der Bereich -123 bis -91 des CCL3-Promotors. Die homologen Sequenzen der murinen Chemokine CCL5 und CXCL10 sind eingezeichnet. R = Purin (A oder G), Y = Pyrimidin (C oder T). Übereinstimmende Sequenzen sind unterstrichen.

Dieses LPS-responsive Element ist darüber hinaus auch Teil eines als *Newcastle Disease Virus responsive element* (VRE) beschriebenen Bereiches im murinen CCL5-Promotor (Lokuta et al., 1996). Das *Newcastle Disease*-Virus ist in der Lage, CCL5 sowohl in RAW 264.7-Zellen als auch in peritonealen murinen Makrophagen direkt zu induzieren. Dafür spielt das VRE, welches sich aus dem oben schon beschriebenen LPS-responsiven Element und einer AT-reichen Domäne zusammensetzt, eine essentielle Rolle. Ein Vergleich der gesamten VRE-Domäne mit dem entsprechenden Abschnitt des CCL3-Promotors offenbart eine starke Homologie über das oben genannte Motiv hinaus (s. Abbildung 28). In ähnlicher Weise wie dies für die ICK-1-Sequenz im CCL3-Promotor in dieser Arbeit beschrieben wurde, reguliert dieses Motiv die Induktion des murinen Chemokins CCL5 sowohl bei einer Stimulation der Zellen mit LPS als auch bei einer Infektion mit einem (RNA-)Virus. Es scheint an dieser Sequenz also ein Transkriptionsfaktor zu binden, der im Rahmen einer Kernantwort (*core*

response) durch verschiedene infektiöse Stimuli aktiviert werden kann und eine Aktivierung von Makrophagen vermittelt.



**Abbildung 28: Vergleich der homologen Sequenzen bei CCL3 und dem murinen Chemokin RANTES.**

Dargestellt ist der Bereich -123 bis -91 des CCL3-Promotors. Die homologe Sequenz des *virus responsive elements* (VRE) im murinen CCL5-Promotor ist eingezeichnet. R = Purin (A oder G), Y = Pyrimidin (C oder T). Übereinstimmende Sequenzen sind unterstrichen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die ICK-1-Sequenz zwar eine starke Homologie zur NIP-Sequenz des IL-3-Promotors aufweist, sie hat jedoch nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit eine andere regulatorische Funktion nach einer Stimulation von Monozyten mit LPS oder der Infektion mit dem Influenza A-Virus. Die Transkriptionsfaktoren, die an den beiden Sequenzen binden, konnten bisher nur für NIP teilweise identifiziert werden (YY1). Durch die Ähnlichkeit mit der ICK-Sequenz ist es wahrscheinlich, dass an den beiden *cis*-regulatorischen Sequenzen ICK-1 und NIP dieselben Transkriptionsfaktoren binden und dass zumindest einer dieser Faktoren YY1 ist.

Eine starke Ähnlichkeit in der Sequenz und in der Funktion weist das ICK-1-Element zu einem Motiv im murinen CCL5-Promotor auf. Diese Motiv hat, wie auch ICK-1 in der vorliegenden Arbeit, eine positiv regulatorische Funktion bei der Induktion des Chemokins in LPS-stimulierten oder Virus-infizierten Zellen. Für diese Sequenz konnten jedoch noch keine bindenden Transkriptionsfaktoren identifiziert werden. Weiterführende Experimente mit Gelshifts oder Chromatin-Immunopräzipitations-Assays wären dazu notwendig.

## 1.2. Die *cis*-regulatorische Sequenz MNP

### 1.2.1. MNP als neue *cis*-regulatorische Sequenz im CCL3-Promotor

Neben der ICK-1-Sequenz wurde in dieser Arbeit die MNP-Sequenz als essentielles Promotorelement für eine CCL3-Transkription durch Stimulation von Monozyten mit LPS oder Infektion mit dem Influenza A-Virus identifiziert. Diese Sequenz war erstmals beschrieben worden, als Ritter et al. 1995 die unterschiedliche Regulation der Transkription des CCL3-Gens in T-Zellen und Monozyten/Makrophagen untersuchten (Ritter et al., 1995). Hierzu wurden transiente Transfektionen mit verschiedenen Konstrukten des CCL3-Promotors bei T-Zellen (Jurkat) und Makrophagen (U937) durchgeführt, welche mit Mitogenen stimuliert wurden. Eine Deletion des Promotorabschnittes –119 bis –87 hatte in Jurkat-Zellen einen Anstieg der Luciferase-Aktivität zur Folge (wahrscheinlich verursacht durch den Wegfall des Repressorelements ICK-1/NIP). Eine Deletion des darauffolgenden Abschnittes –87 bis –76 führte dagegen zu einem starken Abfall der Aktivität. In stimulierten U937-Zellen zeigte die Deletion des Promotorabschnittes –119 bis –87 keinen Anstieg der Luciferase-Aktivität, sondern einen Rückgang der Aktivität. Dies führte zu der Schlussfolgerung der Autoren, dass an der ICK-1-Sequenz in der lymphozytären Jurkat-Zelllinie bzw. der myelomonozytären U937-Zelllinie unterschiedliche Transkriptionsfaktoren binden. Die regulatorische Funktion der ICK-Sequenz und der dort bindenden Faktoren ist also gewebs- bzw. zellspezifisch. Im Falle der myelomonozytären Zellen wies die ICK-1-Sequenz keine Repressoraktivität auf, sondern fungierte als positive *cis*-regulatorische Sequenz. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen dieser Arbeit, da auch bei LPS-stimulierten bzw. Influenza-infizierten Monozyten ICK-1 für eine verstärkte Transkription des CCL3-Gens essentiell ist. Nur wenn beide regulatorischen Sequenzen (MNP und ICK) intakt sind, ist eine Induktion von CCL3 möglich.

Gelshifts mit dem entsprechenden Oligonukleotid dieses Promotorabschnittes zeigten neben dem schon von Nomiya et al. (1993) gefundenen ICK-1-Bandenmuster zwei neue Banden: eine MNP-1 genannte, die nur in U937-Zellen vorkam, und eine MNP-2 (*MIP-1 $\alpha$  nuclear protein-2*) genannte, die auch im Extrakt aus Jurkat-Zellen nachgewiesen konnte. Anschließende Methylierungs-Interferenz-Analysen zeigten zu den bekannten Kontaktpunkten für ICK-1 (s. Nomiya et al. 1993) auch die von MNP-1 und MNP-2 (s.

Abbildung 29). Daraufhin wurde ein *Gelshift-Screening* mit dem entsprechenden Oligonukleotid (ein 62 bp-Fragment) und einer Mutation davon (62M1, sie führt zum Verschwinden der MNP-Komplexe, Ritter et al., 1995) in verschiedenen Zelllinien durchgeführt. MNP-1 Komplexe konnten in den Extrakten der myelozytären Zelllinien U937 und THP-1 sowie den B-Zelllinien Raji und BJAB nachgewiesen werden. Deutliche MNP-2 Komplexe dagegen konnten nur bei Jurkat-Zellen (T-Zellen) beobachtet werden. Damit konnte auch für die MNP-Sequenz gezeigt werden, dass die Bindung von Faktoren an *cis*-regulatorische Sequenzen je nach Zelltyp unterschiedlich sein kann. Für die in dieser Arbeit verwendeten monozytären Zellen der Zelllinie Mono Mac 6 ist eine wesentliche Rolle des Faktors MNP-2 bei der Transkription von CCL3 daher unwahrscheinlich.

Ein Vergleich der Luciferase-Aktivitäten des Wildtyp-Promotors und eines Promotors mit der Mutation 62M1 zeigte, dass die Mutation in stimulierten Jurkat-Zellen zwar einen Abfall der Luciferase-Aktivität bewirkt, jedoch nur in stimulierten U937-Zellen fast vollständig auf Null zurückgeht. Dies ist ein Hinweis darauf, dass der MNP-Faktor, der durch die Mutation 62M1 nicht mehr an diesem Promotorabschnitt binden kann, ein wichtiger positiv regulierender Faktor für die CCL3-Transkription in myelozytären Zellen ist. Die Tatsache, dass eine Konkurrenz im Gelshift mit ICK-1 Oligonukleotiden aus anderen Promotoren zwar die ICK-1-Banden, nicht jedoch die MNP-Banden zum Verschwinden bringen kann, legt nahe, dass es sich tatsächlich um verschiedene Transkriptionsfaktoren handelt. Dies wird auch durch die Methylierungs-Interferenz-Analysen der Kontaktpunkte von ICK-1 und MNP unterstrichen. Ein weiterer Hinweis darauf, dass mit MNP eine Bindungsstelle für neue Transkriptionsfaktoren identifiziert wurde, die eine essentielle Bedeutung für die Transkription des CCL3-Gens hat, ist die starke Konservierung der für MNP wichtigen Sequenz TTGTGCAAC. Obwohl die drei bei GenBank eingetragenen humanen CCL3-Promotoren durchaus leicht unterschiedliche Basenfolgen aufweisen, ist dieses Motiv in allen dreien unverändert enthalten (GenBank Nr. M24110, D90144 und M23178). An den beiden Sequenzen MNP und ICK binden demnach distinkte Faktoren, die vor allem in myelomonozytären Zellen eine positive Regulation der CCL3-Transkription vermitteln. Insbesondere als Teil einer Kernantwort auf verschiedene Stimuli (wie LPS und Influenza A).

Um zu zeigen, dass es sich bei MNP-1 und MNP-2 um verschiedene Faktoren handelt, haben Sharma et al. eine chromatographische Auftrennung der beiden Faktoren über Heparin-Sepharose-Säulen untersucht (Sharma et al., 1998). Die MNP-1- und ICK-1-Aktivitäten wurden dabei in einer anderen Fraktion gefunden, als die Hauptaktivität des MNP-2-Faktors. Ein UV-crosslinking zeigte, dass MNP-1 ein Heterodimer ist, das aus zwei Untereinheiten mit ca. 60 bzw. 68 kDa Molekulargewicht besteht.

### **1.2.2. Bindung von C/EBP $\beta$ an der MNP-Sequenz**

In dem Promotorabschnitt  $-124$  bis  $-99$ , der sich als essentiell für die Transkription des CCL3-Gens sowohl bei einer Stimulation mit LPS als auch bei einer Infektion mit Influenza A/PR/8 herausgestellt hat, wurden also die beiden positiv regulatorischen Sequenzen ICK-1 und MNP identifiziert. Während eine endgültige Identifizierung der an der ICK-1-Sequenz bindenden Proteine noch aussteht, gibt es gute Hinweise darauf, welcher Transkriptionsfaktor an der MNP-Sequenz binden könnte. Im Jahr 2002 fand eine Arbeitsgruppe um Fernandez heraus, dass bei einer Aktivierung von monozytären THP-1-Zellen durch Immunkomplexe die Chemokine CCL3, CCL4 und CCL5 induziert werden können (Fernandez et al. 2002). Bei der Aufklärung des Mechanismus dieser Induktion wiesen die Autoren mittels Gelshift nach, dass die Aktivierung von Fc-Rezeptoren durch die Immunkomplexe einen Transkriptionsfaktor der C/EBP (CCAAT/enhancer-binding protein)-Familie, C/EBP $\beta$  (auch NF-IL6 für nuclear factor for IL-6 genannt), innerhalb des CCL3-Promotors binden lässt. Diese Bindungsstelle mit der Kernsequenz 5'-GCAA-3' liegt innerhalb der MNP-Sequenz und umfasst alle in den Methylierungs-Interferenz-Analysen von Ritter et al. (1995) ermittelten Kontaktpunkte der MNP-Faktoren (s. Abbildung 29).



gegenseitig beeinflussen können und je nach Zelltyp eine Repressor- oder Aktivator-Rolle haben können (Ralph et al., 2006). Auch für das Papillomavirus HPV-18 konnte eine Interaktion von C/EBP $\beta$  und YY1 gezeigt werden (Bauknecht et al., 1996). Obwohl diese Modelle sich stark von dem in dieser Arbeit verwendeten unterscheiden, zeigt dies, dass diese beiden Faktoren miteinander interagieren können, um eine Induktion von Genen zu vermitteln.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit den Luciferase-Konstrukten mMNP und mICK haben gezeigt, dass sowohl die Mutation der MNP-Sequenz als auch die Mutation der ICK-1-Sequenz zu einer drastischen Reduktion der Transkription führten (s. Ergebnisse 2.3.). Das gilt sowohl für LPS-stimulierte Zellen als auch für Zellen, die mit Influenza A/PR/8 infiziert waren. In beiden Fällen wirken die an den beiden Sequenzen bindenden Transkriptionsfaktoren synergistisch für eine Transkription des CCL3-Gens, d.h. beide Faktoren sind für eine optimale Transkription des Gens notwendig. Dabei sind nur geringe Unterschiede in der Aktivität der MNP- bzw. ICK-1-bindenden Faktoren erkennbar. Somit gehören diese beiden *cis*-regulatorischen Sequenzen zu einer Kernantwort, welche auf infektiöse Stimuli hin die Induktion des Chemokins CCL3 vermittelt. Die besten Kandidaten für die Bindung an diesen *cis*-regulatorischen Sequenzen sind die beiden Transkriptionsfaktoren C/EBP $\beta$  (an der MNP-Sequenz) und YY1 (an der ICK-Sequenz) neben vielleicht noch unbekanntem weiteren Faktoren. C/EBP $\beta$  kann durch eine Infektion mit Influenza A-Viren aktiviert werden (Wada et al., 1995). Auch YY1 kann durch eine virale Infektion aktiviert werden und reguliert mit seinem erst kürzlich entdeckten Homolog YY2 (Nguyen et al., 2004) die Transkription humaner und muriner  $\beta$ -Interferongene (Klar und Bode, 2005).

Im Rahmen einer Influenza A-Infektion spielt das Chemokin CCL3 eine wichtige Rolle. Es wird nicht nur von infizierten Monozyten/Makrophagen sezerniert (Sprenger et al., 1996; Kaufmann et al., 2001), sondern findet sich auch im Blut oder Nasen-Rachensekret von Influenza-infizierten Patienten (Teran et al., 1999; Fritz et al., 1999). Die Induktion von CCL3 im Verlauf der Infektion, die in essentieller Weise von den *cis*-regulatorischen Sequenzen MNP und ICK deren Bindungsfaktoren abhängt, ist allerdings durchaus unterschiedlich zu bewerten. Eine unkontrollierte Zytokin- und Chemokinfreisetzung wie bei den Vogelgrippeviren von 1997 in Hong Kong oder der „Spanischen Grippe“ von

1918 kann zur Virulenz und Infektions-assoziierten Mortalität beitragen (Cheung et al., 2002, Kobasa et al. 2007; de Jong 2006). Insbesondere der Vogelgrippevirus von 1997 und der genetisch rekonstruierte Erreger der spanischen Grippe von 1918 bewirken eine starke Induktion von verschiedenen proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen in infizierten Zellen (Kobasa et al. 2007; de Jong 2006), unter denen auch CCL3 zu finden ist (Tumpey et al., 2005; Zhou et al., 2006). Zellen Erwachsener produzieren dabei höhere Mengen an CCL3 als die von Kindern und Erwachsene zeigten auch eine erhöhte Mortalität im Verlauf der Vogelgrippe in Hong Kong 1997 (Yuen et al., 1998; Zhou et al., 2006). Aber auch bei Influenza-infizierten Kindern gibt es eine Assoziation zwischen höheren Konzentrationen an CCL3 im Nasen-Rachensekret von Influenza-infizierten Patienten und einem schwereren Krankheitsverlauf (Garofalo et al., 2005).

In Mäusen, deren Gen für den CCL3/CCL5-Rezeptor ausgeschaltet wurde, zeigten sich dagegen auch eine schwerere Verlaufsform einer Influenza-Infektion mit erhöhter Mortalität (Dawson et al., 2000). Ein möglicher Mechanismus dahinter könnte sein, dass die Interaktion von CCL5 mit dem CCL3/CCL5-Rezeptor und die nachfolgende Aktivierung intrazellulärer Signalwege ein antiapoptotisches Signal für Virus-infizierte Makrophagen darstellt (Tyner et al., 2005). Eine andere mögliche Erklärung ist die Sequestrierung von freiem CCL3 und CCL5 durch CCR5-Rezeptoren (Ariel et al., 2006). Auch die T-Zellantwort wird durch CCL3 und CCR5 beeinflusst. Eine zumindest transiente Expression von CCR5 kann CD4+ T-Zellen zum Ort der Infektion leiten (Roman et al., 2002) und die Interaktion von CD4+ und CD8+ T-Zellen sowie die Aktivität und Effektivität von CD8+ T-Zellen wird durch CCL3 positiv verstärkt (Jones et al., 2003; Castellino et al., 2006).

Darüber hinaus gibt Hinweise darauf, dass CCL3 auch relevant für eine Therapie von viralen Atemwegserkrankungen sein könnte (Bonville et al., 2003). Bei experimenteller Infektion von Mäusen mit dem Pneumonia-Virus und anschließendem Therapieversuch mit dem Virustatikum Ribavirin und/oder einem CCL3-antagonisierenden Ansatz ließ sich nur mit der Doppelstrategie eine deutliche Reduktion der Mortalität erreichen. Ähnliches gilt auch für eine Kombination von Ribavirin und dem knock out des CCL3-Rezeptors CCR1 (Bonville et al., 2004).

Die Induktion von CCL3 über die Sequenzen MNP und ICK bzw. die dort potentiell bindenden Transkriptionsfaktoren C/EBP $\beta$  und YY1 scheint also sowohl zur Eindämmung der Infektion als auch zur immunvermittelten Pathogenität beitragen zu können. Die genaue Wirkung von Virus-induziertem CCL3 hängt dabei wahrscheinlich a) von der Spezies und dem infektiösen Agens, b) den beteiligten anderen Chemokinen/Zytokinen wie z.B. CCL5 und c) der Expression der verschiedenen Chemokinrezeptoren ab. Insbesondere bei CCL3 und CCL5 gibt es trotz der Benutzung des gemeinsamen Rezeptors CCR5 Hinweise auf unterschiedliche biologische Effekte, die durch kleine Strukturunterschiede der Chemokine vermittelt werden könnten (Ottersbach et al., 2006). Eine Entwicklung zukünftiger Therapien schwerer viraler Atemwegserkrankungen könnte unter Berücksichtigung dieser Aspekte u.a. auf die Entwicklung spezifischer Inhibitoren für CCL3 oder dessen Induktion abzielen. Auch eine Antagonisierung der Rezeptoren CCR5 (wie bei HIV) oder CCR1 wäre denkbar.

## **2. Die Induktion von Transkriptionsfaktoren der IRF-Familie durch eine Infektion mit Influenza A/PR/8**

Ziel dieser Arbeit war es, die molekularen Mechanismen, die zur Induktion von Zytokinen und Chemokinen bei einer Influenza A/PR/8-Infektion führen und vor allem die beteiligten Transkriptionsfaktoren zu identifizieren bzw. ihre Induktion/Aktivierung nachzuweisen. Eine wichtige Gruppe von Transkriptionsfaktoren bei der Abwehr viraler Erreger, die Transkriptionsfaktoren der *Interferon regulatory factor*-Familie (IRF-Familie), wurden erst 1989 entdeckt (Miyamoto et al., 1988). Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Induktion der Typ I Interferone (Mamane et al., 1999; Taniguchi et al., 2002) und sind deshalb als essentielle Faktoren der Wirtsabwehr gegen Viren von großer Bedeutung (Biron, 1999; Taniguchi und Takaoka, 2002). Deshalb lag die Vermutung nahe, diese Moleküle könnten auch bei einer Influenza A-Infektion eine wichtige Rolle spielen. Es gibt sogar Hinweise darauf, dass eine effektive antivirale Abwehr durch das Interferon-System zum Gewebs-Tropismus des Influenza-Virus beiträgt (García-Sastre et al., 1998).

Obwohl die Transkriptionsfaktoren der IRF-Familie die Transkription einiger Chemokingene, v.a. im Rahmen einer viralen Infektion, regulieren (z.B. CCL5; Lin et al., 1999; Genin et al., 2000), konnten bisher keine funktionell aktiven *cis*-regulatorischen Sequenzen im CCL3-Promotor identifiziert werden, an denen IRF-Faktoren binden. Erst kürzlich wurde allerdings ein neuer Transkriptionsfaktor der IRF-Familie beschrieben (IRF-5), der auch konstitutiv exprimiert und abhängig vom Virustyp bei einer viralen Infektion phosphoryliert und aktiviert wird (Barnes et al., 2001). Dieser Transkriptionsfaktor, der auch eine zentrale Rolle in der Signaltransduktion der Toll-like Rezeptoren spielt (Schoenemeyer et al., 2005; Takaoka et al., 2005), ist in der Lage, die Induktion von diversen Zytokinen und Chemokinen zu induzieren, darunter auch CCL3 (Barnes et al., 2002; Barnes et al., 2004). Die entsprechenden *cis*-regulatorischen Sequenzen im CCL3-Promotor wurden allerdings noch nicht identifiziert. IRF-5 wirkt nicht nur als Vermittler einer antiviralen Abwehr, sondern auch als Regulator von Zellzyklus und Apoptose (Mori et al., 2002; Barnes et al., 2003; Cheng et al., 2006).

Während die Aktivität vieler Transkriptionsfaktoren über einen Liganden (z.B. Steroid-Hormonrezeptoren) oder eine Phosphorylierung/Dephosphorylierung (z.B. NF- $\kappa$ B) kontrolliert wird, wird die Aktivität des zuerst entdeckten Vertreters der IRF-Familie, IRF-1, auch über seine Induktion auf mRNA-Ebene kontrolliert (Taniguchi et al. 2001). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die mRNA von IRF-1 durch eine Infektion mit Influenza A/PR/8 in humanen Monozyten induziert wird. In der monozytären Zelllinie Mono Mac 6 (MM6) ließ sich weiterhin eine Induktion des Proteins nachweisen. Obwohl die Induktion von mRNA des Faktors IRF-1 durch eine Infektion mit dem Influenza A/Beijing/353/89 schon von Ronni et al. beschrieben worden war (Ronni et al. 1995), ließ sich hier erstmals auch das Genprodukt nachweisen (s. Ergebnisse 3.2).

Neben seiner Eigenschaft, Gene der antiviralen Abwehr zu induzieren, ist IRF-1 (zusammen mit IRF-2) auch als wichtiger Faktor bei der Zellzykluskontrolle und Apoptose sowohl in Tumorzellen als auch in nicht-transformierten Zellen identifiziert worden (Tanaka et al. 1994; Tamura et al. 1995; Kim et al., 2004). Ob diese Funktion allerdings auch bei einer Virus-Infektion eine Rolle spielt, ist bisher nicht bekannt. Sie wäre jedoch sinnvoll, da durch das kontrollierte Absterben der Wirtszelle die Replikation des Virus eingeschränkt werden kann.

Es gibt aber Hinweise, dass IRF-1 zumindest indirekt, über sezerniertes IFN- $\gamma$ , bei einer Virusinfektion aktiviert wird und die Expression des Apoptose-induzierenden Oberflächenmoleküls TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*) verstärkt (Park et al., 2004). Zellzyklus und/oder Apoptose werden aber auch von anderen Transkriptionsfaktoren kontrolliert. Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B beispielsweise spielt einerseits eine zentrale Rolle bei der Aktivierung der Immunantwort gegen Viren (s. Einleitung 4.5.), andererseits ist er aber auch in der Lage, in Influenza-infizierten Zellen pro-apoptotische Proteine wie TRAIL zu induzieren (Wurzer et al., 2004). Er kann aber auch als Gegenspieler des IRF-1 als negativer Regulator einer Interferon-Antwort und antiviralen Abwehr fungieren (Wei et al., 2006). Das durch die Influenza-A Infektion induzierte IRF-1 hat also wahrscheinlich eine doppelte Aufgabe: zum einen die Induktion von Zytokinen und Chemokinen zur Bekämpfung der viralen Infektion auf zellulärer Ebene und zum anderen die Induktion von Apoptose zur Eindämmung der Virusreplikation. Neben IRF-1 wurden auch IRF-3 und IRF-7 als wichtige Faktoren bei einer viralen Infektion von Säugerzellen identifiziert (Sato et al., 2000). IRF-3 ist zusätzlich an der Signaltransduktion über die Toll-like Rezeptoren 3 und 4 (TLR 3 und 4) beteiligt (Shinobu et al., 2002; Fitzgerald et al., 2003) und ein Zielmolekül der Glukokortikoid-vermittelten Immunsuppression (Reily et al., 2006). Anders als IRF-1 wirken IRF-3 und IRF-7 über eine autokrine bzw. parakrine Rückkopplungsschleife und verstärken so die antivirale Antwort (Marie et al., 1998; Mamane et al., 1999). Dabei kommt es nach der Erstinfektion der Zelle durch die Aktivierung von Rho-GTPasen und den Kinasen I $\kappa$ B und TANK-binding kinase-1 (TBK-1) zur Phosphorylierung des konstitutiv exprimierten Transkriptionsfaktors IRF-3 (Ehrhardt et al., 2004). Kürzlich wurden RNA Helikasen identifiziert (retinoic acid-inducible gene I [RIG-I] und melanoma differentiation-associated antigene 5 [mda-5]; Andrejeva et al., 2004; Yoneyama et al., 2004), die intrazelluläre dsRNA erkennen können und über ein in der mitochondriales Adaptorprotein (*mitochondrial antiviral signaling* [MAVS]; Seth et al., 2005) die Kinasen IKK/I $\kappa$ B und TBK-1 aktivieren. IRF-3 bewirkt, zusammen mit anderen durch die Virusinfektion aktivierten Faktoren wie AP-1 und NF- $\kappa$ B, eine Induktion von IFN- $\beta$  und bestimmten  $\alpha$ -Interferonen. Aber auch das Chemokin CCL5 wird durch IRF-3 induziert (Lin et al. 1999). Durch die sezernierten Zytokine werden die Typ I IFN-Rezeptoren sowohl umliegender

Zellen als auch der infizierten Zelle selbst aktiviert. Über eine Aktivierung des JAK-STAT-Signalwegs in Kooperation mit dem Faktor IRF-9, die zusammen ISGF-3 bilden, kommt es zur Induktion von IRF-7 (s. Einleitung 4.5.1.). Dieses wiederum induziert gemeinsam mit IRF-3 die Typ I IFN-Synthese und bewirkt einen *switch* in der IFN- $\alpha$ -Produktion. Darüber hinaus wird das ursprüngliche Signal verstärkt und auch benachbarte Zellen in die antivirale Abwehr mit einbezogen. Die Aktivierung des zentralen Faktors IRF-3 durch Phosphorylierung und andere zelluläre Abwehrmaßnahmen werden bei der Influenza A-Infektion jedoch durch die Wirkungen des viralen NS1-Proteins abgeschwächt bzw. inhibiert (Übersichten in García-Sastre, 2001 und Ludwig et al., 2003).

Neben der Induktion von IRF-1 wurde auch die Induktion von IRF-7 durch das Influenza A-Virus untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die mRNA von IRF-7 durch die Infektion von primären Monozyten mit dem Influenza A-Virus induziert wird. Darüber hinaus ließ sich in der monozytären Zelllinie Mono Mac 6 auch erstmals die Induktion des Proteins IRF-7 durch das Influenza A-Virus nachweisen (s. Ergebnisse 3.5). Damit ist ein Weg der Aktivierung von infizierten Monozyten gezeigt, der zu einer erhöhten antiviralen Abwehr dieser Zellen, der Synthese von Zytokinen, Typ I Interferonen und Chemokinen sowie einer Apoptose der Zellen führen kann. IRF-7 scheint sogar einer der wichtigsten Faktoren überhaupt für die Aktivierung einer Typ I IFN-Antwort zu sein (Honda et al., 2006) und ist zudem involviert in der Differenzierung von Makrophagen und dendritischen Zellen (Lu und Pitha, 2001; Coccia et al., 2004).

Diese Doppelrolle der IRF-Faktoren macht wichtige Aspekte der zellulären Abwehr von viralen Infektionen klar. Erstens wird das Zytokin-Signal verstärkt und an andere Zellen weitergegeben und die zellulären Abwehrmaßnahmen werden in Gang gesetzt. Gleichzeitig wird durch die Produktion von Chemokinen wie z.B. CCL5 auch die Rekrutierung anderer Immunzellen zum Ort der Infektion eingeleitet. Zweitens wird die eigene Proteinsynthese der infizierten Zelle eingeschränkt und unter Umständen die Apoptose eingeleitet, um den Viren die Grundlage zur Vermehrung zu entziehen. Drittens führt eine Reifung von dendritischen Zellen bzw. eine Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen zu einer besseren Aktivierung des angeborenen und erworbenen Immunsystems. Diese Strategien versuchen also auf mehreren Ebenen eine effektive Replikation und Verbreitung der Viren im Körper zu verhindern.

### 3. Die Induktion des Zytokins IL-24/mda-7 durch eine Infektion mit Influenza A/PR/8

Das *melanoma differentiation-associated gene 7* (mda-7, Homologe: Ratte c49a/mob-5, Maus FISP) ist ein bei humanen Melanomen identifiziertes Protein, welches selektiv das Wachstum von Tumorzellen hemmen kann (Jiang et al., 1996; Su et al., 1998; Zhao et al., 2005; Sarkar et al., 2005). Aufgrund seiner genomischen Lage in einem Cluster von IL-10 und verwandten Zytokinen und seiner Bindung an IL-Rezeptoren wurde es in IL-24 umbenannt und zur Familie der IL-10-ähnlichen Zytokine gezählt (Huang et al., 2001; Dumoutier et al., 2001). Es kann experimentell durch Interferon- $\beta$  (IFN- $\beta$ ) und Mezerin in Melanom-Zellen induziert werden und konnte auch nach Stimulation von PBMCs mit Concanavalin A (ConA) oder PHA nachgewiesen werden. IL-24 kann auch durch LPS in PBMCs induziert werden (Caudell et al., 2002; Garn et al., 2002). Sezerniertes IL-24 bindet an zwei heterodimere Rezeptoren (IL-22R1/IL-20R2 und IL-20R1/IL-20R2), die auch von anderen Vertretern der IL-10-ähnlichen Zytokine benutzt werden. Durch die Bindung an diese Rezeptoren werden die Signalübertragungsmoleküle STAT-1 und STAT-3 aktiviert (Wang et al., 2002), die wiederum selbst als Transkriptionsfaktoren wirken können. Dabei beeinflusst IL-24 nicht die Produktion von TNF- $\alpha$  bei LPS-stimulierten PBMCs im Sinne einer antiinflammatorischen Reaktion wie sein Verwandter IL-10. Es ist ganz im Gegenteil in der Lage, proinflammatorische Zytokine wie IL-6, TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  selbst zu induzieren (Wang et al., 2002; Garn et al., 2002; Poindexter et al., 2005) und aktiviert den für viele immunologische Reaktionen wichtigen Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B (Aggarwal et al., 2004).

Die Induktion von IL-24 durch LPS und seine Fähigkeit, seinerseits typisch proinflammatorische Zytokine zu induzieren, legt eine mögliche Rolle von IL-24 im Rahmen von Infektionen nahe. Das verwandte IL-22, welches z.T. über dieselben Rezeptoren wirkt wie IL-24, ist auch in der Lage, proinflammatorische Moleküle wie z.B. das Chemokin CXCL5 und antimikrobielle Peptide der Defensin-Familie zu induzieren (Wolk et al., 2004; Boniface et al., 2005). Die Tatsache, dass das *Yaba-like disease virus* aus der Familie der *Poxviridae* ein Protein produziert (Y134R), das dieselben Rezeptoren bindet wie IL-24 (Bartlett et al., 2004), macht eine Funktion von IL-24 auch im Rahmen von viralen Infektionen denkbar. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit auch die

Transkription von IL-24 mRNA in Monozyten analysiert, die mit Influenza A/PR/8 infiziert waren. Es zeigte sich eine deutliche Induktion von IL-24 mRNA durch das Influenza A-Virus (Garn et al., 2002). Ein Vorteil dieser Induktion von IL-24 durch Virus-infizierte Zellen könnte nicht nur in der Induktion weiterer Zytokine liegen, sondern auch in einer verstärkten Apoptose. Für Krebszellen ist gezeigt worden, dass IL-24 durch die Aktivierung von PKR, ähnlich wie bei einer viralen Infektion, die Proteinsynthese herunterregeln und die Apoptose der Zelle einleiten kann (Pataer et al., 2002). Dazu kann IL-24 direkt mit der PKR interagieren (Pataer et al., 2005), was eine Erklärung dafür ist, dass IL-24 sowohl Rezeptor-vermittelte als auch Rezeptor-unabhängige Wirkungen zeigen kann (Sauane et al., 2004). Auf die Differenzierung von naiven T-Zellen hat IL-24, ganz im Gegensatz zu IL-10, keine Wirkung, es fördert aber die T-Zell-Proliferation (Oral et al., 2006).

Die Induktion von IL-24 durch das Influenza A-Virus könnte ein weiterer Baustein in der komplexen Maschinerie der antiviralen Abwehr sein, die Infektion einzudämmen und die Replikation des Virus zu blockieren. Dabei gibt es zum einen direkte Effekte in der infizierten Zelle, wie die Aktivierung von PKR, als auch Rezeptor-vermittelte Effekte an anderen Zellen (Zytokin-/Chemokin-Induktion), die für die virale Abwehr eine Rolle spielen könnten. Die „Gentherapie“ mit adenoviral exprimiertem IL-24, wie dies z.Z. in Phase I-Studien bei Patienten mit kolorektalem Carcinom erprobt wird (Cunningham et al., 2005), eröffnet u.U. auch für die Behandlung von (viralen) Infektionen neue Möglichkeiten.

## Zusammenfassung

Im Verlauf einer Infektion mit dem Influenza-Virus A/PR/8 werden nicht nur respiratorische Epithelien, sondern auch Monozyten und Makrophagen infiziert. Obwohl diese für die Replikation des Virus nur eine untergeordnete Rolle spielen, sind sie für die Koordination und Verstärkung der Immunantwort des Körpers auf die Infektion wichtig. Diese Funktionen an der Schnittstelle zwischen angeborener und erworbener Immunität üben Monozyten/Makrophagen u.a. über die Sekretion regulatorischer Moleküle wie z.B. Zytokine und Chemokine aus.

Auch bei der Infektion primärer Monozyten mit Influenza A-Viren kommt es zur Freisetzung einer Vielzahl von Zytokinen und Chemokinen, wie z.B. CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ). CCL3 und seine Rezeptoren CCR2 und CCR5 regulieren die Immunantwort bei einer Influenza A-Virusinfektion durch die Rekrutierung mononukleärer Zellen und die Verstärkung bzw. Aktivierung anderer Immunzellen, u.a. auch der T-Zellen. In dieser Arbeit wurde die transkriptionelle Regulation der Induktion von CCL3 durch Influenza A/PR/8 in Monozyten untersucht. Im CCL3-Promotor wurde ein Abschnitt identifiziert, der essentiell ist für eine Induktion von CCL3 durch die Infektion mit Influenza A/PR/8 oder durch eine Stimulation mit LPS. Es konnte gezeigt werden, dass die beiden potentiellen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren innerhalb dieses regulatorischen DNA-Abschnittes (MNP und ICK) synergistisch wirken, d.h. nur zusammen eine maximale Induktion von CCL3 als Antwort auf den entsprechenden Stimulus möglich ist. Dies gilt sowohl für die Influenza A-Infektion als auch für die LPS-Stimulation.

Es gibt starke Hinweise dafür, dass an einer dieser beiden Bindungsstellen, MNP, der Transkriptionsfaktor C/EBP $\beta$  bindet; der oder die bindenden Faktoren an der ICK-Stelle konnten bisher nicht identifiziert werden. Die Tatsache, dass sowohl eine Influenza A-Infektion als auch eine Stimulation mit LPS das Chemokin CCL3 über die beiden Bindungsstellen MNP und ICK induzieren kann, spricht für eine Aktivierung der dort bindenden Faktoren im Rahmen einer Kernantwort (*core response*), die als Reaktion auf verschiedene

Stimuli vorkommt und stellt damit auch ein interessantes Ziel zu einer möglichen Intervention dar.

Zu den Transkriptionsfaktoren, die eine Aktivierung des Immunsystems sowohl bei viralen als auch bei bakteriellen Infektionen vermitteln, gehören auch die Mitglieder der *Interferon regulatory factor* (IRF)-Familie. Diese können durch intrazelluläre Signalwege aktiviert oder neu induziert werden und regulieren u.a. ihrerseits die Induktion von Zytokinen und Chemokinen wie IL-12 und CCL5. In dieser Arbeit wurde deshalb auch die Induktion der Transkriptionsfaktoren IRF-1 und IRF-7 im Rahmen einer Influenza A-Virusinfektion untersucht. Für beide Faktoren konnte eine Induktion auf mRNA-Ebene und eine *de novo*-Proteinsynthese gezeigt werden. Dies unterstreicht die zentrale Rolle, die diese Faktoren bei der Aktivierung des Immunsystems als Antwort auf extra- und intrazelluläre Pathogene haben.

Interleukin-24 (IL-24) ist ein erst 1996 neu entdecktes Zytokin, das Homologien zu IL-10 aufweist und bisher vor allem wegen seiner anti-proliferativen Wirkung auf Tumorzellen untersucht worden ist. Obwohl es funktionell andere Eigenschaften als IL-10 aufweist, konnte in dieser Arbeit zum ersten Mal gezeigt werden, dass IL-24 auch durch eine Influenza A-Virusinfektion in primären Monozyten auf mRNA-Ebene induzierbar ist. Die genaue Wirkung von IL-24 im Rahmen einer viralen Infektion ist noch nicht aufgeklärt. Es gibt jedoch Hinweise, dass IL-24 eine Aktivierung der intrazellulären Proteinkinase PKR vermitteln kann, die bei viralen Infektionen eine wichtige Rolle spielt. Weitere Mechanismen der Aktivierung des Immunsystems durch IL-24 im Rahmen von viralen Infektionen sind noch zu erforschen.

## V. Literaturverzeichnis

Abbas, A. K., Lichtman, A.H., Pober, J.S., 2000. Cellular and Molecular Immunology. 3. Auflage, W.B. Saunders Company, Philadelphia, USA.

Aggarwal, S., Takada, Y., Mhashilkar, A.M., Sieger, K., Chada, S., Aggarwal, B.B., 2004. Melanoma differentiation-associated gene-7/IL-24 gene enhances NF-kappa B activation and suppresses apoptosis induced by TNF. *J. Immunol.*, 173: 4367-4376.

Akira S, Isshiki H, Sugita T, Tanabe O, Kinoshita S, Nishio Y, Nakajima T, Hirano T, Kishimoto T., 1990. A nuclear factor for IL-6 expression (NF-IL6) is a member of a C/EBP family. *EMBO J.* 6:1897-906.

Alam, J., Cook, J.L., 1990: Reporter genes: application to the study of mammalian gene transcription. *Anal. Biochem.*, 188: 245-254.

Alberts, B., Bray, D., Lewis J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D., 1994. Molecular Biology of the Cell. 3. Auflage, Garland Science

Altstaedt, J., Kirchner, H., Rink, L., 1996. Cytokine production of neutrophils is limited to interleukin-8. *Immunology*, 89:563-568.

Andreesen, R., Brugger, W., Scheibenbogen, C., Kreutz, M., Leser, H.G., Rehm, A., Lohr, G.W., 1990. Surface phenotype analysis of human monocyte to macrophage maturation. *J. Leukoc. Biol.*, 47:490-497.

Ariel A. Fredman G., Sun YP., Kantarci A., Van Dyke TE., Luster AD., Serhan CN., 2006. Apoptotic neutrophils and T cells sequester chemokines during immune response resolution through modulation of CCR5 expression. *Nat Immunol.*, 7(11):1209-16.

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

Barnes, P.J., Moore, P.A., Pitha, P.M., 2001. Virus-specific activation of a novel interferon regulatory factor, IRF-5, results in the induction of distinct interferon alpha genes. *J. Biol. Chem.*, 276: 23382-23390.

Barnes, B.J., Kellum, M.J., Field, A.E., Pitha, P.M., 2002. Multiple regulatory domains of IRF-5 control activation, cellular localization, and induction of chemokines that mediate recruitment of T lymphocytes. *Mol. Cell. Biol.*, 22: 5721-5740.

Barnes, B.J., Kellum, M.J., Pinder, K.E., Frisancho, J.A., Pitha, P.M., 2003. Interferon regulatory factor 5, a novel mediator of cell cycle arrest and cell death. *Cancer Res.*, 63: 6424-6431.

Barnes, B.J., Richards, J., Mancl, M., Hanash, S., Beretta, L., Pitha, P.M., 2004. Global and distinct targets of IRF-5 and IRF-7 during innate response to viral infection. *J. Biol. Chem.*, 279:45194-45207.

Barrett, T., Inglis, S.C. 1985. Growth purification and titration of influenza viruses. In "Virology: A practical approach" (B.W.J. Maty, ed.) pp. 119-150. Oxford IRL Press 1993.

Bartlett, N.W., Dumoutier, L., Renauld, J.C., Kotenko, S.V., McVey, C.E., Lee, H.J., Smith, G.L., 2004. A new member of the interleukin 10-related cytokine family encoded by a poxvirus. *J. Gen. Virol.*, 85 : 1401-1412.

Bartocci, A., Matrogiannis, D.S., Migliorati, G., Stockert, R.J., Wolkoff, A.W., Stanley, E.R., 1987. Macrophages specifically regulate the concentration of their own growth factor in the circulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:6179-6183.

Bauknecht, T., See, R.H., Shi, Y., 1996. A novel C/EBP beta-YY1 complex controls the cell-type-specific activity of the human papillomavirus type 18 upstream regulatory region. *J. Virol.*, 70: 7696-7705.

Belardelli, F., 1995. Role of interferons and other cytokines in the regulation of the immune response. *APMIS*, 103:161-179.

Bender, A., Amann, U., Jager, R., Nain, M., Gemsa, D., 1993. Effect of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor on human monocytes infected with influenza A virus. Enhancement of virus replication, cytokine release, and cytotoxicity. *J. Immunol.*, 151:5416-5424.

Bergmann, M., Garcia-Sastre, A., Carnero, E., Pehamberger, H., Wolff, K., Palese, P., Muster, T., 2000. Influenza virus NS1 protein counteracts PKR-mediated inhibition of replication. *J. Virol.*, 74: 6203-6206.

Berkman, N., John, M., Roesems, G., Jose, P.J., Barnes, P.J., Chung, K.F., 1995. Inhibition of macrophage inflammatory protein-1 alpha expression by IL-10. Differential sensitivities in human blood monocytes and alveolar macrophages. *J Immunol.* 9: 4412-8.

Blum S, Forsdyke RE, Forsdyke DR., 1990. Three human homologs of a murine gene encoding an inhibitor of stem cell proliferation. *DNA Cell Biol.*;9:589-602.

Bogdan, C., 2000. The function of type I interferons in antimicrobial immunity. *Curr. Opin. Immunol.*, 12: 419-424.

Bokoch, G.M., 1995. Chemoattractant signaling and leukocyte activation. *Blood*, 86:1649-1660.

Bonecchi, R., Bianchi, G., Bordignon, P.P., D'Ambrosio, D., Lang, R., Borsatti, A., Sozzani, S., Allavena, P., Gray, P.A., Mantovani, A., Sinigaglia, F., 1998. Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *J. Exp. Med.*, 187:129-134.

Boniface, K., Bernard, F.X., Garcia, M., Gurney, A.L., Lecron, J.C., Morel, F., 2005. IL-22 inhibits epidermal differentiation and induces proinflammatory gene expression and migration of human keratinocytes. *J. Immunol.*, 174: 3695-3702.

Bonville, C.A., Easton, A.J., Rosenberg, H.F., Domachowske, J.B., 2003. Altered pathogenesis of severe pneumovirus infection in response to combined antiviral and specific immunomodulatory agents. *J. Virol.*, 77: 1237-1244.

Bonville, C.A., Lau, V.K., DeLeon, J.M., Gao, J.L., Easton, A.J., Rosenberg, H.F., Domachowske, J.B., 2004. Functional antagonism of chemokine receptor CCR1 reduces mortality in acute pneumovirus infection in vivo. *J. Virol.*, 78: 7984-7989.

Botchan, M., Stringer, J., Mitchinson, T., Sambrook, J., 1980: Integration and excision of SV 40-DNA from the chromosome of a transformed cell. *Cell*, 20: 143-152.

Bousquet, J., Chanez, P., Lacoste, J.Y., Barneon, G., Ghavanian, N., Enander, I., Venge, P., Ahlstedt, S., Simony-Lafonatin, J., Godard, P., et al., 1990. Eosinophilic inflammation in asthma. *N. Engl. J. Med.*, 323(15): 1033-1039.

Boyum, A. 1968. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*, 97: 77-89.

Bradford M, 1967. A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms quantities of protein, utilizing the principle of protein-dye binding. *Annual reviews of Biochemistry* 72, 248-252

Brivanlou AH, Darnell JE., 2002. Signal transduction and the control of gene expression. *Science*. 5556: 813-8.

Bursill CA, Channon KM, Greaves DR. 2004 The role of chemokines in atherosclerosis: recent evidence from experimental models and population genetics. *Curr Opin Lipidol.* ,15,145-9.

Bußfeld, D., 1997. Molekulare Mechanismen der Produktion von Chemokinen bei Virusinfektionen humaner monozytärer Zellen. Dissertation, Marburg.

Bußfeld, D., Kaufmann, A., Meyer, R.G., Gemsa, D., Sprenger, H., 1996. Differential mononuclear leukocyte attracting chemokine production after stimulation with active and inactivated influenza A virus. *Cell. Immunol.*, 186: 1-7.

Bußfeld D, Bacher M, Moritz A, Gemsa D, Sprenger H., 1997. Expression of transcription factor genes after influenza A virus infection. *Immunobiology*.;198:291-8.

Bußfeld D, Nain M, Hofmann P, Gemsa D, Sprenger H., 2000. Selective induction of the monocyte-attracting chemokines MCP-1 and IP-10 in vesicular stomatitis virus-infected human monocytes. *J Interferon Cytokine Res.* ;20:615-21.

Butcher, E.C., 1991. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell*, 67, 1033-1036.

Calotta, F., Borre, A., Wang, J.M., Tattanelli, M., Maddalena, F., Polentarutti, N., Peri, G., Mantovani, A., 1992. Expression of a monocyte chemotactic cytokine by human mononuclear phagocytes. *J. Immunol.*, 148:760-765.

Caudell EG, Mumm JB, Poindexter N, Ekmekcioglu S, Mhashilkar AM, Yang XH, Retter MW, Hill P, Chada S, Grimm EA.2002. The protein product of the tumor suppressor gene, melanoma differentiation-associated gene 7, exhibits immunostimulatory activity and is designated IL-24. *J Immunol.* ,168:6041-6.

Castellino, F., Huang, A.Y., Altan-Bonnet, G., Stoll, S., Scheinecker, C., Germain, R.N., 2006. Chemokines enhance immunity by guiding naive CD8+ T cells to sites of CD4+ T cell-dendritic cell interaction. *Nature*, 440: 890-895.

Cavaillon, J.M., Haeffner-Cavaillon, N., 1990. Signals involved in interleukin 1 synthesis and release by lipopolysaccharide-stimulated monocytes/macrophages. *Cytokine*, 2:313-329.

Chan, V.W., Kothakota, S., Rohan, M.C., Panganiban-Lustan, L., Gardner, J.P., Wachowicz, M.S., Winter, J.A., Williams, L.T., 1999. Secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) is chemotactic for mature dendritic cells. *Blood*, 93:3610-3616.

Chatterjee-Kishore M, Kishore R, Hicklin DJ, Marincola FM, Ferrone S. 1998. Different requirements for signal transducer and activator of transcription 1alpha and interferon regulatory factor 1 in the regulation of low molecular mass polypeptide 2 and transporter associated with antigen processing 1 gene expression. *J Biol Chem.* ,273:16177-83.

Chen, W., Calvo, P.A., Malide, D., Gibbs, J., Schubert, U., Bacik, I., Basta, S., O'Neill, R., Schickli, J., Palese, P., Henklein, P., Bennink, J.R., Yewdell, J.W., 2001. A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat. Med.*, 7(12): 1306-1312.

Cheng, T.F., Brzostek, S., Ando, O., Van Scoy, S., Kumar, K.P., Reich, N.C., 2006. Differential activation of IFN regulatory factor (IRF)-3 and IRF-5 transcription factors during viral infection. *J. Immunol.*, 176: 7462-7470.

Cheung, C.Y., Poon, L.L., Lau, A.S., Luk, W., Lau, Y.L., Shortridge, K.F., Gordon, S., Guan, Y., Peiris, J.S., 2002. Induction of proinflammatory cytokines

in human macrophages by influenza A (H5N1) viruses: a mechanism for the unusual severity of human disease? *Lancet*, 360: 1831- 1837.

Chollet-Martin, S., Montravers, P., Gibert, C., Elbim, C., Desmonts J.M., Fagon, J.Y., Gougerot-Pocidalò, M.A., 1993. High levels of interleukin-8 in the blood and alveolar spaces of patients with pneumonia and adult respiratory distress syndrome. *Infect. Immun.*, 61(11): 4553-4559.

Choi AM, Knobil K, Otterbein SL, Eastman DA, Jacoby DB. 1996. Oxidant stress responses in influenza virus pneumonia: gene expression and transcription factor activation. *Am J Physiol.* ;271:L383-91.

Coccia, E.M., Severa, M., Giacomini, E., Monneron, D., Remoli, M.E., Julkunen, I., Cella, M., Lande, R., Uze, G., 2004. Viral infection and Toll-like receptor agonists induce a differential expression of type I and lambda interferons in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells. *Eur. J. Immunol.*, 34: 796-805.

Colotta, F., Borre, A., Wang, J.M., Tattaneli, M., Maddalena, F., Polentarutti, N., Peri, G., Mantovani, A. 1992. Expression of a monocyte chemotactic cytokine by human mononuclear phagocytes. *J Immunol*, 148: 760-765.

Cook DN, Beck MA, Coffman TM, Kirby SL, Sheridan JF, Pragnell IB, Smithies O., 1995. Requirement of MIP-1 alpha for an inflammatory response to viral infection. *Science.*;269:1583-5

Cox, N.J., Subbarao, K., 1999. Influenza. *Lancet*, 354: 1277-1282.

Cunningham, C.C., Chada, S., Merritt, J.A., Tong, A., Senzer, N., Zhang, Y., Mhashilkar, A., Parker, K., Vukelja, S., Richards, D., Hood, J., Coffee, K., Nemunatis, J., 2005. Clinical and local biological effects of an intratumoral injection of mda-7 (IL24; INGN 241) in patients with advanced carcinoma: a phase I study. *Mol. Ther.*, 11: 149-159.

Curran, T., Franza, B.R. Jr., 1988. Fos and Jun: the AP-1 connection. *Cell*, 55: 395-397.

Darnell., J.E., 1997. STATs and gene regulation. *Science*, 277: 1630-1635.

Darnell., J.E., Kerr, I.M., Stark, G.R., 1994. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science*, 264: 1415-1420.

Davidson, B.A., Stewart, C.C., Russo, T.A., Chess, P.R., Knight P.R.<sup>3rd</sup>, 2005. Discrimination of resident and infiltrated alveolar macrophages by flow cytometry in influenza A virus-infected mice. *Exp. Lung Res.*, 31: 323-329.

Dawson, T.C., Beck, M.A., Kuziel, W.A., Henderson, F., Maeda, N., 2000. Contrasting effects of CCR5 and CCR2 deficiency in the pulmonary inflammatory response to influenza A virus. *Am. J. Pathol.*, 156(6): 1951-1959.

de Jong MD., Simmons CP., Thanh TT., Hien VM., Smith GJ., Chau TN., Hoang DM., Chau NV., Khanh TH., Dong VC., Qui PT., Cam BV., Ha do Q., Guan Y., Peiris JS., Chinh NT., Hien TT., Farrar J.,2006. Fatal outcome of human influenza A (H5N1) is associated with high viral load and hypercytokinemia. *Nat Med.* (10):1203-7.

Deuel, T.F., Keim, P.S., Farmer, M., Heinrichson, R.L., 1977. Amino acid sequence of human platelet factor 4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*,74:2256-2258.

de Wet JR, Wood KV, DeLuca M, Helinski DR, Subramani S., 1987. Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol Cell Biol.*;7:725-37.

Dieu-Nosjean, M.C., Vicari, A., Lebecque, S., Caux, C., 1999. Regulation of dendritic cell trafficking: a process that involves the participation of selective chemokines. *J. Leukoc. Biol.*, 66:252-262.

Dolin, R., 1997. Influenza. Harrison's principles of internal medicine 14<sup>th</sup> edition:1112-1116.

Dumoutier L, Leemans C, Lejeune D, Kottenko SV, Renauld JC.,2001. Cutting edge: STAT activation by IL-19, IL-20 and mda-7 through IL-20 receptor complexes of two types. *J Immunol.* ,167:3545-9.

Duffield, J.S., Erwig, L.P., Wei, X., Liew, F.Y., Rees, A.J., Savill, J.S., 2000. Activated macrophages direct apoptosis and suppress mitosis of mesangial cells. *J. Immunol.*, 164:2110-2119.

Durbin, J.E., Fernandez-Sesma, A., Lee, C.K., Rao, T.D., Frey, A.B., Moran, T.M., Vukmanovic, S., Garcia-Sastre, A., Levy, D.E., 2000. Type I IFN modulates innate and specific antiviral immunity. *J. Immunol.*, 164: 4220-4228.

Ehrhardt, C., Kardinal, C., Wurzer, W.J., Wolff, T., von Eichel-Streiber, C., Pleschka, S., Planz, O., Ludwig, S., 2004. Rac1 and PAK1 are upstream of IKK-epsilon and TBK-1 in the viral activation of interferon regulatory factor-3. *FEBS Lett.* 567: 230-238.

Eklund EA, Kakar R., 1999. Recruitment of CREB-binding protein by PU.1, IFN-regulatory factor-1, and the IFN consensus sequence-binding protein is necessary for IFN-gamma-induced p67phox and gp91phox expression. *J Immunol.*;163:6095-105.

Elsner, J., Petering, H., Kluthe, C., Kimming, D., Smolarski, R., Ponath, P., Kapp, A., 1998. Eotaxin-2 activates chemotaxis-related events and release of reactive oxygen species via-pertussis toxin-sensitive G proteins in human eosinophils. *Eur. J. Immunol.*, 28:2152-2158.

Endter C, Dobner T.,2004. Cell transformation by human adenoviruses. *Curr Top Microbiol Immunol.* ;273:163-214.

Engeland, K., Andrews, N.C., Mathey-Prevot, B., 1995. Multiple proteins interact with the nuclear inhibitory protein repressor element in the human interleukin-3 promoter. *J. Biol. Chem.*, 270: 24572-24579.

Esche C, Stellato C, Beck LA.,2005. Chemokines: key players in innate and adaptive immunity. *J Invest Dermatol.*;125(4):615-28.

Escher, S.E., Sticht, H., Forssmann, W.G., Rosch, P., Adermann, K., 1999. Synthesis and characterization of the human CC chemokine HCC-2. *J. Pept. Res.*, 54:505-513.

Farber, J.M., 1993. Mig and IP-10: CXC chemokines that target lymphocytes. *J. Leukoc. Biol.*, 61:246-257.

Fernandez N, Renedo M, Sanchez Crespo M.,2002. FcgammaR receptors activate MAP kinase and up-regulate the cyclooxygenase pathway without increasing arachidonic acid release in monocytic cells. *Eur J Immunol.* ;32:383-92.

Fesq, H., Bacher, M., Nain, M., Gemsa, D., 1994. Programmed cell death (apoptosis) in human monocytes infected by influenza A virus. *Immunobiology*, 190:175-182.

Fickenscher, H., Hör, S., Küpers, H., Knappe, A., Wittmann, S., Sticht, H., 2002. The interleukin-10 family of cytokines. *Tr. Immunol.*, 23(2): 89-96.

Fields, B.N., Knipe, D.M. (Hrsg.) 1991. *Fundamental Virology*. 2<sup>nd</sup> edition. Raven Press, New York.

Figdor, C.G., Leemans, J.M.M., Bont, W.S., DeVries, J.E. 1983. Theory and practise of centrifugal elutriation (CE). *Cell Biophysics*, 5: 105-118.

Fitzgerald, K.A., Rowe, D.C., Barnes, B.J., Caffrey, D.R., Visintin, A., Latz, E., Minks, B., Pitha, P.M., Golenbock, D.T., 2003. LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7

and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *J. Exp. Med.*, 198: 1043-1055.

Flory E, Kunz M, Scheller C, Jassoy C, Stauber R, Rapp UR, Ludwig S., 2000. Influenza virus-induced NF-kappaB-dependent gene expression is mediated by overexpression of viral proteins and involves oxidative radicals and activation of IkappaB kinase. *J Biol Chem.*;275(12):8307-14.

Forsdyke DR., 1985. cDNA cloning of mRNAs which increase rapidly in human lymphocytes cultured with concanavalin-A and cycloheximide. *Biochem Biophys Res Commun.*;129(3):619-25.

Fried, M., Corthers, D.M., 1981. Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.*, 9(23): 6505-6525.

Fritz, R.S., Hayden, F.G., Calfee, D.P., Cass, L.M., Peng, A.W., Alvord, W.G., Strober, W., Straus, S.E., 1999. Nasal cytokine and chemokine responses in experimental influenza A virus infection: results of a placebo-controlled trial of intravenous zanamivir treatment. *J. Infect. Dis.*, 180: 586-593.

Garcia-Sastre A, Durbin RK, Zheng H, Palese P, Gertner R, Levy DE, Durbin JE., 1998. The role of interferon in influenza virus tissue tropism. *J Virol.*;72:8550-8.

Garcia-Sastre, A., 2001. Inhibition of interferon-mediated antiviral responses by influenza A viruses and other negative-strand RNA viruses. *Virology*, 279: 375-384.

Garcia-Velasco, J.A., Arici, A., 1998. Chemokines and human reproduction. *Fertil. Steril.*, 71:983-993.

Gardner, I.D., Lawton, J.W., 1982. Depressed human monocyte function after influenza infection in vitro. *J Reticuloendothel Soc*, 32: 443-448.

Garn, H., Schmidt, A., Grau, V., Stumpf, S., Kaufmann, A., Becker, M., Gemsa, D., Siese, A., 2002. IL-24 is expressed by rat and human macrophages. *Immunobiol.*, 205: 321-334.

Garner, M.M., Revzin, A., 1981. A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: application to components of the *Escherichia coli* lactose operon regulatory system. *Nucleic Acids Res.*, 9(13): 3047-3060.

Garofalo, R.P., Hintz, K.H., Hill, V., Patti, J., Ogra, P.L., Welliver, R.C. Sr., 2005. A comparison of epidemiologic and immunologic features of bronchiolitis caused by Influenza virus and respiratory syncytial virus. *J. Med. Virol.*, 75: 282-289.

Garten, W., Klenk, H.-D., 1999. Understanding influenza virus pathogenicity. *Trends Microbiol.*, 7(3): 99-100.

Geiss GK, An MC, Bumgarner RE, Hammersmark E, Cunningham D, Katze MG., 2001. Global impact of influenza virus on cellular pathways is mediated by both replication-dependent and -independent events. *J Virol.* ;75(9):4321-31.

Gemsa, D., Kalden, J.R., Resch, K. (Hrsg.), 1997. *Immunologie*. 2. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Gemsa, D., Kozan, B., 1984. Entzündungszellen. *Allergologie* 7: 183-184.

Génin, P., Algarté, M., Roof, P., Lin, R., Hiscott, J., 2000. Regulation of RANTES chemokine gene expression requires cooperativity between NF- $\kappa$ B and IFN-regulatory factor transcription factors. *J. Immunol.*, 164: 5352-5361.

Gerard, C., Rollins, B.J., 2001. Chemokines and disease. *Nat. Immunol.* 2(2): 108-115.

Gluzman, Y., 1981: SV 40-transformed simian cells support the replication of early SV 40 mutants. *Cell*, 23:175-182.

Godiska, R., Chantry, D., Raport, C.J., Sozzani, S., Allavena, P., Leviten, D., Mantovani, A., Gray, P.W., 1997. Human macrophage-derived chemokine (MDC), a novel chemoattractant for monocytes, monocyte-derived dendritic cells, and natural killer cells. *J. Exp. Med.*, 185:1595-1604.

Goldfeld, A.E., Maniatis, T., 1989. Coordinate viral induction of tumor necrosis factor alpha and interferon beta in human B cells and monocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:1490-1494.

Goldfeld, A.E., Strominger, J.L., Doyle, C., 1991. Human tumor necrosis factor alpha gene regulation in phorbol ester stimulated T and B cell lines. *J. Exp. Med.*, 174:73-81.

Gong, J.H., Sprenger, H., Hinder, F., Bender, A., Schmidt, A., Horch, S., Nain, M., Gemsa, D., 1991. Influenza A virus infection of macrophages. Enhanced tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) gene expression and lipopolysaccharide-triggered TNF-alpha release. *J. Immunol.*, 147: 3507-3513.

Gordon, S., Taylor, P.R., 2005. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.*, 5: 953-964.

Goriely, S., Molle, C., Nguyen, M., Albarani, V., Haddou, N.O., Lin, R., De Wit, D., Flamand, V., Willems, F., Goldman M., 2006. Interferon regulatory factor 3 is involved in Toll-like receptor 4 (TLR4)- and TLR3-induced IL-12p35 gene activation. *Blood*, 107: 1078-1084.

Gottlieb, A.B., Luster, A.D., Posnett, D.N., Carter, D.M., 1988. Detection of a gamma interferon-induced protein IP-10 in psoriatic plaques. *J. Exp. Med.*, 168(3): 941-948.

Greenberg, H.B., Piedra, P.A., 2004. Immunization against viral respiratory disease. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 23: S254-S261.

Grove, M., Lowe, S., Graham, G., Pragnell, I., Plumb, M., 1990. Sequence of the murine haemopoietic stem cell inhibitor/macrophage inflammatory protein 1 alpha gene. *Nucleic Acids Res.*, 18:5561.

Hahn, H., Falke, D., Klein, P., 1991. *Medizinische Mikrobiologie*. 1. Auflage. Springer Verlag. ISBN 3-540-19389-8.

Hamer, D.H., Smith, K.D., Boyer, S.H., Leder, P., 1979: SV 40 recombinants carrying rabbit beta-globin gene coding sequences. *Cell* 17: 725-735.

Hamilton, T.A., Adams, D.O., 1987. Molecular mechanism of signal transduction in macrophages. *Immunol Today* 8: 151-158.

Hirashima M, Ono T, Nakao M, Nishi H, Kimura A, Nomiyama H, Hamada F, Yoshida MC, Shimada K.,1992. Nucleotide sequence of the third cytokine LD78 gene and mapping of all three LD78 gene loci to human chromosome 17. *DNA Seq.*;3:203-12.

Hofmann, P., Sprenger, H., Kaufmann, A., Bender, A., Hasse, C., Nain, M., Gemsa, D., 1997. Susceptibility of mononuclear phagocytes to influenza A virus infection and possible role in the antiviral response. *J. Leuc. Biol.*, 61: 1-7.

Honda, K., Yanai, H., Negishi, H., Asagiri, M., Sato, M., Mizutani, T., Shimada, N., Ohba, Y., Takaoka, A., Yoshida, N., Taniguchi, T., 2005. IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature*, 434: 772-777.

Huang EY, Madireddi MT, Gopalkrishnan RV, Leszczyniecka M, Su Z, Lebedeva IV, Kang D, Jiang H, Lin JJ, Alexandre D, Chen Y, Vozhilla N, Mei MX, Christiansen KA, Sivo F, Goldstein NI, Mhashilkar AB, Chada S, Huberman E, Pestka S, Fisher PB.,2001. Genomic structure, chromosomal localization

and expression profile of a novel melanoma differentiation associated (mda-7) gene with cancer specific growth suppressing and apoptosis inducing properties. *Oncogene*.;20(48):7051-63.

Huang, Q., Liu, D., Majewski, P., Schulte, L.C., Korn, J.M., Young, R.A., Lander, E.S., Hacohen, N., 2001. The plasticity of dendritic cell responses to pathogens and their components. *Science*, 294: 870-875.

Hume, D.A., 2006. The mononuclear phagocyte system. *Curr. Opin. Immunol.*, 18: 49-53.

Huarte M, Sanz-Ezquerro JJ, Roncal F, Ortin J, Nieto A.,2001. PA subunit from influenza virus polymerase complex interacts with a cellular protein with homology to a family of transcriptional activators. *J Virol.*;75:8597-604.

Imhof, B.A., Dunon, D. 1995. Leukocyte migration and adhesion. *Adv Immunol*, 58: 345-416.

Ishiji T., 2000. Molecular mechanism of carcinogenesis by human papillomavirus-16. *J Dermatol.* ;27(2):73-86.

Irving SG, Zipfel PF, Balke J, McBride OW, Morton CC, Burd PR, Siebenlist U, Kelly K.,1990. Two inflammatory mediator cytokine genes are closely linked and variably amplified on chromosome 17q. *Nucleic Acids Res.* ;18:3261-70.

Jamaluddin M, Garofalo R, Ogra PL, Brasier AR.,1996. Inducible translational regulation of the NF-IL6 transcription factor by respiratory syncytial virus infection in pulmonary epithelial cells. *J Virol.* ;70:1554-63.

Jennings, S.T., Etensohn, D.B., Roberts, N.J., Jr., 1984. Influenza virus infection of human alveolar and peripheral blood-derived macrophages. Production of factors that alter fibroblast proliferation. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 130:98-102.

Jiang, H., Su, Z., Lin, J.J., Goldstein, N.I., Young, C.S.H., Fisher, P.B., 1996. The melanoma differentiation-associated gene mda-7 suppresses cancer-cell growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 93, 9160-9165.

Jones E, Price DA, Dahm-Vicker M, Cerundolo V, Klenerman P, Gallimore A.,2003. The influence of macrophage inflammatory protein-1alpha on protective immunity mediated by antiviral cytotoxic T cells. *Immunology.*;109:68-75.

Junqueira L.C., Carneiro, J., 1986. *Histologie. 2. Auflage.* Springer Verlag, Berlin.

Kamijo R, Harada H, Matsuyama T, Bosland M, Gerecitano J, Shapiro D, Le J, Koh SI, Kimura T, Green SJ, et al.,1994. Requirement for transcription factor IRF-1 in NO synthase induction in macrophages. *Science.*;263:1612-5.

Kano A, Haruyama T, Akaike T, Watanabe Y., 1999. IRF-1 is an essential mediator in IFN-gamma-induced cell cycle arrest and apoptosis of primary cultured hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* ,257:672-7.

Kaplan, D.H., Schreiber, R.D. The interferons: biochemistry and biology. In: Thèze, J. (Hrsg.), 1999. *The cytokine network and immune functions.* 1. Auflage, Oxford University Press, Oxford.

Kaplan, G., Luster, A.D., Hancock, G., Cohn, Z.A., 1987. The expression of a gamma interferon-induced protein (IP-10) in delayed immune responses in human skin. *J. Exp. Med.*, 166:1098-1108.

Kasama, T., Strieter, R.M., Standiford, T.J., Burdick, M.D., Kunkel, S.L. 1993. Expression and regulation of human neutrophil-derived macrophage inflammatory protein 1 alpha. *J Exp Med*, 178: 63-72.

Kastenbauer S, Ziegler-Heitbrock HW.,1999. NF-kappaB1 (p50) is upregulated in lipopolysaccharide tolerance and can block tumor necrosis factor gene expression. *Infect Immun.* ;67:1553-9.

Kato, S., Anderson, R.A., Camerini-Otero, R.D., 1986: Foreign DNA introduced by calcium phosphate is integrated into repetitive DNA elements of the mouse L cell genome. *Mol. Cell. Biol.*, 6: 1787-1795.

Kaufmann, A., 1998. Differentielle Induktion der Chemokin- und Zytokinsynthese und funktionelle Veränderungen der Chemokinrezeptorexpression in humanen Monozyten und Makrophagen durch bakterielle Moduline, Influenza-A-Virus und Virosomen. Dissertation, Marburg.

Kaufmann, A., Salentin, R., Meyer, R.G., Bussfeld, D., Pauligk, C., Fesq, H., Hofmann, P., Nain, M., Gemsa, D., Sprenger, H., 2001. Defense against influenza A virus infection: essential role of the chemokine system. *Immunobiology* 204: 603-613.

Kim, E.A., Lee, K.S., Primack, S.L., Yoon, H.K., Byun, H.S., Kim, T.S., Suh, G.Y., Kwon, O.J., Han, J., 2002. Viral pneumonia in adults: Radiologic and pathologic findings. *Radiographics*, 22: S127-S149.

Kim, P.K., Armstrong, M., Liu, Y., Yan, P., Bucher, B., Zuckerbraun, B.S., Gambotto, A., Billiar, T.R., Yim, J.H., 2004. IRF-1 expression induces apoptosis and inhibits tumor growth in mouse mammary cancer cells in vitro and in vivo. *Oncogene*, 23: 1125-1135.

Klar, M., Bode, J., 2005. Enhanceosome formation over the beta interferon promoter underlies a remote-control mechanism mediated by YY1 and YY2. *Mol. Cell. Biol.*, 25: 10159-10170.

Kobasa D, Jones SM, Shinya K, Kash JC, Copps J, Ebihara H, Hatta Y, Kim JH, Halfmann P, Hatta M, Feldmann F, Alimonti JB, Fernando L, Li Y, Katze MG, Feldmann H, Kawaoka Y., 2007. Aberrant innate immune response in lethal infection of macaques with the 1918 influenza virus. *Nature* 445(7125):319-23.

Koopmann W, Krangel MS.,1997. Identification of a glycosaminoglycan-binding site in chemokine macrophage inflammatory protein-1alpha. *J Biol Chem.* 272:10103-9.

Lahrtz, F., Piali, L., Nadal, D., Pfister, H.W., Spanaus, K.S., Baggiolini, M., Fontana, A., 1997. Chemotactic activity on mononuclear cells in the cerebrospinal fluid of patients with viral meningitis is mediated by interferon-gamma inducible protein-10 and monocyte chemotactic protein-1. *Eur. J. Immunol.*, 27(19): 2484-2489.

Lamb, R., Takeda, M., 2001. Death by influenza protein. *Nat. Med.*, 7(12): 1286-1288.

Lange, W., Vogel, G.E., Uphoff, H., 1999. Influenza. Virologie, Epidemiologie, Klinik, Therapie und Prophylaxe. Blackwell-Wissenschaftsverlag Berlin-Wien.

Lapp, W.S., Mendes, M., Kirchner, H., Gemsa, D., 1980. Prostaglandin synthesis by lymphoid tissue of mice experiencing a graft-versus-host reaction: Relation to immunosuppression. *Cell. Immunol.*, 50:271-281.

Latchman DS.,1997. Transcription factors: an overview. *Int J Biochem Cell Biol.* ;29:1305-12.

Laudanna, C., Campbell, J.J., Butcher, E.C., 1996. Role of Rho in chemoattractant-activated leukocyte adhesion through integrins. *Science*, 271:981-983.

Lewis WH, Srinivasan PR, Stokoe N, Siminovitch L.,1980. Parameters governing the transfer of the genes for thymidine kinase and dihydrofolate

reductase into mouse cells using metaphase chromosomes or DNA. *Somatic Cell Genet.*;6:333-47.

Levinson B, Kenwrick S, Lakich D, Hammonds G Jr, Gitschier J., 1990. A transcribed gene in an intron of the human factor VIII gene. *Genomics.*;7:1-11.

Liebermann DA, Hoffman B.,2002. Myeloid differentiation (MyD) primary response genes in hematopoiesis. *Oncogene.*;21:3391-402.

Lin, R., Heylbroeck, C., Genin, P., Pitha, P.M., Hiscott, J., 1999. Essential role of interferon regulatory factor 3 in direct activation of RANTES chemokine transcription. *Mol. Cell. Biol.*, 19: 959-966.

Lipes MA, Napolitano M, Jeang KT, Chang NT, Leonard WJ.,1988 Identification, cloning, and characterization of an immune activation gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.*;85:9704-8.

Liu, J., Shanjin, C., Herman, L.M., Xiaojing, M., 2003. Differential regulation of Interleukin (IL)-12 p35 and p40 gene expression and Interferon (IFN)- $\gamma$  primed IL-12 production by IFN Regulatory Factor 1. *J. Exp. Med*, 198:1265-1276.

Loetscher, P., Seitz, M., Baggiolini, M., Moser, B., 1996. Interleukin-2 regulates CC chemokine receptor expression and chemotactic responsiveness in T lymphocytes. *J. Exp. Med.*, 184:569-577.

Lohoff M, Ferrick D, Mittrucker HW, Duncan GS, Bischof S, Rollinghoff M, Mak TW.,1997. Interferon regulatory factor-1 is required for a T helper 1 immune response in vivo. *Immunity.*;6:681-9.

Lokuta, M.A., Maher, J., Noe, K.H., Pitha, P.M., Shin, M.L., Shin, H.S., Mechanisms of murine RANTES chemokine gene induction by Newcastle disease virus. *J. Biol. Chem.*, 271: 13731-13738.

Lopata, M.A., Cleveland, D.W., Sollner-Webb, B., 1984: High level transient expression of a chloramphenicol acetyl transferase gene by DEAE-dextran mediated DNA transfection coupled with a dimethyl sulfoxide or glycerol shock treatment. *Nucl. Acids Res.*, 12: 5707-5717.

Lowy, D.R., Rands, E., Scolnick, E.M., 1978: Helper-independent transformation by unintegrated Harvey sarcoma virus DNA. *J. Virol.*, 26: 291-298.

Lu, R., Pitha, P.M., 2001. Monocyte differentiation to macrophage requires interferon regulatory factor 7. *J. Biol. Chem.*, 276(48): 45491-45496.

Ludwig S, Ehrhardt C, Neumeier ER, Kracht M, Rapp UR, Pleschka S.,2001. Influenza virus-induced AP-1-dependent gene expression requires activation of the JNK signaling pathway. *J Biol Chem* 15;276:10990-8.

Luster, A.D., 1998. Chemokines- Chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N. Engl. J. Med.*, 338:436-445.

Luster, A.D., Rothenberg, M.E., 1997. Role of the monocyte chemoattractant protein and eotaxin subfamily of chemokines in allergic inflammation. *J. Leukoc. Biol.*, 62(5): 620-633.

Luther, S. A., Cyster, J.G., 2001. Chemokines as regulators of T cell differentiation. *Nat. Immunol.*, 2(2): 102-107.

Mackay, C.R., 2001. Chemokines: immunology's high impact factors. *Nat. Immunol.*, 2(2): 95-101.

Madireddi MT, Dent P, Fisher PB.,2000. Regulation of mda-7 gene expression during human melanoma differentiation. *Oncogene.*;19:1362-8.

Mak, N.K., Ada, G.L., 1984. The acquisition of anti-influenza virus activity by macrophages. *Immunobiology*, 166:458-472.

Mamane, Y., Heylbroeck, C., Génin, P., Algarté, M., Servant, M.J., LePage, C., DeLuca, C., Kwon, H., Lin, R., Hiscott, J., 1999. Interferon regulatory factors: the next generation. *Gene*, 237: 1-14.

Männel, D.N., Falk, W., 1989. Optimal induction of tumor necrosis factor production in human monocytes requires complete S-form lipopolysaccharide. *Infect. Immun.*, 57:1953-1958.

Marcello A, Lusic M, Pegoraro G, Pellegrini V, Beltram F, Giacca M., 2004. Nuclear organization and the control of HIV-1 transcription. *Gene*. 4;326:1-11.

Marié, I., Durbin, J.E., Levy, D.E., 1998. Differential viral induction of distinct interferon- genes by positive feedback through interferon regulatory factor-7. *EMBO J.*, 17(22): 6660-6669.

Marini, M, Vittori, E., Hollemborg, J., Mattoli, S. 1992. Expression of the potent inflammatory cytokines, granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor and interleukin-6 and interleukin-8, in bronchial epithelial cells of patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 89: 1001-1009.

Mathey-Prevot, B., Andrews, N.C., Murphy, H.S., Kreissman, S.G., Nathan, D.G., 1990. Positive and negative elements regulate human interleukin 3 expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 5046-5050.

Matikainen S, Pirhonen J, Miettinen M, Lehtonen A, Govenius-Vintola C, Sareneva T, Julkunen I.,2000. Influenza A and sendai viruses induce differential chemokine gene expression and transcription factor activation in human macrophages. *Virology*. 10;276:138-47.

Matsumoto M, Sakao Y, Akira S., 1998. Inducible expression of nuclear factor IL-6 increases endogenous gene expression of macrophage inflammatory protein-1 alpha, osteopontin and CD14 in a monocytic leukemia cell line. *Int Immunol.* ;10:1825-35.

Matsushima, K., Larsen, C.G., DuBois, C.G., Oppenheim, J.J., 1989. Purification and characterization of a novel monocyte chemotactic and activating factor produced by a human myelomonocytic cell line. *J. Exp. Med.*, 169:1485-1490.

Menten P, Wuyts A, Van Damme J.,2002 Macrophage inflammatory protein Cytokine Growth Factor Rev.;13(6):455-81.

McCutchan, J.H., Pagano, J.S., 1968: Enhancement of the infectivity of simian virus 40 deoxyribonucleic acid with diethylaminoethyl-dextran. *J. Natl. Cancer Inst.*, 41: 351-357.

Miller, E.J. Cohen, A.B., Nagao, S., Griffith, D., Maunder, R.J., Martin, T.R., Weiner-Kronish, J.P., Sticherling, M., Christophers, E., Mattay, M.A., 1992. Elevated levels of NAP-1/ Interleukin-8 are present in the airspaces of patients with the adult respiratory distress syndrome and are associated with increased mortality. *Am Rev Respir Dis*, 146: 427-432.

Miller, M.D., Hata, S., De Waal Malefyt, R., Krangel, M.S., 1989. A novel polypeptide secreted by activated human T lymphocytes. *J. Immunol.*, 143:2907-2916.

Mitchell PJ, Tjian R., 1989. Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science*. 28;245:371-8.

Miyamoto, M., Fujita, T., Kimura, Y., Maruyama, M., Harada, H., Sudo, Y., Miyata, T., Taniguchi, T., 1988. Regulated expression of a gene encoding a nuclear factor, IRF-1, that specifically binds to IFN-beta gene regulatory elements. *Cell*, 54: 903-913.

Mogensen, S.C., 1979. Role of macrophages in natural resistance to virus infections. *Micro. Biol. Rev.*, 43:1-26.

Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A.,2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol.*;19:683-765.

Morales, J., Homey, B., Vicari, A.P., Hudak, S., Oldham, E., Hedrick, J., Orozoco, R., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., McEvoy, L.M., Zlotnik, A., 1999. CTACK, a skin-associated chemokine that preferentially attracts skin-homing memory T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:14470-14475.

Mori, T., Anazawa, Y., Iizumi, M., Fukuda, S., Nakamura, Y., Arakawa, H., 2002. Identification of the interferon regulatory factor 5 gene (IRF-5) as a direct target for p53. *Oncogene*, 21: 2914-2918.

Muhlethaler-Mottet A, Di Berardino W, Otten LA, Mach B., 1998. Activation of the MHC class II transactivator CIITA by interferon-gamma requires cooperative interaction between Stat1 and USF-1. *Immunity.*;8:157-66.

Nain, M., Hinder, F., Gong, J.H., Schmidt, A., Bender, A., Sprenger, H., Gemsa, D., 1990. Tumor necrosis factor-alpha production of influenza A virus-infected macrophages and potentiating effect of lipopolysaccharides. *J Immunol*, 145: 1921-1928.

Nakao, M., Nomiyama, H., Shimada, K., 1990. Structures of human genes coding for cytokine LD78 and their expression. *Mol. Cell. Biol.*, 10: 3646-3658.

Nakaya T, Sato M, Hata N, Asagiri M, Suemori H, Noguchi S, Tanaka N, Taniguchi T., 2001. Gene induction pathways mediated by distinct IRFs during viral infection. *Biochem Biophys Res Commun.*;283:1150-6.

Nathan, C.F., 1987. Secretory products of macrophages. *J Clin Invest*, 79: 319-326.

Nelken, N.A., Coughlin, S.R., Gordon, D., Wilcox, J.N., 1991. Monocyte chemoattractant protein-1 in human atheromatous plaques. *J. Clin. Invest.*, 88(4) : 1121-1127.

Neote K, DiGregorio D, Mak JY, Horuk R, Schall TJ., 1993. Molecular cloning, functional expression, and signaling characteristics of a C-C chemokine receptor. *Cell*. 12;72:415-25.

Neurath, M., Ma, X., Pettersson, S., 1997. DNA/Protein-Interaktionen. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.

Nguyen, N., Zhang, X., Olashaw, N., Seto, E., 2004. Molecular cloning and functional characterization of the transcription factor YY2. *J. Biol. Chem.*, 279: 25927-25934.

Nichols J, Nimer SD.,1992. Transcription factors, translocations, and leukemia. *Blood.*;80:2953-63.

Obaru K, Fukuda M, Maeda S, Shimada K., 1986. A cDNA clone used to study mRNA inducible in human tonsillar lymphocytes by a tumor promoter. *J Biochem (Tokyo).*;99:885-94.

Oliveira, E.C., Marik, P.E., Colice, G., 2001. Influenza pneumonia: a descriptive study. *Chest*, 119: 1717-1723.

Ottersbach, K., McLean, J., Isaacs, N.W., Graham, G.J., 2006. A310 helical turn is essential for the proliferation-inhibiting properties of macrophage inflammatory protein-1 alpha (CCL3). *Blood* 107(4): 1284-1291.

Pahl HL., 1999. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene*. 1999 Nov 22;18(49):6853-66.

Pahl HL, Baeuerle PA., 1997. The ER-overload response: activation of NF-kappa B. *Trends Biochem Sci.*;22:63-7.

Paludan SR, Mogensen SC.,2001. Virus-cell interactions regulating induction of tumor necrosis factor alpha production in macrophages infected with herpes simplex virus. *J Virol.*;75:10170-8.

- Park, S.Y., Seol, J.W., Lee, Y.J., Cho, J.H., Kang, H.S., Kim, I.S., Park, S.H., Kim, T.H., Yim, J.H., Kim, M., Billiar, T.R., Seol, D.W., 2004. IFN-gamma enhances TRAIL-induced apoptosis through IRF-1. *Eur. J. Biochem.*, 271: 4222-4228.
- Pascual, C.J., Sanberg, P.R., Chamizo, W., Haraguchi, S., Lerner, D., Baldwin, M., El-Badri, N.S., 2005. Ovarian monocyte progenitor cells: phenotypic and functional characterization. *Stem Cells Dev.*, 14: 173-180.
- Passlick B, Flieger D, Ziegler-Heitbrock HW., 1989. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood.* ;74:2527-34.
- Pataer, A., Vorburger, S.A., Chada, S., Balachandran, S., Barber, G.N., Roth, J.A., Hunt, K.K., Swisher, S.G., 2005. Melanoma differentiation-associated gene-7 protein physically associates with the double-stranded RNA-activated protein kinase PKR. *Mol. Ther.*, 11: 717-723.
- Paul, W. E. (Hrsg.), 1999. *Fundamental Immunology*. 4. Auflage. Lipincott-Raven, New York.
- Pauligk, C., 1997. Induktion von Zytokinen und Chemokinen in neutrophilen Granulozyten durch bakterielles Lipopolysaccharid und Influenza A-Virus. Diplomarbeit, Marburg.
- Pestka S, Krause CD, Sarkar D, Walter MR, Shi Y, Fisher PB., 2004. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annu Rev Immunol.*;22:929-79.
- Pine R., 2002 IRF and tuberculosis. *J Interferon Cytokine Res.* 2002;22:15-25.
- Piqueras, B., Connolly, J., Freitas, H., Palucka, A.K., Banchereau, J., 2006. Upon viral exposure, myeloid and plasmacytoid dendritic cells produce 3 waves of distinct chemokines to recruit immune effectors. *Blood*, 107: 2613-2618.
- Pirhonen J, Sareneva T, Kurimoto M, Julkunen I, Matikainen S., 1999. Virus infection activates IL-1 beta and IL-18 production in human macrophages by a caspase-1-dependent pathway. *J Immunol.*;162:7322-9.
- Poindexter, N.J., Walch, E.T., Chada, S., Grimm, E.A., 2005. Cytokine induction of interleukin-24 in human peripheral blood mononuclear cells. *J. Leukoc. Biol.*, 78: 754-752.
- Ptashne M., 1988. How eukaryotic transcriptional activators work. *Nature.* 335:683-9.
- Ralph WM Jr., Liu K., Auburn KJ., 2006. CCAAT/enhancer-binding protein beta represses human papillomavirus 11 upstream regulatory region expression through a promoter-proximal YY1-binding site. *J Gen Virol.*;87:51-9.
- Ramji DP., Foka P., 2002. CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *Biochem J.*;365:561-75.
- Rangel-Moreno J., Moyron-Quiroz JE., Hartson L., Kusser K., Randall TD., 2007. Pulmonary expression of CXC chemokine ligand 13, CC chemokine ligand 19, and CC chemokine ligand 21 is essential for local immunity to influenza. *Proc Natl Acad Sci U S A.*,104(25):10577-82.
- Reily, M.M., Pantoja, C., Hu, X., Chinenov, Y., Rogatsky, I., 2006. The GRIP1:IRF3 interaction as a target for glucocorticoid receptor-mediated immunosuppression. *EMBO J.* 25: 108-117.
- Reinecker, H.C., Loh, E.Y., Ringler, D.J., Mehta, A., Rombeau, J.L., MacDermott, R.P., 1995. Monocyte-chemoattractant protein 1 gene expression in intestinal epithelial cells and inflammatory bowel disease mucosa. *Gastroenterology*, 108(1): 40-50.

Ritter, L.M., Bryans, M., Abdo, O., Sharma, V., Wilkie, N.M., 1995. MIP-1 $\alpha$  nuclear protein (MNP), a novel transcription factor expressed in hematopoietic cells that is crucial for transcription of the human MIP-1 $\alpha$  gene. *Mol. Cell. Biol.*, 15 (6): 3110-3118.

Rodriguez-Frade, J.M., Mellado, M., Martinez-A., C., 2001. Chemokine receptor dimerization : two are better than one. *Trends Immunol.*, 22(11): 612-617.

Rollins, B.J., Stier, P., Ernst, T., & Wong, G.G., 1989. The human homolog of the JE gene encodes a monocyte secretory protein. *Mol. Cell. Biol.*, 9:4687-4695.

Roman E, Miller E, Harmsen A, Wiley J, Von Andrian UH, Huston G, Swain SL., 2002. CD4 effector T cell subsets in the response to influenza: heterogeneity, migration, and function. *J Exp Med*;196:957-68.

Roitt, I., Brostoff, J., Male, D., 1987. *Lehrbuch der Immunologie*. 1. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Romagnani P, Lasagni L, Annunziato F, Serio M, Romagnani S., 2004. CXC chemokines: the regulatory link between inflammation and angiogenesis. *Trends Immunol.* ;25:201-9.

Ronni, T., Sareneva, T., Pirhonen, J., Julkunen, I., 1995. Activation of IFN-alpha, IFN-gamma, MxA, and IFN regulatory factor 1 genes in influenza A virus-infected human peripheral blood mononuclear cells. *J. Immunol.*, 154: 2764-2774.

Rossi, D., Zlotnik, A., 2000. The biology of chemokines and their receptors. *Annu. Rev. Immunol.*, 18 : 217-242.

Rollins, B.J., 2006. Release the hounds ! A chemokine elicits monocytes from bone marrow. *Nat. Immunol.*, 7: 230-232.

Roman, E., Miller, E., Harmsen, A., Wiley, J., von Andrian, U.H., Huston, G., Swain, S.L., 2002. CD4 effector T cell subsets in the response to influenza: heterogeneity, migration, and function. *J. Exp. Med.*, 196: 957-968.

Salazar-Mather, T.P., Hamilton, T.A., Biron, C.A., 2000. A chemokine-to-cytokine-to-chemokine cascade critical in antiviral defense. *J. Clin. Invest.*, 105(7): 985-993.

Salazar-Mather, T.P., Orange, J.S., Biron, C.A., 1998. Early murine cytomegalovirus (MCMV) infection induces liver natural killer (NK) cell inflammation and protection through macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ )-dependent pathways. *J. Exp. Med.*, 187(1): 1-14.

Salentin R., Gemsa D., Sprenger H., Kaufmann A., 2003. Chemokine receptor expression and chemotactic responsiveness of human monocytes after influenza A virus infection. *J Leukoc Biol.* , 74(2):252-9.

Salkowski CA, Thomas KE, Cody MJ, Vogel SN., 2000. Impaired IFN-gamma production in IFN regulatory factor-1 knockout mice during endotoxemia is secondary to a loss of both IL-12 and IL-12 receptor expression. *J Immunol.*;165(7):3970-7.

Samuel CE., 2001 Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev.* ;14:778-809.

Sarawar, S.R., Doherty, P.C., 1994. Concurrent production of interleukin-2, interleukin-10, and gamma interferon in the regional lymph nodes of mice with influenza pneumonia. *J. Virol.*, 68: 3112-3119.

Sarkar, D., Su, Z.Z., Vozhilla, N., Park, E.S., Gupta, P., Fisher, P.B., 2005. Dual cancer-specific targeting strategy cures primary and distant breast carcinomas in nude mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102: 14034-14039.

Sato, M., Suemori, H., Hata, N., Asagiri, M., Ogasawara, K., Nakao, K., Nakaya, T., Katsuki, M., Noguchi, S., Tanaka, N., Taniguchi, T., 2000. Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN- $\alpha$ /beta gene induction. *Immunity*, 13: 539-548.

Sauane, M., Lebedeva, I.V., Su, Z.Z., Choo, H.T., Randolph, A., Valerie, K., Dent, P., Gopalkrishnan, R.V., Fisher, P.B., 2004. Melanoma differentiation associated gene-7/interleukin-24 promotes tumor cell-specific apoptosis through both secretory and nonsecretory pathways. *Cancer Res.*, 64: 2988-2893.

Schall, T.J., Bacon, K., Toy, K.J., Goeddel, D.V., 1990. Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. *Nature*, 347:669-671.

Schall, T.J., Bacon, 1994. Chemokines, leukocyte trafficking, and inflammation. *Curr Opin Immunol*, 6: 865-873.

Schall, T.J., Jongstra, J., Dyer, B.J., Jorgensen, J., Clayberger, C., Davis, M.M., Krensky, A.M., 1988. A human T cell-specific molecule is a member of a new gene family. *J. Immunol.*, 141:1018-1025.

Schenborn, E., Groskreutz, D., 1999. Reporter gene vectors and assays. *Mol. Biotechnol.*, 13(1): 29-44.

Schoenemeyer, A., Barnes, B.J., Mancl, M.E., Latz, E., Goutagny, N., Pitha, P.M., Fitzgerald, K.A., Golenbock, D.T., 2005. The interferon regulatory factor, IRF5, is a central mediator of toll-like receptor 7 signaling. *J. Biol. Chem.*, 280: 17005-17012.

Schwarzmann, S.W., Adler, J.L., Sullivan, R.J., Marine, W.M., 1971. Bacterial pneumonia during the Hong Kong influenza epidemic of 1968-1969. *Arch Intern Med*, 127: 1037-1041.

Seth, R.B., Sun, L., Ea, C.K., Chen, Z.J., 2005. Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF- $\kappa$ B and IRF 3. *Cell*, 122: 669-682.

Shaffer, A.L., Yu, X., He, Y., Boldrick, J., Chan, E.P., Staudt, L.M., 2000. BCL-6 represses genes that function in lymphocyte differentiation, inflammation, and cell cycle control. *Immunity*, 13: 199-212.

Sharma, V., Xu, M., Ritter, L.M., 1998: Biochemical characterization of MIP-1 $\alpha$  nuclear protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 248: 716-721.

Shi, Y., Lee, J.S., Galvin, K.M., 1997. Everything you have ever wanted to know about Yin Yang 1..... *Biochim. Biophys. Acta*, 1332: F49-66.

Shin, H.S., Drysdale, B.E., Shin, M.L., Noble, P.W., Fisher, S.N., Paznekas, W.A., 1994. Definition of a lipopolysaccharide-responsive element in the 5'-flanking regions of MuRantes and crg-2. *Mol. Cell. Biol.*, 14: 2914-2925.

Shinobu, N., Iwamura, T., Yoneyama, M., Yamaguchi, K., Suhara, W., Fukuhara, Y., Amano, F., Fujita, T., 2002. Involvement of TIRAP/MAL in signaling for the activation of interferon regulatory factor 3 by lipopolysaccharide. *FEBS Lett.*, 517: 251-256.

Smith, W., Andrews, C.H., Laidlaw, P.P. 1933. A virus obtained from influenza patients. "The Influenza viruses". *Virology Monogr.* Hoyle, L. (editor). Springer Verlag, Wien, New York (1968).

Sprenger, H., Bacher, M., Rischkowsky, E., Bender, A., Nain, M., & Gemsa, D., 1994. Characterization of a high molecular weight tumor necrosis factor- $\alpha$  mRNA in influenza A virus-infected macrophages. *J Immunol*, 152: 280-289.

Sprenger, H., Meyer, R.G., Kaufmann, A., Bussfeld, D., Rischkowsky, E., Gemsa, D., 1996b. Selective induction of monocyte and not neutrophil-attracting chemokines after influenza A virus infection. *J. Exp. Med.*, 184: 1191-1196.

Sprenger, H., Rösler, A., Tonn, P., Braune, H.J., Huffmann, G., Gemsa, D., 1996. Chemokines in the cerebrospinal fluid of patients with meningitis. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 80(2): 155-161.

Stamatoyannopoulos JA, Clegg CH, Li Q., 1997. Sheltering of gamma-globin expression from position effects requires both an upstream locus control region and a regulatory element 3' to the A gamma-globin gene. *Mol Cell Biol.*;17:240-7.

Standiford, T.J., Strieter, R.M., Chensue, S.W., Westwick, J., Kasahara, K., Kunkel, S.L., 1990. IL-4 inhibits the expression of IL-8 from stimulated human monocytes. *J. Immunol.*, 145: 1435-1439.

Standiford TJ, Kunkel SL, Liebler JM, Burdick MD, Gilbert AR, Strieter RM., 1993. Gene expression of macrophage inflammatory protein-1 alpha from human blood monocytes and alveolar macrophages is inhibited by interleukin-4. *Am J Respir Cell Mol Biol.*;9:192-8.

Stark, G.R., Kerr, I.M., Williams, B.R.G., Silverman, R.H., Schreiber, R.D., 1998. How cells respond to interferons. *Annu. Rev. Biochem.*, 67: 227-264.

Stevens AM, Wang YF, Sieger KA, Lu HF, Yu-Lee LY., 1995. Biphasic transcriptional regulation of the interferon regulatory factor-1 gene by prolactin: involvement of gamma-interferon-activated sequence and Stat-related proteins. *Mol Endocrinol.*;9:513-25.

Stieneke-Grober, A., Vey, M., Angliker, H., Shaw, E., Thomas, G., Klenk, H.-D., Garten W., 1992. Influenza virus hemagglutinin with multibasic cleavage site is activated by furin, a subtilisin-like endoprotease. *J Gen Virol*, 11: 2407-2414.

Stiver, G., 2003. The treatment of influenza with antiviral drugs. *CMAJ*, 168: 49-57.

Su, Z.Z., Madireddi, M.T., Lin, J.J., Young, C.S., Kitada, S., Reed, J.C., Goldstein, N.I., Fisher, P.B., 1998. The cancer growth suppressor gene mda-7 selectively induces apoptosis in human breast cancer cells and inhibits tumor growth in nude mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 14400-14405.

Sun Z, Means RL, LeMagueresse B, Means AR., 1995. Organization and analysis of the complete rat calmodulin-dependent protein kinase IV gene. *J Biol Chem.*;270(49):29507-14.

Suske, G., Gross, B., Beato, M., 1989. Non-radioactive method to visualize specific DNA-protein interactions in the band shift assay. *Nucleic Acids Res.*, 17: 4405.

Taffet, S.M., Russell, S.W., 1981. Macrophage-mediated tumor cell killing: regulation of expression of cytolytic activity by prostaglandin E. *J Immunol*, 126: 424-427.

Takaoka, A., Yanai, H., Kondo, S., Duncan, G., Negishi, H., Mizutani, T., Kano, S., Honda, K., Ohba, Y., Mak, T.W., Taniguchi, T., 2005. Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. *Nature*, 434: 243-249.

Tamura, T., Ishihara, M., Lamphier, M.S., Tanaka, N., Oishi, I., Aizawa, S., Matsuyama, T., Mak, T.W., Taki, S., Taniguchi, T., 1995. An IRF-1-dependent pathway of DNA damage-induced apoptosis in mitogen-activated T lymphocytes. *Nature*, 376: 596-599.

Tanaka, Y., Adams, D.H., Hubscher, S., Hirano, H., Siebenlist, U., Shaw, S. 1993. T-cell adhesion induced by proteoglycan-immobilized cytokine MIP-1 beta. *Nature*, 361: 79-82.

Tanaka, N., Ishihara, M., Kitagawa, M., Harada, H., Kimura, T., Matsuyama, T., Lamphier, M.S., Aizawa, S., Mak, T.W., Taniguchi, T., 1994. Cellular commitment

to oncogene-induced transformation or apoptosis is dependent on the transcription factor IRF-1. *Cell*, 77: 829-839.

Taniguchi, T., Takaoka, A., 2002. The interferon- $\alpha/\beta$  system in antiviral responses: a multimodal machinery of gene regulation by the IRF family of transcription factors. *Curr. Opin. Immunol.*, 14: 111-116.

Taniguchi, T., Takaoka, A., 2002. The interferon- $\alpha/\beta$  system in antiviral responses: a multimodal machinery of gene regulation by the IRF family of transcription factors. *Curr. Opin. Immunol.*, 14: 111-116.

Taylor PR, Gordon S., 2003. Monocyte heterogeneity and innate immunity. *Immunity*, 19:2-4.

Teran, L.M., Seminario, M.C., Shute, J.K., Papi, A., Compton, S.J., Low, J.L., Gleich, G.J., Johnston, S.L., 1999. RANTES, macrophage-inhibitory protein 1 $\alpha$ , and the eosinophil product major basic protein are released into upper respiratory secretions during virus-induced asthma exacerbations in children. *J. Infect. Dis.*, 179: 677-681.

Tuan DY, Solomon WB, London IM, Lee DP., 1989. An erythroid-specific, developmental-stage-independent enhancer far upstream of the human "beta-like globin" genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.*;86:2554-8.

Tumpey, T.M., Garcia-Sastre, A., Taubenberger, J.K., Palese, P., Swayne, D.E., Pantin-Jackwood, M.J., Schultz-Cherry, S., Solorzano, A., van Rooijen, N., Katz, J.M., Basler, C.F., 2005. Pathogenicity of influenza viruses with genes from the 1918 pandemic virus: functional roles of alveolar macrophages and neutrophils in limiting virus replication and mortality in mice. *J. Virol.*, 14933-14944.

Tyner, J.W., Uchida, O., Kajiwara, N., Kim, E.Y., Patel, A.C., O'Sullivan, M.P., Walter, M.J., Schwendener, R.A., Cook, D.N., Danoff, T.M., Holtzman, M.J., 2005. CCL5-CCR5 interaction provides antiapoptotic signals for macrophage survival during viral infection. *Nat. Med.*, 11: 1180-1187.

Uguccioni M, D'Apuzzo M, Loetscher M, Dewald B, Baggiolini M., 1995. Actions of the chemotactic cytokines MCP-1, MCP-2, MCP-3, RANTES, MIP-1 $\alpha$  and MIP-1 $\beta$  on human monocytes. *Eur J Immunol.* ;25:64-8.

Uguccioni, M., Loetscher, P., Forssmann, U., Dewald, B., Li, H., Lima, S.H., Li, Y., Kreider, B., Garotta, G., Thelen, M., Baggiolini, M., 1996. Monocyte chemotactic protein 4 (MCP-4), a novel structural and functional analogue of MCP-3 and eotaxin. *J. Exp. Med.*, 183:2379-2384.

Van Furth, R., 1982. Current view on the mononuclear phagocyte system. *Immunobiology*, 161:178-185.

Van Riel, D., Munster, V.J., de Wit, E., Rimmelzwaan, G.F., Fouchier, R.A., Osterhaus, A.D., Kuiken, T., 2006. H5N1 Virus attachment to lower respiratory tract. *Science*, 312: 399.

Veckman, V., Osterlund, P., Fagerlund, R., Melen, K., Matikainen, S., Julkunen, I., 2006. TNF- $\alpha$  and IFN- $\alpha$  enhance influenza-A-virus-induced chemokine gene expression in human A549 lung epithelial cells. *Virology*, 345: 96-104.

Volkman A, Gowans JL., 1965. The origin of macrophages from bone marrow in the rat. *J Exp Pathol.*;46:62-70.

Wada N, Matsumura M, Ohba Y, Kobayashi N, Takizawa T, Nakanishi Y., 1995. Transcription stimulation of the Fas-encoding gene by nuclear factor for interleukin-6 expression upon influenza virus infection. *J Biol Chem.* 28;270:18007-12.

- Walz, A., Meloni, F., Clark-Lewis, I., von Tschärner, V., Baggiolini, M., 1991.  $[Ca^{2+}]_i$  changes and respiratory burst in human neutrophils and monocytes induced by NAP-1/interleukin-8, NAP-2, and gro/MGSA. *J. Leukoc. Biol.*, 50:279-286.
- Walz, A., Peveri, P., Aschauer, H., Baggiolini, M., 1987. Purification and amino acid sequencing of NAF, a novel neutrophil-activating factor produced by monocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 149:755-761.
- Wang X, Li M, Zheng H, Muster T, Palese P, Beg AA, Garcia-Sastre A., 2000. Influenza A virus NS1 protein prevents activation of NF-kappaB and induction of alpha/beta interferon. *J Virol.*;74:11566-73.
- Wang, M., Tan, Z., Zhang, R., Kotenko, S., Liang, P., 2002. Interleukin 24 (MDA-7/MOB-5) signals through two heterodimeric receptors, IL-22R1/IL-20R2 and IL-20R1/IL-20R2. *J. Biol. Chem.*, 277(9): 7341-7347.
- Ward SG., 2004. Do phosphoinositide 3-kinases direct lymphocyte navigation? *Trends Immunol.*;25:67-74.
- Wareing, M.D., Lyon A.B., Lu, B., Gerard, C., Sarawar, S.R., 2004. Chemokine expression during the development and resolution of a pulmonary leukocyte response to influenza A virus infection in mice. *J. Leukoc. Biol.*, 76: 886-895.
- Wei, L., Sandbulte, M.R., Thomas, P.G., Webby, R.J., Homayouni, R., Pfeffer, L.M., 2006. NF $\kappa$ B negatively regulates interferon-induced gene expression and anti-Influenza activity. *J. Biol. Chem.*, 281: 11678-11684.
- Widmer, U., Yang, Z., van Deventer, S., Manogue, K.R., Sherry, B., Cerami, A., 1991. Genomic structure of murine macrophage inflammatory protein-1 alpha and conservation of potential regulatory sequences with a human homolog, LD78. *J. Immunol.*, 146: 4031-4040.
- Wolk, K., Kunz, S., Witte, E., Friedrich, M., Asadullah, K., Sabat, R., 2004. IL-22 increases the innate immunity of tissues. *Immunity*, 21: 241-254.
- Wurzer, W.J., Ehrhardt, C., Pleschka, S., Berberich-Siebelt, F., Wolff, T., Walczak, H., Planz, O., Ludwig, S., 2004. NF-kappaB-dependent induction of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and Fas/FasL is crucial for efficient influenza virus propagation. *J. Biol. Chem.*, 279: 30931-30937.
- Yamada, H., Hirai, K., Miyamasu, M., Iikura, M., Misaki, Y., Shoji, S., Takaishi, T., Kasahara, T., Morita, Y., Ito, K., 1997. Eotaxin is a potent chemotaxin for human basophils. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 231:365-368.
- Ye, J., Cipitelli, M., Dorman, L., Ortaldo, J.R., Young, H.A., 1996. The nuclear factor YY1 suppresses the human gamma interferon promoter through two mechanisms: inhibition of AP1 binding and activation of a silencer element. *Mol. Cell. Biol.*, 16: 4744-4753.
- Ye, J., Young, H.A., Zhang, X., Castranova, V., Vallyathan, V., Shi, X., 1999. Regulation of a cell type-specific silencer in the human interleukin-3 gene promoter by the transcription factor YY1 and an AP2 sequence-recognizing factor. *J. Biol. Chem.*, 274: 26661-26667.
- Yeow, W.S., Au, W.C., Juang, Y.T., Fields, C.D., Dent, C.L., Gewert, D.R., Pitha, P.M., 2000. Reconstitution of virus-mediated expression of interferon alpha genes in human fibroblast cells by ectopic interferon regulatory factor-7. *J. Biol. Chem.*, 275(9): 6313-6320.
- Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsukawa, T., Shinobu, N., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Akira, S., Fujita, T., 2004. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat. Immunol.*, 5: 730-737.

- Yoshie, O., Imai, T., Nomiya, H., 1997. Novel lymphocyte-specific CC chemokines and their receptors. *J Leukoc Biol*, 62: 634-644.
- Yuen, K.Y., Chan, P.K., Peiris, M., Tsang, D.N., Que, T.L., Shortridge, K.F., Cheung, P.T., To, W.K., Ho, E.T., Sung, R., Cheng, A.F., 1998. Clinical features and rapid viral diagnosis of human disease associated with avian influenza A H5N1 virus. *Lancet*, 351: 467-471.
- Zhao, L., Gu, J., Dong, A., Zhang, Y., Zhong, L., He, L., Wang, Y., Zhang, J., Zhang, Z., Huiwang, J., Qian, Q., Qian, C., Liu, X., 2005. Potent antitumor activity of oncolytic adenovirus expressing mda-7/IL-24 for colorectal cancer. *Hum. Gene Ther.*, 16: 845-858.
- Zhirnov, O.P., Konakova, T.E., Wolff, T., Klenk, H.D., 2002. NS1 protein of influenza A virus down-regulates apoptosis. *J. Virol.*, 76: 1617-1625.
- Zhou LJ, Tedder TF., 1996. CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* ;93:2588-92.
- Ziegler-Heitbrock, H.W., Thiel, E., Futterer, A., Herzog, V., Wirtz, A., Riethmüller, G., 1988. Establishment of a human cell line (Mono Mac 6) with characteristics of mature monocytes. *Int. J. Cancer*, 41(3): 456-461.
- Zlotnik, A., Yoshie, O., 2000. Chemokines: A new classification System and Their Role in Immunity. *Immunity*, 12:121-127.

## Abkürzungsverzeichnis

AAF	alpha-activated factor
Abb.	Abbildung
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome/erworbenes Immundefektsyndrom
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CD	Cluster of differentiation, Differenzierungsmarker an der Oberfläche von Zellen
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CFU-GM	colony-forming unit granulocyte macrophages
cm	Zentimeter
CMV	Zytomegalievirus
DEAE	Diethylaminoethyl
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ER	endoplasmatisches Retikulum
FCS	fötales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
Ig	Immunglobulin
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IRF	interferon regulatory factor
ISG	IFN-stimulated genes
ISRE	IFN-stimulated response element
JAK	Janus-Kinase
L	Liter
LPS	Lipopolysaccharid

---

M-CSF	Makrophagen colony-stimulating factors
MHC	major histocompatibility complex
min	Minute
µL	Mikroliter
mL	Milliliter
µm	Mikrometer
mM	Millimolar
MOI	multiplicity of infection
MPS	mononukleäres Phagozyten-System
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NA	Neuraminidase
NF-κB	nuclear factor kappa B
ng	Nanogramm
NIP	nuclear inhibitory protein
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxyd
NP	Nukleokapsid
OP	optische Dichte
PAMP	pathogen-associated molecular patterns
PBS	Phosphate buffered saline
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PCR	Polymerasenkettenreaktion
pH	potentia Hydrogenii
PKR	
PRD	positive regulatory domain
PRR	pattern-recognition receptors
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	reverse Transkription
rpm	rounds per minute
s	Sekunde
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
STAT	signal transducers and activators of transcription
TNF	Tumor-Nekrosefaktor
U	Units
UTR	untranslatierte Region
UV	ultraviolett
z.B.	zum Beispiel
V	Volt

v/v	Volumen pro Volumen
v.a.	vor allem
w/v	weight (Gewicht) pro Volumen
Wt	Wildtyp

## **Verzeichnis der akademischen Lehrer**

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren

In Marburg:

Arnold, Aumüller, Bacher, Barth, Basler, Bauer, Baum, Behr, Becker, Berendes, Berger, Berndt, Bernhardt, Bertalanffy, v. Besedovsky, Beyer, Bien, Brilla, Cetin, Christiansen, Czubayko, Daut, Diedrich, Dittrich, Dodel, Donner-Banzhoff, Ebel, Eilers, Effendy, Eisele, Elsässer, Engenhardt-Cabilic, Fehmann, Feuser, Fruhstorfer, Gemsa, Gente, Geus, Golenhofen, Göke, Görg, Gotzen, Grimm, Griss, Grunder, Gudermann, Hackenberg, Hamer, Happle, Hasilik, Hebebrand, Heeg, Heidenreich, Hellinger, Hellwig, Hemmer, Hering, Herrler, Hess, Herzum, Heufelder, Hildebrandt, Hilgermann, Hochban, Höffken, Hörsch, Hofmann, Huesmann, Jackisch, Jacob, Joseph, Jungclas, Kälble, Kann, Karlson, Katschinski, Kern, Kim-Berger, Kleine, Klenk, Klingmüller, Klose, Klaus, Knoll, Koch, Köhler, Koolman, Krause, Kretschmer, Krieg, Kroh, Kroll, Kuhlmann, Kuhn, Kuni, Lammel, Lang, Lange, Lauer, Lehmann, Legrum, Lengsfeld, Lennartz, Lill, Lippert, Liss, Löffler, Lohoff, Lorenz, Lotzmann, Ludwig, Maier, Maisch, Mann, Mattejat, Mennel, Moll, Moosdorf, Mueller, Müller, Mutters, Nain, Netter, Neubauer, Neurath, Niemeyer, Nies, Niessing, Noll, Nüsing, Oertel, Penzel, Peter, Petermann, Pieper, Pfeiffer, Pohlen, Radsak, Rehder, Remschmidt, Renz, Richter, Roeper, Röhm, Rosemann, Rosenow, Rothmund, Rupp, Schahchtschabel, Schäfer, Schepelmann, Schlegel, Schleyer, Schmid, Schmidt, Schnabel, Schneider, Schreiber, Schüffel, Schuermann, Schulz, Schwarz, Seifart, Seitz, Seyberth, Slenczka, Sommer, Steiniger, Stiletto, Stiller, Stinner, Stempel, Sturm, Sure, Suske, Thomas, Vedder, Vogelmeier, Voigt, Wagner, Waldegger, Weber, Weihe, Werner, Westermann, v. Wichert, Wiegandt, Wilke, Wirth, Wolf, Wulf, Zemlin, Zielke

In Kassel: Braun, Drastig, Franke, Hesterberg, Hillejan, Höpfner, Hummel, Löser, Schrader, Spuck, Zeiger

In Oxford: Gordon, MacPherson, Platt

**Erklärung**

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Die Induktion von CCL3, IRF-1, IRF-7 und IL-24 durch Influenza A Virus-Infektion von Monozyten und die Bedeutung eines essentiellen Abschnittes im CCL3-Promotor“ im Medizinischen Zentrum für Hygiene und Infektionsbiologie im Institut für Immunologie unter der Leitung von Prof. Dr. D. Gemsa mit Unterstützung durch Dr. A. Kaufmann ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem inländischen und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden in der Zeitschrift „Immunobiology“ im Jahre 2002 veröffentlicht.

Berlin, den 26.04.2008