

# INAUGURAL - DISSERTATION

zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der  
Naturwissenschaftlich - Mathematischen Gesamtfakultät  
der  
Ruprecht - Karls - Universität  
Heidelberg

vorgelegt von:

Diplom-Biologe DOMINIK DJANDJI

aus Heidelberg

Thema:

Die pathophysiologische Rolle der Infektion  
von sinusoidalen Endothelzellen der Leber  
mit murinem Zytomegalievirus

Gutachter: Prof. Dr. Günter J. Hämmerling  
Prof. Dr. Percy A. Knolle

## **Danksagung**

Ich danke Herrn Prof. Dr. Percy A. Knolle und Herrn Prof. Dr. Günter J. Hämmerling für das Interesse und die Bereitschaft, diese Arbeit zu betreuen und die Gutachten zu erstellen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Percy A. Knolle für die Vergabe des Themas und die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes in seiner Arbeitsgruppe, sowie für die ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung. Herrn Prof. Dr. Percy A. Knolle, Herrn Dr. Kai Scholz und Herrn Ralf Wilhelm de Haan danke ich zudem für die kritische Durchsicht des Manuskriptes dieser Arbeit.

Darüber hinaus möchte ich allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe(n) danken, insbesondere Frau Beatrix Schumak, Frau Silke Hegenbarth, Frau Özlem Mutluer, Herrn Dr. Andreas Limmer, Herrn Dr. Gerhard Wingender für die gute Zusammenarbeit während des Laboralltags und die Bereitschaft stets ein 'offenes' Ohr für meine Fragen und Problemen zu haben. Außerdem möchte ich von ganzem Herzen meiner Schwester Nicole und meinen lieben Eltern danken, die immer für mich da waren und mich unterstützt haben.

**Es gibt wenige Leute, die kritisch über die Wissenschaft denken. Jede Stimme zählt.**

*Joseph Weizenbaum, (\*1923), östr.-amerik. Mathematiker u. Informatiker am Massachusetts Institute of Technology (MIT)*



**INHALTSVERZEICHNIS**

## ZUSAMMENFASSUNG

## SUMMARY

## 1. EINLEITUNG

1.1 Das murine Zytomegalievirus (MCMV) und die Familie der Herpesviren	1
1.2 Die Struktur des murinen Zytomegalievirus	1
1.3 Die Infektion mit murinem Zytomegalievirus	2
1.4 <i>Immune escape</i> Mechanismen der Zytomegalieviren	4
1.5 Das Immunsystem	6
1.6 Antigenpräsentation und T-Zell-Aktivierung	7
1.7 Die Leber	8
1.8 Das hepatische Sinusoid	9
1.9 Die Zellen der hepatischen Sinusoide	9
1.10 Toleranz in der Leber	11
1.11 Zielsetzung	12

## 2. MATERIAL UND METHODEN 14

2.1 Allgemeine Laborgeräte	14
2.2 Verbrauchsmaterialien	16
2.3 Chemikalien, Reagenzien und Reaktionskits	18
2.4 Allgemeine Lösungen	21
2.5 Verwendete Antikörper	21
2.5.1 Antikörper gegen Oberflächenmarker	21
2.5.2 ELISA - Zytokinantikörper, Sekundär- und Isotyp-Kontrollantikörper:	22
2.5.3 Streptavidinkonjugate und Fluorochromkonjugate	22
2.5.4 Magnetischen Kügelchen ('MicroBeads')	23
2.6 Enzyme	23
2.7 Verwendete Zelllinien	23

2.8	Verwendete Mäusestämme	24
2.9	Verwendete rekombinante Viren	24
2.10	Methoden	25
2.10.1	Virologische Methoden	25
2.10.1.1	Generierung hochtitriger Virusstocks	25
2.10.1.2	Viruskonzentration via Ultrazentrifugation	25
2.10.1.3	Virustitration	25
2.10.1.4	UV-Inaktivierung von MCMV und Inaktivierungskontrolle	27
2.10.2	Präparation primärer Zellen	27
2.10.2.1	Aufreinigung von Leukozyten aus Milz	27
2.10.2.2	Perfusion muriner Leber	28
2.10.2.3	Aufreinigung von Milzzellen zur Analyse im <i>in vivo</i> Zytotoxizitätstest aus muriner Leber via Percollgradienten	29
2.10.2.4	Aufreinigung sinusoidaler Leber-Endothelzellen via Metrizamidgradienten und Gegenstromzentrifugation (Elutriation)	29
2.10.3	<i>In vivo</i> Probengabe	31
2.10.3.1	Adoptiver Zelltransfer	31
2.10.4	Magnetische Zellsortierung (MACS)	31
2.10.5	Proteinbiochemische Methoden	32
2.10.5.1	Aufreinigung monoklonaler Antikörper aus Hybridomzellüberständen durch Affinitätschromatographie	32
2.10.5.2	Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE):	33
2.10.5.3	Coomassie-Färbung der Polyacrylamidgelelektrophorese:	35
2.10.6	Zellkulturmethoden	36
2.10.6.1	Zellkulturen und ihre Propagation	36
2.10.6.2	<i>In vitro</i> Kultivierung primärer Zellen	36
2.10.6.3	Infektion primärer Zellen und Zelllinien	37
2.10.6.4	Ermittlung von Zellkonzentrationen	38
2.10.6.5	Kryokonservierung von eukaryontischen Zellen	38
2.10.7	<i>In vitro</i> Kreuzpräsentationsassay ( <i>Cross-Priming</i> )	39
2.10.8	MLR – Mixed Lymphocyte Reaction	39
2.10.9	Sandwich-ELISA	40
2.10.10	Immunfluorometrische Methoden	41

2.10.10.1 Immunfluoreszenzmessungen am Durchflusszytometer	41
2.10.10.2 Färbung von Oberflächenantigenen und Fixation	42
2.10.10.3 Sortieren von MCMV-GFP infizierten LSEC am Durchflusszytometer	43
2.10.10.4 Zellmarkierung mit fluoreszierenden Farbstoffen	44
2.10.10.5 Messung am Durchflusszytometer	44
3. ERGEBNISSE	45
3.1 Permissivität sinusoidaler Leber-Endothelzellen (=LSEC) für murines Zytomegalievirus	45
3.1.1 Durchflusszytometrische Bestimmung der Permissivität von LSEC und Fibroblasten	45
3.1.2 Mikroskopische Analyse der Permissivität von LSEC und Fibroblasten	47
3.1.3 Variation in der Permissivität von LSEC für MCMV an Tag 1 und 2 nach Präparation	49
3.2 Nachkommenvirus	51
3.2.1 Inkorporation von MCMV-Virionen durch LSEC	51
3.2.2 Bestimmung von Nachkommenvirus nach Infektion von LSEC und Fibroblasten mit MCMV	52
3.3 Weitergabe von MCMV – Infektion in <i>trans</i>	53
3.4 Expressionsanalyse immunologisch bedeutender Oberflächenmoleküle MCMV infizierter LSEC	55
3.4.1 Expression verschiedener MHC-Klasse-I Allele nach Infektion von LSEC mit MCMV	55
3.4.2 Expression von Adhäsionsmolekülen nach Infektion mit MCMV	56
3.4.3 Expression von kostimulatorischen Oberflächenmolekülen nach MCMV- Infektion	57
3.5 Antigenaufnahme nach Infektion von LSEC mit murinem Zytomegalievirus	58
3.6 Antigenpräsentation nach MCMV-Infektion von LSEC ( <i>in vitro</i> )	59
3.6.1 Kreuzpräsentation MCMV-GFP infizierter LSEC (Bulk culture)	59
3.6.2 Kreuzpräsentation FACS-sortierter MCMV-GFP infizierter LSEC	60
3.6.3 Endogene Antigenpräsentation MCMV-OVA infizierter LSEC	62
3.6.3.1 Kinetik der Antigenpräsentation MCMV-OVA infizierter LSEC	63

3.6.3.2 Notwendigkeit endogener Expression viraler Antigene für die Präsentation	64
3.7 Kreuz-Priming und Kreuz-Toleranz für naive T-Zellen ( <i>in vitro</i> )	66
3.7.1 Kreuz-Priming naiver CD8 <sup>+</sup> -T-Zellen durch MCMV-infizierte LSEC	66
3.7.2 Kreuz-Toleranz naiver CD8 <sup>+</sup> -T-Zellen durch MCMV-infizierte LSEC und DC	67
3.7.3 Priming naiver CD8 <sup>+</sup> -T-Zellen durch MCMV-OVA infizierte LSEC	68
3.7.4 Toleranzinduktion in naiven CD8 <sup>+</sup> -T-Zellen durch MCMV-OVA infizierte LSEC	69
3.8 <i>In vivo</i> Toleranzinduktion durch MCMV-OVA infizierte LSEC in einem adoptiven Transferexperiment (Pilotexperiment)	71
4. DISKUSSION	76
4.1 Infektion von LSEC mit murinem Zytomegalievirus (MCMV)	76
4.2 Infektion durch an LSEC gebundenes MCMV	82
4.3 Toleranzinduktion durch MCMV infizierte LSEC	85
6. LITERATURVERZEICHNIS	94

### ZUSAMMENFASSUNG

Zytomegalieviren wie humanes Zytomegalievirus (HCMV) und murines Zytomegalievirus (MCMV) sind DNA-Viren, die nach Primärinfektion lebenslang im infizierten Wirtsorganismus in einem latenten Zustand verbleiben können. In etwa 50-70% der Bevölkerung weltweit sind seropositiv für HCMV. Klinisch verläuft die Infektion mit HCMV für gewöhnlich asymptomatisch, vorausgesetzt der infizierte Wirt weist ein intaktes Immunsystem auf. Zytomegalieviren haben zahlreiche aktive Mechanismen entwickelt, um der drohenden Immunantwort des infizierten Wirtsorganismus zu entgehen. Die Manipulation der MHC-Klasse-I Antigenpräsentation stellt nur ein Beispiel der unzähligen viralen Evasionsmechanismen von Zytomegalieviren dar, um während einer antiviralen Immunantwort unerkant zu bleiben. Außerdem besitzen Zytomegalieviren einen natürlichen Tropismus für Endothelzellen.

Die Leber favorisiert eher Toleranz als Immunität. Unter den hepatischen Zellpopulationen, die für die Induktion von Immuntoleranz in Frage kommen, konnten sinusoidalen Endothelzellen der Leber (LSEC) als sessile antigenpräsentierende Zellen (APC) identifiziert werden. LSEC sind in der Lage, systemische antigenspezifische Immuntoleranz in CD8<sup>+</sup>-T-Zellen zu induzieren.

Im Zuge der Dissertation sollte nun untersucht werden, welche physiologische Rolle eine Infektion von LSEC mit murinem Zytomegalievirus (MCMV) spielt und welche Konsequenzen sie nach sich zieht.

Die Analyse der Infektion von LSEC mit MCMV hat gezeigt, dass LSEC permissiv für eine Infektion mit MCMV sind. Die Infektion von LSEC mit MCMV verläuft nicht-produktiv. LSEC sind in der Lage, Virionen effizient aufzunehmen. Dabei hat sich herausgestellt, dass an LSEC gebundenes Virus weiterhin infektiös bleibt und permissive Zielzellen effizient *trans* infizieren kann. Diese Beobachtung spricht für eine Funktion infizierter LSEC als zentrale virale Propagationsplattform innerhalb des Wirtsorganismus. Durch die Analyse der immunologisch relevanten Oberflächenmoleküle infizierter LSEC konnte beobachtet werden, dass LSEC durch eine Infektion mit MCMV keiner phänotypischen Veränderung ausgesetzt sind. Außerdem konnte nach Infektion von LSEC mit MCMV keine Beeinträchtigung in der Aufnahme exogener Antigene festgestellt werden. Die Präsentation exogener, als auch endogener viral kodierter Antigene führt zu Immuntoleranz in CD8<sup>+</sup>-T-Zellen *in vitro*.

Die aktiven Mechanismen viraler Immunevasion scheinen bei LSEC im Gegensatz zu dendritischen Zellen (DC) nicht zu greifen. Die funktionelle Analyse infizierter LSEC in einem Pilotexperiment lieferte zudem einen deutlichen Hinweis darauf, dass LSEC eine wichtige physiologische Rolle in der Induktion von CD8<sup>+</sup>-T-Zelltoleranz gegenüber viral kodierten Antigenen *in vivo* spielen. Die Daten legen den Schluss nahe, dass die Infektion tolerogener LSEC mit MCMV einen neuartigen passiven viralen Immunevasions - mechanismus beschreibt. LSEC nehmen dabei eine Brückenfunktion wahr, indem sie den Übergang von früher zu später Phase der Infektion mit MCMV sicherstellen.

## SUMMARY

Cytomegaloviruses are large DNA viruses, once infected with will stay lifelong in a latent state in the infected host. Around 50-70% of the population worldwide is seropositive for human cytomegalovirus (HCMV). Infection with HCMV is usually harmless as long as the infected host is immunocompetent. Permanent immune surveillance is required to maintain the virus in its latent state. During their coevolution with their specific host, cytomegaloviruses like HCMV and murine cytomegalovirus (MCMV) have evolved a wide variety of strategies to evade the host's immune system and thus recognition. Interference with the MHC-class-I antigen presentation pathway is just one example out of many viral mechanisms to escape an antiviral immune response. Furthermore, it has been shown that cytomegaloviruses display a natural tropism for endothelial cells. Transplant surgery studies suggest that the liver is involved in tolerance induction. Among the liver resident cells, liver sinusoidal endothelial cells (LSEC) have been identified as tolerogenic antigen presenting cells that are capable of inducing antigen specific systemic immune tolerance in CD8<sup>+</sup> T cells.

In the thesis it was questioned what physiological role an infection of LSEC with MCMV plays and what consequences it would have in the context of the course of infection.

LSEC are permissive for infection with MCMV although non-productive. Incubation of LSEC with MCMV leads to efficient viral uptake. Viruses bound to LSEC has been found to be infectious and support in *trans* infection of permissive target cells by infected LSEC. Therefore LSEC seem to serve as a viral propagation platform in the infected host. Also, MCMV infection of LSEC did not result in an alteration of the immunologically relevant surface molecules. LSEC were still able to take up exogenous antigen and to present exogenous as well as endogenous antigens in the context of MHC-class-I during infection. This resulted in the induction of CD8<sup>+</sup> T cell tolerance *in vitro*.

Thus, the active immune evasion strategies of MCMV do not seem to have an effect on LSEC compared to dendritic cells (DC). Moreover, the functional analysis of MCMV infected LSEC in a pilot experiment has supported the hypothesis that LSEC play an important role in the induction of CD8<sup>+</sup> T cell tolerance towards virally encoded antigens *in vivo*. Therefore, MCMV infection of LSEC describes a novel passive viral immune escape mechanism. LSEC functions as a bridge in ensuring the transition of the early to the late phase of infection.

## **1. EINLEITUNG**

### **1.1 Das murine Zytomegalievirus (MCMV) und die Familie der Herpesviren**

Herpesviren lassen sich in drei Gruppen einteilen, wobei man die  $\alpha$ -,  $\beta$ - und die  $\gamma$ -Unterfamilie unterscheidet. Diese Einteilung wurde anhand des Wirtsspektrums, der Replikationsgeschwindigkeit und des Zelltropismus getroffen.  $\alpha$ -Herpesviren (z.B. Herpes-Simplex-Virus Typ 1 und 2) besitzen ein breites Wirtsspektrum und kurze Replikationszeiten. Die speziesspezifischen  $\beta$ -Herpesviren, ebenso wie die  $\gamma$ -Herpesviren (z.B. HHV-8, EBV), zeichnen sich hingegen durch ein enges Wirtsspektrum und lange Replikationszeiten aus (Mocarski 1993). Das Zytomegalievirus (griech.: kytos, Zelle; megas, gross) wird dabei der  $\beta$ -Unterfamilie der *Herpesviridae* zugeordnet. Eine Infektion mit dem murinen Zytomegalievirus (MCMV) zeichnet sich sowohl durch eine Vergrößerung der infizierten Zelle, als auch durch Bildung von nukleären Einschlusskörperchen ('Eulenaugen') und Synzytienbildung aus. Herpesviren sind in der Lage, lebenslang im Wirt zu verbleiben. Dieser als Latenz bezeichnete Zustand setzt voraus, dass die virale Genexpression fast vollständig zum Erliegen kommt. In dieser Phase können keine viralen Partikel nachgewiesen werden, so dass das Immunsystem des Wirtes erst nach viraler Reaktivierung gegen die Infektion vorgehen kann. Virale Latenz wird für gewöhnlich in immunkompetenten Wirten beobachtet, wohingegen produktive virale Replikation stets in immunsupprimierten Individuen auftritt (z.B. AIDS-Patienten oder Transplantatempfängern).

Das murine Zytomegalievirus konnte 1954 von Smith aus Speicheldrüsen einer Maus isoliert und mittels embryonalen Mauszellen propagiert werden (Smith 1954). Zwei Jahre später isolierte Smith das humane Zytomegalievirus (HCMV) aus den Speicheldrüsen und der Niere eines Kindes (Smith 1956).

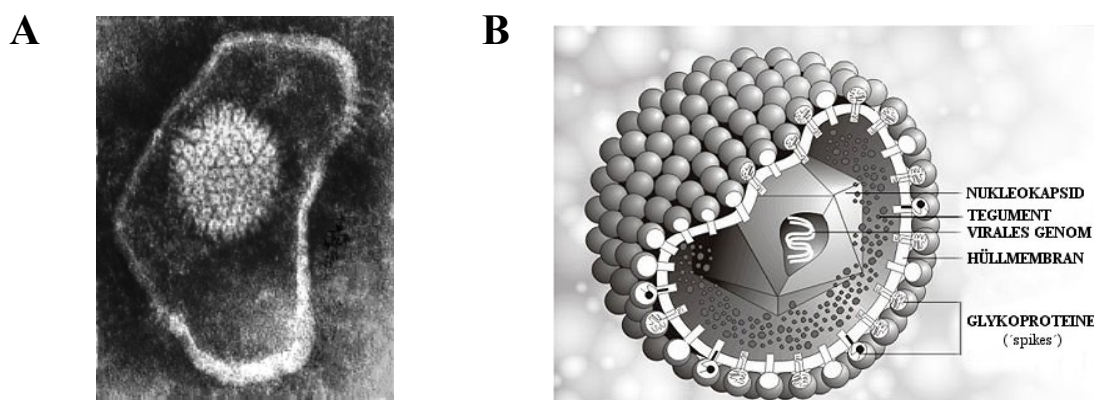
### **1.2 Die Struktur des murinen Zytomegalievirus**

Das murine Zytomegalievirus ist ein 230kbp großes DNA-Virus mit einem Durchmesser von 150-200nm. Die lineare doppelsträngige virale DNA liegt spindelförmig in einem ikosaedrischen Nukleokapsid vor, welches von einer elektronendichten Phosphoproteinschicht, dem Tegument, umgeben wird. In die das Virion umgebende Hüllmembran ('*envelope*') sind die viralen Glykoproteine eingelagert. Man vermutet, dass



diese Glykoproteine für die Bindung an einen spezifischen Wirtszellrezeptor verantwortlich sind.

Zytomegalieviren besitzen mit 170-200 offenen Leserahmen (ORFs) eine hohe genomische Kodierungskapazität. Von den 170 ORFs des murinen Zytomegalievirus besitzen 78 eine signifikante Homologie zu HCMV (Rawlinson 1996). Der Guanin-Cytosin-Gehalt des MCMV-Genoms liegt bei ~59%. Im Gegensatz zu der eingeschränkten Speicherkazität von RNA-Viren, dient ein hoher Prozentsatz (bei Pocken- und Herpesviren bis zu 50%) der von DNA-Viren kodierten Proteine zur Manipulation der antiviralen Immunantwort des Wirtsorganismus (*immune escape*).



**Abb. 1: Die Struktur des murinen Zytomegalievirus (MCMV)**  
**A:** Elektronenmikroskopische Aufnahme des Zytomegalievirus  
 (Quelle: <http://www.pharmakologie.uni-wuerzburg.de/~brune/research.htm>)  
**B:** Schematische Darstellung der Virionstruktur von Zytomegalieviren  
 (Quelle: modifiziert nach Mario Reschke ©1994)

### 1.3 Die Infektion mit murinem Zytomegalievirus

Die produktive Replikation des murinen Zytomegalievirus beginnt mit dem Eindringen des Virions in die Wirtszelle. Der spezifische Oberflächenrezeptor, an den MCMV auf der Wirtszelle bindet, ist bislang unbekannt. Lediglich der unspezifische Rezeptor Heparinsulfat-Proteoglykan wurde bisher beschrieben (Compton 1993; Song 2001). Für HCMV konnte hingegen gezeigt werden, dass es spezifisch an DC-SIGN (*Dendritic Cell Specific ICAM-Grabbing Non-integrin*) binden kann, wobei das Hüllmembran-Glykoprotein b (gHb) als viraler Ligand fungiert (Halary 2002). DC-SIGN (Geijtenbeek 2000) ist ein Adhäsionsrezeptor, ein Mannose bindendes C-Typ Lektin. Zudem wurde bereits beschrieben, dass die Bindung an DC-SIGN und DC-SIGNR verschiedenen Viren, wie beispielsweise HIV (*Human Immunodeficiency Virus*), HCV (*Hepatitis C Virus*) und Mycobacterium tuberculosis

die Infektion von Zielzellen in *trans* ermöglicht (Tailleux 2003, Kwon 2002; Wang 2004). Mit mSIGNR1 konnte jedoch auch ein murines Homolog von DC-SIGN identifiziert werden, welches ebenso wie L-SIGN spezifisch von sinusoidalen Leberendothelzellen (LSEC) exprimiert wird (Geijtenbeek 2002).

Nach Bindung von MCMV an den Oberflächenrezeptor der Wirtszelle, kommt es zum Verschmelzen von Wirtszellmembran und viraler Hüllmembran (Navarro 1993). Dadurch wird das Tegument mitsamt Kapsid in das Zytoplasma der Wirtszelle entlassen. Dort angekommen wird das Virion über Mikrotubuli zum Zellkern transportiert, wo die virale DNA über den Kernporenkomplex in das Nukleoplasma gelangt.

Die lineare virale DNA zirkularisiert dort zu einem Episom und die Transkription viraler Gene beginnt. Der Replikationszyklus von CMV wird in drei Phasen unterteilt: sehr frühe (*immediate early*=IE), frühe (*early*=E) und späte (*late*=L) Gene. Die IE-Genexpression ist unabhängig von viraler *de novo* Genexpression und beginnt 1-3 Stunden nach Infektion (Misra 1978). Daran schliesst sich 1-3 Stunden nach Infektion die Expression der E-Gene an, gefolgt von der Expression der L-Genprodukte, die etwa 12-13 Stunden nach Infektion gebildet werden. Der gesamte Replikationszyklus von MCMV dauert 48 Stunden (Moon 1979). Die Genprodukte der IE-Gene stellen Transkriptionsfaktoren dar, die die Expression der E-Gene zur Folge haben, die wiederum für die Synthese viraler DNA verantwortlich sind. Der Beginn der viralen DNA-Synthese definiert den Beginn der L-Genexpression. Die DNA-Synthese erfolgt nach dem Mechanismus des 'rolling-circle', wodurch ein einzelner DNA-Doppelstrang entsteht, der aus mehreren Einheiten des viralen Genoms besteht ('Koncatamere').

Mit der DNA-Synthese setzt auch die Expression der L-Gene ein, die vornehmlich für virale Glykoproteine kodieren. Der Zusammenbau der Virionen beginnt im Zellkern mit leeren Kapsomeren, die modifiziert werden und letztlich mit viraler DNA beladen werden. Inwieweit sich das Tegument bereits im Zellkern an das Kapsid anlagern kann, ist noch nicht vollkommen geklärt. Die reifen Kapside gelangen über die innere und äussere Kernmembran mittels Knospung (*budding*) ins Zytoplasma. Dort angekommen lagern sich zytoplasmatische Membranzisternen an die viralen Partikel und bilden so eine das Kapsid umhüllende Doppelmembran. An der Einlagerung und Modifizierung von Glykoproteinen ist das Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) beteiligt. Nach abgeschlossener Reifung kann das Virion durch Verschmelzen seiner äusseren Membran mit der zellulären Plasmamembran in den extrazellulären Raum entlassen werden (Mocarski, Fields in Virology, Kapitel 76, 4. Auflage).

### **1.4 Immune escape Mechanismen der Zytomegalieviren**

Viren haben im Laufe der Koevolution mit ihrem Wirtsorganismus zahlreiche Mechanismen entwickelt, um der antiviralen Immunantwort des Wirtes zu entgehen. Zytomegalieviren etablieren nach Primärinfektion immunkompetenter Organismen einen Zustand der Latenz, der es aufgrund eingeschränkter Genexpression (Reaktivierungsereignisse) ermöglicht, unerkannt im Wirt zu verbleiben. Partielle Genexpression, sogenannte Reaktivierungsereignisse sind ein Kennzeichen des viralen Latenzstatus. Das eigentliche Ziel von Viren besteht jedoch darin, sich zu vermehren ohne den Wirtsorganismus zu schädigen. Daher replizieren sie bevorzugt in Geweben, die einer weniger strikten immunologischen Kontrolle unterliegen, wie beispielsweise in den Epithelzellen der Speicheldrüsen. Die erwähnten Epithelzellen exprimieren nicht ausreichend MHC-Klasse-I (*Major Histocompatibility Complex*) Moleküle zur Stimulation von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen). Zytomegalieviren exprimieren sogenannte Immunevasine, die die antivirale Immunantwort manipulieren und abschalten.

Beim Vergleich viraler immunregulatorischer Gene mit Genen zellulären Ursprungs, findet man sowohl Sequenzhomologien, als auch abweichende, nicht homologe Bereiche. Homologe Gene legen die Vermutung nahe, dass die Viren diese Gene aus dem Wirtsgenom übernommen haben, um sich einen strategischen Vorteil zu verschaffen.

Die Angriffspunkte viraler Immunevasion stellen *angeborene*, als auch *erworbene* (adaptive) Verteidigungsmechanismen dar. Das Komplementsystem als frühes unspezifisches Abwehrsystem pathogener Mikroorganismen, wird von HCMV durch Expression eines Inhibitors des Membranangriffskomplexes (CD59), der in die virale Hüllmembran inseriert wird, deaktiviert (Spear 1995; Spiller 1997). MCMV exprimiert virale IgG Fc-Rezeptoren (*m138*: Thäle 1994; Crnkovic-Mertens 1998), die IgG-Antikörper über deren konstante Region (Fc-Teil) binden und damit einer Aktivierung des Komplementsystems, als auch von Phagozyten entgegenwirken. NK-Zellen (Natürliche Killerzellen) werden durch ein viral kodiertes MHC-Klasse-I Homolog (*m144*: Farrell 1997; Reyburn 1997) daran gehindert, infizierte Zellen zu lysieren. Makrophagen wiederum regulieren bei Infektion mit HCMV die Expression von MHC-Klasse-II Molekülen herunter, wodurch diese nicht mehr in der Lage sind, B- und CD4-T-Zellen zu stimulieren (Fish 1996). Für HCMV ist die Induktion von TGF-β1 beschrieben worden, einem immunsuppressiven Zytokin, welches die T-

Zellproliferation unterdrückt und gleichzeitig stimulierend auf die virale Replikation wirkt (Michelson 1994).

Viral kodierte Chemokin- und Wachstumsrezeptoren, wie  $\beta$ -Chemokin-bindende Proteine, G-Protein gekoppelte Rezeptorhomologe (GCR, *G-coupled receptor*) sowie TNF(Tumor Nekrose Faktor)-Rezeptorhomologe (*molecular mimicry*) verändern die natürliche Funktion der entsprechenden Liganden.  $\beta$ -Chemokine (=CC-Chemokine), unterscheiden sich von  $\alpha$ -Chemokinen (=CXC-Chemokinen) darin, dass sie lediglich Monozyten, anzulocken vermögen. CXC-Chemokine hingegen dirigieren neutrophile Granulozyten zu den Infektionsherden. Die viral kodierten GCRs (Chee 1990; Rawlinson 1996) binden dabei die entsprechenden  $\beta$ -Chemokine und aktivieren dadurch das intrazelluläre G-Protein, was einen Kalziumanstieg zur Folge hat. Man vermutet, dass viral kodierte Chemokine, sogenannte Virokine, zur Rekrutierung uninfizierter Zellen dienen und virale GCR-Homologe das Wanderungsverhalten infizierter Zellen verändern (Davis-Poynter 1997). Dies würde einen Mechanismus zur Ausbreitung viraler Partikel beschreiben.

Antivirale CD8<sup>+</sup>-T-Zellen spielen eine entscheidende Rolle in der Immunabwehr von Zytomegalievirusinfektionen. Adoptive Zelltransfermodelle in der Maus konnten zeigen, dass antivirale CD8<sup>+</sup>-T-Zellen protektiv wirken (Reddehase 1985), indem sie an der Bekämpfung der akuten Primärinfektion beteiligt sind und den viralen Latenzstatus aufrechterhalten (Polic 1998).

CD8<sup>+</sup>-T-Zellaktivierung setzt die Antigenprozessierung und -präsentation durch eine professionelle antigenpräsentierende Zelle (APC) voraus. Zytomegalieviren können jedoch auch diesen Mechanismus gezielt unterbinden. Diese immunsubversiven Gene werden in der E-Phase der viralen Genexpression gebildet und greifen in den MHC-Klasse-I Präsentationsweg ein. Eine Ausnahme stellt hier das Tegumentprotein *UL83* von HCMV dar, welches bereits in der IE-Phase gebildet wird und die Präsentation des IE1-Genproduktes durch Inhibition proteasomaler Prozessierung verhindert (Gilbert 1996).

Mit *m04*, *m06* und *m152* wurden drei Gene identifiziert, die in den MHC-Klasse-I Weg eingreifen. HCMV hingegen besitzt vier Gene zur Subversion MHC-Klasse-I restringierter Antigenpräsentation (*US3*, *US11*, *US6* und *US2*). Die Expression von *m152* (gp37/40) bewirkt die Retention von MHC-Klasse-I Komplexen im Endoplasmatischen Retikulum-Cis-Golgi-

Kompartiment (Gold 2002; Thäle 1995; Ziegler 1997, 2000). Außerdem reguliert es die Oberflächenexpression des hochaffinen Liganden H-60 des aktivierenden NK-Zell-Rezeptors NKG2D herunter (Krpmotic 2002). Damit manipuliert *m152* gleichzeitig *angeborene*, als auch *erworbene* Immunmechanismen. Das *m06* Genprodukt gp34 (gp48) hingegen bindet an MHC-Klasse-I Komplexe und dirigiert diese zu späten endolysosomalen Kompartimenten (Reusch 1999). Die Expression von *m04* führt zur Bindung von gp34 an MHC-Klasse-I Moleküle mit nachfolgender Eskorte zur Zelloberfläche (Kleijnen 1997; Kavanagh 2001). Das Immunevasingen *m04* stellt somit eine Ausnahme dar, da es nicht wie die anderen beiden Gene an der Herunterregulation von MHC-Klasse-I Molekülen beteiligt ist, sondern dem entgegenwirkt (Wagner 2002). Des Weiteren konnte in Analysen mit Deletionsmutanten gezeigt werden, dass *m04* die Funktion von *m152* negativ beeinflusst, indem es die transiente Bindung von *m152* ausnutzt, um dann selbständig an MHC-Klasse-I Moleküle zu binden und diese zur Zelloberfläche zu transportieren. Im Gegensatz dazu konnte ein solcher Zusammenhang für *m04* und *m06* nicht beobachtet werden. HCMV besitzt immunsubversive Gene mit vergleichbarer Funktion. Die Expression von *US3* (gp32/33) führt zur Retention von MHC-Klasse-I Komplexen im Endoplasmatischen Retikulum (Jones 1997). Die Genprodukte von *US2* (gp24) und *US11* (gp33) bewirken die Translokation der schweren  $\alpha$ -Kette von MHC-Klasse-I Molekülen zur zellulären Degradation in das Zytosol (Wiertz 1996). Zudem verhindert *US6* (gp21) den Transport antigener Peptide mittels TAP (Transporter associated with antigen processing) in das Endoplasmatische Retikulum (Ahn 1997; Hengel 1997; Lehner 1997).

Obwohl beide Viren (MCMV und HCMV) ähnliche Strategien entwickelt haben, um einer Erkennung durch das Immunsystem des infizierten Wirtsorganismus zu entgehen, sind diese Gene nicht homolog zueinander und weisen auf eine spezifische Adaption der Viren an ihren Wirt hin (Karlin 1994).

### 1.5 Das Immunsystem

Die Aufgabe des Immunsystems besteht darin, den Organismus vor potentiell schädlichen Mikroorganismen, wie Viren, Parasiten, Bakterien und deren Toxinen zu schützen. Im Laufe der Evolution haben sich verschiedenste Mechanismen entwickelt, eingedrungene Pathogene zu detektieren und zu bekämpfen. Die erste Verteidigungslinie stellt das *angeborene* Immunsystem dar. Zu ihm zählen Natürliche Killerzellen (NK-Zellen), Granulozyten,

Makrophagen, dendritische Zellen (DC) und das Komplementsystem. Diese Zellen sind vor allem während der ersten Tage nach einer Infektion bis zum Einsetzen der *erworbenen* oder *adaptiven* Immunantwort aktiv, die etwa fünf Tage nach Primärinfektion einsetzt. Das *angeborene* Immunsystem erkennt konservierte pathogene Strukturen (PAMPS – *Pathogen Associated Molecular Patterns*) durch nicht polymorphe Rezeptoren, wie beispielsweise die Toll Like Rezeptors (TLRs).

Die adaptive Immunantwort hingegen umfasst T- und B-Zellen, die ihr Antigen spezifisch über einen Rezeptor erkennen können. Die Antigenrezeptoren der B- und T-Zellen zeichnen sich durch eine enorme Rezeptorvielfalt aus, wobei zu jedem Zeitpunkt etwa  $10^8$  unterschiedliche Rezeptorspezifitäten im Organismus vorhanden sind. Der T-Zellrezeptor (TCR) erkennt sein spezifisches Antigen in Form von kurzen Peptiden, welche an sogenannte MHC-Moleküle gebunden sind. B-Zell-Rezeptoren hingegen erkennen die native dreidimensionale Struktur ihres Antigens ohne die Notwendigkeit zellulärer Prozessierung. Der Rezeptor von B-Zellen kann zudem auch in Form löslicher Immunglobuline vorkommen. Der B-Zell-Rezeptor (BCR) und der T-Zell-Rezeptor, als auch die MHC-Moleküle sind im Gegensatz zu den Antigenrezeptoren der *angeborenen* Immunantwort hoch polymorph (Janeway, Immunologie, 5. Auflage).

### 1.6 Antigenpräsentation und T-Zell-Aktivierung

MHC-Moleküle höherer Vertebraten können in zwei Klassen unterteilt werden, MHC-Klasse-I Moleküle, die auf allen kernhaltigen Zellen vorkommen, und MHC-Klasse-II Moleküle, die vornehmlich auf professionellen Antigen-präsentierenden Zellen (APC) wie dendritischen Zellen, Makrophagen und B-Zellen exprimiert werden.

Prozessierte endogene Proteinen werden in Form von Peptiden über MHC-Klasse-I Moleküle  $CD8^+$ -T-Zellen präsentiert. Dagegen sind Peptide, die im Kontext mit MHC-Klasse-II Molekülen  $CD4^+$ -T-Zellen präsentiert werden, Antigene exogenen Ursprungs.  $CD4^+$ - und  $CD8^+$ -Moleküle stellen Korezeptoren dar, über die sich zwei Subtypen von T-Zellen voneinander unterscheiden lassen. Die klassische Sichtweise der Antigenpräsentation beschreibt lediglich die beiden erwähnten Mechanismen. Bevan *et al.* konnten 1976 neben dem endogenen (MHC-Klasse-I) und dem exogenen Weg (MHC-Klasse-II) der Antigenpräsentation einen weiteren beschreiben. Professionelle APCs sind nämlich in der Lage, exogen aufgenommene Antigene über MHC-Klasse-I Moleküle  $CD8^+$ -T-Zellen zu präsentieren. Dieser Mechanismus wird als Kreuzpräsentation bezeichnet (Morrison 1986,

Bevan 1976; Rock 1990). Diesen 'exklusiven' Präsentationsweg findet man vor allem bei professionellen APC wie dendritischen Zellen und bei Makrophagen (Reis e Sousa 1995; Rock 1996). Dadurch ist es professionellen APC möglich, exogene Antigene, wie beispielsweise virale Bestandteile, aufzunehmen, und eine CD8<sup>+</sup>-T-Zellantwort auszulösen ohne von dem entsprechenden Pathogen infiziert worden zu sein.

Zur Aktivierung von naiven T-Zellen sind 2 Signale notwendig. Das erste Signal erfolgt durch die Interaktion des TCR mit dem MHC-Peptidkomplex, welches jedoch zur Aktivierung der T-Zelle nicht ausreicht. Ein zweites Signal wird durch kostimulatorische Moleküle und Zytokine geliefert. T-Zellen reagieren auf eine Aktivierung mit Zytokinausschüttung, Proliferation und einer Veränderung ihres Expressionsprofils verschiedener Oberflächenantigene. Funktionell sind CD8<sup>+</sup>-T-Zellen nach Aktivierung und Differenzierung zu zytotoxischen Effektorzellen direkt an der Elimination infizierter Körperzellen beteiligt. CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wiederum haben regulatorische Funktionen, wie beispielsweise die Aktivierung von B-Zellen und Makrophagen durch Zytokinausschüttung und TCR-Rezeptorligation. Die Aktivierung von T-Zellen findet in darauf spezialisierten Bereichen im Organismus statt. Dabei wandern dendritische Zellen durch die verschiedenen Gewebe des Organismus und nehmen als unreife DCs Antigene auf. Dies löst einen Reifungsprozess aus, der sie zu den peripheren lymphoiden Organen wandern (Milz, Lymphknoten) lässt, wo sie die prozessierten Peptide als gereifte dendritische Zellen, T-Zellen präsentieren (Janeway, Immunologie, 5. Auflage).

### 1.7 Die Leber

Die Leber besitzt mannigfaltige Aufgaben. Sie ist beispielsweise an der Entgiftung und Metabolisierung toxischer Substanzen, am Cholesterin- und Lipidstoffwechsel, beteiligt, fungiert als Glucosespeicher und nimmt immunologische Aufgaben wahr. Bis zu 2000 Liter Blut durchströmen die Leber tagtäglich. Die Blutversorgung der Leber setzt sich aus venösem (75%), dem Verdauungstrakt entspringenden, und arteriellem Blut (25%) zusammen, welches aus der systemischen Zirkulation stammt. Das venöse, nährstoffreiche Blut erreicht die Leber über die Pfortader (*Vena porta*), wohingegen das arterielle Blut über die hepatische Arterie (*Arteria Hepatica*) in die Leber gelangt. Dort angekommen verzweigen sich venöser und arterieller Blutstrom in die *Venae* und *Arteriae interlobulares*, von wo aus sie letztendlich gemeinsam die mikrovaskulären Gefäße der Leber, die hepatischen Sinusoide erreichen.

Folglich mischen sich venöses und arterielles Blut und sorgen für einen arteriovenösen Blutstrom in den hepatischen Sinusoiden. Der sinusoidale Blutstrom gelangt schließlich über die Zentralvenolen in die untere Hohlvene (*Vena cava inferior*) und erreicht so wieder die systemische Zirkulation.

### 1.8 Das hepatische Sinusoid

Die Leber erscheint aufgrund der Anordnung der parenchymalen Leberzellen, den sogenannten Hepatozyten, als schwammartig verzweigtes Organ. Das Blut, welches durch die hepatischen Sinusoide fließt, trifft dort zuerst auf hepatische Makrophagen (Kupfferzellen) und sinusoidale Leberendothelzellen (LSEC; Wisse 1985). Aufgrund der langsamen Fließgeschwindigkeit des Blutes innerhalb der Sinusoide (25-250µm/sec) und deren engen Durchmessers von 7-12µm wird sowohl die effiziente Beseitigung von Makromolekülen, als auch der Kontakt zwischen den sinusoidalen Zellpopulationen und Leukozyten des Blutstromes gewährleistet (MacPhee 1995; Smedsrod 1990; Knolle 2000). LSEC kleiden die Wände der Sinusoide aus und bilden so eine Barriere zwischen den Leukozyten im Blutstrom und den parenchymalen Hepatozyten (Limmer 1998).

### 1.9 Die Zellen der hepatischen Sinusoide

Die hepatischen Zellpopulationen umfassen Leber-dendritische Zellen, Leberassoziierte Lymphozyten (LAL), Sternzellen, Hepatozyten, Kupfferzellen und sinusoidale Leberendothelzellen.

Hepatozyten (Ø 30µm) stellen mit 60% die größte Zellpopulation der Leber dar. Neben ihren zahlreichen Stoffwechselfunktionen, reagieren Hepatozyten auf proinflammatorische Zytokine wie IL-1, IL-6 und TNFα mit der Bildung von Akut-Phase-Proteinen, die die Immunantwort sowohl lokal in der Leber, als auch systemisch beeinflussen (Fey 1990).

Sinusoidale Endothelzellen der Leber trennen den arteriovenösen Blutstrom in den Sinusoiden von den parenchymalen Hepatozyten. LSEC besitzen keine Basalmembran wie Endothelzellen anderer Organe. Zwischen LSEC und Hepatozyten liegt der sogenannte 'Raum von Dissé', der reich an extrazellulärer Matrix ist. In diesem Zwischenraum sind die Sternzellen lokalisiert, die an LSEC angelagert sind und den sinusoidalen Blutstrom



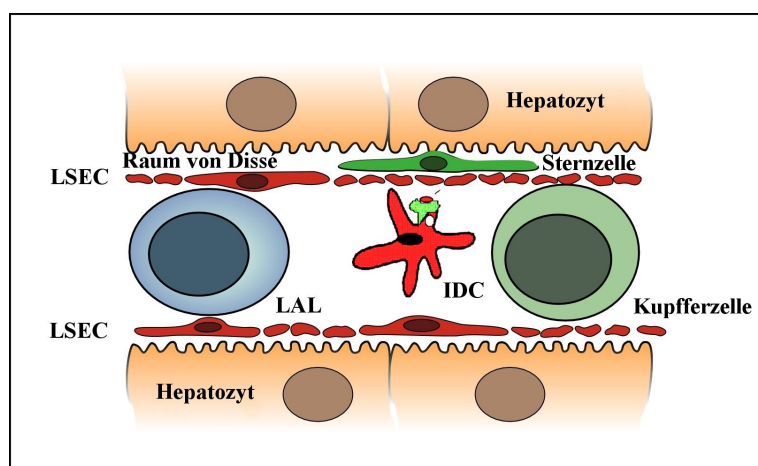
kontrollieren, indem sie die Kontraktion der sinusoidalen Gefäße auslösen können (Oda 2000). Dadurch verringert sich der Durchmesser im Sinusoid.

Kupfferzellen, die hepatischen Makrophagen, sind vornehmlich periportal angesiedelt und wandern mit langsamer Flussrate durch die Sinusoide. Durch den geringen Durchmesser der Sinusoide kommt es wiederholt zum Erliegen des Blutstroms durch die passierenden Kupfferzellen (MacPhee 1992).

LSEC besitzen kleine Poren, sogenannte Fenestrae (100-150nm), durch die kleine Moleküle (<100nm) in den Raum von Dissé gelangen können. Größere Moleküle hingegen können die durch LSEC geschaffene Barriere nicht überwinden, sondern müssen erst durch eine membranständige Lipase metabolisiert werden (Wisse 1985; Fraser 1995). Makromoleküle können jedoch über rezeptorvermittelte Aufnahme durch LSEC mit anschließender Transzytose zu Hepatozyten gelangen (Kempka 1988).

LAL stellen eine außergewöhnliche Zellpopulation innerhalb der Leber dar. Sie besitzen ein restringiertes TCR-Repertoire und bilden zusammen mit LSEC und Kupfferzellen die lokale Verteidigungseinheit der Leber im Kampf gegen eindringende pathogene Mikroorganismen und Tumoren (Norris 1998).

Neben Kupfferzellen sind in der periportalen Region der Leber dendritische Zellen angesiedelt (Thomson 1999). Diese Zellen sind vermutlich an der Regulation der Immunantwort beteiligt, indem sie Antigene aus dem venösen Blut aufnehmen, prozessieren und in den drainierenden hepatischen Lymphknoten präsentieren (Matsuno 2000).



**Abb.2: Die Zellen der hepatischen Sinusoide;** LSEC (Liver Sinusoidal Endothelial Cells); Kupfferzellen (hepatische Makrophagen); Sternzellen im Raum von Dissé; Hepatozyten; LAL (Liver Associated Lymphocytes). IDC (Liver Dendritic Cells).

(Quelle: modifiziert nach Prof. Dr. P.A. Knolle, IMMEI, Bonn)

### **1.10 Toleranz in der Leber**

Aus der Transplantationschirurgie gibt es Beobachtungen, die nahe legen, dass periphere antigenspezifische Immuntoleranz in der Leber entsteht. Zum einen wird die Transplantation allogener Lebertransplantate selbst über MHC-Barrieren hinweg generell gut akzeptiert (Cantor 1967; Calne 1969). Außerdem werden weitere Organe desselben Spenders ebenfalls gut angenommen (Rasmussen 1995; Dahmen 1994). Weiter untermauert wird dieser Befund durch die Tatsache, dass die direkte intraportale Injektion (in die Pfortader) von Antigenen zu antigenspezifischer peripherer Immuntoleranz führt (Boeckx 1975). Schließlich verbessert die Drainage, also das Umleiten des Blutstromes eines transplantierten Organs in die Pfortader, die Akzeptanz des Transplantats (Gorczyński 1994).

Eine maßgebliche Beteiligung an der Induktion antigenspezifischer Immuntoleranz in der Leber konnte den mikrovaskulären sinusoidalen Endothelzellen der Leber zugeschrieben werden (Knolle 2000; Knolle 2001). Diese sessilen APC exprimieren alle notwendigen Moleküle, die zur Interaktion mit CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen notwendig sind, wie MHC-Klasse I und II, Adhäsionsmoleküle (CD54, CD106), Mustererkennungsrezeptoren zur Antigenaufnahme (Mannoserezeptor, Scavengerrezeptor) und kostimulatorische Moleküle (CD40, PD1L, ICOS-L, CD80, CD86; Knolle 2000; Limmer 2000). Die antigenspezifische Stimulation von T-Zellen durch LSEC führt zur Induktion antigenspezifischer systemischer T-Zelltoleranz (Limmer 2000; Knolle 1999). Toleranz in CD4<sup>+</sup>-T-Zellen ist durch IL-4 bzw. IL-10 Sekretion gekennzeichnet. CD8<sup>+</sup>-T-Zellen wiederum sind nach Stimulation durch LSEC funktionell inert, zeigen keine zytotoxischen Effektorfunktionen und schütten keine charakteristischen Zytokine mehr aus.

Darüber hinaus spielt das immunsuppressive Mikromilieu, welches in der Leber vorherrscht, eine wichtige Rolle, indem es die Toleranzinduktion begünstigt. Das hepatische Mikromilieu ist reich an den immunsuppressiven Zytokinen IL-10 und TGF- $\beta$ , welche von Hepatozyten, LSEC und anderen Leberzellen gebildet werden. Die Zytokine IL-10 und TGF- $\beta$  inhibieren die Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-12 und IFN $\gamma$  durch Makrophagen. Außerdem induzieren sie die Produktion von PGE<sub>2</sub> (Prostaglandin E<sub>2</sub>), regulieren die Expression von MHC-Klasse-II Molekülen herunter und lösen die autokrine und parakrine Sekretion von IL-10 und TGF- $\beta$  aus (Gordon 2002). Betrachtet man die zentrale Stellung der Leber im Organismus mitsamt ihrer tolerogenen Funktion, so stellt die Leber ein überaus attraktives Ziel für zahlreiche pathogene Mikroorganismen dar, die sich dort in Sicherheit wiegen können.

### 1.11 Zielsetzung

Die Leber ist das Ziel zahlreicher hepatotroper Viren. Sowohl die anatomisch zentrale Lage der Leber, als auch deren funktionelle Beteiligung an der Induktion peripherer Immuntoleranz, machen sie zum attraktiven Ziel für virale Infektionen. Die sinusoidalen Endothelzellen der Leber (LSEC) sind in der Lage, antigenspezifische Immuntoleranz in CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (Knolle 1999; Limmer 2000) zu induzieren. LSEC verfügen über alle notwendigen Moleküle, die zur Interaktion mit T-Zellen benötigt werden (Adhäsionsmoleküle, MHC-Klasse-I/II, Mustererkennungsrezeptoren zur Antigenaufnahme und kostimulatorische Moleküle). Die hepatische Population von LSEC steht in direktem Kontakt mit dem arteriovenösen Blutstrom der Leber. Sie bilden eine ununterbrochene Barriere zwischen dem Blut und den parenchymalen Hepatozyten. Pathogene Mikroorganismen, insbesondere hepatotrope Viren (HBV, HCV und CMV), müssen daher ebenfalls die durch LSEC geschaffene Barriere überwinden, um Hepatozyten erreichen zu können. Es wäre jedoch auch vorstellbar, dass Viren die tolerogene Funktion von LSEC ausnutzen, um periphere Immuntoleranz bezüglich viraler Antigene zu induzieren.

Zytomegalieviren (Familie der Herpesviridae) sind große DNA-Viren, die lebenslang im Wirtsorganismus verbleiben können. Eine Infektion von immunkompetenten Organismen verläuft im Allgemeinen asymptomatisch.  $\beta$ -Herpesviren haben im Laufe der Koevolution mit ihrem spezifischen Wirt zahlreiche Strategien entwickelt, um einer Immunantwort des infizierten Wirtes zu entgehen (*viral immune escape*).

Im Zuge der Dissertation sollten im Mausmodell folgende Fragen beantwortet werden:

- (1) Sind sinusoidale Leberendothelzellen permissiv für eine Infektion mit dem murinen Zytomegalievirus?
- (2) Bilden MCMV infizierte LSEC Nachkommenviren?
- (3) Dienen infizierte LSEC als virales Reservoir zur Ausbreitung der Infektion?
- (4) Beeinflusst die Infektion von LSEC mit MCMV deren Phänotyp?

(5) Verändert eine Infektion von LSEC mit MCMV deren Fähigkeit zur Antigenpräsentation?

(6) Stellt die Infektion von LSEC mit MCMV einen passiven Mechanismus von Seiten des Virus dar, Immuntoleranz gegenüber viralen Antigenen zu induzieren?

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Allgemeine Laborgeräte

Analysenwaagen	‘U4100 – OD2.2’ und ‘MC BA 100’ (Sartorius, Göttingen)
Autoklav	Selectomat S2000 (von MMM, München)
AutoMACS	Miltenyi, Bergisch Gladbach
Brutschränke	Typ ‘B 5060 EC-CO2’ und ‘T 6030’ (Heraeus Instruments, Hanau) ‘CO2 Incubator’ MCO - 17AI’ (Sanyo, Japan)
Durchflusszytometer	FACScan, FACSCalibur und FACSorter (Becton Dickinson, Heidelberg)
Dynal MPC-L	(Dynal Biotech, Hamburg)
Einfriergerät, Kryo-	Qualifreeze (Nunc, Wiesbaden)
Eismaschinen	Scotsman® ‘MF-40’ und ‘B-550’ (Frimont Bettolinc, Pogliano, Italien)
Elektrophoresekammern	Mini-Protean® II Cell (BioRad, München) ZMBH, Abt. Feinmechanik
Elektrophoresekammer	ZMBH, Abt. Feinmechanik
ELISA - Lesegerät	Spectra MAX 250 (Molecular Devices, MWG BIOTECH, Ebersberg)
Erlenmeyerkolben	50ml, 100ml, 250ml, 500ml (Schott, Mainz)
Geltrockner	Dual Temperature SLAB Gel Dryer, Model 1125B (Bio-Rad, München)
Heizblöcke	Ori-Block DB-1 und DB-3 (Techne, Cambridge, UK)
Kamera	SC35/12 (Olympus, Hamburg)
Kühlaggregat	RT 100 Refrigerated Condensation Trap (Savant, Farmingdale, UK)
Kühlschränke (+4°C)	vario - cooler (Bosch, Stuttgart) 2021 Maxicoldlab (LKB Bromma, Cambridge, UK)
Kühlschränke (-20°C)	economic, economic - froster, Froster - 720 und GS 52 A (Bosch, Stuttgart) Modell Nr. TC 213-1 (Tritec, Hannover)
Kühlschränke (-70°C)	Advantage (Nunc, Wiesbaden) ULT Freezers Model 917 (Forma Scientific via ThermoLife)

	Science, Egelsbach)
MACS - Gerät	vario MACS (Miltenyi, Bergisch Gladbach)
Magnetrührer	IKAMAG RET-GS und RCT (IKA-Labor Technik, Staufen i.Br.)
Mikroskope	DM RD + DM RXE (Leica Instruments, Nussloch)
Kyrostatt	2800 Frigocut N (Reichert-Jung, Nussloch)
Mikrotiterplatten-Waschgerät	Nunc-Immuno <sup>TM</sup> Wash12; Nunc Brand Products (Nalge Nunc International, via neoLab, Heidelberg)
Netzgeräte	Model 200/2.0, Model 1000/500 und Power Pack 200 (Bio-Rad, München) 2297 Macrodrive 5 (LKB Biotechnology AB, Bromma, Sweden) ST 504 (Gibco BRL, Karlsruhe)
pH – Meter	pH 523 (Wissenschaftlich-Technische Werkstätten (WTW), Weilheim)
Pipettierhilfen	pipetboy acu (Integra Bioscience, Fernwald) pipetus - akku (Hirschmann Labor Technik, Eberstadt)
Pumpen	Type MZ 2C (vacuubrand, Wertheim) Masterflex (Cole-Parmer Instrument Company via Novodirect, Kehl/Rhein) MS-4 Reglo (Ismatec, Laboratoriumstechnik GmbH, Wertheim-Mondfeld)
Reinstwasseranlage	‘Milli – Q’, Reagent Grade Water System (Millipore via membraPure, Membrantechnik, Reinstwasser, Bodenheim)
Rollenmischer	‘M 5’ und ‘ST5 CAT’ (neoLab, Heidelberg)
Rotoren	Sorvall GSA, HB-4 und HB-6 (Du Pont Instruments, Bad Homburg v.d.H.) ‘JE-6B’ (Beckman Coulter, Unterschleissheim-Lohhof)
Schüttelinkubator	‘RC-2-U Pilot Shaker’ (Adolf Kühner AG, Apparatebau, Basel, Schweiz über Bachofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen)
Schüttler, horizontal	‘Rollordrum’, Modell TC-7 (New Brunswick Scientific Co, Inc., Edison, New Jersey, USA)
Spektralphotometer	Ultrospec 3000 UV/Visible Spectrophotometer (Amersham Pharmacia, Freiburg) Ultraspec II Model 4050 (LKB Biochrom, Cambridge, UK)
Stickstofftank	MVE XLC 810HE und EN1251 (Chart Industries, Canton,

	Georgia, USA
Tischschüttelgerät	MS-1 Minishaker und VF2 (IKA – Labortechnik, Staufen i.Br.) Reax2000 (Heidolph, Kehlheim)
Ultrazentrifuge	OPTIMA™ LE-80K (Beckman Coulter)
UV-Beleuchtungstisch	Spectroline, Model TL-312A, Transilluminator, 312nm (Fisher Scientific, Nidderau)
Wasserbäder	minitherm 1 (Dinkelberg – Labortechnik, Neu-Ulm) Type 1012 (Gesellschaft für Labortechnik (GFL), Burgwedel) ZMBH, Abt. Feinmechanik
Wasserbad, Schüttel- Werkbank, steril	1092 (Gesellschaft für Labortechnik (GFL), Burgwedel) Steril Gard Hood (the Baker Company, Inc., Sanford, Maine, USA via Labotec, Labor - Technik, Göttingen) Lamin-Air (Heraeus, Hanau)
Zählkammer	Neubauer ‘improved’ (la fontaine über Labotec, Labor – Technik, Göttingen)
Zentrifugen	Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge (Du Pont Instruments, Bad Homburg v.d.H.) Elutriator Avanti J-25 I (Beckman Coulter, Unterschleissheim- Lohhof) Cryofuge 6-4, Variofuge 3.0R, Biofuge A Typ 1230 und Omnifuge 2.0 RS (Heraeus Instruments, Hanau)

Alle weiteren Labormaterialien wurden über die Firmen neoLab (Heidelberg) und Roth (Karlsruhe) bezogen.

### 2.2 Verbrauchsmaterialien

Deckgläschen	21x26mm (Menzel - Gläser über neoLab, Heidelberg)
Dispensertips	1,25ml, 2,5ml und 5ml (Labotec, Labor - Technik, Göttingen)
Einmalröhrchen , Polypropylen- 12/75mm	(Greiner Labortechnik, Nürtingen) Falcon 2053 (Becton Dickinson, Heidelberg)
Einmalröhrchen, Polystyren- 6,0/38mm	(Greiner Labortechnik, Nürtingen, #101101)
Einmalröhrchen, Polystyrol- 18/95mm	(Greiner Labortechnik, Nürtingen)
Filterpapier	Whatmann, 3 MM (Labotec, Labor - Technik, Göttingen) 597 1/2 folded filters Ø240mm (Schleicher & Schuell, Dassel)

Fotofilme	667 B&W Instant Pack Film (Polaroid, Offenbach)
Gewebskulturschalen	94/16mm (Greiner Labortechnik, Nürtingen)
Glaskanülen, heparinisiert	Mikro-HK- Kapillaren (Heiland, Hamburg)
Handschuhe, Einmal-Kanülen	S, M, L (SafeMed, Willishalten und Hakle-Kimberly, Koblenz) 0,3x13mm, 30G, 0,4x19mm, 27Gx $\frac{3}{4}$ " , 0,45x25mm, 26Gx1" , 0,9x40mm, 20Gx1 $\frac{1}{2}$ " , 0,9x70mm, 20Gx2 $\frac{3}{4}$ " (B.Braun, Melsungen); 0,9x120mm (Ehrhardt-Söhne, Geislingen)
Konzentrationssäulen	'centriplus YM30', Ausschlussgröße 30kD (Amicon über Millipore, Eschborn)
Kryoröhrchen	1ml (Nunc, Wiesbaden)
Kyrostatt- Kleber	'Eukitt' Mounting Medium (Electron Microscopy Science, Fort Washington, PA, USA)
MACS - Säulen	MS <sup>+</sup> und VS <sup>+</sup> (Miltenyi, Bergisch Gladbach)
MACS - Auffanggefäße	Miltenyi, Bergisch Gladbach
Meßpipetten	2ml, 5ml, 10ml, 25ml, (Greiner Labortechnik, Nürtingen)
Mikrotiterplatten	6-, 12-, 24-, 48-, 96-Loch (Nunc, Wiesbaden und Greiner Labortechnik, Nürtingen)
Objektträger	76 x 26mm (IDL, Nidderau) 'SuperFrost Plus' (Menzel-Gläser via NeoLab)
Parafilm	Parafilm „M“® (American National Can TM, Greenwich, CT, USA via neoLab, Heidelberg)
Pasteurpipetten	150mm, 230mm (Roth, Karlsruhe)
Petrischale	10 cm Ø (Sahrsted, Nümbrecht)
pH - Indikatorstäbchen	pH 6,5-10,0 und pH 0-6 (Merck, Darmstadt)
Pipettenspitzen	Standartips 10µl, 100µl, 1000µl (Eppendorf, Hamburg und Biozym Diagnostik, Hess. Oldendorf)
Präparierbesteck	Labotec, Labor - Technik, Göttingen
Protein A Säule	Econo-Pac® Protein A Columns (BioRad, München)
Reaktionsgefäße	0,5ml, 1,5ml, 2,0ml (Eppendorf, Hamburg) 1,5ml mit Schraubverschluss (Sarstedt, Nümbrecht, # 72.692)
Siebe, Nylon-	'Cell Strainer', 30µm, 70µm und 100µm (Becton Dickonson, Heidelberg)
Skalpelle	Präzisa (Dahlhausen Medizin - Technik, Köln)



Sterilfilter	0.2µm (Schleicher & Schuell, Einbeck)
Sterilfilter, Flaschen-	'Tissue Culture Filter Units' 150ml, 500ml, 1000ml (Nunc, Wiesbaden)
Ultrazentrifugenröhrchen	Polyallomer 25x89mm (Beckman Coulter)
Zellkulturflaschen	25cm <sup>2</sup> , 80cm <sup>2</sup> , 175cm <sup>2</sup> , 500cm <sup>2</sup> (Nunc, Wiesbaden)
Zentrifugenröhrchen	15ml, 50ml (Greiner Labortechnik, Nürtingen) 200ml (Nunc, Wiesbaden), 250ml (Corning, Bodenheim)

Alle weiteren Verbrauchsmaterialien wurden über die Firmen Roth (Karlsruhe), neoLab (Heidelberg) und Nunc (Wiesbaden) bezogen.

### 2.3 Chemikalien, Reagenzien und Reaktionskits

AA/Bis (Acrylamid - Bisacrylamid - Fertiglösung, 30%)	(Roth, Karlsruhe)
ABTS	(Sigma, Deisenhofen)
Accutase	(PAA, Cölbe)
Actinomycin D (C <sub>62</sub> H <sub>86</sub> N <sub>12</sub> O <sub>16</sub> , MW = 1255)	(Sigma, Deisenhofen)
Agarose	(Gibco BRL, Karlsruhe)
L-Alanin (C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub> , MW = 89,09)	(Sigma, Deisenhofen)
Albumin, Rinderserum- (BSA)	(Serva, Heidelberg)
Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> Cl, MW = 53,49)	(Merck, Darmstadt)
Ammoniumpersulfat (APS, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> , MW = 228,2)	(BioRad, München)
L-Asparagin (C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , MW = 132,1)	(Merck, Darmstadt)
BM Blue Soluble	(Roche Diagnostics, Mannheim)
Bromphenolblau (C <sub>19</sub> H <sub>10</sub> Br <sub>4</sub> O <sub>5</sub> S, MW = 670,0)	(Sigma, Deisenhofen)
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> • 2H <sub>2</sub> O, MW = 147)	(Merck, Darmstadt)
CFSE / CFDA-SE (5- und 6- Gemisch, C <sub>29</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>11</sub> , MW = 557,47)	(Molecular Probes, Leiden, Niederlanden)
Coomassie Brilliant Blue R-250 (MW = 826,0)	(BioRad, München)
Diethylpyrocarbonate (DEPC) (C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> , MW = 162,1)	(Sigma, Deisenhofen)
Dimethylsulfoxid (DMSO) ((CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> OS, MW = 78,13)	(Merck, Darmstadt)
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , MW = 142,0)	(Merck, Darmstadt)
DMEM - Medium	(Gibco BRL, Karlsruhe)
Essigsäure (C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> , MW=60,05)	(Roth, Karlsruhe)

Ethanol, absolut ( $C_2H_5OH$ , MW = 46,07)	(Riedel-de Haën, Seelze)
Ethidiumbromidlösung, 1% ( $C_{21}H_{20}N_3Br$ , MW = 394,3)	(Fluka über Sigma, Deisenhofen)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA) ( $C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$ , MW = 372,2)	(Gerbu, Gaiberg)
Fötale Kälberserum (FCS)	(PAN Biotech, Aidenbach)
Fötale Kälberserum (low LPS, low IgG) (FCS <sup>-LPS</sup> )	(PAA, Cölbe)
Formalin; Formaldehyd (HCHO, MW = 30,03)	(Merck, Darmstadt)
D(+)-Glucose ( $C_6H_{12}O_6$ , MW = 180,2)	(Sigma, Deisenhofen)
L-Glutamin (200mM) ( $C_5H_{10}N_2O_3$ , MW = 146,1)	(Gibco BRL, Karlsruhe)
Glycin ( $C_2H_5NO_2$ , MW = 75,07)	(Sigma, Deisenhofen)
Heparin	(Amersham Pharmacia, Freiburg)
HEPES ( $C_8H_{18}N_2O_4S$ , MW = 238,3)	(Gerbu, Gaiberg und Sigma, Deisenhofen)
N-Hydroxysuccinimidobiotin ( $C_{14}H_{19}N_3O_5S$ , MW = 341,4)	(Sigma, Deisenhofen)
IPTG ( $C_9H_{18}SO_5$ , MW = 238,3)	(Sigma, Deisenhofen)
Isopropanol ( $(CH_3)_2CHOH$ , MW = 60,1)	(Merck, Darmstadt)
Kaliumacetat ( $KC_2H_3O_2$ , MW = 98,14)	(Merck, Darmstadt)
Kaliumchlorid (KCl, MW = 74,55)	(Merck, Darmstadt)
Kaliumhydrogencarbonat ( $KHCO_3$ , MW = 100,12)	(Merck, Darmstadt)
Kaliumhydrogenphosphat ( $K_2HPO_4$ , MW = 174,2)	(Sigma, Deisenhofen)
Kaliumdihydrogenphosphat ( $KH_2PO_4$ , MW = 136,09)	(Gerbu, Gaiberg)
Kalziumchlorid ( $CaCl_2$ , MW = 147,0)	(Sigma, Deisenhofen)
Kollagen R	(Serva, Heidelberg)
Lymphoprep	(Nycomed Pharma, Unterschleissheim)
Magnesiumchlorid ( $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ , MW = 203,3)	(Merck, Darmstadt)
Magnesiumsulphat ( $MgSO_4$ , MW = 120,4)	(Sigma, Deisenhofen)
2-Mercaptoethanol ( $HS(CH_2)_2OH$ , MW = 78,13)	(Sigma, Deisenhofen)
Methanol ( $CH_3OH$ , MW = 32,04)	(Riedel de Haen, Seelze)
Metrizamid	(Sigma, Deisenhofen)
Natriumacetat ( $C_2H_3O_2Na$ , MW = 82,03)	(Merck, Darmstadt)
Natriumazid ( $NaN_3$ , MW = 65,01)	(Sigma, Deisenhofen)
Natriumbicarbonat ( $NaHCO_3$ , MW = 84,01)	(Sigma, Deisenhofen)
Natriumchlorid ( $NaCl$ , MW = 58,44)	(Merck, Darmstadt)

Natriumcitrat ( $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ , MW = 294,1)	(Roth, Karlsruhe)
Natrium - deoxycholate ( $C_{24}H_{39}O_4Na \cdot H_2O$ , MW = 432,6)	(Sigma, Deisenhofen)
Natriumdihydrogenphosphat ( $NaH_2PO_4$ , MW = 120,0)	(Merck, Darmstadt)
Natriumhydrogenphosphat ( $Na_2HPO_4$ , MW = 142)	(Sigma, Deisenhofen)
Natriumdodecylsulphat (SDS) ( $CH_3(CH_2)_{10}CH_2SO_3Na$ , MW = 288,38)	(Merck, Darmstadt)
Natriumhydroxid (NaOH, MW = 40,0)	(Merck, Darmstadt)
Natriumpyruvat ( $C_3H_3O_3Na$ , MW = 110,0)	(Sigma, Deisenhofen)
Nicht - essentielle Aminosäuren (100x)	(Seromed, Berlin)
Ovalbumin, Grad V, VI, VII	(Sigma, Deisenhofen)
Ovalbumin-Texas-Red	(Molecular Probes, Leiden, Niederlanden)
Paraformaldehyd (PFA) ( $H(-OCH_2)_n-OH$ )	(Serva, Heidelberg)
PBS	(Biochrom, Berlin)
Penicillin (10.000U/ml) /Streptomycin (10.000 $\mu$ g/ml)	(Gibco BRL, Karlsruhe)
Percoll	(Amersham Pharmacia, Freiburg)
Neutravidin <sup>TM</sup> Horseradish Peroxidase Conjugate	(PIERCE #31001)
Polyoxysorbitanmonolaurat	siehe Tween 20
Protein G (Hi Trap <sup>TM</sup> ) Affinitätssäulen (1ml)	(Amersham Pharmacia, Freiburg)
RPMI 1640 - Medium	(Seromed, Berlin)
Salzsäure (HCl, MW = 36,46)	(Sigma, Deisenhofen)
Schwefelsäure ( $H_2SO_4$ , MW = 98,08))	(Universität Heidelberg, Theoretikum, Abtl. Chemikalienlager)
SDS	s. Natriumdodecylsulphat
SIINFEKL	(ZMBH, Abteilung Biosynthese)
C-SNARF-1 (Carboxy-Seminaphthorhodafluor-1)	(Molecular Probes, Leiden, Niederlanden)
Streptomycin (10.000 $\mu$ g/ml)/Penicillin (10.000U/ml)	(Gibco BRL, Karlsruhe)
Stickstoff, flüssig	(Linde, Wiesbaden)
Sucrose ( $C_{12}H_{22}O_{11}$ , MW = 342,3)	(Sigma, Deisenhofen)
TEMED ( $C_6H_{16}N_2$ , MW = 116,2)	(BioRad, München)
Tris (Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan)	(Riedel de Haen, Seelze)
Tris - Base ( $(CH_2OH)_3CNH_2$ , MW = 121,1)	(Roth, Karlsruhe)

Triton X-100	(Sigma, Deisenhofen)
Trypanblau, 0,4% (C <sub>34</sub> H <sub>24</sub> N <sub>6</sub> O <sub>14</sub> S <sub>4</sub> Na <sub>4</sub> , MW = 960,8)	(Biochrom, Berlin)
Trypsin/EDTA	(Gibco BRL, Karlsruhe)
Trypton	(Difco Laboratories, Augsburg)
Türkislösung	(Merck, Darmstadt)
Tween 20	(Merck, Darmstadt)
Urea (NH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub> , MW = 60,06)	(Sigma, Deisenhofen)
Wasserstoffperoxid (30%) (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , MW = 34)	(Merck, Darmstadt)

## 2.4 Allgemeine Lösungen

GBSS (Gey's balanced salt solution): ddH<sub>2</sub>O, 137mM NaCl, 5mM KCl, 1,6mM CaCl<sub>2</sub>, 0,9mM MgCl<sub>2</sub>, 0,3mM MgSO<sub>4</sub>, 0,2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,7mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7,4, 2,7mM NaHCO<sub>3</sub>, 5,5mM D(+)-Glucose, 50mM HEPES, pH 7,4 eingestellt mit NaOH und sterilfiltriert (0,2µm), 4°C

## 2.5 Verwendete Antikörper

### 2.5.1 Antikörper gegen Oberflächenmarker

Sofern nicht anders angegeben wurden monoklonale Antikörper gegen murine Epitope verwendet, die mit Biotin oder einem Fluorochrom (FITC, PE, PerCP-Cy5.5 oder APC) konjugiert waren.

Antigen	Isotyp	Klon	Bemerkung	Quelle
CD3	IgG1, Hamster	145-2C11		
CD8α	IgG2a κ, Ratte	53-6.7	= Ly-2	BD
CD11a	IgG2a κ, Ratte	2D7	= Integrin αL, LFA-1 α-Kette	BD
CD16/32	IgG2b κ, Ratte	2.4G2	= Anti-FCγR III + II / unkonjugiert eingesetzt	BD
CD40	IgG2a κ, Ratte	3/23		BD
CD44	IgG2b κ, Ratte	IM7	= Pgp-1, Ly-24	BD
CD54	IgG1 κ, Hamster	3E2	= ICAM-1	BD
CD80	IgG2, Hamster	16-10A1	= B7.1	BD
CD86	IgG2a κ, Ratte	GL1	= B7.2	BD
CD106	IgG2a κ, Ratte	429	= VCAM-1	BD
Ig κ, Ratte	IgG2a κ, Maus	MAR 18.5	Gegen RI-1 und RI-1b Allotyp / unkonjugiert eingesetzt	Hb
MHC I	IgG2a κ, Ratte	34-2-12	α-H-2Dd	BD
MHC I	IgG2a κ, Ratte	AF6-88.5	α-H-2K <sup>b</sup>	BD
ME9F1	IgG2a, Ratte	ME9F1		Hb

**Tabelle 1. Verwendete Antikörper;** Quellenabkürzungen: BD = PharMingen (Hamburg bzw. via Becton Dickinson, Heidelberg); Heidelberg; Hb = eigene Aufreinigung aus Hybridomkulturen.

### **2.5.2 ELISA - Zytokinantikörper, Sekundär- und Isotyp-Kontrollantikörper**

Sofern nicht anderes angegeben, wurden alle verwendeten ELISA - Zytokin-, Sekundär- und Isotyp-Kontrollantikörper von PharMingen (Hamburg bzw. via Becton Dickinson, Heidelberg) bezogen. Bei den für ELISA verwendeten Antikörperpaaren, war der erste Antikörper unkonjugiert, der zweite Biotin-konjugiert.

- IFN $\gamma$ : Klon AN-18.17.24 (IgG1  $\kappa$ , Ratte) und Klon R4-6A2 (IgG1, Ratte)
- IL-2: Klon JES6-1A12 (IgG2a, Ratte) und Klon JES6-5H4 (IgG2b, Ratte)
- IL-4: Klon 11B11 (IgG1, Ratte) und Klon BVD6-24G2 (IgG1, Ratte)
- IL-6 : Klon MP5-20F3 (IgG1, Ratte) und Klon MP5-32C11 (IgG2a, Ratte)
- IL-10: Klon JES5-2A5 (IgG1, Ratte) und Klon SXC-1 (IgM, Ratte)
- IL-12 : Klon 9A5 (IgG2b, Ratte) und Klon C17.8 (IgG2a, Ratte)
  
- $\alpha$ - Ratte Ig  $\kappa$  (Klon MAR 18.5) (aus Hybridomüberstand aufgereinigt)
- $\alpha$ - Maus IgG2a/2b (Klon R2-40)
- Hamster IgG1 (Klon G235-2356)
- Hamster IgG2 (Klon Ha4/8)
- Maus IgG1  $\kappa$  (Klon MOPC-21)
- Maus IgG2a  $\kappa$  (Klon G155-178)
- Ratte IgG2a  $\kappa$  (Klon R35-95)
- Ratte IgG2b  $\kappa$  (Klon A95-1)

### **2.5.3 Streptavidinkonjugate und Fluorochromkonjugate**

Streptavidin, konjugiert mit:

- FITC PharMingen (Hamburg bzw. via Becton Dickinson, Heidelberg);
- PE PharMingen (Hamburg bzw. via Becton Dickinson, Heidelberg) und Molecular Probes (Leiden, Niederlanden)
- PE-Cy5 CyChrome: PharMingen (Hamburg bzw. via Becton Dickinson, Heidelberg)  
R670: Gibco BRL (Karlsruhe)
- APC PharMingen (Hamburg bzw. via Becton Dickinson, Heidelberg) und Molecular Probes (Leiden, Niederlanden)

### **2.5.4 Magnetischen Kügelchen ('MicroBeads')**

- $\alpha$ -murin CD8-, CD11c- sowie  $\alpha$ -Biotin MicroBeads (Miltenyi, Bergisch Gladbach)

### **2.6 Enzyme**

- Biotin Protein Ligase BirA (Bestandteil des 'Bulk Biotin Protein Ligase' Kit, Avitivity, Denver, CO, USA)
- DNase Grade I oder II (Boehringer, Mannheim und Roche Diagnostics, Mannheim)
- Kollagenase A (*Clostridium histolyticum*) (Boehringer, Mannheim)

### **2.7 Verwendete Zelllinien**

Sofern nicht anders angegeben, lagen alle verwendeten Zelllinien bereits im Labor vor und konnten von mir verwendet werden.

- B3Z: CD8<sup>+</sup> T-Zellhybridom, welches spezifisch das aus dem Ovalbumin stammende SIINFEKL - Peptid im Kontext des MHC I Moleküls H-2K<sup>b</sup> erkennt. B3Z verfügt auch über ein lacZ( $\beta$ -Gal)-Konstrukt, das vom NF-AT-Element des IL-2-Promotors gesteuert wird (van Bleek 1990).
- BO1710.4: CD4<sup>+</sup>-T-Zellhybridom, welches spezifisch das aus Ovalbumin stammende MHC-Klasse-II Peptid (Ovalbumin<sup>323-339</sup>) im Kontext mit dem MHC-Klasse-II Molekül I-A<sup>b</sup> erkennt.
- C57-K<sup>b</sup> : Maus-Fibroblasten-Zelllinie aus C57BL/6 Mäusen, die das MHC-Klasse-I Molekül H2-K<sup>b</sup> auf der Zelloberfläche trägt.
- J774.2: murine Makrophagenlinie, die aus Balb/c Mäusen isoliert wurde
- ME9F1: B - Zellhybridom, welches einen monoklonalen Ratte - Antikörper (IgG2a) produziert, der ein Protein unbekannter Funktion auf der Zelloberfläche muriner Endothel- und Muskelzellen erkennt (Harder 1991).
- M2-10B4: Knochenmark-Stroma Zellen aus einer (C57BL/6J X C3H/HeJ)F1 Maus, die in ihrer Morphologie Fibroblasten ähneln (ATCC#: CRL-1972).

### 2.8 Verwendete Mäusestämme

- Balb/c: Inzuchtstamm mit dem MHC Haplotyp H-2<sup>d</sup> (Versuchstierhaltung des IMMEI, Bonn)
- C57BL/6: Inzuchtstamm mit dem MHC Haplotyp H-2K<sup>b</sup>. (Versuchstierhaltung des ZMBH-Heidelberg und des IMMEI-Bonn)
- OT-I Mäuse: V $\alpha$ 2V $\beta$ 5 T - Zellrezeptor transgene Mäuse, deren transgener T-Zellrezeptor spezifisch das aus dem Ovalbumin stammende SIINFEKL-Peptid im Kontext des MHC-Klasse-I Moleküls H2-K<sup>b</sup> erkennt (Hogquist 1994). (Versuchstierhaltung des ZMBH, Heidelberg)
- RAG2<sup>-/-</sup>: RAG2-Gen (*Recombinase Activating 2*) defiziente Tiere, die aufgrund der fehlenden Rekombination alle T-Zellrezeptor und B-Zellrezeptor tragenden Zellen fehlen.

### 2.9 Verwendete rekombinante Viren

Die rekombinanten Viren MCMV-GFP und MCMV-OVA wurden freundlicherweise von Dr. Torsten Sacher (Labor Prof. U.Koszinowski, Max von Pettenkofer Institut, München) zur Verfügung gestellt.

MCMV-GFP – rekombinantes Virus, welches eine GFP-Kassette trägt, die unter Kontrolle des murinen endogenen IE2-Promotors steht (Manning 1988, Cardin 1995).

MCMV-OVA – rekombinantes Virus, welches das Modellantigen Ovalbumin unter Kontrolle des humanen IE1-Promotors exprimiert.

Die beiden rekombinanten Viren replizieren sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* wie Wildtyp-Virus (persönliche Mitteilung Labor Prof. U.Koszinowski).

## **2.10 Methoden**

### **2.10.1 Virologische Methoden**

#### **2.10.1.1 Generierung hochtitriger Virusstocks**

Material: Gewebskulturschalen

Lösungen: Zellkulturmedium: DMEM Medium, 5% (v/v) FCS,  $10^5$ U Penicillin, 0,1g/L Streptomycin, 4mM L-Glutamin

Methode: Knochenmark-Stroma Zellen M2-10B4 wurden mit einer Konfluenz von 50% am Vortag auf Zellkulturschalen ausplattiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen mit einer MOI von 0.1 des entsprechenden rekombinanten Virus infiziert. Fünf bis sieben Tagen später wurde der virushaltige Überstand in 50ml Falcon-Röhrchen gesammelt und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur Konzentrierung mittels Ultrazentrifugation gelagert.

#### **2.10.1.2 Viruskonzentration via Ultrazentrifugation**

Material: Ultrazentrifugationsröhrchen, Kanülen (0.9x120mm)

Lösungen: PBS, 20% (w/v) Sucroslösung

Methode: Die virushaltigen Überstände wurden in UZ-Röhrchen überführt, mit einem 5ml einer 20%-igen Sucroslösung unterschichtet und für 18 Stunden bei 25000rpm,  $4^{\circ}\text{C}$  ultrazentrifugiert. Nach dem Zentrifugationslauf wurden die Überstände abgenommen und verworfen. Die resultierenden virushaltigen Pellets hingegen wurden in je 200 $\mu\text{l}$  PBS aufgenommen, gepoolt und anschliessend aliquotiert. Danach erfolgte die Lagerung bei  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### **2.10.1.3 Virustitration**

Über die Virustitration wurde die Verdünnung bestimmt, die in einer Zellkultur noch einen zytopathogenen Effekt verursacht. Durch diese quantitative Bestimmung werden die



„infektiösen Einheiten“ angegeben, deren Anzahl nicht mit den tatsächlichen physikalischen Partikeln übereinstimmt. Für die verwendeten Viren wurde die sogenannte „tissue culture infective dosis  $_{50}/\text{ml}$ “ (TCID $_{50}/\text{ml}$ ) bestimmt. TCID $_{50}$  beschreibt die Dosis, die in Zellkulturversuchen bei 50 % der Ansätze eine Infektion (als CPE zu erkennen) auslöst. Bei den Titrationen von Virussuspensionen wurde die gleiche Zelllinie (M2-10B4) verwendet, auf der auch die Viren angezogen worden waren:

Material: Zellkulturmedium: DMEM Medium, 5% (v/v) FCS,  $10^5\text{U}$   
 Penicillin, 0,1g/L Streptomycin, 4mM L-Glutamin

96-Loch-Platten

Methode: Von den entsprechenden Zelllinien wurden 70 % konfluente Zellrasen trypsinisiert und ausgezählt. Die Zellsuspension wurde mit Zellkulturmedium auf Konzentrationen von 50.000 (M2-10B4-Zellen) Zellen/ml eingestellt. Die Vertiefungen einer 96-Loch-Platte wurden mit jeweils 200  $\mu\text{l}$  der verdünnten Zellsuspension befüllt und anschließend im Brutschrank (37° C / 5 % CO $_2$ ) für 2 h inkubiert. Die zu titrierenden Virusproben wurden in 10er Schritten in dem entsprechenden Zellkulturmedium verdünnt und nach Entfernen des Zellkulturmediums jeweils 200  $\mu\text{l}$  der Virusverdünnungen pro Loch nach folgendem Muster pipettiert:

Verd.	1. Titration					2. Titration				
$10^{-2}$										
$10^{-3}$										
$10^{-4}$										
$10^{-5}$										
$10^{-6}$										
$10^{-7}$										
$10^{-8}$										
$\emptyset$										

Zur Bestimmung des Virustiters wurde mindestens eine Doppelbestimmung durchgeführt. Da aus Vorversuchen der ungefähre Titer der MCMV-Rekombinanten bekannt war, wurden Virusverdünnungen von  $10^{-2}$  bis  $10^{-8}$  aufgetragen. Parallel zur Titration wurde eine Zellkontrolle angelegt, die nur das 'Titrationsmedium' ohne Virus enthielt. Nach 7tägiger

Inkubation wurde der logarithmische Virustiter ( $\log \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ ) nach der Methode von Spearman und Kaerber errechnet:

$$\log \text{TCID}_{50}/\text{ml} = a + 0,5 + n \times 1/r + 0,7 \\ a + n \times 0,17 + 1,2 \quad (\text{für } r = 6)$$

a = negativer Exponent der höchsten Virusverdünnung, die in allen Löchern einer Reihe einen CPE bewirkt

n = Summe aller weiteren Plattenlöcher in denen ein CPE zu detektieren ist

r = Anzahl der Wiederholungen pro Verdünnung (s.o. r = 6)

### 2.10.1.4 UV-Inaktivierung von MCMV und Inaktivierungskontrolle

Material: Rekombinantes MCMV, UV-Lichtquelle (Sterilbank)

Methode: Die funktionelle Inaktivierung von Viren stellt eine Methode dar, um *de novo* Genexpression viral kodierter Gene zu untersuchen. Anhaltende UV-Exposition verursacht Mutationen im Genom und DNA-Strangbrüche. Zur Inaktivierung von MCMV wurde das Virus für eine Stunde UV-Bestrahlung unter einer Sterilbank ausgesetzt. Danach wurde das rekombinante Virus in einer  $\text{TCID}_{50}$  Virustiterbestimmung (siehe 2.10.1.3) auf Inaktivierung überprüft. Das inaktivierte Virus wurde nach Bestrahlung direkt in Analysen verwendet.

### 2.10.2 Präparation primärer Zellen

#### 2.10.2.1 Aufreinigung von Leukozyten aus Milz

Material: Metallsieb (250 $\mu\text{m}$ )  
Nylonsieb 'Cell Strainer', 70 $\mu\text{m}$

Lösungen: Lysepuffer: 155mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 10mM  $\text{KHCO}_3$ , 1mM EDTA, pH 7,29  
Kollagenaselösung: GBSS, 0,05% (w/v) Kollagenase A, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  DNase  
MACS - Puffer: PBS, 1% (v/v) FCS, 5mM EDTA, pH 7.2

**Methode:** Zur Entnahme aller Organe wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet, in 70% Ethanol getaucht und die Leibeshöhle unter sterilen Bedingungen geöffnet. Die Milz wurde von Fettgewebe und Gefäßen getrennt und in PBS (4°C) überführt. Anschliessend wurde sie mit Hilfe eines 5ml Spritzenstempels durch ein Metallsieb gedrückt, dieses mit PBS gespült und die Zellsuspension zentrifugiert (10min, 350g, 4°C). Das Milzzellpellet wurde zur osmotischen Erythrozytenlyse je nach Größe in 5-10ml Lysepuffer aufgenommen und 5min auf Eis inkubiert. Die Lösung wurde anschließend mit PBS gewaschen (10min, 350g, 4°C), in 10ml Medium aufgenommen, gesiebt (70µm) und erneut gewaschen (10min, 350g, 4°C). Je nach der Pelletgröße wurden die Zellen in 2-10ml Medium aufgenommen und gegebenenfalls die Zellzahl bestimmt.

Zur Aufreinigung von dendritischen Zellen (DC) aus der Milz wurden die Zellen in Kollagenaselösung aufgenommen (ca. 3ml/Milz) und im Schüttelinkubation (248rpm, 37 °C) für 20-30min verdaut. Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS (10min, 350g, 4°C) wurden die Zellen in MACS-Puffer resuspendiert und über einen 70µm Nylonsieb gegeben, um tote Zellen und Zelltrümmer zu entfernen.

### **2.10.2.2 Perfusion muriner Leber**

**Material:** 0,45x25mm, 26Gx1'' Kanüle (braun)

**Lösungen:** Perfusionslösung: GBSS (ohne Ca<sup>2+</sup>), 0,05% (w/v) Kollagenase A, 40°C  
4% (w/v) PFA Lösung

**Methode:** Nach Eröffnung des Peritoneums wurde eine Kanüle in die Pfortader (*Vena porta*) eingeführt, die untere Hohlvene (*Vena cava inferior*) durchtrennt und die Leber mit 5-6 ml/min Perfusionslösung für 3-10 Sekunden perfundiert. Die Perfusion diente sowohl dem Entfernen von Blutzellen aus den Gefäßen, als auch dem Auspülen interzellulärem Ca<sup>2+</sup>-Ionen aus dem Lebergewebe, wodurch die Desmosomen und damit der Zellverband aufgelockert wurde. Die Gallenblase wurde entfernt und die Leber in kaltes PBS (Präparation von Leber assoziierten Lymphozyten mittels Percollgradienten) bzw. angewärmtes GBSS (Präparation nicht-parenchymaler sinusoidaler Leberendothelzellen) überführt.

### **2.10.2.3 Aufreinigung von Milzzellen zur Analyse im *in vivo* Zytotoxizitätstest aus muriner Leber via Percollgradienten**

- Material: Metallsieb (250µm)  
0,9x70mm, 20Gx2<sup>3</sup>/<sub>4</sub>'' Kanüle (gelb)
- Lösungen: MACS - Puffer: PBS, 1% (v/v) FCS, 5mM EDTA, pH 7.2  
100% Percoll - Stocklösung: 90% (v/v) Percoll-Lösung, 10% (v/v) 10xPBS  
40% bzw. 80% Percoll-Lösung: 100% Percoll - Stocklösung, entsprechend verdünnt mit Zellkulturmedium (mit 1% FCS) bzw. MACS - Puffer (RT)  
Kollagenaselösung: GBSS, 0,05% (w/v) Kollagenase A, 100µg/ml DNase
- Methode: Die Perfusion und die Entnahme der Leber erfolgte wie unter 2.10.2.2 beschrieben. Die Lebern wurden daraufhin mit Hilfe eines 5ml Spritzenstempels durch ein Metallsieb gedrückt, dieses mit PBS gespült und die Zellsuspension zentrifugiert (10min, 350g, 4°C). In einigen Experimenten wurde das Pellet in Kollagenaselösung aufgenommen, im Schüttelinkubation (248rpm, 37 °C) für 15-30min verdaut und erneut mit PBS gewaschen (10min, 350g, 4°C). Dieser Schritt erhöhte die Gesamtzellausbeute. Im Anschluss daran, oder in den Experimenten ohne Kollagenaseverdau direkt nach dem ersten Waschschrift, wurde das Pellet in 4-5ml 40% Percoll-Lösung aufgenommen und in 15ml Röhrchen überführt. Bei Aufreinigung mehrerer Lebern, wurde darauf geachtet, nicht mehr als ca. 1,5 Lebern auf ein 15ml Röhrchen zu verteilen. Die Suspension wurde mittels einer 5ml Spritze und einer 70mm Kanüle mit ca. 3ml 80% Percoll-Lösung unterschichtet und zentrifugiert (20min, 800g, 14-22°C, ohne Bremse). Nach Abnehmen und Waschen der resultierenden Interphase mit PBS (10min, 350g, 4°C) wurde das Pellet in 0,5-1ml Medium aufgenommen und gegebenenfalls die Zellzahl bestimmt.

### **2.10.2.4 Aufreinigung sinusoidaler Leber-Endothelzellen via Metrizamidgradienten und Gegenstromzentrifugation (Elutriation)**

- Material: Gewebeskulturschalen 94 / 16mm  
Zentrifuge: J2-MC mit Rotor 'JE-6B'

Lösungen: Kollagenaselösung: GBSS, 0,05% (w/v) Kollagenase A, 100µg/ml DNase  
30% (w/v) Metrizamid in GBSS (ohne NaCl); Blockierungspuffer: PBS, 1%  
(w/v) BSA; LSEC - Medium: DMEM Medium, 10% (v/v) FCS<sup>-LPS</sup>, 10<sup>5</sup>U  
Penicillin, 0,1g/L Streptomycin, 4mM L-Glutamin

Methode: Die Perfusion und die Entnahme der Leber erfolgte wie unter 2.10.2.2 beschrieben. Die Lebern wurden daraufhin mittels Pinzette und Schere mechanisch dissoziiert, bevor sie in 4-6ml Kollagenaselösung pro Leber aufgenommen und im Schüttelinkubator verdaut wurden (30min, 248rpm, 37°C). Die resultierende Zellsuspension wurde daraufhin mit Hilfe eines 5ml Spritzenstempels durch ein Metallsieb gedrückt, dieses mit GBSS gespült und die Lösung zentrifugiert (10min, 350g, 20°C). Das Pellet wurde zu 5ml Gesamtvolumen mit GBSS aufgenommen und mit 7ml Metrizamid (30%) gemischt, wodurch sich eine Dichte von 1.089 g/cm<sup>3</sup> ergibt. Die Zellsuspension wurde in ein 15ml Röhrchen überführt, vorsichtig mit 0.5-1ml GBSS überschichtet und zentrifugiert (20min, 1400g, 20°C, ohne Bremse). Die Bande zwischen Gradientenoberfläche und GBSS wurde abgenommen und mit GBSS gewaschen (10min, 350g, 20°C). Zur Aufreinigung mittels Gegenstromzentrifugation wurde das Pellet in ca. 5-7ml GBSS resuspendiert.

Die Gegenstromzentrifugation erlaubt eine effiziente Zelltrennung aufgrund der Zellgröße und -dichte. Mittels einer peristaltischen Pumpe und angeschlossenem Schlauchsystem wird die zu separierende Zellsuspension bei laufender Zentrifuge in einen speziellen Rotor eingespeist. Die Fließrichtung ist hierbei der konstantgehaltenen Zentrifugalkraft entgegengerichtet. Mit steigender Flussrate können zunehmend größere und schwerere Zellen die Zentrifugalkraft überwinden und aus der Rotorkammer ausgespült und gesammelt werden.

Der Rotor wurde nach Herstellerangaben zusammengesetzt, an das Pumpensystem angeschlossen und auf Dichtigkeit getestet. Das komplette Schlauchsystem wurde mit 70% Ethanol desinfiziert, mit PBS gespült und für ca. 30 Minuten mit Blockierungspuffer gefüllt um unspezifische Proteinbindungsstellen abzusättigen. Im Anschluss daran wurde der Blockierungspuffer und etwaige Luftblasen mit GBSS ausgespült, die Pumpe auf eine Flussrate von 16ml/min eingestellt und die Zentrifuge gestartet

(2500rpm, 24°C). Zum Beladen der Zellen wurde der Bypass aus dem direkten Fluss genommen, die Zellsuspension mittels einer 10ml Spritze langsam injiziert und durch das Öffnen des Bypasses ins System eingespült. Der Durchlauf wurde gesammelt und die Flussrate sukzessiv erhöht. In der Regel wurden je eingestellter Flussrate folgende Volumina gesammelt (die diesen Flussraten entsprechenden Zellfraktionen sind in Klammern angegeben): bei 16ml/min (vornehmlich Erythrozyten und Lymphozyten) ca. 80-100ml, bei 22ml/min (LSEC hoher Reinheit) 100-150ml und bei 28ml/min (LSEC geringerer Reinheit), 32ml/min (Mischfraktion aus LSEC und Kupfferzellen) und 55ml/min (Kupfferzellen) je 50-100ml. Die Zellsuspensionen wurden anschließend zentrifugiert (10min, 350g, 4°C), die resultierenden Pellets in 10ml LSEC - Medium aufgenommen und die Zellzahl bestimmt.

### 2.10.3 *In vivo* Probengabe

#### 2.10.3.1 Adoptiver Zelltransfer

Material: Kanülen (0,4x19mm, 27Gx<sup>3/4</sup>'')

Methode: Die Maus wurde fixiert und LSEC ( $5 \times 10^6$ ) zusammen mit OT-I-T-Zellen ( $5 \times 10^6$ ) wurden in 250µl PBS intravenös in die laterale Schwanzvene von RAG2<sup>-/-</sup> Mäusen injiziert.

#### 2.10.4 Magnetische Zellsortierung (MACS)

Mit Hilfe des MACS ist es möglich, einzelne Zellpopulationen in einem Zellgemisch voneinander zu trennen. Mit Antikörpern gegen spezifische zelluläre Oberflächenmoleküle beschichtete magnetische Kügelchen ('microbeads', Ø ca. 50nm) werden zu der Zellsuspension gegeben. Die magnetischen Kügelchen binden über die Antikörper an diejenigen Zellen, welche das entsprechende Epitop tragen. Die Lösung wird im Folgenden über eine Säule geführt, die sich innerhalb eines starken Magnetfeldes befindet. Durch Spülen der Säule werden alle Zellen, die nicht durch die magnetischen Kügelchen im Magnetfeld zurückgehalten werden von der Säule ausgewaschen. Nach dem Entfernen des Magnetfeldes können die gebundenen Zellen eluiert werden.

Material: AutoMACS bzw. vario MACS  
MS<sup>+</sup> (bis zu 2x10<sup>8</sup> Gesamtzellen) bzw. VS<sup>+</sup> (für bis zu 2x10<sup>9</sup> Gesamtzellen)  
Säulen  
Magnetische Kügelchen  
Rollenmischer 'M 5'

Lösungen: MACS - Puffer: PBS, 1% (v/v) FCS, 5mM EDTA, pH 7.2

Methode: Die aufgereinigten Zellen wurden zu einer Konzentration von 10<sup>7</sup> Zellen pro 90µl in MACS- Puffer aufgenommen und mit 10µl der jeweiligen magnetischen Kügelchen pro 10<sup>7</sup> Zellen versetzt. Die resultierende Zellsuspension wurde für 20min bei 4°C auf dem Rollenmischer inkubiert und daraufhin mit dem 10-20fachen Volumen an MACS-Puffer gewaschen (10min, 350g, 4°C). Das Zellpellet wurde der Zellzahl und der verwendeten Säule entsprechend in Puffer aufgenommen, was pro MS<sup>+</sup> - Säule 0,5-1ml bzw. pro VS<sup>+</sup> - Säulen 1-10ml Zellsuspension entsprach. Die Säule wurde mit 500µl für MS<sup>+</sup> bzw. 3ml für VS<sup>+</sup> Puffer equilibriert und die Zellsuspension aufgetragen. Nach dreimaligem Waschen der Säule mit 500µl (MS<sup>+</sup>) bzw. 3ml (VS<sup>+</sup>) Puffer wurde die Säule aus dem Magnetfeld genommen und die gebundenen Zellen eluiert. Hierzu wurden 1ml (MS<sup>+</sup>) bzw. 5ml (VS<sup>+</sup>) Puffer auf die Säule aufgetragen und dieser mit dem Stempels einer 10ml Spritze durch die Säule gepresst. Bei einigen Versuchen wurde anstelle freier Säulen (vario MACS) die automatisierte Version des AutoMACS eingesetzt. Die Bedienung erfolgt hierbei nach Herstellerangaben.

### 2.10.5 Proteinbiochemische Methoden

#### 2.10.5.1 Aufreinigung monoklonaler Antikörper aus Hybridomzellüberständen durch Affinitätschromatographie

Material: Protein-G Säule  
Konzentrationssäulen: Amicon 'centriplus YM30', Ausschlussgröße 30kD  
pH - Indikatorstäbchen: pH 6,5-10,0 und pH 0-6

Lösungen: Elutionspuffer: 100mM Glycin, 100mM NaCl, pH 2,3 bzw. pH 1 (eingestellt mit HCl)

Neutralisationspuffer: 1,5M NaHCO<sub>3</sub>

Methode: Die Überstände der B - Zellhybridomkulturen wurden über zwei Lagen Filterpapier filtriert und anschließend bei 4°C über eine mit PBS equilibrierte Protein-G Säule gegeben. Nach 1-1,5 Litern Überstand wurde die Säule mit PBS gewaschen, bis im Durchlauf kein Protein mehr nachweisbar war (Photometer, 280nm). Dies war in der Regel nach 300-500ml PBS der Fall. Anschließend wurde der Antikörper mit 10ml Elutionspuffer pH 2,3 bei Raumtemperatur eluiert. Um das Protein so kurz als möglich dem sauren pH-Wert des Elutionspuffers auszusetzen, wurde das Eluat zu 1ml Aliquots in 1.5ml Mikrozentrifugengefäße aufgefangen, in die 100µl Neutralisationspuffer vorgelegt worden waren. Die gewonnenen Aliquots wurden vereinigt, gegebenenfalls der pH - Wert auf pH 7-7,5 eingestellt und der Antikörper mittels der Konzentrationssäulen ankonzentriert (1.000g, 4°C). Die längerfristige Lagerung des aufgereinigten Antikörpers erfolgte bei -20°C. Wiederholtes einfrieren und auftauen wurde vermieden. Die verwendeten Protein-G Säulen wurden mit Elutionspuffer pH 1 gereinigt und in PBS gelagert.

### 2.10.5.2 Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Für die Auftrennung der Proteine wurde die Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) eingesetzt. Polyacrylamidgele entstehen durch die Polymerisierung von monomeren Acrylamid bei Anwesenheit von N,N'-methylenbisacrylamid, welches die Vernetzung der Polymerketten ermöglicht. Die Reaktion wird durch Ammoniumpersulfat (APS) gestartet, wobei TEMED die Reaktion durch eine Stabilisierung der Radikale katalysiert (nach Voet 1995). Hier wurde das diskontinuierliche System nach Ornstein (1964), Davis (1964) bzw. Laemmli (1970) verwendet, bei welchem dem Trenngel ein Sammelgel mit einer größeren Maschenweite und Ionenkonzentration und einem niedrigeren pH-Wert vorgeschaltet wird. Der Sammelgelpuffer enthält Chloridionen (*'leading ions'*), welche eine größere elektrophoretische Mobilität als die Proteine aufweisen. Der Elektrophoresepuffer enthält hingegen Glycin (*'trailing ions'*) mit einer geringen Mobilität im Vergleich mit den Proteinen. Zwischen der Chlorid- und Glycinfront bildet sich hierdurch eine schmale Zone geringerer Leitfähigkeit und somit höhere Spannung aus, innerhalb der die Proteine der Probe fokussiert werden. Nach Erreichen



des Trenngeles bedingt der pH-Sprung einer Ionisierung der Glycinmoleküle die nun als Ionen schneller als die Proteine wandern und diese 'überholen'. Befreit von dieser einen Begrenzung werden die Proteine im weiteren Verlauf der Elektrophorese in Abhängigkeit ihres Molekulargewichtes (im denaturierten Gelen) oder nach Form und Ladung (in nativen Gelen) getrennt (Sambrook et al. 1989, S. 18.47, Ausubel et al. 1999, S.10.2.30).

Fand die Proteintrennung unter denaturierenden Bedingungen statt, so wurden die Proteine im Vorfeld mit dem Detergenz SDS und 2-Mercaptoethanol gekocht und unter Anwesenheit von SDS im Elektrophoresepuffer getrennt. Für native Gele wurde auf diesen Schritt und auf SDS und 2-Mercaptoethanol verzichtet (Ausubel 1999, S.10.2.4).

Material: Mini-Protean® II Cell für Gele von 7cm x 8cm x 0,75mm

Lösungen: Trenngelpuffer: 1.5M Tris - Base , pH 8,8

Sammelgelpuffer: 0.5M Tris - Base , pH 6,8

Elektrophoresepuffer (nativ): 25mM Tris - Base , 192mM Glycin

Elektrophoresepuffer (denaturierend): 25mM Tris - Base , 192mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS

AA/Bis: 30% (w/v) Acrylamid, 0,8% (w/v) Bisacrylamid

10% (w/v) Ammoniumpersulfat (APS)

10% (w/v) SDS

Ladepuffer (nativ): 125mM Tris - Base, pH 6,8, 25% (v/v) Glycerin, ca. 0,01%

(w/v) Bromphenolblau, Ladepuffer (denaturierend): 125mM Tris - Base, pH 6,8, 25% (v/v) Glycerin, 2% (w/v) SDS, 10% (v/v) 2-Mercaptoethanol, ca.

0,01% (w/v) Bromphenolblau

	4% Sammelgel	10% Trenngel	[Endkonz.]
H <sub>2</sub> O	6,04ml	5,01ml	-/-
SDS	100µl	125µl	0,1%
Sammelgelpuffer	2,5ml	-/-	125mM
Trenngelpuffer	-/-	3,13ml	375mM
AA/Bis	1,3ml	4,15ml	4 bzw. 10%
APS	50µl	62,5µl	0,05%
TEMED	10µl	6,25µl	0,1 bzw. 0,05%
Gesamtvolumen	10ml	12,5ml	

**Tabelle 2. Zusammensetzung der Polyacrylamidgellösungen:** Im Falle von nativen Gelen wurde SDS durch Wasser ersetzt.

Methode: Die Gelappertur wurde laut Herstellerangaben aufgebaut und die Gele gegossen. Die Trenngellösung wurde zum Ausschluss von Luftsauerstoff, welcher die Polymerisation verhindert, und um eine horizontale Gelfront zu gewährleisten, mit Wasser überschichtet, welches nach frühestens einer Stunde Polymerisationszeit durch die Sammelgellösung ersetzt wurde. Der Probenkamm, welcher die Probenaschen im Sammelgel ausspart, wurde nach 30-60min entfernt, Elektrophoresepuffer in die obere Kammer gefüllt und diese auf Dichtigkeit geprüft. Die Proben wurden mit einem Volumen des jeweiligen Ladepuffers gemischt und direkt, im Falle eines nativen, oder nach 5min Kochen bei 95°C, im Falle eines denaturierenden Gels, aufgetragen. Das untere Reservoirs wurde mit Elektrophoresepuffer gefüllt und die Elektrophorese bei 4°C mit 150V und 15mA pro Gel für ca. 1h durchgeführt. Zur Größenbestimmung der aufgetrennten Proteine wurde jeweils ein Molekulargewichtsstandard mitgeführt. Die Lauffront konnte durch das im Ladepuffer enthaltene Bromphenolblau verfolgt werden.

### 2.10.5.3 Coomassie - Färbung der Polyacrylamidgelelektrophorese

Material: Gelrockner 'Dual Temperature SLAB Gel Dryer' Model 1125B  
Rollenmischer 'M 5'

Lösungen: Färbelösung: 50% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure, 0.05% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250, Entfärbelösung: 20% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure

Methode: Das Polyacrylamidgel wurde auf dem Rollenmischer für 30-45min in Färbelösung gefärbt und anschließend in Entfärbelösung solange entfärbt bis der Hintergrund neutral und die aufgetrennten Proteine als blaue Banden sichtbar waren. Anschließend konnten die Gele im Gelrockner in ca. zwei Stunden bei 80°C vakuumgetrocknet werden.

## 2.10.6 Zellkulturmethoden

### 2.10.6.1 Zellkulturen und ihre Propagation

Die käuflichen RPMI- und DMEM- Medien enthalten Phenolrot als pH - Indikator, welches bei pH 7,4 eine hellrote Färbung hervorruft. Durch Stoffwechselprozesse der Zellen sinkt der pH - Wert des Mediums und die Färbung wechselt über orange zu gelb. Dieser Farbwechsel erlaubt eine einfache Inspektion der Mediumqualität. Bei allem verwendeten FCS wurde vor dem Einsatz die Komplementfaktoren hitzeinaktiviert (30min, 56°C).

Material: Rollschüttler

Lösungen: T-Zellmedium: RPMI 1640 Medium, 5% (v/v) FCS, 10<sup>5</sup>U Penicillin, 0,1g/L Streptomycin, 2mM L-Glutamin, 50µM 2-Mercaptoethanol  
Hybridommedium: T - Zellmedium mit 5% und 10% (v/v) FCS, 20mM HEPES

Methode: Das T-Zellhybridom B3Z wurde in T-Zellmedium bei 37°C unter 5%-iger CO<sub>2</sub>-Begasung kultiviert. Alle in Kultur gehaltenen Zellen wurden in regelmäßigen Abständen, insbesondere bei einer Veränderung der Medienfärbung, mit frischem Medium um den Faktor 10-30 verdünnt. Zur späteren Antikörpergewinnung wurden die jeweiligen B-Zellhybridome in zwei Liter Flaschen auf einem Rollschüttler expandiert. Bis zu einem Kulturvolumen von 500ml wurde hierzu Hybridommedium mit 10%, danach mit 5% FCS verwendet. Die Zellsuspensionen wurden nach dem Farbumschlag zu Gelb zentrifugiert (6000g, 10min, 4°C) und die Überstände zur Antikörperaufreinigung (siehe 2.10.5.1) eingesetzt.

### 2.10.6.2 *In vitro* Kultivierung primärer Zellen

Lösungen: T-Zellmedium: RPMI 1640 Medium, 5% (v/v) FCS, 10<sup>5</sup>U Penicillin, 0,1g/L Streptomycin, 2mM L-Glutamin, 50µM 2-Mercaptoethanol  
Kollagenlösung: ddH<sub>2</sub>O, 0.1 mg/ml (w/v) Kollagen R  
LSEC - Medium: DMEM Medium, 10% (v/v) FCS<sup>-LPS</sup>, 10<sup>5</sup>U Penicillin, 0,1g/L Streptomycin, 4mM L-Glutamin  
Waschpuffer: PBS, 1% BSA

Methode: Zur Kultur der nicht-parenchymalen Leberzellen wurden Kollagen beschichtete Zellkulturplatten verwendet. Hierzu wurden die Kulturplatten vor Gebrauch mit Kollagenlösung gefüllt, mindestens eine Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend mit Aqua dest. gespült und unter der Sterilbank luftgetrocknet. Die Zellen aus der Elutriation wurden zu  $1 \times 10^6$  Zellen/ml in LSEC-Medium aufgenommen und 20ml dieser Zellsuspension pro beschichteter Zellkulturplatte ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen zum Entfernen von nicht adhären Zellen und Zelltrümmern mit Waschlösung gespült. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C unter 5%-iger CO<sub>2</sub> - Begasung.

Zum Ernten der adhären wachsenden LSEC wurden die Zellen einmal mit Waschlösung gespült und anschließend durch Inkubation mit Trypsin/EDTA oder Accutase bei 37°C für maximal fünf Minuten von der Zellkulturplatte abgelöst. Die resultierende Zellsuspension wurde anschließend zur Inaktivierung des Trypsins mit LSEC-Medium gewaschen (10min, 350g, 4°C). Die Kultivierung von T-Zellen erfolgte mit T-Zellmedium bei 37°C unter 5%-iger CO<sub>2</sub> - Begasung. Für Kokulturen aus nicht-parenchymalen und T-Zellen wurde RPMI-Medium verwendet.

### 2.10.6.3 Infektion primärer Zellen und Zelllinien

Material: Rekombinantes MCMV

Lösungen: T-Zellmedium: RPMI 1640 Medium, 5% (v/v) FCS, 10<sup>5</sup>U Penicillin, 0,1g/L Streptomycin, 2mM L-Glutamin, 50µM 2-Mercaptoethanol  
LSEC-Medium: DMEM Medium, 10% (v/v) FCS<sup>-LPS</sup>, 10<sup>5</sup>U Penicillin, 0,1g/L Streptomycin, 4mM L-Glutamin

Methode: Zu infizierende Zellen wurden mit der entsprechenden MOI des gewünschten rekombinanten Virus für 2 Stunden inkubiert. Die Zellen wurden daraufhin mit PBS gewaschen und mit frischem Medium versehen. Die Zelldichte bei Infektion mit MCMV sollte dabei 70% nicht übersteigen. Ferner ist bei primären nicht-parenchymalen Leber-Endothelzellen darauf zu achten, dass

diese Zellen einen Tag nach Präparation eine geringere Permissivität aufweisen als am zweiten Tag nach Präparation.

### 2.10.6.4 Ermittlung von Zellkonzentrationen

Material: Zählkammer: Neubauer 'improved'

Lösungen: Trypanblau-Lösung: 1:10 (v/v) Verdünnung der 0,4% Stammlösung in ddH<sub>2</sub>O

Methode: Die Ermittlung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe der sogenannten Neubauer Zählkammer. Nach Auszählen von 16 kleinen Außenquadraten lässt sich die Zellzahl wie folgt berechnen:

$$\text{gezählte Zellen} \times \text{Verdünnung} \times 10.000 \text{ (Kammerfaktor)} = \text{Zellzahl/ml}$$

Um die Vitalität der Zellen zu ermitteln erfolgte die Verdünnung der Zellsuspension hierbei mit Trypanblau- bzw. Türkislösung. Die enthaltenden Farbstoffe werden von lebenden Zellen aktiv aus dem Zytoplasma transportiert und färben somit nur tote Zellen blau bzw. violett an. Darüber hinaus führt das in der Türkislösung enthaltene Essigsäure zu einer Erythrozytenlyse.

### 2.10.6.5 Kryokonservierung von eukaryontischen Zellen

Material: 1ml Kryoröhrchen

Einfrierbehälter 'Kryo'

Lösungen: Einfriermedien: 90% (v/v) FCS, 10% (v/v) DMSO, 4°C

Methode: Die Zellen wurden in einer Konzentration von 10-20 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml in Einfriermedium aufgenommen und je 1ml dieser Lösung in Kryoröhrchen pipettiert. Die Röhrchen wurden in dem Einfrierbehälter, gefüllt mit kaltem (4°C) Isopropanol, für mindestens 5 Stunden auf -80°C gekühlt und anschließend in flüssigen Stickstoff zur Endlagerung überführt. Das Auftauen der konservierten Zellsuspensionen wurde rasch bei 37°C durchgeführt und die Lösung nach dem Auftauen umgehend mit 50ml des entsprechenden Kulturmediums gewaschen (10min, 400g, 4°C). Das Pellet wurde anschließend in frischem Medium resuspendiert und wie beschrieben propagiert.

### 2.10.7 *In vitro* Kreuzpräsentationsassay (*Cross-Priming*)

Die Fähigkeit von APCs, exogene lösliche Proteine zu internalisieren, in den MHC-Klasse-I Weg einzuschleusen und damit die Präsentation antigener Peptide über MHC-Klasse-I Moleküle auf der Zelloberfläche zu gewährleisten, wird als Kreuzpräsentation bezeichnet (Bevan 1976). Kreuzpräsentation kann *in vitro* mittels B3Z einem T-Zellhybridom (siehe 2.7), welches bei Aktivierung, IL-2 sezerniert, oder primären antigenspezifischen naiven CD8-T-Zellen gemessen werden. Dadurch können Faktoren, die diesen Präsentationsweg beeinflussen (wie beispielsweise virale Infektionen), eingehend studiert werden.

Material: B3Z-T-Zell-Hybridom

Lösungen: T-Zell-Medium RPMI 10%FCS Pen/Strep&/Glutamin  $\beta$ -Mercapto-Ethanol  
PBS 1%FCS

Methode: Die auf Kreuzpräsentation zu untersuchenden APCs wurden 2-3 Stunden vor Kokultur mit B3Z bzw. primären naiven CD8-T-Zellen für 18-20 Stunden bei 37°C mit einer geeigneten Menge an Antigen (=Protein) inkubiert (für Ovalbumin 10 $\mu$ M; für Ovalbumin Texas Red 5 $\mu$ g). Die APCs wurden nach Inkubation mit Antigen zweimal mit PBS 1%FCS gewaschen. Als Positivkontrolle diente die exogene Beladung von MHC-Klasse-I Molekülen mit dem entsprechenden Peptid (SIINFEKL 10-15nM). Zur Analyse der Kreuzpräsentation bei Infektion mit murinem Zytomegalievirus, wurden APCs (DC, LSEC) mit einer MOI von 1 infiziert, bevor sie 48h später in dem Assay eingesetzt wurden. Nach Antigenbeladung wurden die Zellen mit den Indikatorzellen B3Z für 18-20 Stunden koinkubiert. Der Zellüberstand wurde entnommen und die Menge an enthaltenem IL-2 quantifiziert (ELISA).

### 2.10.8 MLR – Mixed Lymphocyte Reaction

Material: RPMI 1640 Medium, 5% (v/v) FCS, 10<sup>5</sup>U Penicillin, 0,1g/L Streptomycin, 2mM L-Glutamin, 50 $\mu$ M 2-Mercaptoethanol

Methode: OT-I Mäusen wurden die Milzen entnommen und daraus die T-Zellen wie unter 2.10.4 beschrieben angereichert. Die T-Zellen (5x10<sup>5</sup>) wurden daraufhin mit LSEC bzw. DC (2.5x10<sup>5</sup>) für fünf Tage koinkubiert. Anschließend wurden die T-Zellen ab gespült, gezählt und für 20h auf einer 96 Loch Mikrotiterplatte,

die zuvor mit 10µg/ml αCD3 Antikörper für eine Stunde beschichtet worden war, restimuliert. Die fünftägige Kokultur, als auch die folgende Restimulation wurden in RPMI 1640 Medium durchgeführt. Die Überstände wurden mittels ELISA auf ihren Gehalt an IFN $\gamma$  und IL-2 hin analysiert.

### **2.10.9 Sandwich-ELISA**

Der Sandwich - ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) ist ein immunologisches Verfahren welches die quantitative Detektion löslicher Proteine bis in den Pikogrammbereich ermöglicht (Engvall 1971, Mosmann 1989). Das Protein wird hierbei mittels eines Antikörpers an die feste Phase gebunden und mit Hilfe eines weiteren Antikörpers, der ein nicht-kompetitives zweites Epitop des Proteins erkennt, detektiert. Durch Zugabe einer Detektionslösung setzt das an den Antikörper konjugierte Enzym Peroxidase ein Substrat in ein farbiges Produkt um. In allen verwendeten Lösungen wurde auf Natriumazid verzichtet, da dies die Peroxidase irreversibel blockiert.

Material: ELISA - Lesegerät

Mikrotiterplatten-Waschgerät

‘MaxiSorp’ 96-Loch Mikrotiterplatten mit flachen Boden

Lösungen: Coating-Puffer: 0,1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 8,5 (eingestellt mit 0,1M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)

Waschpuffer: PBS, 0,05% Tween 20

Blockierungspuffer: PBS, 1% BSA

ABTS Puffer: 0,1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 4,2 (eingestellt mit 1M Zitronensäure)

Detektionslösung A: ABTS-Puffer, 1mg/ml ABTS, 2µl/ml 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Detektionslösung B: BM Blue Soluble

Stoplösung: 0.18 M Schwefelsäure (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)

Methode: Die 96-Loch Mikrotiterplatten wurden zunächst vier Stunden mit dem primären Antikörper (100µl/Loch) gegen das entsprechende Protein in ‘Coating-Puffer’ beschichtet. Die Konzentrationen aller eingesetzten monoklonaler Antikörper wurden in Vorversuchen anhand aufgereinigter Proteine bestimmt. Alle Inkubationsschritte wurden bei 4°C durchgeführt. Nach der Inkubation wurde die primäre Antikörperlösung verworfen, die Platte

gewaschen und verbliebene freie Proteinbindungsstellen mit 250µl/Loch Blockierungspuffer für mindestens 30 Minuten abgesättigt. Nach erneutem Waschen wurden 50-100µl/Loch der in Frage stehenden Lösungen und der Standardlösungen aufgebracht und für mindestens sechs Stunden inkubiert. Danach wurden die Überstände abgenommen oder verworfen, die Platte gewaschen und 100µl/Loch des biotinylierten sekundären Antikörpers in PBS oder Blockierungspuffer hinzu gegeben. Die Platte wurde nach Inkubation für mindestens 4 Stunden gewaschen und 100µl/Loch einer 1:1000 Verdünnung der Streptavidin-Peroxidase in PBS hinzu pipettiert. Nach 30-45 Minuten und extensivem Waschen der Platte wurde zügig 100µl/Loch der Detektionslösung aufgebracht und die Messung durchgeführt.

Es kamen hierbei zwei Detektionsmethoden zum Einsatz. In den meisten Fällen wurde frische Detektionslösung A verwendet deren grüne Farbreaktion wiederholt bei 405nm gemessen wurde. Bei Messungen die eine höhere Sensitivität erforderten, wurde Detektionslösung B eingesetzt. Die zunächst blaue Farbreaktion wurde wiederholt bei 650nm gemessen, anschließend mit 50µl Stoplösung beendet und die Absorption der nun gelben Lösung bei 450nm erneut aufgenommen. Die exakten Proteinkonzentrationen wurden vom Programm 'SPF 2.6' (Molecular Devices) anhand der mitgeführten Verdünnungsreihe des jeweiligen Proteins in PBS errechnet. Die Standardkurve wurde hierbei mit der Einstellung '4-Parameter' erstellt.

### 2.10.10 Immunfluorometrische Methoden

#### 2.10.10.1 Immunfluoreszenzmessungen am Durchflusszytometer (FACS)

Die Durchflusszytometrie erlaubt die Untersuchung der Zellgröße, Granularität und der Immunfluoreszenzmarkierung einzelner Zellen in Suspension. Mittels spezieller Fließparameter werden die Zellen einzeln an einer monochromatischen Lichtquelle (Argon-Laser bzw. Helium-Neon-Laser) vorbeigeführt. Die Streuung des geradewegs durch die Zelle gehenden Strahles, dem sogenannten '*forward scatter*' (FS), gibt Aufschluss über die Zellgröße. Die Streuung des Lichtstrahles, dem sogenannten '*sideward scatter*' (SS), ermöglicht Rückschlüsse auf die Granulierung der Zelle. Fluorochrome, die zur Immunfluores-



zenzmarkierung von Zellantigenen verwendet werden, können durch das Laserlicht kurzfristig in einen angeregten Zustand überführt werden. Beim Übergang des Fluorochroms zurück in den Grundzustand wird die Energie in Form eines Photons mit einer charakteristischen Wellenlänge frei. Diese Photonen werden von hochempfindlichen Photozellen (Photomultiplier) detektiert. Diese Messung von Größe, Granulierung und Fluoreszenzintensität ermöglicht eine Charakterisierung der Zellen.

Material: Durchflusszytometer 'FACScan', 'FACSCalibur' und 'FACSDiva'  
Einmalröhrchen, Polypropylen- 12/75mm

Lösungen: BACS - Puffer: PBS, 1% (w/v) BSA, 0,05% (w/v) Natriumazid  
FACS - Puffer: PBS, 2% (v/v) FCS, 0,1% (w/v) Natriumazid  
1% (v/v) Formalin  
2% (w/v) Paraformaldehyd (PFA)  
PFA/Tween - Lösung: 1% PFA, 0,01% Tween20

### **2.10.10.2 Färbung von Oberflächenantigenen und Fixation**

Meist wurden Antikörper verwendet, die mit einem Fluorochrom gekoppelt waren und somit direkt eine Detektion am Durchflusszytometer gestatteten. Bei unkonjugierten bzw. mit Biotin konjugierten Antikörpern erfolgte die Markierung in einem weiteren Schritt mittels eines Fluorochrom konjugierten Zweitantikörpers bzw. eines Streptavidin-Fluorochrom-Konjugats.

Methode: Die Zellen wurden zu  $5-10 \times 10^6$  Zellen/ml im jeweiligen Puffer aufgenommen und je 50-100µl der Zellsuspension in 12/75mm Einmalröhrchen pipettiert. Bei allen Färbungen kam FACS-Puffer zum Einsatz. Zur Reduktion unspezifischer Bindungen wurde jeweils zu der ersten Antikörperlösung 10µg/ml Ratte:Maus (1:1) IgG und 1µg/ml  $\alpha$ -CD16/32 (2.4G2) Antikörper zugegeben.

Bei Färbungen wurden die Zellen in 50-100µl Puffer, nach Zugabe der vom Hersteller empfohlenen bzw. in Vorversuchen austitrierten Menge(n) des/der Antikörper resuspendiert und für 15min bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend zweimal mit 100µl Puffer gewaschen (2min, 350g, 4°C), der Überstand verworfen und die empfohlenen Menge(n) des/der Antikörper

und/oder Streptavidin-Konjugats, hinzugegeben. Die Zellen wurden kurz resuspendiert, für 15min bei 4°C inkubiert und abschließend zweimal gewaschen (2min, 350g, 4°C).

Färbungen mit weiteren Fluorochrom-konjugierten Antikörpern wurden zusammen oder im Anschluss daran durchgeführt. Die Zellen wurden hierzu zweimal mit 100µl Puffer gewaschen (2min, 350g, 4°C), der Überstand verworfen und für die weitere Oberflächenfärbung wie oben beschrieben behandelt.

Schluss sich an die Oberflächenfärbung eine zytoplasmatische Färbung an, so wurden die Zellen zum Fixieren in 100µl PBS resuspendiert, und die Lösung mit 100µl 2% PFA - Lösung gemischt. Nach 15min Inkubation auf Eis wurde einmal mit FACS-Puffer gewaschen und die Zellen je nach Bedarf weiterverwendet. Bei den verbleibenden Färbungen wurde wahlweise wie beschrieben mit PFA oder mit Formalin fixiert. Für letzteres wurden die Zellen in 1% Formalinlösung resuspendiert und mindestens 15min inkubiert.

### **2.10.10.3 Sortieren von MCMV-GFP infizierten LSEC am Durchflusszytometer**

Material: FACSorter 'FACSDiva' (BD-Heidelberg)

Einmalröhrchen, Polypropylen- 12/75mm

Lösungen: FACS - Puffer: PBS, 2% (v/v) FCS, 0,1% (w/v) Natriumazid

Methode: LSEC, die zuvor mit dem rekombinanten Virus MCMV-GFP infiziert bzw. mit fluoreszierendem Antigen (Ovalbumin Texas Red) inkubiert worden waren, wurden mittels Accutase von der Mikrotiterplatte (24-Loch) abgelöst, zentrifugiert (10min, 350g, 4°C), in FACS-Puffer resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Die Probe wurde auf  $1 \times 10^6$  Zellen/ml in PBS eingestellt und anschliessend am FACSSorter über die Fluoreszenz sortiert. Sortierte Zellen wurden in FACS-Einmalröhrchen aufgefangen, in die FACS-Puffer vorgelegt worden war und die Zellzahl bestimmt. Nach dem Sortiervorgang wurden die Zellen umgehend in den entsprechenden Experimenten eingesetzt.

### 2.10.10.4 Zellmarkierung mit fluoreszierenden Farbstoffen

Zur Markierung von Zellen zu Beginn der Versuche wurden die Farbstoffe CFSE und C-SNARF-1 verwendet. Beide Reagenzien können passiv die Membran passieren. CFSE wird durch zelluläre Esterasen gespalten. Die Spaltprodukte sind fluoreszent und binden sich kovalent an freie Aminogruppen intrazellulärer Proteine. C-SNARF-1 dagegen wird intrazellulär hydrolytisch gespalten, wodurch die Azetatgruppen entfernt werden. Die freien Methylgruppen binden daraufhin an intrazelluläre Thiole. Derartige Markierungen fanden unter anderem Verwendung einerseits bei dem nichtradioaktiven Zytotoxizitätstest (Aichele 1997, Hernandez 2002, Coles 2002), bei dem, als Alternative zum  $^{51}\text{Cr}$  - Freisetzungstest (Brunner 1968), der Fluoreszenzfarbstoff das Radioisotop ersetzt.

Methode: Die zu markierenden Zellen wurden zu  $2-4 \times 10^7$  Zellen in PBS (RT) aufgenommen und zügig mit einem Volumen einer zweifach konzentrierten Farbstofflösung (in PBS, RT) gemischt. Die resultierende Farbstoffkonzentration ergab sich aus der angestrebten Färbintensität und lag zwischen  $0,1-1\mu\text{M/ml}$ . Die Zellen wurden 15min bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen (10min,  $350\text{g}$ ,  $4^\circ\text{C}$ ).

### 2.10.10.5 Messung am Durchflusszytometer

Methode: Die Lagerung der  $12/75\text{mm}$  Einmalröhrchen erfolgte bei  $4^\circ\text{C}$  im Dunkeln. Zur Einstellung des Durchflusszytometers wurden Einzelfärbungen und Isotypenkontrollen verwendet. Die Bedienung der Durchflusszytometer erfolgte nach Herstellerangaben und die Daten wurden mit den mitgelieferten Programmen 'CellQuest' und 'CellQuest Pro' ausgewertet. Zur Berechnung der Zytotoxizität wurde das in 'CellQuest Pro' ermittelte Verhältnis aus der Zellmenge der Targetzellen ( $R_T$ ) zu derjenigen der Kontrollzellen ( $R_0$ ) in das 'Excel' - Programm (Microsoft) exportiert. Das Verhältnis  $R_T:R_0$  wurde in den Kontrolltieren ( $\emptyset$ ) gemittelt und als 0% Zytotoxizität gesetzt. Die spezifische Zellyse in den Versuchstieren (\*) in Prozent wurde anschließend nach folgender Formel berechnet: spezifische Zytotoxizität\* (%) =  $100 - ((R_T:R_0)^* \times 100) / (R_T:R_0)^{\emptyset}$ .

### **3. ERGEBNISSE**

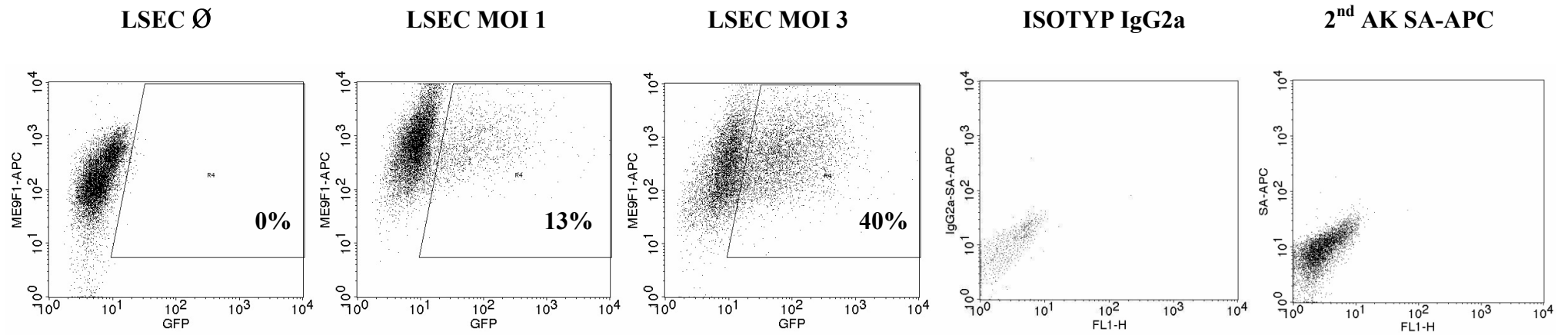
#### **3.1 Permissivität sinusoidaler Leber-Endothelzellen (LSEC) für murines Zytomegalievirus (MCMV)**

##### **3.1.1 Durchflusszytometrische Bestimmung der Permissivität von LSEC und Fibroblasten**

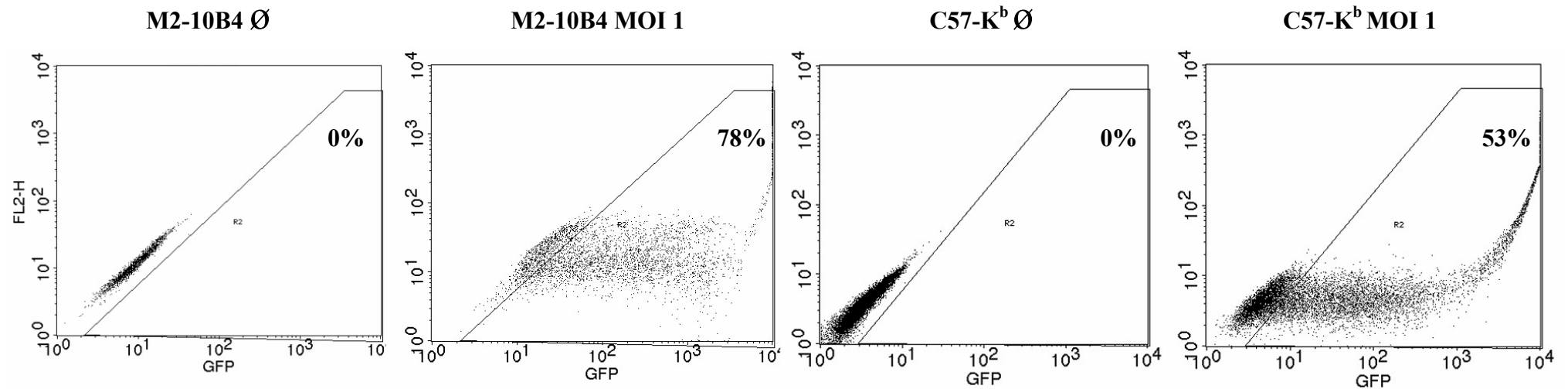
Als Maß für die Permissivität diente die Genexpression des viral kodierten GFP (=Grün fluoreszierendes Protein), welches unter Kontrolle des viralen Immediate Early 2 Promotors in MCMV-GFP steht. Das Wachstum des rekombinanten Virus MCMV-GFP entspricht dem von Wildtyp-MCMV und wird durch die Deletion des viralen IE2-Gens weder *in vitro* noch *in vivo* beeinträchtigt (Cardin 1995). Es wurde zunächst untersucht, ob und in welchem Ausmaß LSEC empfänglich für eine Infektion mit MCMV sind. LSEC, Knochenmark-Stromazellen M2-10B4 (Lutarewych 1997) sowie die Fibroblastenlinie C57-K<sup>b</sup> wurden mit dem rekombinanten Virus MCMV-GFP (MOI 1 und 3) infiziert und 48 Stunden nach Infektion am Durchflusszytometer analysiert. LSEC wurden zudem mit dem Mausendothelzellmarker ME-9F1 angefärbt, der mikrovaskuläre sinusoidale Endothelzellen der Leber spezifisch erkennt (Harder 1991).

Die *in vitro* Analyse ergab, dass LSEC nach Kontakt mit MCMV-GFP eine GFP Fluoreszenz aufweisen. Bei einer MOI von 1 konnten 13%, bei einer MOI von 3 hingegen 40% GFP positive LSEC gemessen werden. Die GFP-Expressionsrate infizierter M2-10B4 (78%) und C57-K<sup>b</sup> (53%) Zellen ist bei einer eingesetzten MOI von 1 verglichen mit LSEC um das drei- bis fünffache stärker. Die Infektionsrate von LSEC nimmt mit einer höheren MOI zu. Die verwendeten Zelllinien unterscheiden sich in diesem Aspekt dahingehend, dass sie ein unterschiedliches Permissivitätsverhalten gegenüber MCMV-Infektion aufweisen, was vermutlich an der Konfluenz der untersuchten Zellen liegt. Zudem handelt es sich bei LSEC um postmitotische quieszente Zellen. MCMV benötigt jedoch mitotisch aktive Zellen, um replizieren zu können, was die geringe GFP-Expression MCMV infizierter LSEC erklären würde (Kalejta 2002).

A



B

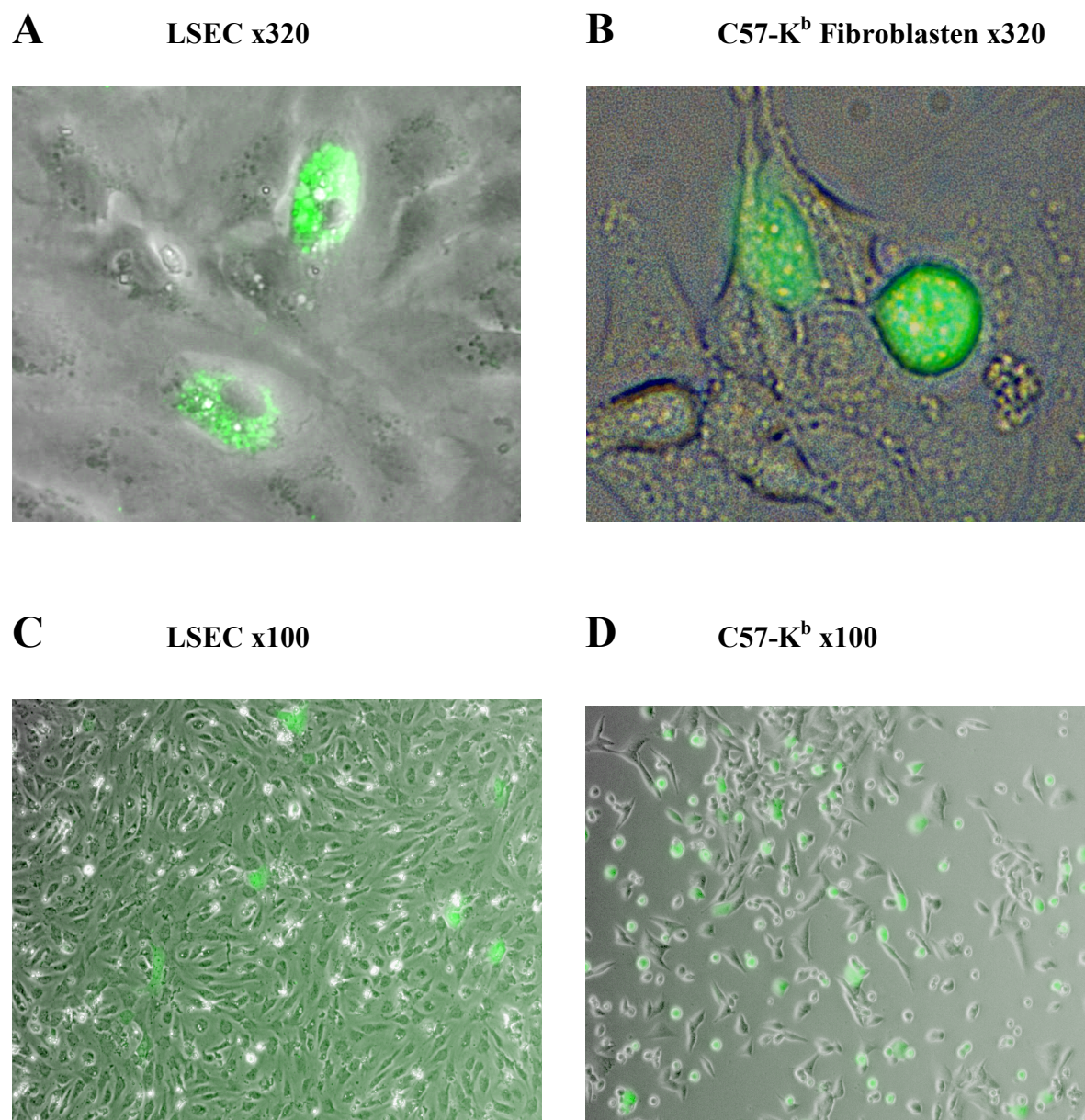


**Abb. 3:** LSEC sind permissiv für eine Infektion mit MCMV-GFP; M2-10B4 und C57-K<sup>b</sup> Zellen (MOI 1), als auch LSEC (MOI 1 und 3) wurden mit MCMV-GFP infiziert. Die Zellen wurden anschließend am Durchflusszytometer gemessen. Fibroblasten sind um den Faktor drei bis fünf permissiver für eine Infektion mit MCMV als LSEC.  
**A:** MCMV infizierte LSEC (MOI 1 und 3);  
**B:** MCMV-infizierte C57-K<sup>b</sup> und M2-10B4 (MOI 1) AK: Isotyp IgG2a, Sekundärkonjugat SA-APC, Endothelzellmarker ME-9F1-bio

### **3.1.2 Mikroskopische Analyse der Permissivität von LSEC und Fibroblasten**

Im nächsten Schritt wurden infizierte LSEC und Fibroblasten einer mikroskopischen Untersuchung unterzogen. Dazu wurden LSEC und C57-K<sup>b</sup> Fibroblasten mit MCMV-GFP (MOI 1) infiziert und 48 Stunden nach Infektion mittels Fluoreszenzmikroskop analysiert. Die Analyse am Fluoreszenzmikroskop ist durch das Auflösungsvermögen eingeschränkt und daher weniger sensitiv verglichen mit durchflusszytometrischen Messungen. Außerdem beeinträchtigt die hohe Autofluoreszenz der Zellen die Analyse, wodurch lediglich intensiv fluoreszierende Zellen zu detektieren sind. Die Probleme einer basalen Hintergrundfluoreszenz treten vor allem bei mikroskopischen Analysen mit GFP auf. Die Abbildungen A und C zeigen infizierte LSEC, die Abbildungen B und D infizierte C57-K<sup>b</sup>.

Bei Betrachten einzelner MCMV-GFP infizierter LSEC ist auffällig, dass das exprimierte GFP ausschliesslich im Zytoplasma der Zelle wieder zu finden ist (Abb.4 A). Die zytoplasmatische Akkumulation von GFP erfolgt bei infizierten LSEC in Form von vesikulären Strukturen, die gleichmäßig über das Zytosol verteilt sind. LSEC zeigen auch keine Anzeichen infektionsbedingter morphologischer Veränderungen wie zelluläre Abkuglung (Abb.4 C). Im Gegensatz dazu erscheinen Fibroblasten nach Infektion mit MCMV abgekugelt und weisen eine über die ganze Zelle verteilte GFP-Expression auf (Abb.4 B und D), die den Zellkern einschließt. Die bei LSEC beobachteten vesikulären Strukturen können bei infizierten Fibroblasten zum Zeitpunkt der Analyse nicht detektiert werden. Im Vergleich führt demnach eine Infektion mit MCMV nicht zu dem typischen zytopathischen Effekt wie er bei infizierten Fibroblasten zu beobachten ist (Abb.4 C und D).



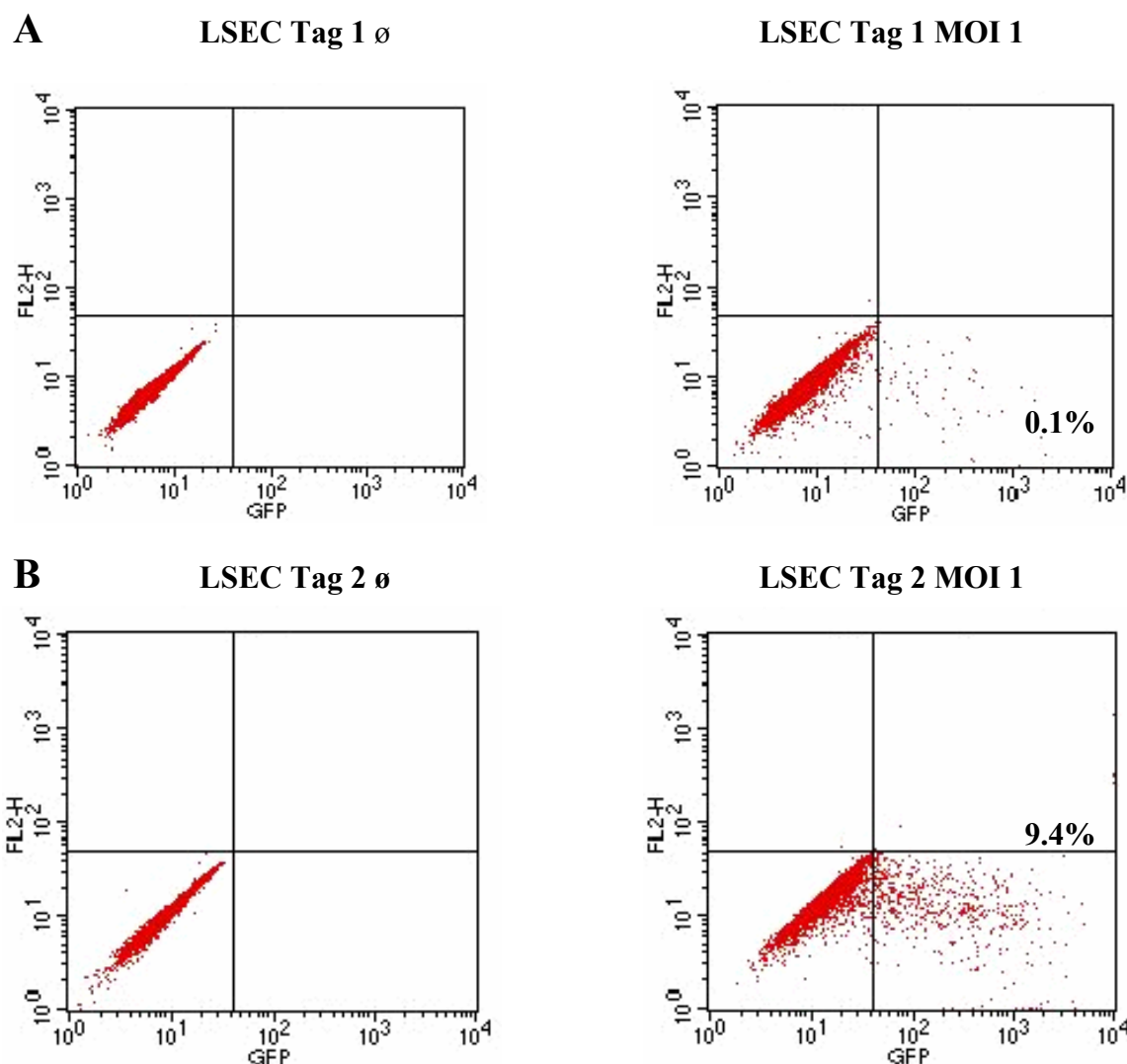
**Abb. 4:** Mikroskopische Analyse der Infektion Sinusoidaler Leber-Endothelzellen mit murinem Zytomegalievirus; A+C, LSEC wurden zwei Tage nach Präparation mit MCMV-GFP (MOI 1) infiziert. Zwei Tage nach Infektion wurden die Zellen am Fluoreszenzmikroskop analysiert. B+D, Fibroblasten (C57-K<sup>b</sup>) wurden mit MCMV-GFP (MOI 1) infiziert. Zwei Tage nach Infektion wurden die Zellen am Fluoreszenzmikroskop analysiert. Infizierte LSEC weisen GFP-positive zytoplasmatisch lokalisierte vesikuläre Strukturen auf, wohingegen infizierte Fibroblasten einheitlich GFP-positiv erscheinen, da sowohl zytoplasmatisch, als auch nukleär GFP gleichermaßen verteilt ist. Vergrößerung: A+B: x320; C+D: x100.

### 3.1.3 Variation in der Permissivität von LSEC für MCMV an Tag 1 und 2 nach Präparation

An Tag 1 nach Präparation und Kultivierung von LSEC aus muriner Leber scheinen die Zellen in einem aktivierten Zustand vorzuliegen, der die Infektion mit MCMV negativ beeinflusst. Lediglich 0.1% GFP positive LSEC (MCMV-GFP MOI 1) können mittels Durchflusszytometer detektiert werden. Dieser Effekt ist an Tag 2 nach Präparation (9.4% GFP positive LSEC) nicht mehr zu beobachten (Abb.5).

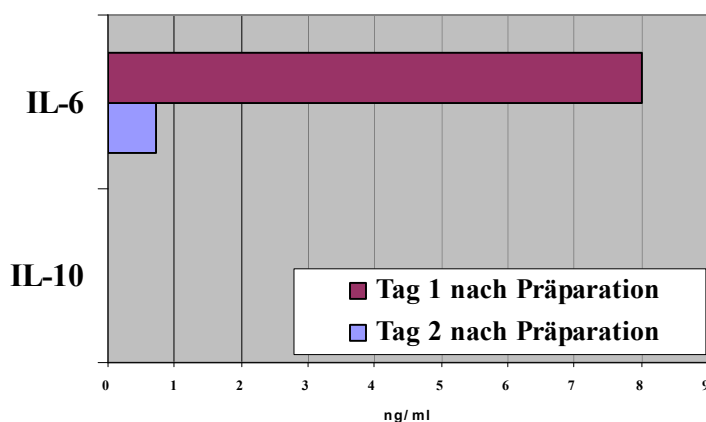
Welche Ursachen diese Beobachtungen haben ist zurzeit noch unklar, könnten jedoch auf die Isolierungsmethode dieser nicht-parenchymalen Zellen zurückzuführen sein. Die zur Aufreinigung von LSEC verwendete Kollagenase enthält LPS und womöglich auch noch andere TLR-Liganden (*Toll Like Receptors*), die für den aktivierten Zustand von LSEC verantwortlich sein könnten. Um einen Hinweis auf das veränderte Verhalten von LSEC zu erhalten, wurde ein Zytokinprofil aus Zellüberständen von Tag 1 und 2 erstellt. Das Zytokin IL-10 konnte im Zellüberstand von LSEC nicht detektiert werden. Daraus kann geschlossen werden, dass sich in den präparierten LSEC keine kontaminierenden Kupfferzellen befinden. Die Analyse des Zytokins IL-6 hingegen ergab erhöhte Werte an Tag 1 nach Präparation. Zwei Tage nach Präparation war der gemessene Wert für das Zytokin IL-6 um den Faktor 10 niedriger. Das pro-inflammatorische Zytokin IL-6 wird für gewöhnlich von Monozyten (z.B. dendritische Zellen und Makrophagen) und Knochenmark-Stromazellen sekretiert. IL-6 wird über das Blut verbreitet und gelangt so in die Leber, wo es Hepatozyten dazu stimuliert, Akut-Phase-Proteine zu bilden. Die erhöhte Zytokinsekretion kultivierter LSEC als Folge der Isolierung einen Tag nach Präparation lässt demnach auf einen veränderten Zustand dieser postmitotischen Zellen schließen. Interessant wäre die Beteiligung von Typ I Interferonen (IFN- $\alpha/\beta$ ) bei Infektion von LSEC mit MCMV zu untersuchen. Es konnte nämlich in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass die Expression von IFN- $\alpha/\beta$  durch infizierte dendritische Zellen (DC) zu verminderter viraler Replikation führt (Dalod 2003). Die Analyse von Typ I Interferonen (IFN- $\alpha/\beta$ ) wird zurzeit durchgeführt, jedoch liegt zum Zeitpunkt des Erstellens dieser Arbeit noch kein Ergebnis vor.





**Abb.5:** Variation in der Permissivität von LSEC für MCMV an Tag 1 und 2 nach Präparation; LSEC wurden mit MCMV-GFP (MOI 1) am Tag 1 (A) bzw. 2 (B) nach Präparation infiziert. Zwei Tage nach Infektion wurde die Anzahl GFP positiver LSEC am Durchflusszytometer ermittelt.

## Zytokinexpression



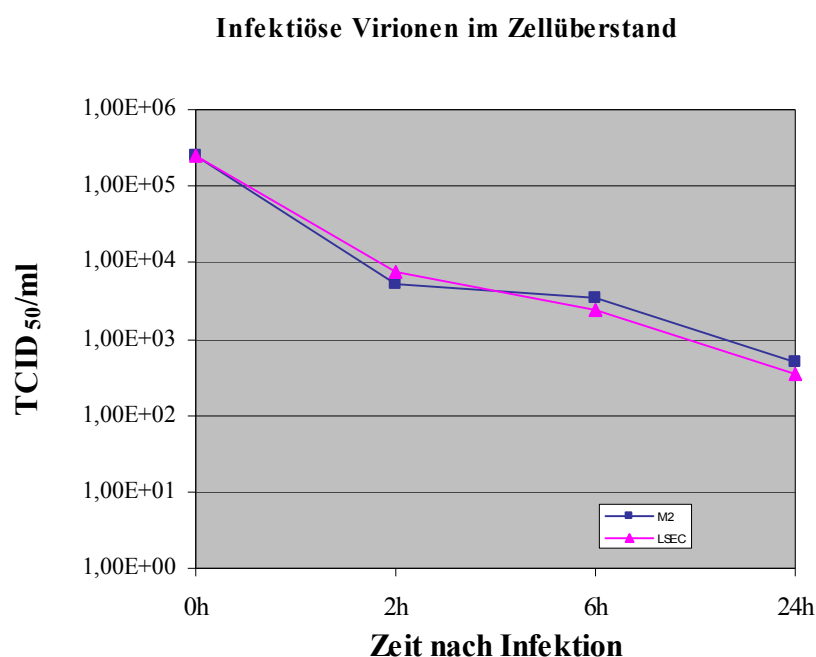
**Abb. 6:** Zytokinprofil sinusoidaler Leber-Endothelzellen an Tag 1 und 2 nach Präparation;

An Tag 1 und 2 nach Präparation von LSEC wurden Zellüberstände gesammelt und mittels ELISA auf die Zytokine IL-6 und IL-10 hin untersucht. An Tag 1 nach Präparation konnten erhöhte IL-6 Werte gemessen werden, die an Tag zwei um das zehnfache erniedrigt waren. Im Diagramm ist die Menge an gebildetem IL-6 und IL-10 in ng/ml aufgetragen.

## 3.2 Nachkommenvirus

### 3.2.1 Inkorporation von MCMV-Virionen durch LSEC

In der folgenden Analyse sollte kinetisch festgestellt werden, in welchem Zeitrahmen LSEC und M2-10B4 Zellen Virionen aufnehmen können. LSEC ( $2.5 \times 10^5$ ) und M2-10B4 Zellen ( $2.5 \times 10^5$ ) wurden mit MCMV-GFP (MOI 1) inkubiert. Zu den Zeitpunkten 2h, 6h und 24h nach Infektion wurde der Zellüberstand entnommen und die verbleibende Menge Virionen über eine  $TCID_{50}$ -Virustitration bestimmt. Es konnte beobachtet werden, dass Virus in Medium ohne Zellen nach zwei Tagen nicht mehr infektiös ist (persönliche Beobachtung; Daten nicht gezeigt). Zwei Stunden nach Infektion haben LSEC Virionen ebenso effizient aufgenommen auf wie M2-10B4 Zellen. Aus diesem Ergebnis kann geschlossen werden, dass die reduzierte Expressionsrate MCMV infizierter LSEC im Vergleich zu M2-10B4 Zellen (siehe Experiment 3.1.1) scheinbar nicht auf eine geringere Aufnahme infektiöser Virionen durch LSEC zurückzuführen ist. Dabei bleibt jedoch unklar, ob das Virus lediglich an die Zelloberfläche von LSEC gebunden vorliegt, oder aber internalisiert wurde.

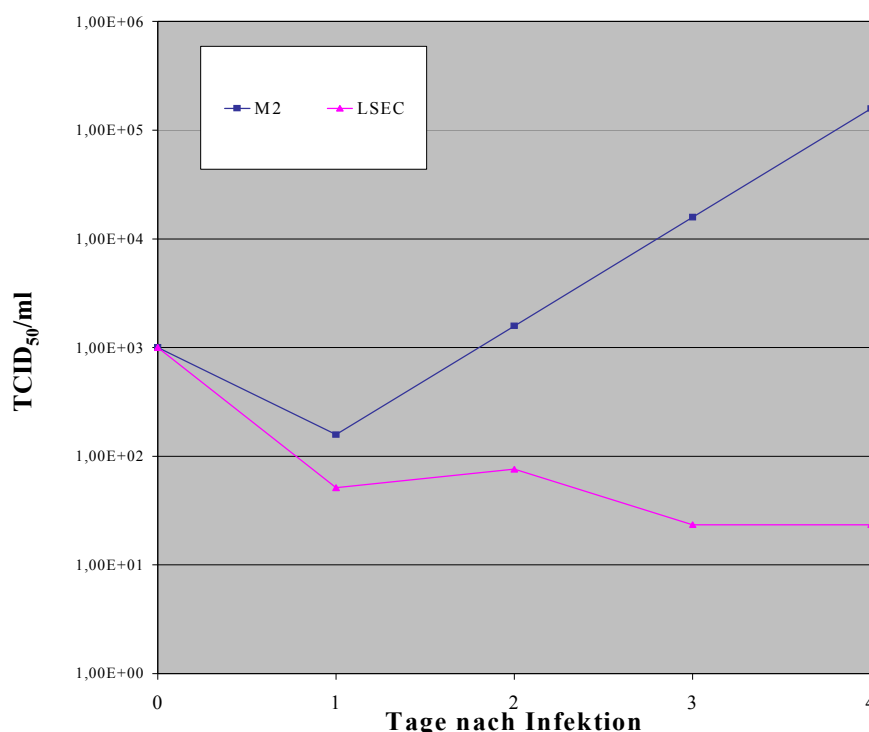


**Abb. 7:** LSEC und M2-10B4 Zellen inkorporieren Virionen gleichermaßen effizient; LSEC und M2-10B4 Zellen wurden mit MCMV-GFP (MOI 1) infiziert. Nach 2h, 6h und 24h wurde der Zellüberstand entnommen und die verbleibende Menge Virionen über eine  $TCID_{50}$ -Virustitration bestimmt. Im Diagramm ist die ermittelte  $TCID_{50}/ml$  gegen die Zeit aufgetragen.

### 3.2.2 Bestimmung von Nachkommenvirus nach Infektion von LSEC und Fibroblasten mit MCMV

Eine virale Wachstumskurve nach Infektion von Zellen gibt Aufschluss darüber, ob replikationskompetente Nachkommenviren gebildet werden. LSEC ( $2 \times 10^5$ ) und M2-10B4 ( $2 \times 10^5$ ) Zellen wurden mit jeweils  $1 \times 10^3$  MCMV-GFP Viren infiziert. Nachkommenviren wurden über eine TCID<sub>50</sub>-Virustitration aus Zellüberständen ein, zwei, drei und vier Tage nach Infektion bestimmt. Anhand der Wachstumskurve ist zu erkennen, dass einen Tag nach Infektion weder bei LSEC, noch bei M2-10B4 Zellen Nachkommenviren im Zellüberstand zu detektieren sind. Im weiteren Verlauf kann bei infizierten M2-10B4 Zellen ein Anstieg gebildeter Virionen ermittelt werden, der von Tag zwei ( $1.5 \times 10^3$ ) bis Tag vier ( $1.5 \times 10^5$ ) kontinuierlich zunimmt. Im Zellüberstand infizierter LSEC hingegen können auch an den Tagen zwei, drei und vier keine Nachkommenviren nachgewiesen werden. Somit bilden MCMV infizierte LSEC offensichtlich keine Nachkommenviren.

#### Nachkommenvirus

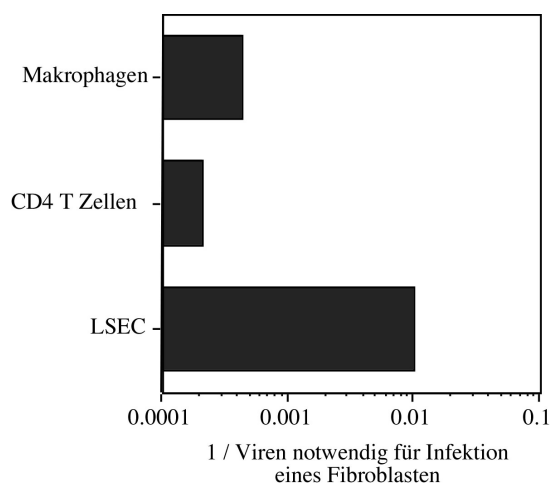


**Abb. 8:** LSEC generieren keine Nachkommenviren; LSEC und M2-10B4 Zellen wurden mit  $1 \times 10^3$  MCMV-GFP Viren infiziert. An den Tagen 1, 2, 3 und 4 wurden die Zellüberstände gesammelt und der Virustiter via TCID<sub>50</sub> bestimmt. Die Virustitration wurde mit M2-10B4 Zellen durchgeführt. Im Graphen ist der ermittelte Virustiter (TCID<sub>50</sub>/ml) gegen die Zeit aufgetragen.

### 3.3 Weitergabe von MCMV – Infektion in *trans*

Die Weitergabe von infektiösem MCMV durch infizierte Zellen stellt einen viralen Mechanismus dar, sich im Organismus auszubreiten. Dabei scheinen Endothelzellen eine besondere Rolle bei der Ausbreitung von MCMV zu spielen (Waldman 1991; Sinzger 1999). Um zu untersuchen, ob und in welchem Ausmaß infizierte LSEC zur Weitergabe von Virus befähigt sind, wurden LSEC, Makrophagen (J774.2) und CD4<sup>+</sup>-T-Zellen (LB27.4) mit MCMV-GFP (MOI 1) inkubiert und zwei Stunden nach Infektion gewaschen. Die Zellen wurden daraufhin mit SNARF-gefärbten permissiven C57-K<sup>b</sup> Fibroblasten kokultiviert. Vierundzwanzig Stunden nach Kokultur wurden die Fibroblasten im Durchflusszytometer analysiert und die Anzahl doppelt positiver Fibroblasten (GFP-positiv=Infektion und SNARF-positiv=Identifikation der Fibroblasten) bestimmt. Als Negativkontrolle wurden C57-K<sup>b</sup> Fibroblasten mit uninfizierten Zellen bzw. mit Zellen, die mit UV-inaktiviertem Virus inkubiert worden waren, kokultiviert. Durch die zeitlich gewählte Abfolge des Experiments kann ausgeschlossen werden, dass neu gebildete Virionen das Ergebnis des Experiments verfälschen.

Im Diagramm ist dargestellt, wie viele Viren notwendig sind, um einen permissiven Fibroblasten infizieren zu können. LSEC sind verglichen mit CD4<sup>+</sup>-T-Zellen und Makrophagen deutlich effizienter in der Weitergabe von viralen Partikeln. Jedes hundertste mit LSEC inkubierte Virus wird an permissive Zellen (C57-K<sup>b</sup>) weitergegeben, wohingegen Makrophagen jedes zweitausendvierhundertste (1:2400) und CD4<sup>+</sup>-T-Zellen nur jedes viertausendachthundertste (1:4800) Virus weitergeben. Die Weitergabe von Virionen durch infizierte LSEC an permissive Zellen beschreibt eine Infektion in *trans*. Extrazellulär gebundene Virionen können jedoch nicht ausgeschlossen werden. Eine Infektion von Zielzellen *in trans* konnte bereits für das Molekül DC-SIGN (*Dendritic Cell Specific ICAM Grabbing Non-integrin*) im Zusammenhang mit einer HIV-Infektion beschrieben werden (Geijtenbeek 2000).



**Abb. 9:** Weitergabeffizienz viraler Partikel durch infizierte Immunzellen; LSEC, CD4<sup>+</sup>-T-Zellen (BO1710.4) und Makrophagen (J774.2) wurden mit MCMV-GFP (MOI 1) für 2 Stunden infiziert. Danach wurden die infizierten Zellen mit permissiven SNARF-gefärbten-Fibroblasten kokultiviert. 24h später erfolgte die Analyse am Durchflusszytometer. Die untersuchten Zelltypen sind im Diagramm gegen die benötigte Anzahl an Viren pro MCMV-GFP-positiven Fibroblasten dargestellt.

Mikrovaskuläre sinusoidale Endothelzellen der Leber (=LSEC) sind permissiv für eine Infektion mit murinem Zytomegalievirus. Verglichen mit Fibroblasten sind LSEC um den Faktor drei bis fünf weniger permissiv für MCMV (Abb.3). Mikroskopische Analysen infizierter LSEC (48 Stunden nach Infektion mit MCMV-GFP) deuten auf eine zytoplasmatische Akkumulation von GFP-positiven Einschlusskörperchen, die bei Fibroblasten zum Zeitpunkt der Analyse nicht beobachtet werden konnten (Abb.4). Zudem erscheinen LSEC nach Infektion morphologisch unverändert und zeigen keinen infektionsbedingten zytopathischen Effekt, wohingegen M2-10B4 Zellen eine charakteristische abgerundete Form aufweisen (Abb.4). Zudem sind LSEC äußerst effizient in der Inkorporation von Virionen. Bereits zwei Stunden nach Infektion sind weniger als 5% der eingesetzten viralen Partikel im Zellüberstand infizierter LSEC zu detektieren (Abb.7).

Infizierte LSEC bilden keine Nachkommenviren, was auf eine nicht produktive Infektion dieser Zellen schließen lässt (Abb.8). Bei der Weitergabe von infektiösen Vironen an permissive Zellen sind LSEC deutlich effizienter als Makrophagen (1:4800) oder CD4<sup>+</sup>-T-Zellen (1:2400). Jedes hundertste Virus wird von LSEC an permissive Zellen weitergegeben (Abb.9).

### **3.4 Expressionsanalyse immunologisch bedeutender Oberflächenmoleküle MCMV infizierter LSEC**

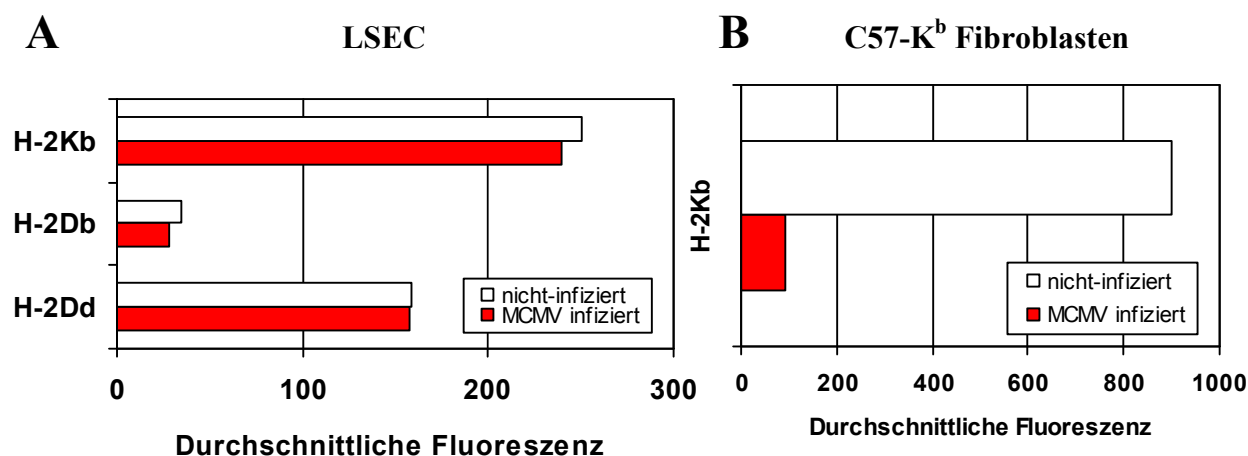
Zytomegalieviren haben eine Reihe von Mechanismen entwickelt, um einer Entdeckung durch das Immunsystem zu entgehen. Zur Aktivierung von protektiven antiviralen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen ist die Expression von MHC-Klasse-I Molekülen, Adhäsionsmolekülen und kostimulatorischen Molekülen durch antigenpräsentierende Zellen erforderlich. Im Folgenden wurde daher untersucht, ob und inwieweit eine Infektion von LSEC mit MCMV eine Veränderung des Expressionsprofils dieser Oberflächenmoleküle hervorruft.

#### **3.4.1 Expression verschiedener MHC-I Allele nach Infektion von LSEC mit MCMV**

LSEC aus C57BL/6 (H-2<sup>b</sup>) und Balb/c (H-2<sup>d</sup>) Mäusen wurden zwei Tage nach Präparation mit MCMV-GFP (MOI 1) infiziert. 48 Stunden nach Infektion wurden die Zellen auf Oberflächenexpression von MHC-Klasse-I Molekülen (H-2D<sup>b</sup>, H-2K<sup>b</sup> und H-2D<sup>d</sup>) hin untersucht.

Als Kontrollzellen wurden uninfizierte LSEC mit den entsprechenden Antikörpern angefärbt. Die MHC-Klasse-I restringierte Fibroblastenzelllinie C57-K<sup>b</sup> (H-2K<sup>b</sup>) wurde als Positivkontrolle mitgeführt, um einen Defekt viral kodierter immunsuppressiver Gene bzw. deren Expression ausschließen zu können. Im Diagramm ist die durchschnittliche Fluoreszenzintensität infizierter und nicht infizierter LSEC gegenübergestellt. Die Analyse infizierter Zellen erfolgte durch 'gaten' auf die infizierte GFP-positive LSEC-Population.

Die MHC-Klasse-I Expression auf der Zelloberfläche von LSEC bleibt nach Infektion mit murinem Zytomegalievirus unbeeinflusst. Im Gegensatz dazu kommt es zu einem drastischen Verlust der Oberflächenexpression von MHC-Klasse-I Molekülen bei C57-K<sup>b</sup> Fibroblasten.

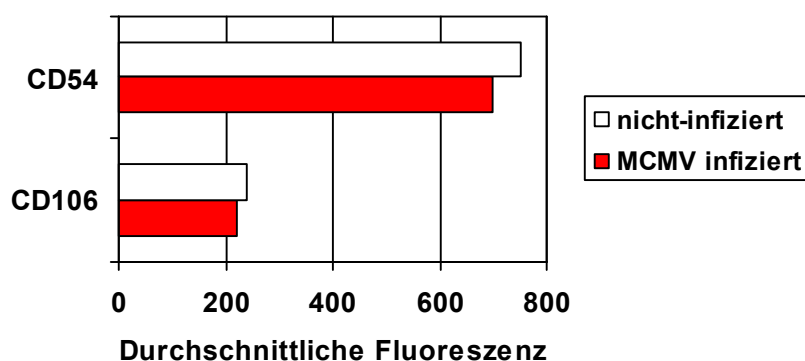


**Abb. 10:** Analyse verschiedener MHC-Klasse-I Allele 48h nach Infektion von LSEC mit MCMV-GFP (MOI 1); (A), LSEC aus C57BL/6 und Balb/c Mäusen wurden zwei Tage nach Präparation mit MCMV-GFP (MOI 1) infiziert. Zwei Tage nach Infektion wurden die Zellen auf die MHC-Klasse-I Allele H-2D<sup>b</sup>, H-2K<sup>b</sup> und H-2D<sup>d</sup> angefärbt und anschliessend am Durchflusszytometer gemessen. Als Vergleichswerte dienten LSEC, die nicht mit Virus inkubiert worden waren. (B), Als Kontrolle wurden C57-K<sup>b</sup> (H-2K<sup>b</sup>) Fibroblasten mit MCMV-GFP (MOI 1) für 48h infiziert und anschliessend auf das MHC-Klasse-I Molekül H-2K<sup>b</sup> angefärbt. Die durchschnittliche Fluoreszenzintensität ist als Balkendiagramm dargestellt.

### 3.4.2 Expression von Adhäsionsmolekülen nach Infektion mit MCMV

LSEC aus C57BL/6 (H-2b) Mäusen wurden zwei Tage nach Präparation mit MCMV-GFP (MOI 1) infiziert. 48 Stunden nach Infektion wurden die Zellen auf Oberflächenexpression von Adhäsionsmolekülen (CD54 und CD106) hin untersucht. Als Kontrollzellen wurden nicht infizierte LSEC mit den entsprechenden Antikörpern angefärbt.

Im Diagramm ist die durchschnittliche Fluoreszenzintensität infizierter und uninfizierter LSEC gegenübergestellt. Die Analyse infizierter Zellen erfolgt durch 'gaten' auf die infizierte GFP-positive LSEC-Population. Die Oberflächenexpression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 (CD54) und VCAM-1 (CD106) bleibt nach Infektion von LSEC mit murinem Zytomegalievirus weitgehend unverändert.

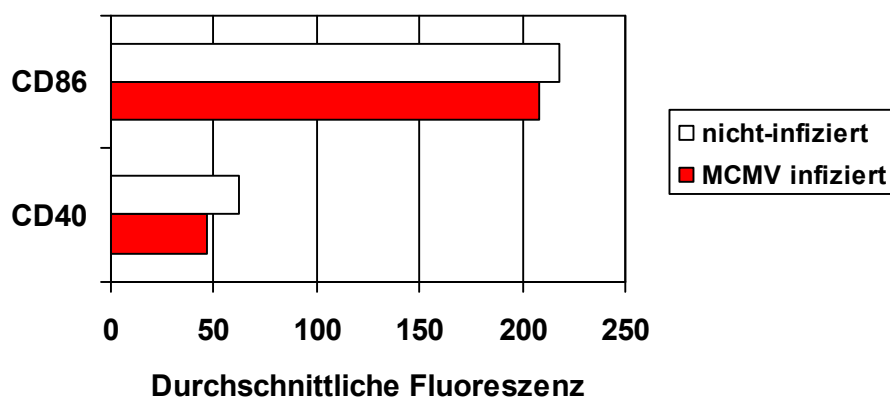


**Abb. 11:** Analyse verschiedener Adhäsionsmoleküle 48h nach Infektion von LSEC mit MCMV-GFP (MOI 1); LSEC aus C57BL/6 Mäusen wurden zwei Tage nach Präparation mit MCMV-GFP (MOI 1) infiziert. Zwei Tage nach Infektion wurden die Zellen auf CD54 (ICAM-1) und CD106 (VCAM-1) gefärbt und anschliessend am Durchflusszytometer gemessen. Als Vergleichswerte dienten LSEC, die nicht mit Virus inkubiert worden waren. Die durchschnittliche Fluoreszenzintensität ist als Balkendiagramm dargestellt.

### 3.4.3 Expression von kostimulatorischen Oberflächenmolekülen nach MCMV-Infektion

LSEC aus C57BL/6 (H-2b) Mäusen wurden zwei Tage nach Präparation mit MCMV-GFP (MOI 1) infiziert. 48 Stunden nach Infektion wurden die Zellen auf Oberflächenexpression von kostimulatorischen Molekülen (CD40 und CD86) hin untersucht. Als Kontrollzellen wurden nicht infizierte LSEC mit den entsprechenden Antikörpern angefärbt.

Im Diagramm ist die durchschnittliche Fluoreszenzintensität infizierter und uninfizierter LSEC gegenübergestellt. Die Analyse infizierter Zellen erfolgt durch 'gaten' auf die infizierte GFP-positive LSEC-Population. Die Oberflächenexpression der kostimulatorischen Moleküle CD40 und CD86 (=B7.2) bleibt durch Infektion mit dem murinen Zytomegalievirus unbeeinflusst.



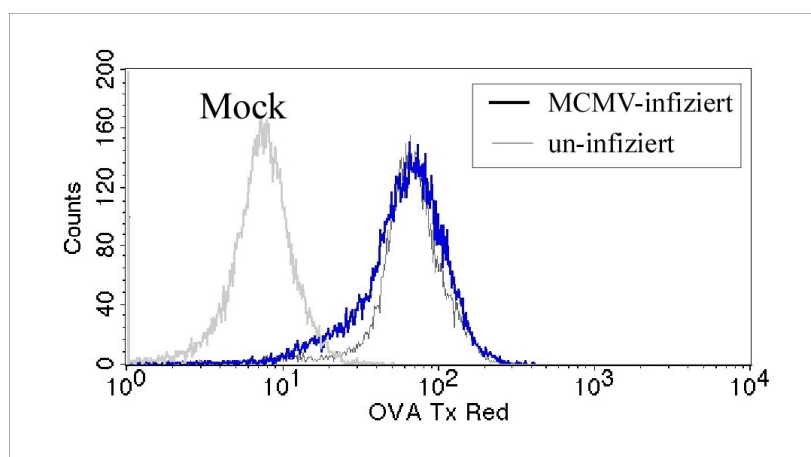
**Abb. 12:** Analyse verschiedener kostimulatorischer Moleküle 48h nach Infektion von LSEC mit MCMV-GFP (MOI 1); LSEC aus C57BL/6 Mäusen wurden 48h nach Präparation für weitere 48 Stunden mit MCMV-GFP (MOI 1) infiziert. Danach wurden die Zellen auf CD40 und CD86 gefärbt und anschliessend am Durchflusszytometer gemessen. Als Vergleichswerte dienten LSEC, die nicht mit Virus inkubiert worden waren. Die durchschnittliche Fluoreszenzintensität ist als Balkendiagramm dargestellt.



### 3.5 Antigenaufnahme nach Infektion von LSEC mit murinem Zytomegalievirus

LSEC exprimieren eine Reihe von Mustererkennungsrezeptoren, wie den Mannoserezeptor, den Scavengerrezeptor und L-SIGN (*Liver/Lymph-node Specific ICAM-3 Grabbing Non-integrin*), die sie zu effizienter Aufnahme löslicher extrazellulärer Antigene befähigen. Um festzustellen, ob LSEC durch eine Infektion mit MCMV in ihrer Fähigkeit, exogene lösliche Antigene aufzunehmen, beeinträchtigt werden, wurde im Folgenden untersucht. Dazu wurden LSEC mit MCMV-GFP (MOI 1) infiziert und zwei Tage nach Infektion für 30min mit 5µg Ovalbumin-Texas-Red inkubiert. Danach erfolgte die Analyse am Durchflusszytometer.

Infizierte GFP-positive LSEC wurden durch 'gaten' von nicht-infizierten LSEC unterschieden. Als Kontrolle diente die nicht-infizierte LSEC-Population. Die im Histogramm dargestellten Ergebnisse zeigen, dass LSEC keine Reduktion der Antigenaufnahme 48 Stunden nach Infektion mit MCMV aufweisen.



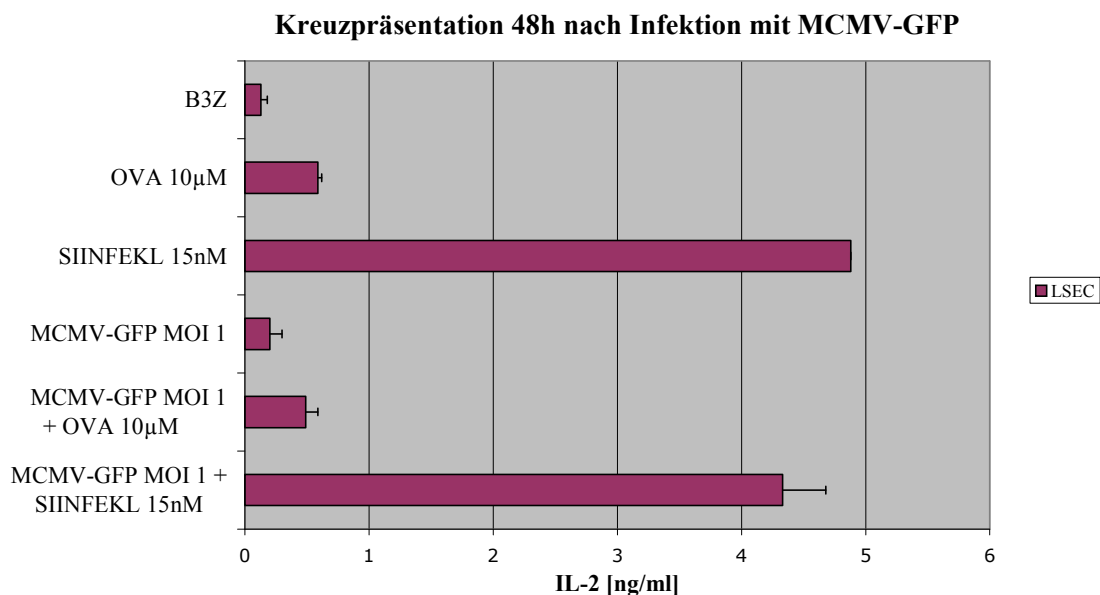
**Abb. 13:** Die Antigenaufnahme von Ovalbumin über den Mannoserezeptor MCMV-GFP infizierter LSEC ist 48 Stunden nach Infektion unbeeinflusst; LSEC aus C57BL/6 Mäusen wurden achtundvierzig Stunden nach Präparation für weitere 48h mit MCMV-GFP (MOI 1) infiziert. Danach wurden die Zellen für 30min mit 5µg Ovalbumin-Texas-Red (5µg/24Loch) inkubiert und anschliessend mit PBS gewaschen. Als Kontrolle wurde die nicht-infizierte LSEC-Population verwendet. LSEC wurden auf ME-9F1 gefärbt. Die Analyse erfolgte am Durchflusszytometer. Im Histogramm sind ME-9F1 positive Zellen dargestellt. Bei der Analyse infizierter LSEC wurde um die infizierte, GFP-positive LSEC-Population eine Auswahlregion gelegt.

### 3.6 Antigenpräsentation nach MCMV-Infektion von LSEC (*in vitro*)

Zytomegalieviren haben im Laufe der Evolution zahlreiche Strategien entwickelt, um die MHC-I restringierte Antigenpräsentation zu manipulieren und damit der CD8<sup>+</sup>-T-Zellantwort zu entgehen. LSEC sind in der Lage, exogene Antigene zu internalisieren, prozessieren und anschließend CD8<sup>+</sup>-T-Zellen MHC-Klasse-I restringiert zu präsentieren (Kreuzpräsentation). Die Infektion mit MCMV hat offensichtlich keinen Einfluss auf die Fähigkeit von LSEC, exogenes Antigen aufzunehmen. Außerdem konnte keine Modulation der MHC-Klasse-I Expression nach Infektion von LSEC mit MCMV festgestellt werden. Folglich wäre zu erwarten, dass eine Infektion von LSEC mit MCMV keinen Einfluss auf deren Fähigkeit zur Antigenpräsentation hat. Ob jedoch und inwieweit eine Infektion von LSEC einen Effekt auf die Antigenpräsentation exogener Antigene (Kreuzpräsentation) hat, wurde im Folgenden analysiert.

#### 3.6.1 Kreuzpräsentation MCMV-GFP infizierter LSEC (*Bulk culture*)

LSEC wurden mit MCMV-GFP (MOI 1) infiziert und zwei Tage nach Infektion für zwei Stunden mit löslichem Antigen (10µM Ovalbumin) bzw. mit Peptid (15nM SIINFEKL) inkubiert. Danach wurden die Zellen gewaschen und für 20 Stunden mit dem T-Zellhybridom B3Z koinkubiert, welches bei Stimulation durch H-2K<sup>b</sup> SIINFEKL IL-2 sezerniert. B3Z ist ein CD8<sup>+</sup>-T-Zellhybridom, welches spezifisch das aus Ovalbumin stammende SIINFEKL-Peptid im Kontext des MHC-Klasse-I Moleküls H-2K<sup>b</sup> erkennt. B3Z verfügt außerdem über ein lacZ(β-Gal)-Konstrukt, das vom NF-AT-Element des IL-2 Promotors gesteuert wird (van Bleek 1990). IL-2 im Zellüberstand wurde anschließend in einem ELISA quantifiziert. Als Kontrolle dienten nicht infizierte LSEC. Die exogene Beladung von H-2K<sup>b</sup> mit spezifischem Peptid (SIINFEKL) diente als Positivkontrolle. Die Versuchsansätze mit infizierten LSEC stellen eine Mischpopulation aus infizierten und nicht infizierten LSEC dar. Vergleicht man infizierte mit nicht infizierten LSEC kann keine Reduktion in Form von IL-2 gemessen werden. Die Fähigkeit der Mischpopulation aus infizierten und nicht infizierten LSEC exogene Antigene zu präsentieren, ist ungemindert. Daher ist ein parakriner Effekt auszuschließen.

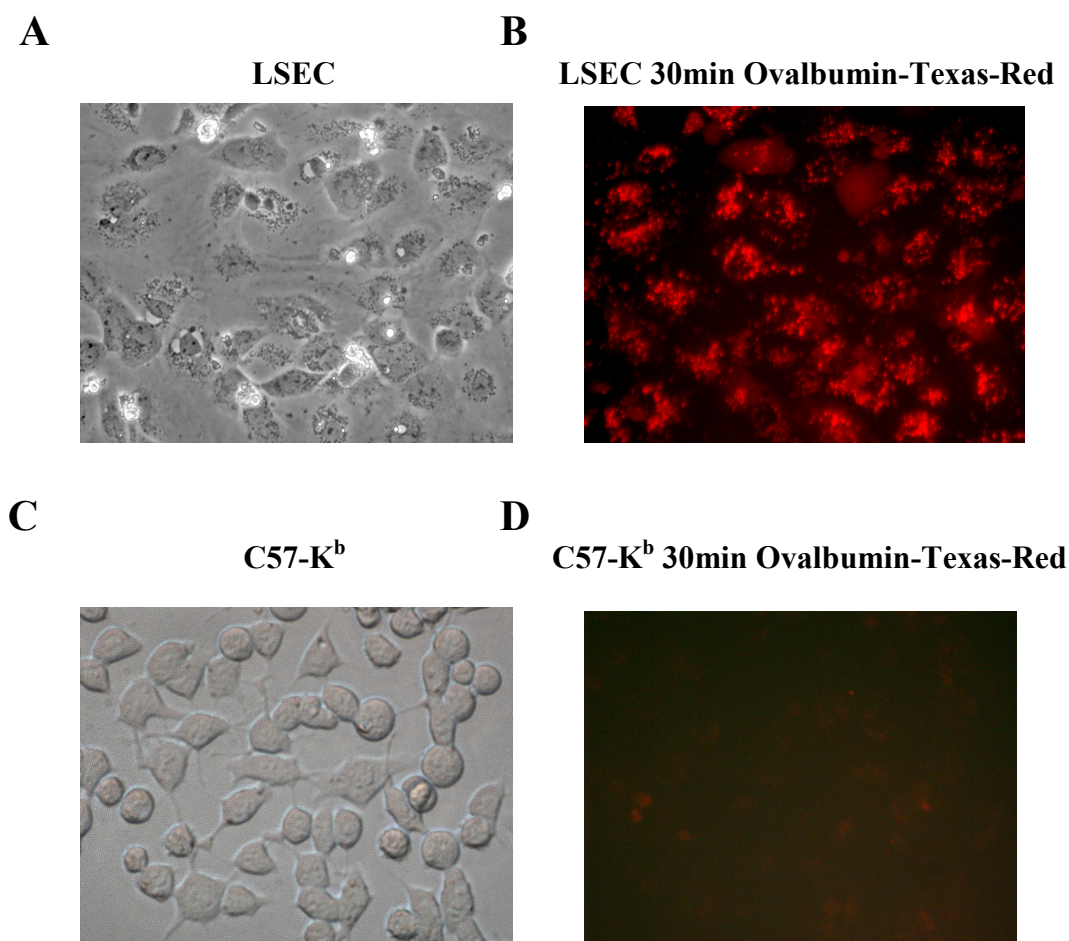


**Abb. 14:** Kreuzpräsentation MCMV-GFP infizierter LSEC für das T-Zellhybridom B3Z (bulk culture); LSEC wurden mit MCMV-GFP (MOI 1) infiziert und zwei Tage nach Infektion für zwei Stunden mit löslichem Antigen (10µM Ovalbumin) bzw. Peptid (15nM SIINFEKL) inkubiert. Danach wurden die Zellen gewaschen und für 20 Stunden mit dem T-Zellhybridom B3Z koinkubiert. Antigenpräsentation wurde in einem IL-2 ELISA analysiert. Im Diagramm ist die von B3Z gebildete Menge an IL-2 in ng/ml aufgetragen. Es wurden jeweils Zweifachwerte pro Ansatz analysiert, wobei der Mittelwert im Diagramm dargestellt ist.

### 3.6.2 Kreuzpräsentation FACS-sortierter MCMV-GFP infizierter LSEC

Die Analyse einer Mischpopulation aus infizierten und nicht infizierten LSEC lässt keine Rückschlüsse auf den direkten Effekt einer viralen Infektion auf die Fähigkeit zur Kreuzpräsentation durch LSEC zu. Die Möglichkeit eines negativen parakrinen Einflusses infizierter auf nicht infizierte LSEC auf die Kreuzpräsentation konnte im vorangegangenen Experiment ausgeschlossen werden. Aus diesem Grund sollte im Folgenden eine rein infizierte LSEC-Population auf Kreuzpräsentation hin untersucht werden.

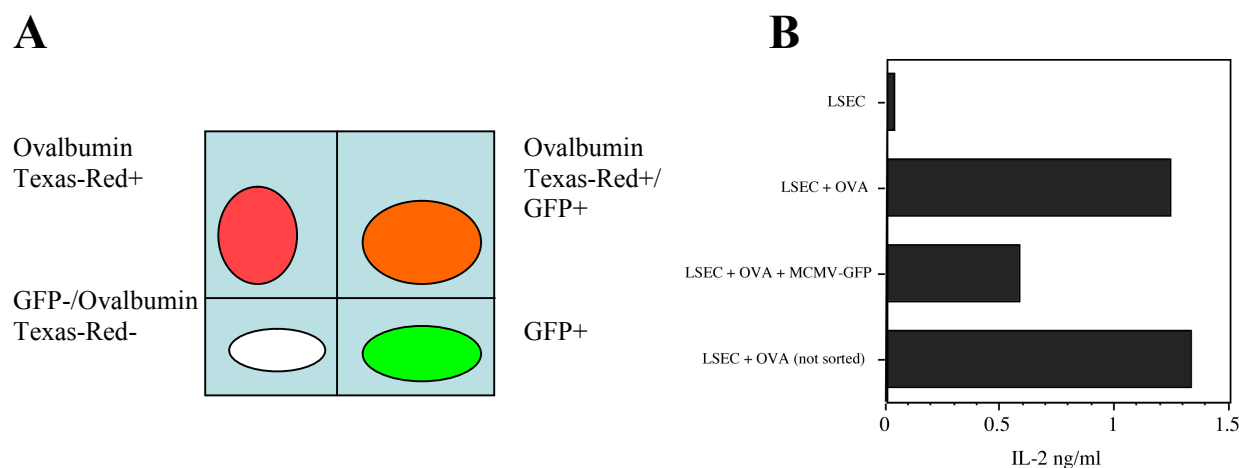
LSEC sind äußerst effizient in der rezeptorvermittelten Aufnahme exogener löslicher Antigene wie Ovalbumin oder acetyliertem-(*Low density lipoprotein*)-LDL (Knolle 2000; Limmer 2000). Bereits nach einer Inkubationszeit von 30min haben LSEC Ovalbumin inkorporiert (Abb.15 A+B). Dagegen sind C57-K<sup>b</sup> Fibroblasten nicht in der Lage, innerhalb von 30min lösliches Antigen aufzunehmen (Abb.15 C+D). Aus diesem Grund kann die schnelle Aufnahme von Ovalbumin als spezifischer Marker für LSEC herangezogen werden.



**Abb. 15:** **LSEC inkorporieren lösliches Antigen (Ovalbumin) äußerst effizient;** LSEC und C57-K<sup>b</sup> Fibroblasten wurden für 30min mit löslichem fluoreszierenden Antigen inkubiert (5µg/24-Loch Ovalbumin-Texas-Red). Die Analyse der Inkorporation von Ovalbumins erfolgte am Fluoreszenzmikroskop. **A+B** Mikroskopische Analyse der Inkorporation des löslichen Antigens Ovalbumin durch LSEC 30min nach Inkubation. **C+D** Inkorporation des löslichen Antigens Ovalbumin durch C57-K<sup>b</sup> Fibroblasten 30min nach Inkubation. Vergrößerung: 200x.

Zur Analyse der Kreuzpräsentation infizierter LSEC wurde das fluoreszierende Antigen Ovalbumin-Texas-Red sowohl als Antigen, als auch als Marker sinusoidaler Endothelzellen eingesetzt. LSEC wurden mit MCMV-GFP (MOI 1) infiziert und 48 Stunden nach Infektion für 30min mit 5µg Ovalbumin-Texas-Red inkubiert. Die Zellen wurden daraufhin mittels FACSORTER in folgende Zellpopulationen aufgetrennt: Ovalbumin-Texas-Red positive Zellen, GFP-positive Zellen (MCMV infizierte LSEC), Ovalbumin-Texas-Red/GFP doppelt positive Zellen und Ovalbumin-Texas-Red/GFP doppelt negative Zellen. Als Kontrolle dienten zudem LSEC, die nach Antigengabe von der Zellkulturplatte abgelöst worden waren, jedoch den maschinellen Vorgang des Sortierens nicht durchliefen. Die verschiedenen Populationen wurden schließlich mit dem T-Zellhybridom B3Z für 20 Stunden kokultiviert.

Der Zellüberstand wurde in einem IL-2 ELISA analysiert. Uninfizierte, sortierte LSEC sind verglichen mit nicht-sortierten LSEC gleichermaßen zur Kreuzpräsentation exogener Antigene fähig. Die MCMV infizierte LSEC Population jedoch weist eine um etwa 50% reduzierte Kreuzpräsentationsaktivität auf.



**Abb. 16:** Kreuzpräsentation MCMV-GFP infizierter LSEC für das T-Zellhybridom B3Z (sorting); LSEC wurden mit MCMV-GFP (MOI 1) infiziert und zwei Tage nach Infektion für 30min mit löslichem Antigen (5µg/24 Loch Ovalbumin-Texas-Red) inkubiert. Danach wurden die Zellen mittels FACSsorter voneinander aufgetrennt (A). Die sortierten Zellen wurden anschließend mit dem T-Zellhybridom B3Z für 20 Stunden koinkubiert. Die Analyse erfolgte via IL-2 ELISA. Im Diagramm (B) ist die von B3Z gebildete Menge an IL-2 in ng/ml aufgetragen. Es wurden jeweils Dreifachwerte pro Ansatz analysiert, wobei der Mittelwert im Diagramm dargestellt ist.

### 3.6.3 Endogene Antigenpräsentation MCMV-OVA infizierter LSEC

Professionelle antigenpräsentierende Zellen präsentieren Antigene im Kontext mit MHC-Klasse-I Molekülen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen. Bei einer Infektion des Wirtsorganismus mit einem viralen Pathogen sind DC in der Lage, virale Antigene via Kreuzpräsentation in den MHC-Klasse-I Präsentationsweg einzuschleusen. Werden sie jedoch selbst infiziert, können sie die viralen Antigene in Form von selbst endogen synthetisierten Proteinen über MHC-Klasse-I Moleküle präsentieren.

Das rekombinante Virus MCMV-OVA (von Dr. T. Sacher im Labor von Prof. U. Koszinowski generiert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt; Max von Pettenkofer Institut, München) exprimiert das Modellantigen Ovalbumin unter Kontrolle des HCMV MIEP-Komplexes (*Major Immediate Early Promotor*). Nach Infektion mit MCMV-OVA wird das Modellantigen Ovalbumin in der Wirtszelle endogen exprimiert und kann so in Form

des resultierenden prozessierten Peptids SIINFEKL CD-8<sup>+</sup>-T-Zellen über das MHC-Klasse-I Molekül H-2K<sup>b</sup> präsentiert werden. Die Verwendung dieses Virus ermöglicht die Analyse der endogenen Antigenpräsentation eines viral kodierten Antigens nach Infektion von antigenpräsentierenden Zellen, wie beispielsweise LSEC.

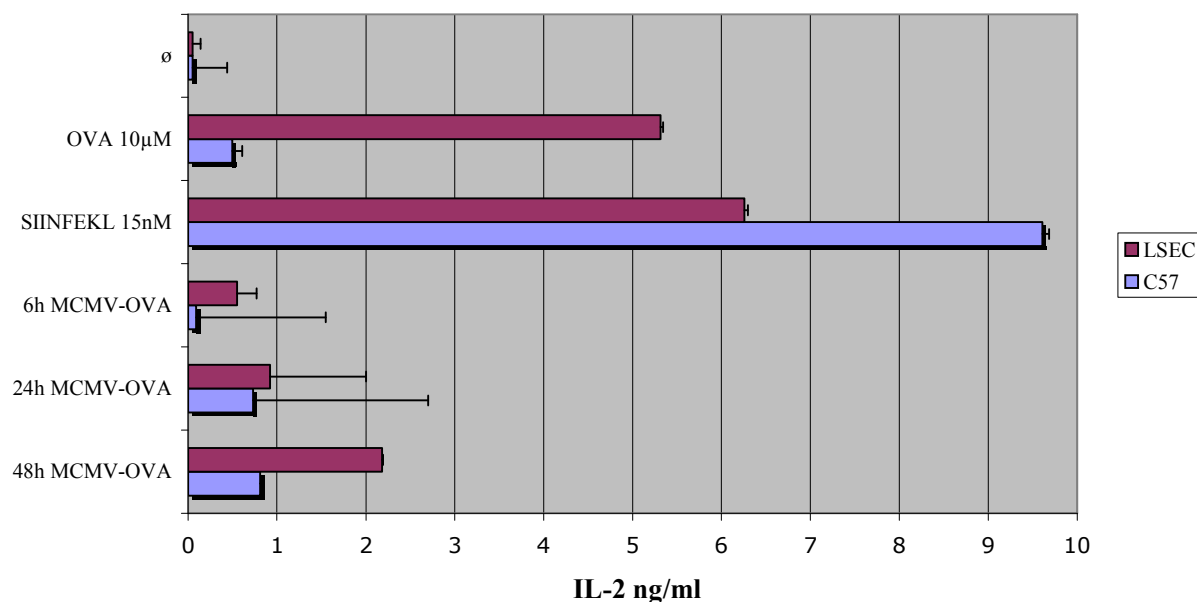
### **3.6.3.1 Kinetik der Antigenpräsentation MCMV-OVA infizierter LSEC**

Im Folgenden wurde untersucht, ob und zu welchem Zeitpunkt MCMV-OVA infizierte LSEC das prozessierte Ovalbuminpeptid SIINFEKL MHC-Klasse-I restringiert präsentieren.

LSEC und C57-K<sup>b</sup> Fibroblasten wurden mit MCMV-OVA (MOI 1) für 6, 24 und 48 Stunden infiziert. Daraufhin wurden die infizierten Zellen für 20 Stunden mit dem T-Zellhybridom B3Z kokultiviert. Der Zellüberstand wurde in einem ELISA auf IL-2 hin untersucht. Als Positivkontrolle dienten nicht infizierte Zellen, die für zwei Stunden entweder mit 10µM Ovalbumin oder aber mit 15nM SIINFEKL beladen wurden. Nicht infizierte, unbeladene Zellen dienten als Negativkontrolle.

Die Analyse ergab, dass LSEC das viral kodierte Modellantigen Ovalbumin bereits sechs Stunden nach Infektion über MHC-Klasse-I präsentieren. Die Menge an gemessenem IL-2 nimmt im Verlauf der Infektion von sechs auf achtundvierzig Stunden um das dreifache zu. Dies lässt auf Präsentation des viral kodierten Peptids in LSEC schließen. C57-K<sup>b</sup> Fibroblasten sind zwar in der Lage, SIINFEKL zu präsentieren, jedoch ist kein weiterer Anstieg der Antigenpräsentation in Form von IL-2 24h nach Infektion mit MCMV-OVA messbar. Dieses Ergebnis deckt sich mit Beobachtungen infizierter Fibroblasten, in denen nach 24h bereits MCMV-kodierte Gene exprimiert sind, welche den MHC-Klasse-I Präsentationsweg manipulieren. Auf LSEC scheinen diese immunsubversiven Gene, sofern sie überhaupt exprimiert werden, keinen Einfluss zu haben.

## Präsentationskinetik viral-kodierten Antigens



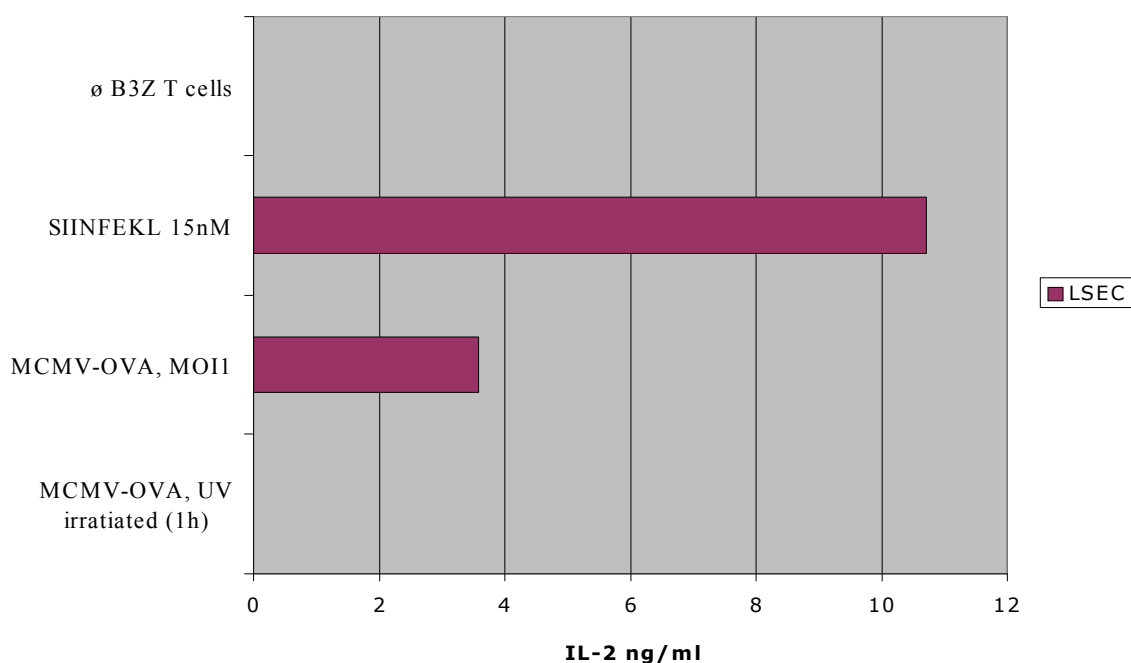
**Abb. 17:** Endogene Antigenpräsentation MCMV-OVA infizierter LSEC und C57-K<sup>b</sup> Fibroblasten für das T-Zellhybridom B3Z (Kinetik); LSEC wurden achtundvierzig Stunden nach Präparation mit MCMV-OVA (MOI 1) infiziert. Kontrollgruppen blieben uninfiziert. Die Fibroblasten wurden frisch ausgesät und entsprechend mit MCMV-OVA (MOI 1) infiziert. Im Zuge der kinetischen Analyse wurden die Zeitwerte 6, 24 und 48 Stunden nach Infektion untersucht. Die endogene Antigenpräsentation wurde indirekt über IL-2 Sekretion von B3Z im ELISA bestimmt. Es wurden jeweils Dreifachwerte pro Ansatz analysiert, wobei der Mittelwert im Diagramm dargestellt ist.

### 3.6.3.2 Notwendigkeit endogener Expression viraler Antigene für die Präsentation

LSEC sind nach Infektion mit MCMV-OVA in der Lage, das viral kodierte Modellantigen Ovalbumin in Form von MHC-Klasse-I Peptid-Komplexen, CD8<sup>+</sup>-T-Zellen zu präsentieren. Virale Proteine könnten jedoch auch Virion assoziiert ohne erforderliche *de novo* Genexpression in die Wirtszelle eingebracht werden (Kreuzpräsentation). Dies scheint jedoch sehr unwahrscheinlich zu sein, da die Expression des Modellantigens Ovalbumin durch den IE-Promotor gesteuert wird. IE-Genprodukte stellen keine viralen Strukturproteine dar, sondern Transkriptionsfaktoren.

Um diese Möglichkeit dennoch ausschließen zu können, wurde MCMV-OVA durch UV-Bestrahlung inaktiviert. UV-Exposition löst DNA-Strangbrüche und Mutationen im Genom aus, wodurch die virale Genexpression verhindert wird. Wird Ovalbumin bereits als Protein zusammen mit Virionen in die Wirtszelle eingeschleust, so würde man trotz UV-Bestrahlung MHC-Klasse-I Präsentation des Peptids SIINFEKL erwarten.

## Keine Antigenpräsentation durch UV-inaktiviertes MCMV-OVA



**Abb. 18:** Die endogene Antigenpräsentation MCMV-OVA infizierter LSEC für das T-Zellhybridom B3Z erfordert *de novo* Genexpression von Ovalbumin; LSEC wurden 48h nach Präparation mit MCMV-OVA (MOI 1) infiziert. Kontrollgruppen blieben uninfiziert. Die Fibroblasten wurden frisch ausgesät und entsprechend mit MCMV-OVA (MOI 1) infiziert. Inaktiviertes MCMV-OVA wurde durch einstündige UV-Exposition generiert. Die endogene Antigenpräsentation wurde indirekt über IL-2 Sekretion von B3Z im ELISA bestimmt.

LSEC wurden mit MCMV-OVA bzw. UV-inaktivierten MCMV-OVA (MOI 1) infiziert. Als Positivkontrolle dienten nicht infizierte Zellen, die für zwei Stunden mit 15nM SIINFEKL-Peptid beladen wurden. Unbeladene, nicht infizierte Zellen wurden als Negativkontrolle eingesetzt. Zwei Tage nach Infektion wurden die Zellen für 20 Stunden mit dem T-Zellhybridom B3Z kokultiviert und der resultierende Zellüberstand in einem ELISA auf IL-2 hin untersucht.

Die Analyse ergab, dass eine *de novo* Genexpression des viral kodierten Antigens Ovalbumin notwendig ist, um CD8<sup>+</sup>-T-Zellen nach Infektion antigenspezifisch stimulieren zu können. Die Inkubation von LSEC mit UV-inaktiviertem MCMV-OVA führt zu keiner messbaren T-Zellstimulation, wohingegen der Versuchsansatz mit replikationskompetentem Virus ein deutliches Signal liefert.



Die Infektion von LSEC mit MCMV führt nicht zu einem veränderten Expressionsprofil der immunologisch relevanten Oberflächenmoleküle wie Adhäsionsmoleküle (CD54, CD106; Abb.11), MHC-Klasse-I Moleküle (Abb.10) und kostimulatorische Moleküle (CD40, CD86; Abb.12). LSEC sind nach MCMV Infektion weiterhin zur Aufnahme löslichen Antigens fähig (Abb.13). Zudem können infizierte LSEC exogene Antigene mittels Kreuzpräsentation über MHC-Klasse-I Moleküle spezifischen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (B3Z T-Zellhybridom) präsentieren (Abb.14+15+16). Außerdem hat die Analyse eines viral kodierten Antigens in Form von rekombinantem MCMV-OVA gezeigt, dass LSEC nach Infektion in der Lage sind, endogene virale Antigene über MHC-Klasse-I zu präsentieren (Abb.17). Die Antigenpräsentation des viral kodierten Proteins setzt jedoch dessen *de novo* Genexpression nach Infektion voraus (Abb.18). Ein negativer parakriner Effekt infizierter Zellen auf die Präsentation nicht-infizierter LSEC in Mischpopulationen konnte nicht beobachtet werden.

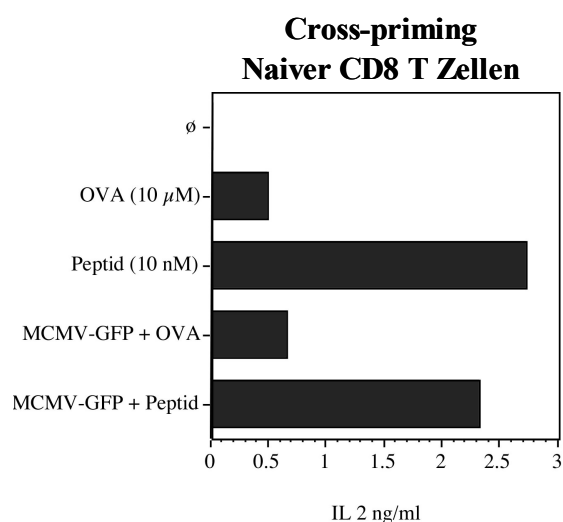
### **3.7 Kreuz-Priming und Kreuz-Toleranz für naive T-Zellen (*in vitro*)**

LSEC sind trotz Infektion (MCMV-GFP) in der Lage, sowohl exogene Antigene (Ovalbumin), als auch endogene, viral kodierte Antigene (MCMV-OVA) MHC-Klasse-I restringiert zu präsentieren. Um einen Hinweis auf die funktionellen Konsequenzen LSEC induzierter CD8<sup>+</sup>-Immunantworten zu bekommen, wurde die Analyse auf naive CD8<sup>+</sup>-T-Zellen aus OT-I Mäusen erweitert. OT-I Mäuse sind transgene Mäuse, deren transgener T Zellrezeptor spezifisch das aus dem Ovalbumin stammende SIINFEKL-Peptid (Ovalbumin<sup>257-264</sup>) im Kontext des MHC-Klasse-I Moleküls H-2K<sup>b</sup> erkennt. OT-I Mäuse besitzen nur CD8<sup>+</sup>-T-Zellen einer Spezifität (Hogquist 1994).

#### **3.7.1 Kreuz-Priming naiver CD8<sup>+</sup>-T-Zellen durch MCMV-infizierte LSEC**

LSEC wurden mit MCMV-GFP (MOI 1) infiziert. Zwei Tage nach Infektion wurden die APC mit löslichem Antigen (Ovalbumin 10µM) für 2 Stunden inkubiert und anschließend mit PBS gewaschen. Als Negativkontrolle dienten nicht infizierte Zellen bzw. nicht-infizierte unbeladene Zellen. Positivkontrollen stellten infizierte bzw. nicht-infizierte LSEC dar, die zuvor für 2 Stunden mit dem SIINFEKL-Peptid (10nM) inkubiert worden waren. Die APC wurden schließlich für 20h mit naiven OT-I CD8<sup>+</sup>-T-Zellen kokultiviert. Der Zellüberstand wurde daraufhin in einem ELISA auf IL-2 hin untersucht. Beim Vergleich infizierter mit nicht infizierten LSEC ist keine Reduktion der Antigenpräsentation in Form von IL-2 messbar.

Aufgrund der Beobachtungen in den Experimenten 3.4 und 3.6.2 kann davon ausgegangen werden, dass infizierte LSEC in der Lage sind, naive T-Zellen zu stimulieren, da infizierte LSEC weder phänotypische Veränderungen ihrer Oberflächenmoleküle, noch eine defiziente Antigenpräsentation aufweisen. Zudem kann in diesem Experiment kein negativer parakriner Effekt auf die Kreuzpräsentation festgestellt werden.



**Abb. 19:** Kreuz-Priming naiver CD8<sup>+</sup>-T-Zellen durch MCMV-GFP-infizierte LSEC; LSEC wurden mit MCMV-GFP (MOI 1) infiziert. Zwei Tage nach Infektion wurden die APC mit löslichem exogenem Antigen (Ovalbumin 10µM) für 2 Stunden inkubiert und anschließend mit PBS gewaschen. Als Negativkontrolle dienten nicht infizierte Zellen bzw. nicht infizierte unbeladene Zellen. Positivkontrollen stellten infizierte bzw. nicht-infizierte LSEC dar, die zuvor für 2 Stunden mit dem SIINFEKL-Peptid (10nM) inkubiert worden waren. Danach wurden die Zellen mit naiven OT-I CD8<sup>+</sup>-T-Zellen für 20 Stunden kokultiviert. Der Zellüberstand wurde in einem ELISA auf IL-2 hin untersucht.

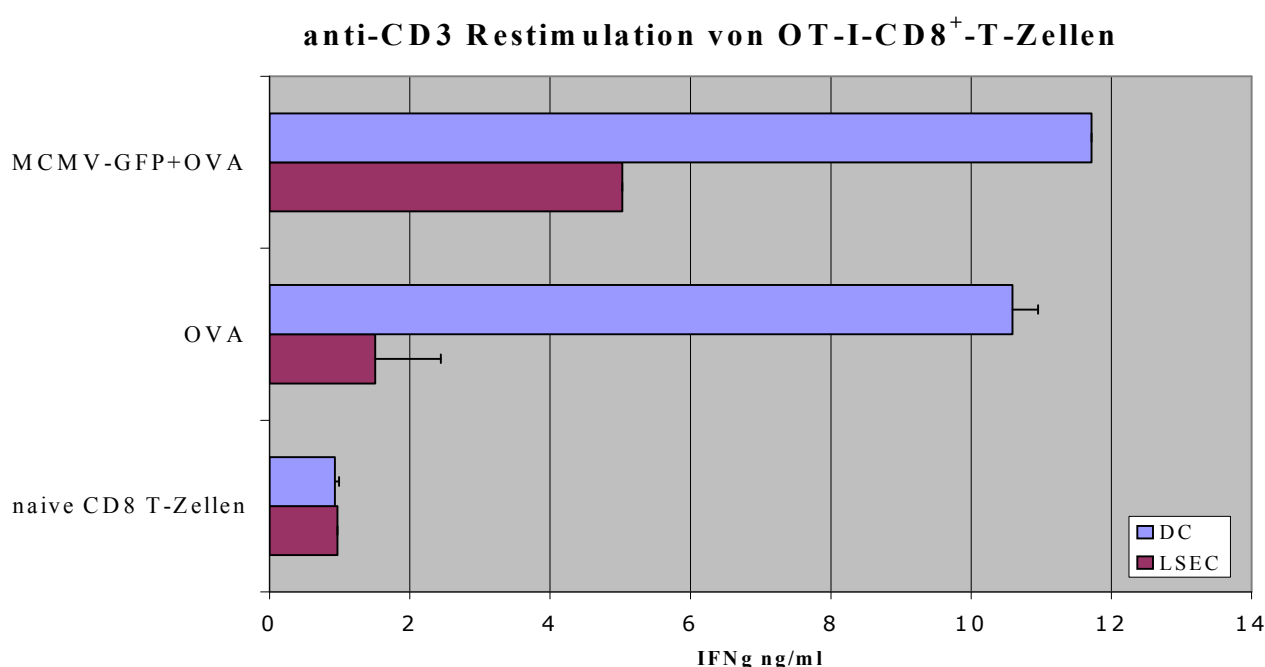
### 3.7.2 Kreuz-Toleranz naiver CD8<sup>+</sup>-T-Zellen durch MCMV-infizierte LSEC und DC

In den folgenden Experimenten sollte ein Vergleich von LSEC mit professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APC), nämlich dendritischen Zellen (DC) gezogen werden, um einen Hinweis auf die Konsequenzen der APC vermittelten Immunantwort nach Infektion mit MCMV zu erhalten. DC wurden daher aus den Milzen von C57BL/6 Mäusen über den DC-Marker CD11c mittels magnetischen Kügelchen isoliert.

LSEC und DC wurden mit MCMV-GFP (MOI 1) infiziert. Als Negativkontrolle dienten nicht infizierte Zellen bzw. nicht infizierte unbeladene Zellen. Zwei Tage nach Infektion wurden die APC mit löslichem exogenem Antigen (Ovalbumin 10µM) für 2 Stunden inkubiert und anschließend mit PBS gewaschen. Als Kontrollansatz dienten unbeladene, nicht infizierte APC. Die APC wurden schließlich für fünf Tage mit naiven OT-I CD8<sup>+</sup>-T-Zellen kokultiviert. Die OT-I CD8<sup>+</sup>-T-Zellen wurden dann für 20 Stunden durch anti CD3 Antikörper restimuliert

und der Zellüberstand daraufhin in einem ELISA auf  $\text{IFN}\gamma$  als Indiz einer zytotoxischen T-Zellantwort hin untersucht.

Vergleicht man die aus der Restimulation resultierende  $\text{IFN}\gamma$ -Antwort naiver OT-I  $\text{CD8}^+$ -T-Zellen für die Präsentation exogener Antigene infizierter bzw. nicht infizierter DC und LSEC, so zeigt sich, dass dendritische Zellen eine starke zytotoxische T-Zellantwort in OT-I  $\text{CD8}^+$ -T-Zellen induzieren. Die gemessenen  $\text{IFN}\gamma$ -Messwerte in den Versuchsansätzen mit MCMV-GFP infizierten DC übersteigen die der entsprechenden LSEC um das zwei- bis dreifache. Beim Vergleich infizierter mit nicht infizierten LSEC ist jedoch auffällig, dass die Infektion mit MCMV-GFP zu einem dreifach höheren  $\text{IFN}\gamma$ -Messwert führt.



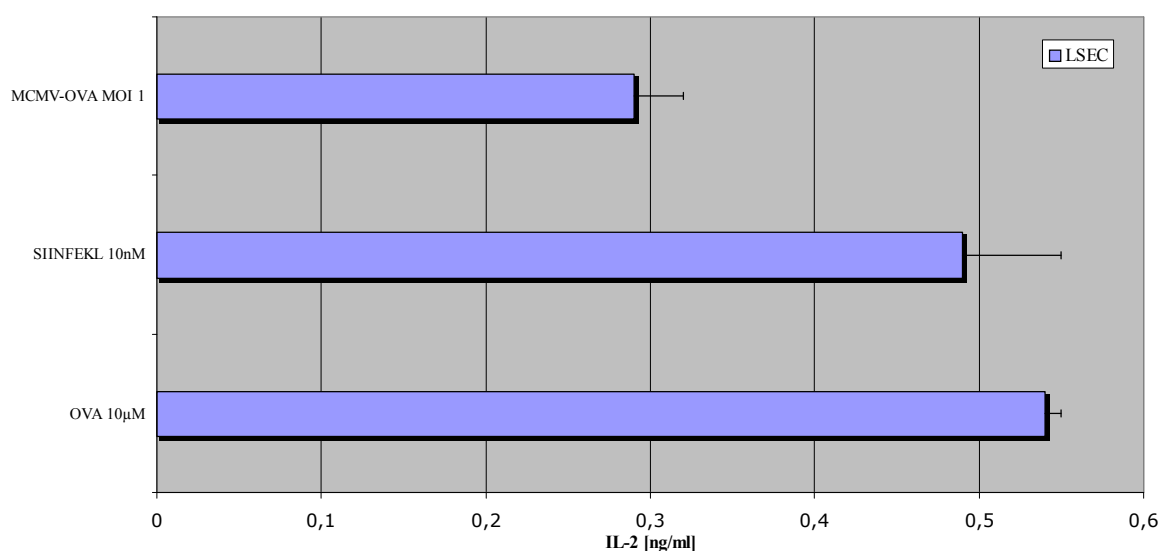
**Abb. 20:** Kreuz-Toleranz naiver  $\text{CD8}^+$ -T-Zellen durch MCMV-GFP-infizierte LSEC führt zu verminderter  $\text{IFN}\gamma$ -Produktion durch OT-I  $\text{CD8}^+$ -T-Zellen; LSEC und DC (aus Milz) wurden mit MCMV-GFP (MOI 1) infiziert. Als Negativkontrolle dienten nicht infizierte Zellen bzw. nicht infizierte unbeladene Zellen. Zwei Tage nach Infektion wurden die APC mit löslichem exogenem Antigen (Ovalbumin  $10\mu\text{M}$ ) für 2h inkubiert und anschliessend mit PBS gewaschen. Die APC wurden fünf Tage mit naiven OT-I  $\text{CD8}^+$ -T-Zellen kokultiviert. Die OT-I T-Zellen wurden danach für 20 Stunden durch anti CD3 Antikörper restimuliert und der Zellüberstand daraufhin in einem ELISA auf  $\text{IFN}\gamma$  hin untersucht. Es wurden jeweils Doppelwerte pro Ansatz analysiert, wobei der Mittelwert im Diagramm dargestellt ist.

### 3.7.3 Priming naiver $\text{CD8}^+$ -T-Zellen durch MCMV-OVA infizierte LSEC

LSEC wurden mit MCMV-OVA (MOI 1) infiziert. Als Kontrollansätze dienten nicht infizierte Zellen. Zwei Tage nach Infektion wurden die nicht infizierten APC einerseits mit löslichem exogenem Antigen (Ovalbumin  $10\mu\text{M}$ ), andererseits mit Peptid ( $10\text{nM}$  SIINFEKL)

für 2 Stunden inkubiert und anschliessend mit PBS gewaschen. Die APC wurden schliesslich für 20h mit naiven OT-I CD8<sup>+</sup>-T-Zellen kokultiviert. Als Negativkontrolle wurden nicht infizierte, unbeladene LSEC mit OT-I CD8<sup>+</sup>-T-Zellen kokultiviert. Der Zellüberstand wurde daraufhin in einem ELISA auf IL-2 hin untersucht. Beim Vergleich infizierter mit nicht infizierten LSEC zeigt sich, dass MCMV-OVA infizierte LSEC naive OT-I CD8<sup>+</sup>-T-Zellen antigenspezifisch stimulieren können.

### Priming naiver CD8<sup>+</sup>-T-Zellen durch MCMV-OVA infizierte LSEC



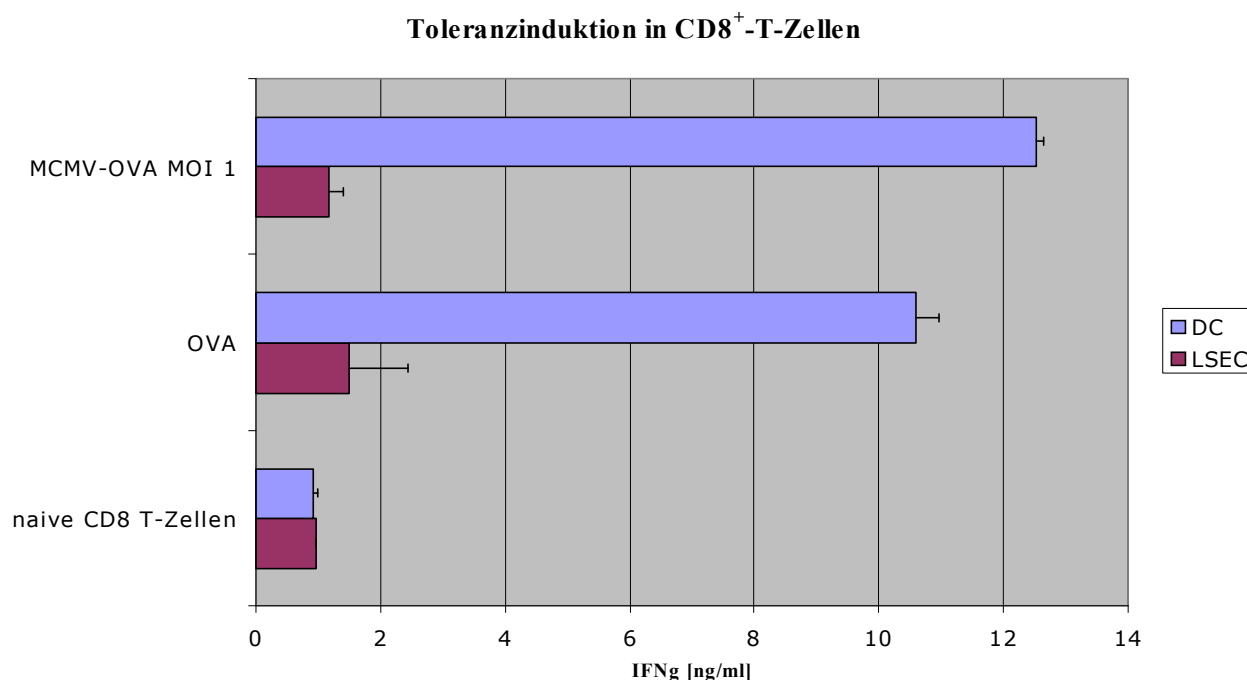
**Abb. 21:** **Priming naiver T-Zellen durch MCMV-OVA infizierte LSEC;** LSEC wurden mit MCMV-OVA (MOI 1) infiziert. Als Kontrollansätze dienten nicht infizierte Zellen. Zwei Tage nach Infektion wurden die nicht infizierten APC einerseits mit löslichem exogenem Antigen (Ovalbumin 10µM), andererseits mit Peptid (10nM SIINFEKL) für 2 Stunden inkubiert. Danach erfolgte die Kokultur von APC mit naiven OT-I CD8<sup>+</sup>-T-Zellen für 20h. Als Negativkontrolle wurden nicht infizierte, unbeladene LSEC mit T-Zellen kultiviert. Die Zellüberstände wurden in einem ELISA auf IL-2 hin analysiert. Die ermittelten Messwerte der Negativkontrolle sind im Diagramm verrechnet. Es wurden jeweils Doppelwerte pro Ansatz analysiert, wobei der Mittelwert im Diagramm dargestellt ist.

### 3.7.4 Toleranzinduktion in naiven CD8<sup>+</sup>-T-Zellen durch MCMV-OVA infizierte LSEC

LSEC sind in der Lage, periphere Immuntoleranz gegenüber löslichen exogenen Antigenen zu induzieren (Limmer 2000). Die Präsentation exogener Antigene (*Cross-Priming*) nach Infektion von LSEC mit MCMV-GFP führt verglichen mit dendritischen Zellen zu einer deutlich reduzierten IFN $\gamma$ -Ausschüttung durch naive OT-I CD8<sup>+</sup>-T-Zellen. Wie verhält sich jedoch die T-Zellantwort im Falle eines endogenen viral kodierten Antigens, nämlich Ovalbumin (MCMV-OVA)?

LSEC und DC (aus der Milz) wurden mit MCMV-OVA (MOI 1) infiziert. Als Negativkontrolle dienten nicht infizierte Zellen. Die APC wurden schließlich für fünf Tage mit naiven OT-I CD8<sup>+</sup>-T-Zellen kokultiviert. Die OT-I T-Zellen wurden dann für 20 Stunden via anti CD3 Antikörper restimuliert und der Zellüberstand in einem ELISA auf IFN $\gamma$  als Anzeichen einer zytotoxischen T-Zellantwort hin untersucht. Nicht infizierte LSEC bzw. DC, die mit für zwei Stunden mit dem löslichen Antigen Ovalbumin (10 $\mu$ M) inkubiert wurden, dienten als Kontrollansätze.

Beim Vergleich der Stimulation von naiven CD8<sup>+</sup>-T-Zellen durch tolerogene LSEC bzw. immunstimulatorische DC ist ein deutlicher Unterschied in der T-Zellantwort zu beobachten, T-Zellen, die mit LSEC kultiviert worden waren, weisen eine deutlich verminderte IFN $\gamma$ -Sekretion auf. Stimulation durch MCMV-OVA infizierte DC hingegen führt zu einer starken IFN $\gamma$ -Antwort. Die Kontrollansätze mit nicht infizierten, jedoch Antigen beladenen APC spiegeln die Ergebnisse infizierter APC wider. Antigen-spezifische Stimulation von naiven CD8<sup>+</sup>-T-Zellen durch LSEC führt im Gegensatz zu DC zu Toleranzinduktion.



**Abb. 22:** **Priming naiver CD8<sup>+</sup>-T-Zellen durch MCMV-OVA infizierte LSEC führt zur Induktion von CD8<sup>+</sup>-T-Zelltoleranz *in vitro*;** LSEC und DC (aus Milz) wurden mit MCMV-OVA (MOI 1) infiziert. Als Negativkontrolle dienten nicht infizierte Zellen bzw. nicht infizierte unbeladene Zellen. Die Zellen wurden für fünf Tage mit naiven OT-I CD8<sup>+</sup>-T-Zellen kokultiviert. Danach wurden die OT-I CD8<sup>+</sup>-T-Zellen für 20h via anti CD3 Antikörper restimuliert. Aus dem Zellüberstand wurde die Menge an IFN $\gamma$  in einem ELISA quantifiziert. Es wurden jeweils Doppelwerte pro Ansatz analysiert, wobei der Mittelwert im Diagramm dargestellt ist.

Die funktionelle Analyse der Antigenpräsentation MCMV infizierter LSEC und der damit verbundenen Konsequenzen für die daraus resultierende T-Zellantwort naiver CD8<sup>+</sup>-T-Zellen konnte zeigen, dass die tolerogene Funktion von LSEC durch Infektion mit MCMV unbeeinträchtigt bleibt. Sowohl die Präsentation exogener Antigene (*Cross-Priming*) durch infizierte LSEC (Abb.19), als auch die Präsentation viral kodierter endogener Antigene (Abb.21) führt zur Induktion von T-Zelltoleranz in naiven CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (Abb.20+22).

### **3.8 *In vivo* Toleranzinduktion durch MCMV-OVA infizierte LSEC in einem adoptiven Transferexperiment (Pilotexperiment)**

Die antigenspezifische Stimulation naiver CD8<sup>+</sup>-T-Zellen durch LSEC führt zur Induktion von Immuntoleranz (Limmer 2000). In einem *in vivo* Pilotexperiment sollte untersucht werden, ob die Infektion von LSEC mit rekombinantem MCMV-OVA zur Induktion antigenspezifischer Immuntoleranz führt.

Drei verschiedene Versuchsansätze kamen in diesem Experiment zum Einsatz:

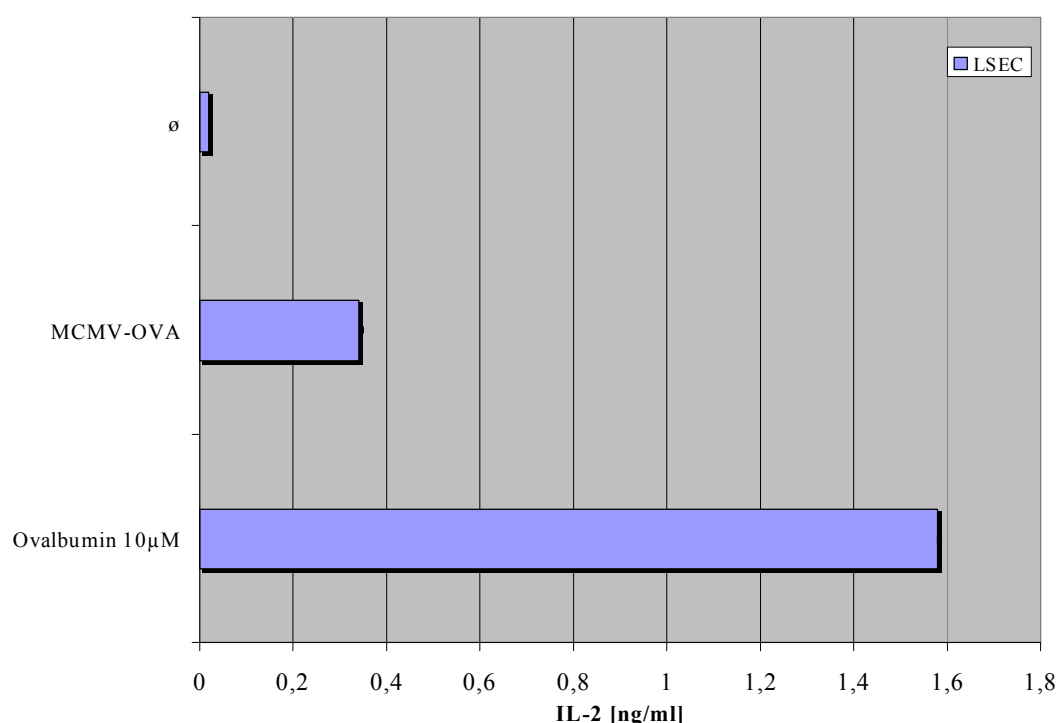
1. Adoptiver Transfer von MCMV-OVA (MOI 0.1) infizierten LSEC ( $5 \times 10^6$ )
2. Adoptiver Transfer von Ovalbumin beladenen LSEC ( $5 \times 10^6$ )
3. Die systemische Infektion mit MCMV-OVA ( $2 \times 10^5$ )

LSEC ( $5 \times 10^6$ ) wurden für zwei Stunden mit MCMV-OVA (MOI 0.1) infiziert oder aber für zwei Stunden mit löslichen Antigen inkubiert (Ovalbumin 10 $\mu$ M) bevor sie zusammen mit OT-I CD8<sup>+</sup>-T-Zellen ( $5 \times 10^6$ ) in eine RAG2<sup>-/-</sup> Maus adoptiv transferiert. Einen weiteren Versuchsansatz stellte eine RAG2<sup>-/-</sup> Maus dar, die neben der Rekonstitution mit CD8<sup>+</sup>-T-Zellen ( $5 \times 10^6$ ) mit  $2 \times 10^5$  MCMV-OVA i.p. infiziert wurde. Als Kontrolle wurde eine RAG2<sup>-/-</sup> Maus lediglich mit antigenspezifischen OT-I CD8<sup>+</sup>-T-Zellen rekonstituiert, um die natürliche Zytotoxizität der transferierten naiven T-Zellen zu bestimmen. Unter Berücksichtigung von Experiment 3.2.1 wurden beim Transfer infizierter LSEC etwa  $4.5 \times 10^5$  Viren transferiert.

Zum Zeitpunkt des Transfers wurden MCMV infizierte, sowie mit Antigen beladene (Ovalbumin 10 $\mu$ g) LSEC für 20h mit naiven OT-I CD8<sup>+</sup>-T-Zellen kokultiviert. Diese Ansätze wurden parallel zum adoptiven Transfer durchgeführt, um zu überprüfen, ob die transferierten

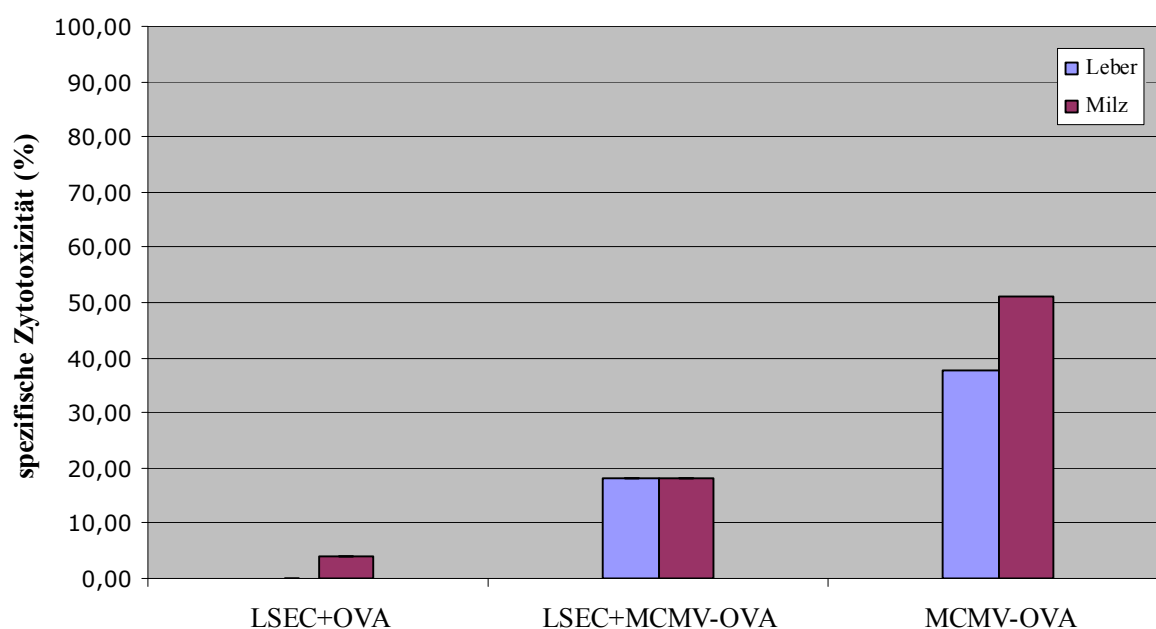
Zellpopulationen fähig sind, CD8<sup>+</sup>-T-Zellen zu stimulieren. Der resultierende Zellüberstand wurde in eine ELISA auf IL-2 hin untersucht. Wie in Abbildung 23 zu sehen ist, sind die transferierten LSEC in den Versuchsansätzen mit MCMV-OVA infizierten LSEC, als auch in demjenigen Ansatz mit Ovalbumin beladenen nicht-infizierten LSEC in der Lage, naive OT-I CD8<sup>+</sup>-T-Zellen antigenspezifisch zu stimulieren.

#### Antigenpräsentation von LSEC vor Transfer



**Abb. 23:** Analyse der Antigenpräsentation zum Zeitpunkt des adoptiven Transfers; MCMV-OVA infizierte LSEC (MOI 0.1), Ovalbumin (10µM) beladene LSEC sowie nicht-infizierte unbeladene LSEC wurden für 20h mit naiven OT-I CD8<sup>+</sup>-T-Zellen kokultiviert. Der Zellüberstand wurde in einem ELISA auf IL-2 hin analysiert. Im Diagramm ist die Menge an IL-2 in ng/ml aufgetragen.

Fünf Tage später erfolgte die Analyse in einem *in vivo* Zytotoxizitätstest gegen syngene Milzzellen ( $1 \times 10^7$ /Maus) aus C57BL/6 Mäusen. Die Hälfte der Milzzellen ( $5 \times 10^6$  Zellen) wurde mit 0.1µM CFSE markiert, wohingegen die andere Hälfte ( $5 \times 10^6$  Zellen) mit dem Peptid SIINFEKL beladenen und mit 10µM CFSE angefärbt wurde. Anschließend wurden die Milzzellen intravenös injiziert, wobei die mit Antigen (SIINFEKL) beladenen Milzzellen spezifische Zielzellen darstellen. Die injizierten Zellen ließen sich *ex vivo* von den endogenen Zellen an Hand der CFSE Markierung differenzieren. Nach vier Stunden wurden Milz und Leber entnommen und die spezifische Zytotoxizität mittels FACS ermittelt.

***In vivo* Zytotoxizität 5 Tage nach Infektion mit MCMV-OVA**

**Abb. 24:** *In vivo* Zytotoxizitätstest 5 Tage nach adoptivem Transfer in Milz und Leber (n=1); LSEC wurden mit MCMV-OVA (MOI 0.1) infiziert oder aber mit löslichem Antigen (Ovalbumin 10 $\mu$ M) inkubiert. Zwei Stunden nach Inkubation bzw. Infektion wurden die MCMV-OVA infizierten LSEC ( $5 \times 10^6$ ) bzw. die Ovalbumin beladenen LSEC ( $5 \times 10^6$ ) zusammen mit jeweils  $5 \times 10^6$  OT-I CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in RAG2<sup>-/-</sup> Mäuse i.v. injiziert. Einen weiteren Versuchsansatz stellte eine RAG2<sup>-/-</sup> Maus dar, die neben der Rekonstitution mit CD8<sup>+</sup>-T-Zellen ( $5 \times 10^6$ ) mit  $2 \times 10^5$  MCMV-OVA i.p. infiziert wurde. Als Kontrollansatz diente eine Maus, die lediglich mit OT-I CD8<sup>+</sup>-T-Zellen rekonstituiert wurde. Fünf Tage später erfolgte die Analyse in einem *in vivo* Zytotoxizitätstest gegen syngene Milzzellen ( $1 \times 10^7$ /Maus) aus C57BL/6 Mäusen. Die Hälfte der Milzzellen ( $5 \times 10^6$  Zellen) wurde mit 0.1 $\mu$ M CFSE markiert, wohingegen die andere Hälfte ( $5 \times 10^6$  Zellen) mit dem Peptid SIINFEKL beladenen und mit 10 $\mu$ M CFSE angefärbt wurde. Anschließend wurden die Milzzellen intravenös injiziert. Vier Stunden nach Injektion wurden Milz und Leber entnommen und die spezifische Zytotoxizität mittels FACS ermittelt.

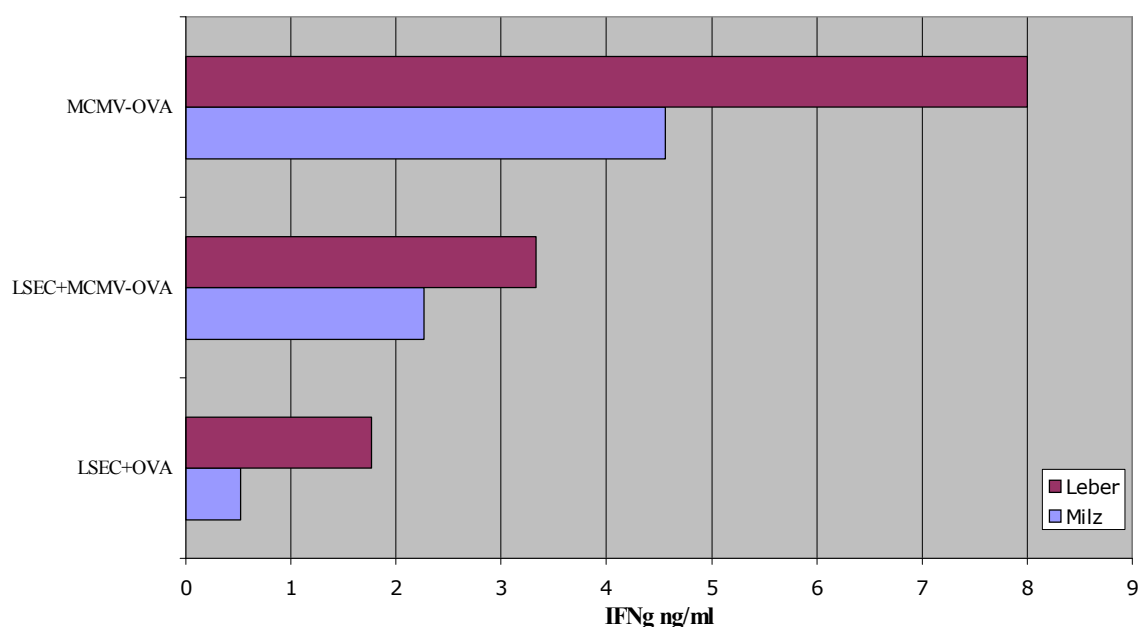
Der Vergleich Antigen beladener mit nicht beladenen Zellen ermöglicht eine Aussage über die spezifische Zytotoxizität. Der adoptive Transfer von OT-I CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in einen lymphopenischen Empfänger hat eine homeostatische Proliferation dieser Zellen zur Folge. Dadurch werden die Zellen aktiviert und weisen eine spezifische Zytotoxizität von 30-40% auf (persönliche Mitteilung Dr. Andreas Limmer; IMMEI, Bonn). Die Kontrollmaus, die lediglich mit naiven OT-I CD8<sup>+</sup>-T-Zellen rekonstituiert worden war, ist im Verlauf des Experiments verstorben, weshalb sich eine Auswertung des Experiments schwierig gestaltet. Geht man jedoch in einer rekonstituierten Kontrollmaus von einer basalen Zytotoxizität von 30-40% aus, so zeigt sich, dass OT-I CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, die durch MCMV-OVA infizierte LSEC oder durch Ovalbumin beladene LSEC stimuliert worden sind, eine verminderte Zytotoxizität



aufweisen. Eine systemische Infektion mit MCMV-OVA dagegen führt zu einer spezifischen zytotoxischen Immunantwort.

Nach Isolation der Zielzellen aus Milz und Leber wurden jeweils  $1 \times 10^5$  OT-I CD8<sup>+</sup>-T-Zellen der unterschiedlichen Versuchsansätze für 20h mittels anti CD-3 Antikörper restimuliert. Die Zellüberstände wurden daraufhin in einem ELISA auf das Vorhandensein von IFN $\gamma$  hin analysiert. Wie in Abbildung 25 zu sehen ist sekretieren OT-I CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, die durch infizierte oder Ovalbumin beladene LSEC stimuliert wurden, kaum IFN $\gamma$ . OT-I CD8<sup>+</sup>-T-Zellen aus dem Versuchsansatz der systemischen MCMV Infektion dagegen weisen eine starke IFN $\gamma$  Sekretion auf. Die Daten der Restimulation untermauern die bereits dargestellten Ergebnisse der spezifischen Zytotoxizität. Trotz der fehlenden relevanten Kontrollmaus, geht aus den Daten ein klarer Hinweis in Richtung T-Zelltoleranz durch MCMV-OVA infizierte LSEC hervor. Die Infektion von LSEC mit MCMV-OVA scheint *in vivo* zur Induktion antigenspezifischer CD8<sup>+</sup>-T-Zelltoleranz zu führen, wohingegen eine systemische Infektion in der Induktion einer zytotoxischen Immunantwort gipfelt. Der Versuchsansatz mit Ovalbumin beladenen LSEC bestätigt die bereits veröffentlichten Daten von Limmer *et al.* (Limmer 2000).

### anti-CD3 Restimulation



**Abb. 25:** **Anti CD3 Restimulation 5 Tage nach adoptivem Transfer;** Nach Isolation aus Milz und Leber wurden die OT-I CD8<sup>+</sup>-T-Zellen für 20h mittels anti CD3 Antikörper restimuliert. Aus dem Zellüberstand wurde die Menge an IFN $\gamma$  in einem ELISA quantifiziert. Im Diagramm ist die ermittelte Menge an IFN $\gamma$  in ng/ml aufgetragen.

Das Pilotexperiment hat gezeigt, dass die Infektion von LSEC mit MCMV-OVA zur Präsentation viral kodierter Antigene nach adoptivem Transfer *in vivo* führt. Die funktionellen Konsequenzen der Präsentation viraler Antigene sprechen für die Induktion von systemischer CD8<sup>+</sup>-T-Zelltoleranz *in vivo*. Im Gegensatz zu einer systemischen Infektion führt die Antigenpräsentation viraler Proteine durch LSEC in sowohl Leber, als auch Milz zu einer reduzierten spezifischen Zytotoxizität der OT-I CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, mit der ein Verlust der zytotoxischen Effektorfunktion in Form von IFN $\gamma$  einhergeht. Die Daten deuten auf eine *in vivo* Relevanz MCMV infizierter LSEC im Kontext eines passiven viralen Evasionsmechanismus hin.

## **4. DISKUSSION**

### **4.1 Infektion von LSEC mit murinem Zytomegalievirus (MCMV)**

Zytomegalieviren (CMV) haben eine Reihe von Strategien entwickelt, um einer Immunantwort des Wirtsorganismus zu entgehen. Trotz dieser Tatsache scheint das Immunsystem immunkompetenter infizierter Individuen eine überlegene Rolle im Kampf gegen eingedrungene pathogene Mikroorganismen wie CMV zu spielen. Zytomegalieviren sind jedoch in der Lage, nach Resolution der Primärinfektion durch das Immunsystem im Wirtsorganismus zu verbleiben. Dabei verstecken sich Zytomegalieviren in Wirtszellen, indem sie die virale Replikation erliegen lassen. Dieser Zustand wird als Latenz bezeichnet (Reddehase 2002; Jarvis 2002; Mocarski, Kapitel 76, Fields in Virology 4.Auflage). In Zeiten geschwächter Immunität des Wirtsorganismus kommt es zu sporadischen endogenen Reaktivierungsereignissen der weit zurückliegenden Primärinfektion, die in produktive Infektion übergehen können (Hummel 2002; Gonczol 1985; Shanley 1979). Eine kontinuierliche Überwachung durch das Immunsystem ist daher von entscheidender Bedeutung, um eine vorhandene Infektion mit CMV in Schach zu halten. Dadurch wird eine opportunistische Adaptation von Zytomegalieviren an den spezifischen Wirtsorganismus deutlich.

In etwa 50-70% der Bevölkerung sind seropositiv für humanes Zytomegalievirus (HCMV). In Entwicklungsländern liegt der Prozentsatz CMV-positiver Individuen bei 100% (de Jong 1998). Die Infektion mit HCMV ist verantwortlich für CID (Cytomegalic Inclusion Disease), die durch kongenitale Infektion des Embryo oder Fötus verursacht wird (Jahn 1988). CID tritt entweder bei Primärinfektion der Mutter oder bei Infektion mit einem anderen Virusstamm auf (Boppana 2001). Kennzeichen von CID sind Vergrößerungen von Milz und Leber (Hepatosplenomegalie), Lungenentzündung, Retinitis, Mikroencephalie und Hepatitis. Mildere Fälle von CID sind gekennzeichnet durch lebenslange neurologische Schäden, wie geistige Retardierung, Blindheit und Taubheit (Pass 2001, Fields in Virology 4.Auflage).

Für gewöhnlich stellt die Infektion mit CMV keine Gefahr dar, da die postnatale Infektion von Kindern harmlos verläuft und die Primärinfektion von erwachsenen Individuen zumeist von einer unauffälligen Mononukleose begleitet wird. Somit verläuft die Infektion von immunkompetenten Individuen asymptomatisch. Vollkommen anders sieht die Situation bei

Kleinkindern und Föten, die noch kein ausgebildetes Immunsystem besitzen, oder aber bei immunsupprimierten Individuen aus. Neben dem Auftreten von CID bei immunologisch 'unreifen' Kindern, stellt die Infektion mit CMV ein schweres Gesundheitsrisiko bei AIDS-Patienten und Transplantatempfängern dar. Lungenentzündung, Hepatitis und Abstoßung von Transplantaten sind bekannte klinisch manifestierte Indikationen einer CMV-Infektion.

Betrachtet man die speziesspezifischen Vertreter der Zytomegalieviren (*β-Herpesviridae*), so ist eine relativ hohe Übereinstimmung innerhalb ihren genomischen Sequenzen (50-100%) evident (Karlin 1994). Funktionell weisen HCMV und MCMV sowohl Übereinstimmungen, als auch Unterschiede auf. Beide Vertreter der *β-Herpesviridae* haben sich im Laufe der Koevolution unabhängig voneinander an ihren spezifischen Wirt angepasst. Trotzdem sind Parallelen nicht von der Hand zu weisen, was beispielsweise anhand der ausgeklügelten Immunevasionsmechanismen deutlich wird. Zur Analyse des Infektionsverlaufs und der Immunantwort des infizierten Wirtsorganismus bieten sich daher Studien am Mausmodell an.

Zytomegalieviren verbreiten sich von einem Wirtsorganismus zum anderen über infizierte Körpersekrete, wie beispielsweise Speichel und Urin (Britt 1990). Speichelsekret scheint eine besondere Rolle bei der Übertragung zu spielen, da das Virus einen spezifischen Tropismus für Speicheldrüsen besitzt (Ho 1991, Cytomegalovirus: Biology and Infection, 2. Auflage).

Nach einer Infektion verbreitet sich CMV über das Blut und gelangt so zu den verschiedenen Organen wie Niere, Milz, Herz, Lunge, Darm und Leber (Sinzger 1996). Wie das Virus nach Primärinfektion in das Blut gelangt, ist noch unklar. Es konnte jedoch im Mausmodell gezeigt werden, dass die intraperitoneale Inokulation von rekombinantem MCMV-lacZ zur Replikation in Makrophagen und Mesothelzellen im Peritoneum führt. Bereits 24h nach Infektion konnte zellassoziertes Virus detektiert werden, welches durch Phagozyten in Milz und Leber transportiert wurde (Stoddart 1994).

Im Blut zirkulierendes Virus passiert die Leber 200-300 Mal tagtäglich. In den hepatischen Sinusoiden trifft es auf sinusoidale Endothelzellen der Leber (LSEC). Während der natürlichen Infektion mit HCMV stellen Fibroblasten, Epithelzellen, Makrophagen, glatte Muskelzellen und Endothelzellen Ziele produktiver Infektion dar (Sinzger 1995). Trotz der Tatsache, dass Fibroblasten gewöhnlich zur Isolation und Propagation von CMV benutzt werden, konnten Studien belegen, dass *ex vivo* isoliertes HCMV bevorzugt in Endothelzellen repliziert (Sinzger 1999; Waldman 1991; Woodroffe 1997). Einen weiteren Beweis konnten

Koffron *et al.* durch den Einsatz von PISH (PCR-ISH - *Polymerase Chain Reaction - In Situ Hybridization*) und Fluoreszenzmikroskopie zur Lokalisation von viraler DNA und Zellen liefern. Die identifizierten Zellen waren ihrer Lokalisation zufolge Endothelzellen zuzuordnen und konnten in Niere, Herz, Milz und Leber nachgewiesen werden (Koffron 1998). Ein spezifischer Endothelzelltropismus wurde ebenfalls von Brune *et al.* beschrieben. Das MCMV-Gen *M45* weist eine Sequenzhomologie mit Ribonukleotidreduktasegenen auf und verhindert Apoptose infizierter vaskulärer Endothelzellen (Brune 2001). Im Gegensatz dazu konnte für das homologe Gen *UL45* von HCMV gezeigt werden, dass es nicht zur produktiven Infektion von Endothelzellen benötigt wird (Hahn 2002). Neuere Studien konnten jedoch einen anderen Genlokus im HCMV-Genom identifizieren (*UL128*, *UL130* und *UL131*), der für einen Endothelzelltropismus verantwortlich ist (Hahn 2004). Aus der Transplantationschirurgie gibt es zudem aktuelle Berichte, die belegen, dass LSEC permissiv für HCMV sind (Bissinger 2004). Es ist jedoch anzumerken, dass sich die Interpretation von Bissinger *et al.* auf die Detektion von IE-Genexpression, nukleären Einschlusskörperchen und viralen Nukleokapsidantigenen stützt. Ob es sich um eine produktive Infektion handelt, wurde nicht gezeigt.

Die Analyse der Permissivität von murinen LSEC hat gezeigt, dass die Inkorporation von Virionen äußerst effizient erfolgt (Kapitel 3.2.1). Durch den Einsatz des rekombinanten Virus MCMV-GFP konnte Genexpression in Form von GFP gemessen werden, welches unter Kontrolle des viralen IE-2 Promotors steht. Die virale Genexpression scheint jedoch nicht alle Gene zu umfassen, da kein Nachkommenvirus im Überstand infizierter LSEC detektiert werden kann (Kapitel 3.2.2). Dieses Ergebnis spricht für eine abortive Infektion. RT-PCR und Western Blot stellen molekularbiologische Methoden dar, um die virale Genexpression nach Infektion von LSEC sowohl auf Transkriptions-, als auch auf Translationsebene zu untersuchen. Durch den Einsatz dieser Methoden wäre es möglich, die Stadien viraler Genexpression in infizierten LSEC zu verfolgen und zu definieren.

Trotz der effizienten Aufnahme viraler Partikel aus dem Medium, entspricht die anhand des Infektionsmarkers GFP ermittelte Infektionsrate von 13% (LSEC MOI 1) verglichen mit Fibroblasten (C57-K<sup>b</sup>, 53% GFP positiv, MOI 1) nicht den Erwartungen (Kapitel 3.1.1). Die beobachtete Diskrepanz könnte in der Konfluenz der untersuchten Zellen begründet sein, die durch deren Teilungsrate festgelegt ist. LSEC befinden sich im Gegensatz zu der analysierten Fibroblastenlinie in einem postmitotischen quieszenten Zustand, wodurch die produktive Infektion von LSEC offensichtlich eingeschränkt wird. Mit einer Erhöhung des Inokulums um

den Faktor drei konnte jedoch die Infektionsrate von LSEC auf 40% gesteigert werden. Eine mögliche Erklärung dieses Befundes würde ein Übermaß an zellgebundenem Virus darstellen, welches somit nicht mehr für die Infektion zur Verfügung stehen würde. Eine Quantifizierung zellassoziierter Virionen wäre durch Antikörper möglich, die gegen virale Hüllmembranglykoproteine gerichtet sind, oder aber durch Isolation der Membranen infizierter Zellen mit anschließender Virustitration. Es wäre jedoch auch vorstellbar, dass die Mehrheit inkorporierter Virionen in einem latenten replikationsinaktiven Zustand in LSEC vorliegt.

Fluoreszenzmikroskopische Analysen sind verglichen mit durchflusszytometrischen Messungen weniger sensitiv und durch deren Auflösungsvermögen beschränkt. Im Falle von MCMV-GFP infizierten LSEC sind im Fluoreszenzmikroskop lediglich diejenigen Zellen sichtbar, die eine starke GFP-Expression aufweisen. Die Anzahl einzelner infizierter GFP positiver LSEC ist über einen längeren Zeitraum konstant ( $> 5$  Tage) und nimmt zahlenmäßig nicht zu, wobei kein zytopathischer Effekt in den infizierten Einzelzellen zu beobachten ist. Vergleicht man infizierte Fibroblasten mit MCMV infizierten LSEC, so ist auffällig, dass auch kein zytopathischer Effekt innerhalb der Gesamtpopulation von LSEC beobachtet werden kann (Kapitel 3.1.2). Die charakteristische abgerundete Morphologie infizierter Zellen, sowie das Abschwimmen infizierter Zellen von Zellkulturschalen sind bei LSEC ebenfalls nicht zu beobachten. Betrachtet man Einzelzellen infizierter Fibroblasten, ist die Expression des Infektionsmarkers GFP gleichmäßig auf Zytoplasma und Zellkern verteilt. Bei infizierten LSEC hingegen scheint die GFP-Expression auf zytoplasmatische Vesikel beschränkt zu sein (Kapitel 3.1.2). Yan *et al.* isolierten zytoplasmatische Vesikel aus HCMV infizierten Speicheldrüsen und analysierten deren Bestandteile. Innerhalb dieser Vesikel konnten sie virale DNA, als auch virale IE- und E-Proteine nachweisen (Yan 2003).

Für Makrophagen wurde bereits gezeigt, dass eine Infektion mit CMV nicht lytisch verläuft, sondern stattdessen große Mengen an intrazellulären Virionen vorhanden sind, die nicht in den extrazellulären Raum entlassen werden. Dabei konnte ebenfalls eine Akkumulation von Virus in zytoplasmatischen Vakuolen beobachtet werden, die offensichtlich nicht in der Lage sind, mit der Plasmamembran zu verschmelzen. Die zytoplasmatische Akkumulation von Vesikeln wird durch virale Disruption von Mikrotubuli hervorgerufen, was dazu führt, dass das Virus die infizierte Zelle nicht über den endolysosomal Weg verlassen kann (Fish 1996).

Einen weiteren Aspekt in der Permissivität von Zellen scheint deren Reifestatus darzustellen. Unreife Monozyten, im Falle von Vorläuferzellen von Makrophagen, werden abortiv infiziert. Die virale Genexpression nach Infektion beschränkt sich IE- und E-Gene (Einhorn 1984; Rice 1984; Taylor-Wiedeman 1991). Eine produktive Infektion konnte jedoch nach Reifung der Zellen zu Makrophagen beobachtet werden (Ibanez 1991; Weinshenker 1988; Lathey 1991; Taylor-Wiedeman 1994). Über die Infektion von maturen bzw. immaturen Dendritischen Zellen (DC) existieren kontroverse Befunde. Mathys *et al.* konnten zeigen, dass die Infektion immaturer DC mit MCMV zu Virusproduktion und zur Reifung der Zellen führt. Die Infektion maturer DC dagegen resultierte in abortiver Infektion und beschränkte sich auf die Expression viraler IE- und E-Gene (Mathys 2003). Hertel *et al.* hingegen untersuchten die Permissivität immaturer und maturer Langerhanszellen (LC). Langerhanszellen sind DC, die vornehmlich in Epithelien vorzufinden sind. Lediglich ein geringer Prozentsatz (3-4%) immaturer Langerhanszellen war permissiv für eine Infektion mit HCMV, wohingegen 48-74% der maturen LC infiziert werden konnten (Hertel 2003). Einen interessanten Hinweis in diesem Zusammenhang lieferten Beck *et al.*, indem sie die Infektion von DC hinsichtlich HCMV-Virusstocks unterschiedlicher Herkunft analysierten. Die Infektion von DC mit einem Virusstock, der auf Endothelzellen adaptiert ist, resultierte in produktiver Infektion von sowohl immaturen, als auch maturen DC. Bei Verwendung eines Virusstocks, der auf Fibroblasten adaptiert ist, kam es zum bereits beschriebenen abortiven Infektionszyklus im Stadium der IE-/E-Genexpression. Die Permissivität von DC wäre folglich vollkommen unabhängig von deren Differenzierungsstatus (Beck 2003). Langerhanszellen scheinen eine Ausnahme darzustellen, da die Experimente von Hertel *et al.* mit endothelotropen Virusstocks durchgeführt wurden. Angesichts dieser Befunde drängt sich die Frage auf, welchen Differenzierungsstatus LSEC besitzen. Eine Maturierung von LSEC ist bisher nicht beschrieben worden. LSEC scheinen, ihrem Phänotyp nach zu urteilen, immaturen DC zu entsprechen. In den Infektionsexperimenten mit LSEC wurden ausschließlich Fibroblasten adaptierte MCMV-Virusstocks eingesetzt, weshalb keine Aussage über ein verändertes Permissivitätsverhalten bei Verwendung eines auf Endothelzellen adaptierten Virusstocks getroffen werden kann. Interessant wäre zudem die Frage, ob *ex vivo* isoliertes MCMV präferentiell in LSEC repliziert.

Bei der Analyse der Permissivität von LSEC für MCMV ist zu beachten, dass es sich hierbei um primäre, quieszente postmitotische Zellen handelt. CMV benötigt mitotisch aktive Zellen, um replizieren zu können (Kalejta 2002). Die Replikation von CMV ist jedoch abhängig von

zellulären Enzymen, die für die Synthese von Deoxyribonukleotiden verantwortlich sind (Gribaudo 2001). Das Enzym Thymidylat Synthase (TS) spielt bei der Synthese von Deoxyribonukleotiden eine entscheidende Rolle (Gribaudo 2000). In ruhenden Zellen sind TS mRNA und Protein kaum detektierbar. Nach Infektion mit HCMV wird die zelleigene Synthese dieses Enzyms stark induziert, wodurch Virusreplikation in ruhenden Zellen ermöglicht wird (Gribaudo 2002). Für MCMV konnte gezeigt werden, dass das bereits beschriebene MCMV Homolog zur Untereinheit R1 der Ribonukleotidreduktase (*M45*) kein funktionelles Equivalent des zellulären Gegenstücks darstellt. Die funktionelle zelluläre Ribonukleotidreduktase besteht aus zwei Untereinheiten (R1, R2). Aus diesem Grund induziert MCMV die Expression der zellulären Ribonukleotidreduktase, um in postmitotischen Zellen replizieren zu können. Virusmutanten, in denen das *M45*-Gen inaktiviert ist, sind nicht mehr replikationskompetent, was auf eine neue bislang unbekannt Funktion dieses Gens schließen lässt (Lembo 2004). Für Endothelzellen hingegen konnte gezeigt werden, dass die Infektion mit einer *M45*-Mutante zu Apoptose in infizierten Zellen führt (Brune 2001). Ob die nicht-produktive Infektion von LSEC mit MCMV auf eine defekte Induktion der zellulären Ribonukleotidreduktase beruht, oder aber das Gen in LSEC genetisch inaktiviert ist (Heterochromatin), ist unklar.

Die vorliegenden Daten zeigen, dass LSEC permissiv für eine Infektion mit MCMV sind. Es kann eine effiziente Inkorporation infektiöser Virionen durch LSEC beobachtet werden, die mit permissiven Fibroblasten vergleichbar ist. Trotzdem kann keine produktive Infektion von LSEC detektiert werden, wie es bei permissiven Fibroblasten der Fall ist. LSEC stellen primäre, postmitotisch quieszente Zellen dar und unterscheiden sich in diesem Punkt von den verwendeten Fibroblastenlinien. Diese Tatsache scheint die Ursache für die ausbleibende Detektion infektiöser Nachkommenviren nach Infektion von LSEC mit MCMV zu sein.



## 4.2 Infektion durch an LSEC gebundenes MCMV

Zytomegalieviren verbreiten sich über das Blut im infizierten Wirtsorganismus und können so die entsprechenden Zielorgane erreichen. Eine besondere Rolle bei der Ausbreitung der Infektion scheinen mononukleäre Zellen im Blut (PBMC – *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) und Endothelzellen zu spielen, da das Virus vor allem zellassoziiert vorzufinden ist (Dankner 1990; Saltzman 1988; Bevan 1993). Die Daten von Stoddart *et al.* zeigen, dass PBMC den prominenten Zelltyp darstellen, der zur Ausbreitung innerhalb des Organismus beiträgt (Stoddart 1994). Sowohl PBMC, als auch Endothelzellen sind an der systemischen Ausbreitung von CMV beteiligt. Obwohl für Prä-Makrophagen keine produktive Infektion nachgewiesen werden konnte, dienen diese Zellen offensichtlich als virales Reservoir und sind zur Weitergabe infektiösen Virus von Zelle zu Zelle fähig, ohne dabei Virus in den extrazellulären Raum zu entlassen (Maidji 1998; Maidji 1996). Maidji *at al.* nehmen in ihren Studien mit Deletionsmutanten an, dass das Glykoprotein *US9* von HCMV für die Weitergabe von Zelle zu Zelle verantwortlich ist. Eine direkte Beteiligung von gpUS9 würde dessen Lokalisation auf der Zelloberfläche bzw. an der Kontaktstelle der beiden Zellen voraussetzen. Huber *et al.* konnten mit rekombinanten replikationsdefizienten adenoviralen Vektoren, die *US9* exprimieren, zeigen, dass gpUS9 vornehmlich ins endoplasmatischen Retikulum lokalisiert. Damit ist fraglich, ob und inwiefern gpUS9 eine direkte Rolle bei der Weitergabe von Zelle zu Zelle spielt (Huber 2002).

Die initiale Interaktion zwischen Phagozyten und Endothelzellen ruft eine inflammatorische Reaktion hervor. Nach einer Infektion von Endothelzellen mit HCMV wurde beobachtet, dass diese Interaktion zu einer Hochregulation von Adhäsionsmolekülen führt. Das umfasst die Moleküle ICAM-1 (CD54), ICAM-2 (CD102), ELAM-1 (*endothelial leucocytes adhesion molecule*) und VCAM-1 (CD106). Diese Adhäsionsmoleküle sind von entscheidender Bedeutung bei der Bindung von Leukozyten an das Endothel. Die erhöhte Expression dieser Moleküle erhöht die Bindungsfrequenz von Leukozyten an Endothelzellen, und ermöglicht dadurch deren Extravasation in das dahinterliegende parenchymale Gewebe (Shahgasempour 1997).

Auf der anderen Seite führt der Kontakt infizierter Zellen mit Immunzellen zur Freisetzung von Mediatoren. Zytokine und Chemokine spielen eine Schlüsselrolle bei der Bekämpfung viraler Infektionen wie beispielsweise MCMV. Chemokine dirigieren Immunzellen zu den

Infektionsherden, wo sie antivirale Zytokine ausschütten. Die Chemokine MIP-1 $\alpha$  (*Macrophage inflammatory Protein 1 $\alpha$* , CCL3), Mig (*Monokine induced by IFN-gamma*) und RANTES (CCL5) sowie IFN $\gamma$  produzierende NK-Zellen sind für die antivirale Immunantwort gegen MCMV entscheidend (Salazar-Mather 2000; Dorner 2004). Es konnte gezeigt werden, dass die Anlockung von Immunzellen bei Infektion mit MCMV zur Akkumulation von Makrophagen und NK-Zellen in der Leber führt (Salazar-Mather 2002). Die koordinierte Expression von Chemokinen und Zytokinen mag von Seiten des Organismus einen protektiven antiviralen Effekt vermitteln, von Seiten des Virus hingegen gesehen, eine Möglichkeit Virus an Immunzellen weiterzugeben (Salazar-Mather 2003).

Eines der Zielorgane viraler Infektion stellt die Leber dar (Stoddart 1994; Mocarski, Kapitel 76, Fields in Virology 4.Auflage). Das Virus wird zellassoziiert über das Blut in die Leber transportiert, wo es auf sinusoidale Endothelzellen trifft. Der geringe Durchmesser hepatischer Sinusoide einerseits, als auch die verlangsamte Flussrate des Blutes andererseits, ermöglichen den direkten Kontakt von im Blut zirkulierenden Leukozyten mit sinusoidalen Endothelzellen (Knolle 2000; Knolle 2001). Außerdem symbolisieren mikrovaskuläre Endothelzellen wie LSEC eine Schaltstelle zwischen Zellen des Blutes und dem Gewebe. Die Analyse der Expressionsrate der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 auf MCMV infizierten LSEC lieferte dagegen keinen Hinweis auf eine erhöhte Expression dieser Moleküle (Kapitel 3.4.2). Das scheint angesichts der anatomischen Lage von LSEC auch nicht notwendig, da ein direkter Kontakt zwischen LSEC und im Blut zirkulierenden Leukozyten ohnehin gegeben ist (Knolle 2001). Die Infektion von Endothelzellen führt wiederum zur Infektion von Zellen die mit Endothelzellen interagieren. Die erhöhte Adhäsion von Leukozyten an infizierte mikrovaskuläre Endothelzellen mit nachfolgender Extravasation aus dem Blut in das umliegende Gewebe ermöglicht die Weitergabe von Virus durch Endothelzellen (Waldman 1995). Außerdem besteht die Gefahr einer Infektion des Parenchyms durch infizierte Zellen (Sinzger 1996).

Die Analyse MCMV infizierter LSEC hat gezeigt, dass LSEC verglichen mit Makrophagen und CD4<sup>+</sup>-T-Zellen am effizientesten in der Weitergabe replikationskompetenter Virionen sind. Jedes 100. in der Primärinfektion eingesetzte Virus wird von LSEC an permissive Zellen weitergegeben. Makrophagen dagegen geben nur jedes 4800. und CD4<sup>+</sup>-T-Zellen nur jedes 2400. Virus an permissive Zellen weiter (Kapitel 3.3). Dieser bidirektionale Mechanismus zur Weitergabe infektiöser Zytomegalieviren stellt eine Infektion von Zielzellen *in trans* dar.

Unlängst konnte durch die Identifikation von DC-SIGN (*Dendritic Cell specific Intercellular Adhesion Molecule Grabbing Non-Integrin*) ein Molekül entdeckt werden, welches die produktive Infektion von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen durch DC gebundenes HIV (*Human Immunodeficiency Virus*) *in trans* vermittelt (Geijtenbeek 2000). DC-SIGN ist ein Transmembranrezeptor (C-Typ Lektin), der spezifisch Kohlenhydratstrukturen auf der Oberfläche von Pathogenen erkennt und bindet (Figdor 2002). Interessanterweise ist auch HCMV in der Lage, an DC-SIGN zu binden und dadurch permissive Zielzellen *in trans* zu infizieren (Halary 2002). Park *et al.* konnten im Gegenzug fünf homologe Gene für DC-SIGN in der Maus identifizieren (Park 2001). Dadurch liegt die Vermutung nahe, dass die homologen Genprodukte von DC-SIGN auch als funktionelle Equivalente in der Maus agieren. Im humanen System konnte zudem ein DC-SIGN verwandtes Molekül identifiziert werden, nämlich DC-SIGNR oder L-SIGN (*Liver/Lymph node Specific ICAM-3 Grabbing Non-Integrin*). L-SIGN wird spezifisch von LSEC und im Lymphknoten exprimiert, jedoch nicht von DC (Bashirova 2001; Pohlmann 2001). Für murine LSEC konnte ebenfalls die Expression eines DC-SIGN Homologs (mSIGNR1 - *murine SIGN Related1*) nachgewiesen werden (Geijtenbeek 2002). Die Tatsache, dass HCMV und MCMV vergleichbare Strategien und Funktionen aufweisen, sowie homologe Gene exprimieren, legen den Schluss nahe, dass MCMV vermutlich über mSIGNR1 an LSEC bindet und dadurch Zielzellen *in trans* infizieren kann. Ob MCMV tatsächlich über ein DC-SIGN verwandtes Molekül LSEC, als auch andere im Blut zirkulierende Zellen *in trans* infiziert, könnte durch eine Antikörper vermittelte Rezeptorblockade (anti-mSIGNR1-Antikörper) untersucht werden. Eine Interaktion von MCMV mit mSIGNR1 würde für eine gezielte Infektion von LSEC sprechen.

Betrachtet man die einzelnen Befunde und die bereits erwähnte anatomische Lage von LSEC innerhalb der Leber, so scheinen LSEC ideale Kandidaten für die virale Propagation im Wirtsorganismus darzustellen. Der intime Kontakt mit im Blut zirkulierenden Zellen, sowie die Expression von homologen Molekülen wie L-SIGN, unterstützen diese Hypothese. Außerdem zeigen die vorgestellten Daten, dass murine LSEC offensichtlich ausgesprochen effizient in der Lage sind, infektiöse Virionen an permissive Zellen *in trans* weiterzugeben. Damit scheinen LSEC die Funktion einer viralen Verbreitungsplattform im Organismus wahrzunehmen.

### **4.3 Toleranzinduktion durch MCMV infizierte LSEC**

Mikrovaskuläre sinusoidale Endothelzellen der Leber sind in der Lage antigenspezifische Immuntoleranz in CD8<sup>+</sup>-T-Zellen gegenüber löslichen im Blut befindlichen Antigenen zu induzieren, die durch den Verlust der spezifischen Effektoraktivität gekennzeichnet ist (Limmer 2000). Die hepatische Population von LSEC stellt sessile APC dar, die alle immunologisch relevanten Moleküle auf ihrer Zelloberfläche tragen, um mit Leukozyten des Blutes zu interagieren und diese antigenspezifisch zu stimulieren (Knolle 2001). Dies schließt Adhäsionsmoleküle (L-SIGN, CD54, CD106), MHC-Klasse-I/-II Moleküle, Mustererkennungsrezeptoren zur Antigenaufnahme (Mannoserezeptor, Scavengerrezeptor) und kostimulatorische Moleküle ein (CD40, PD1L, ICOS-L, CD80, CD86). In ihrem immunologischen Phänotyp entsprechen LSEC immaturren DC (Knolle 2000).

Für hepatotrope pathogene Mikroorganismen wie Zytomegalieviren scheint die persistierende Infektion der Leber einen überaus attraktiven Ort darzustellen, um sich vor der drohenden Immunantwort des infizierten Wirtsorganismus zu verstecken. Außerdem wäre es denkbar, dass Pathogene die tolerogene Funktion von LSEC zu ihren Gunsten ausnutzen. Hält man sich die zahlreichen aktiven Mechanismen vor Augen, die Zytomegalieviren im Laufe ihrer Koevolution mit ihrem spezifischen Wirt entwickelt haben, um einer Immunantwort zu entgehen, so erscheint es fragwürdig, ob Zytomegalieviren eine LSEC vermittelte Tolerisierung überhaupt benötigen. Andererseits würde eine Tolerisierung gegenüber viralen Antigenen durch LSEC einen passiven Evasionsmechanismus darstellen, der ein sicheres immunologisches Umfeld für das Virus schaffen würde.

Die intraperitoneale Infektion mit MCMV führt zur schnellen Ausbreitung des Virus in verschiedene Organe des Wirtsorganismus. NK-Zellen tragen dazu bei, die virale Replikation während der frühen Phase der Infektion einzuschränken (Bukowski 1984, Welsh 1991). Die Beteiligung von NK-Zellen an der antiviralen Immunantwort gegen HCMV wurde zudem durch den Befund untermauert, dass Patienten mit einem partiellen oder absoluten NK-Zell-Defizit unter einer ungewöhnlich starken HCMV Infektion leiden (Biron 1989). Die Resistenz gegenüber einer Infektion mit MCMV konnte in Mäusen auf ein einziges Gen innerhalb des NK-Zell-Gen-Komplexes auf Chromosom 6 zurückgeführt werden, den *Cmv1* Genlokus (Scalzo 1992). Mit dem Einsetzen der adaptiven Immunantwort an Tag vier nach Inokulation mit MCMV, wird das Virus in den meisten infizierten Organen spezifisch beseitigt. Frühe

Arbeiten von Koszinowski *et al.* konnten in adoptiven Transferexperimenten mit immunkomprimierten Mäusen (Balb/c) zeigen, dass CD8<sup>+</sup>-T-Zellen die virale Replikation einschränken und zugleich Gewebeschäden verhindern (Reddehase 1985). Der Hauptanteil der antiviralen CD8<sup>+</sup>-Immunantwort ist gegen virale Antigene der IE-Phase gerichtet (Koszinowski 1987; Volkmer 1987).

Die Erkennung virusinfizierter Zellen durch zytotoxische CD8<sup>+</sup>-T-Zellen setzt die intrazelluläre Prozessierung von viralen Antigenen und deren Transport in das Endoplasmatische Retikulum via TAP 1/2 voraus, wo sie mit MHC-Klasse-I Molekülen assoziieren können und über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche transportiert werden. Im Falle exogener Antigene ist zusätzlich eine Internalisierung von Seiten der APC über Mustererkennungsrezeptoren notwendig. Zytomegalieviren haben jedoch eine ganze Reihe von Mechanismen entwickelt, um der Erkennung durch das Immunsystem aktiv zu entgehen. Im Genom von MCMV konnten drei Gene identifiziert werden, die aktiv in den MHC-Klasse-I Antigenpräsentationsweg eingreifen. Das *m152* Genprodukt gp37/40 führt zur Retention von MHC-Klasse I Molekülen im endoplasmatischen Retikulum-Cis-Golgi-Kompartiment (Thäle 1995; Ziegler 1997, 2000). Die Expression von *m06* (gp48) resultiert in der Bindung von gp34 an MHC-Klasse-I Moleküle mit anschließendem Transport zu späten endolysosomalen Kompartimenten (Reusch 1999). Die Expression von *m04* führt zur Bindung von gp34 an MHC-Klasse-I-Moleküle mit nachfolgender Eskorte zur Zelloberfläche (Kleijnen 1997; Kavanagh 2001). Damit stellt das Immunevasin *m04* eine Ausnahme dar, indem es der nicht an der Herunterregulation von MHC-Klasse-I Komplexen beteiligt ist, sondern gegensätzlich agiert (Wagner 2002). Die Analyse der von LSEC exprimierten immunologisch relevanten Oberflächenmoleküle hat gezeigt, dass diese Zellen offensichtlich nicht durch eine Infektion mit MCMV beeinflusst werden (Kapitel 3.4.1). Weder die Expression verschiedener MHC-Klasse-I Allele, noch die Expression von Adhäsionsmolekülen (CD54; CD106) und kostimulatorischen Moleküle (CD40; CD86) scheint durch Infektion mit MCMV reduziert zu sein. Außerdem konnte auch keine Beeinträchtigung der Fähigkeit MCMV infizierter LSEC exogene lösliche Antigene über den Mannoserezeptor aufzunehmen, beobachtet werden (Kapitel 3.5). An dieser Stelle sollte jedoch erwähnt werden, dass die genannten Immunevasine in der E-Phase des viralen Replikationszyklus gebildet werden. Somit ist unklar, ob die Immunevasine in MCMV infizierten LSEC überhaupt gebildet werden. Aufschluss darüber werden erst Studien auf Transkriptions- und Translationsebene liefern. Eine mit LSEC vergleichbare Situation schien bei MCMV infizierten Makrophagen

vorzuliegen. Hengel *et al.* konnten zeigen, dass primäre Makrophagen aus dem Knochenmark keine Reduktion der MHC-Klasse-I Expression nach Infektion mit MCMV aufweisen (Hengel 2000). Diese Beobachtung konnte jedoch revidiert werden, als LoPiccolo *et al.* zeigen konnten, dass primäre aus dem Knochenmark stammende Makrophagen keine Ausnahme darstellen, sondern ebenso wie Fibroblasten der infektionsbedingten Inhibition der MHC-Klasse-I Antigenpräsentation unterliegen (LoPiccolo 2003). Außerdem konnte ein autokriner Mechanismus beschrieben werden, der zur Reduktion der MHC-Klasse-II Expression auf der Zelloberfläche MCMV infizierter Makrophagen führt. MCMV Infektion induziert die Sekretion von IL-10 durch Makrophagen, was die autokrine Modulation der MHC-Klasse-II Expression zur Folge hat. Neutralisierende anti IL-10 Antikörper konnten diesen Effekt verhindern (Redpath 1999). Im Falle einer Infektion von primären DC mit MCMV konnte von Andrews *et al.* gezeigt werden, dass die Fähigkeit, Antigene (Dextran) über den Mannoserezeptor aufzunehmen, um 70% reduziert ist. Bei der Analyse der immunologisch relevanten Oberflächenmolekülen MCMV infizierter Mäuse, konnten Andrews *et al.* zwei Tage nach Infektion keine Reduktion in der Expression *ex vivo* isolierter DC beobachten. Die Expression von MHC-Klasse-I, als auch von ICAM-1 ist unbeeinflusst, wohingegen die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD40 und CD86 erhöht ist. Vier Tage nach Infektion mit MCMV hingegen konnten Unterschiede im Expressionsverhalten primärer DC festgestellt werden. Die Expression von MHC-Klasse-I Molekülen erschien weiterhin unverändert, jedoch konnte eine deutliche Reduktion in der Expression des Adhäsionsmoleküls CD54, sowie der kostimulatorischen Molekülen CD40 und CD86 beobachtet werden. Die *ex vivo* beobachteten Daten von Andrews *et al.* spiegeln die *in vitro* Daten wider, welche die Forschergruppe zuvor mit der DC-Linie D1 erarbeitet hat (Andrews 2001). DC werden somit im Gegensatz zu LSEC durch eine Infektion mit MCMV in der Expression ihrer immunologisch relevanten Oberflächenmoleküle negativ beeinflusst. Ein wichtiger Unterschied zwischen den beiden APC Populationen besteht zudem darin, dass LSEC keine Nachkommenviren bilden und damit vermutlich auch nicht den vollständigen viralen Replikationszyklus durchlaufen. DC dagegen werden produktiv mit MCMV infiziert, zeigen jedoch ebenso wie LSEC keinen infektionsbedingten zytopathischen Effekt (Andrews 2001).

Wie wirkt sich angesichts der beschriebenen Situation eine Infektion von LSEC bzw. DC mit MCMV auf deren Fähigkeit aus, CD8<sup>+</sup>-T-Zellen zu stimulieren und eine antivirale Immunantwort zu induzieren?

Die Induktion antiviraler CD8<sup>+</sup>-Immunantworten setzt die antigenspezifische Stimulation durch APC voraus. Bei der Analyse MCMV infizierter LSEC hat sich gezeigt, dass sie CD8<sup>+</sup>-T-Zellen trotz Infektion ungehindert antigenspezifisch stimulieren können. Die Antigenpräsentation exogener (Ovalbumin), als auch endogener viral kodierter Antigene (MCMV-OVA) nach Infektion von LSEC führte zur Stimulation antigenspezifischer CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, unabhängig davon, ob es sich bei den T-Zellen um ein T-Zellhybridom (B3Z), oder um primäre naive T-Zellen (OT-I CD8<sup>+</sup>-T-Zellen) handelte (Kapitel 3.6.1, 3.6.3.1, 3.7.1 und 3.7.3). Die Analyse von Mischpopulationen infizierter und nicht-infizierter LSEC lieferte zudem keinen Hinweis auf einen die Antigenpräsentation negativ beeinflussenden parakrinen Effekt von Seiten der infizierten LSEC-Population. Beim Betrachten einer FACS-sortierten infizierten LSEC-Population konnte eine Reduktion in der Stimulation von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen verglichen mit nicht-infizierten LSEC beobachtet werden (Kapitel 3.6.2).

Es ist fraglich, welche Ursachen dieser Beobachtung zu Grunde liegen. Wie bereits erwähnt, führt die Infektion von LSEC mit MCMV nicht zur Reduktion der relevanten Oberflächenmoleküle, die zur Stimulation von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen notwendig sind. Selbst die Expression verschiedener MHC-Klasse-I Allele bleibt bei MCMV Infektion von LSEC unbeeinflusst. Interessanterweise konnten Wagner *et al.* eine MHC-Klasse-I Allel-spezifische Hierarchie in der Inhibition der MHC-Klasse-I Antigenpräsentation durch die drei Immunevasine feststellen. Das MHC-Klasse-I Allel H-2K<sup>b</sup> scheint in diesem Zusammenhang einer weniger starken Inhibition ausgesetzt zu sein. Im Infektionsverlauf kommt es nicht zu einer vollständigen Inhibition der H-2K<sup>b</sup> Expression (Wagner 2002). Die Ursache für die beobachtete Hierarchie MCMV vermittelter MHC-Klasse-I Inhibition könnte an einer unterschiedlich starken Affinität der Immunevasine für die verschiedenen MHC-Klasse-I Allele liegen.

Die Infektion von DC mit MCMV wiederum kann offensichtlich in zwei Phasen unterteilt werden. In der frühen Phase nach Infektion von DC mit MCMV kann eine prominente T-Zellaktivierung gemessen werden, die mit dem erhöhten Expressionslevel der benötigten immunologisch relevanten Oberflächenmoleküle einhergeht (Mathys 2003). Es ist jedoch

bekannt, dass allein durch den Kontakt von HCMV über gB (Glykoprotein B) an den Wirtszellrezeptor zu einer intrazellulären Signalkaskade führt und damit die Aktivierung von DC zur Folge hat (Boyle 1999; Simmen 2001). Durch den Vergleich von DC, die mit UV-inaktiviertem MCMV inkubiert worden waren, mit DC, die mit MCMV infiziert wurden, konnte gezeigt werden, dass die infizierte DC Population eine deutlich stärkere T-Zellstimulation induziert (Mathys 2003). Daraus kann geschlossen werden, dass eine effiziente T-Zellstimulation virale Genexpression voraussetzt. Im späteren Infektionsverlauf dagegen konnte eine Depression in der Stimulierungskapazität von autologen T-Zellen durch MCMV infizierte DC beobachtet werden. Diese Beobachtung geht mit der verminderten Expression von MHC-Klasse-I und kostimulatorischen Molekülen einher (Andrews 2001; Mathys 2003). Dieser biphasische Verlauf der Infektion von DC sichert die Initiation einer antiviralen Immunantwort zum frühen Zeitpunkt in der akuten Phase der Infektion. Das Unvermögen MCMV infizierter DC eine antivirale Immunantwort zu einem späteren Zeitpunkt zu induzieren, spiegelt die aktiven Evasionsmechanismen von MCMV wider. Durch die funktionelle Paralyse infizierter DC kann somit eine fortwährende Induktion zytotoxischer antiviraler CD8<sup>+</sup>-T-Zellvermittelter Immunantworten unterbunden werden. Die in der frühen Phase der Infektion induzierten Immunantworten weiß MCMV jedoch geschickt in die Irre zu führen, indem es die Präsentation viraler Antigene in infizierten Geweben aktiv unterbindet. Holtappels *et al.* konnten für das immundominante M45-Peptid zeigen, dass trotz der Präsenz spezifischer CD8<sup>+</sup>-T-Zellen kein protektiver Schutz resultierte. Die aktive Inhibition der MHC-Klasse-I restringierten Antigenpräsentation in infizierten Zellen verhindert die Erkennung durch das Immunsystem (Ignoranz) und ermöglicht es MCMV, unerkannt im Organismus zu persistieren (Holtappels 2004).

Vergleicht man die funktionellen Konsequenzen der durch MCMV infizierten LSEC induzierten Immunantwort mit der MCMV infizierter DC, dann ergibt sich ein vollkommen anderes Bild. Die Stimulation antigenspezifischer CD8<sup>+</sup>-T-Zellen durch MCMV infizierte LSEC führt für exogene Antigene (Ovalbumin), als auch im Falle von endogenen viral kodierten Antigenen (MCMV-OVA) zur Induktion von CD8<sup>+</sup>-T-Zelltoleranz (Kapitel 3.7.2 und 3.7.4). CD8<sup>+</sup>-T-Zelltoleranz konnte *in vitro* durch den Verlust der zytotoxischen Immunantwort in Form von reduzierter IFN $\gamma$  Sekretion gezeigt werden. Es ist jedoch zu beachten, dass die Ergebnisse der Kreuztoleranz auf Analysen mit Mischpopulationen, die aus infizierten und nicht-infizierten LSEC bestehen, basieren. Bei den Analysen eines viruskodierten Antigens in Form von MCMV-OVA kann außerdem nicht ausgeschlossen



werden, dass der beobachtete tolerogene Effekt zumindest partiell auf Kreuzpräsentation durch nicht-infizierte LSEC zurückzuführen ist, da das viral kodierte Ovalbumin von infizierten LSEC sekretiert wird. Alles in allem deuten die Ergebnisse mit MCMV infizierten LSEC eindeutig in Richtung T-Zelltoleranz. Die Infektion von LSEC mit MCMV konnte keinen Hinweis für die Induktion einer zytotoxischen T-Zellantwort liefern. Der Nettoeffekt der antigenspezifischen Stimulation von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen durch MCMV infizierte LSEC ist trotz Infektion die Induktion antigenspezifischer Immuntoleranz. Außerdem konnte für ein viral kodiertes Antigen in Form von MCMV-OVA gezeigt werden, dass LSEC in der Lage sind Immuntoleranz gegenüber einem viral kodierten Antigen in CD8<sup>+</sup>-T-Zellen zu induzieren. Diese Beobachtung konnte durch ein *in vivo* Pilotexperiment bestätigt werden, in dem MCMV-OVA infizierte LSEC zusammen mit antigenspezifischen OT-I CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in eine lymphopenische RAG2<sup>-/-</sup> Maus adoptiv transferiert wurden. Trotz der Interpretationsschwierigkeiten der Ergebnisse dieses Experiments aufgrund der fehlenden Kontrollmaus, geht ein Hinweis in Richtung LSEC vermittelter CD8<sup>+</sup>-Immuntoleranz hervor. Geht man von einer natürlichen basalen zytotoxischen T-Zellaktivität von 30-40% aus (persönliche Mitteilung Dr. Andreas Limmer, IMMEI, Bonn), die durch Aktivierung der Zellen aufgrund homeostatischer Proliferation beim Transfer in einen lymphopenischen Wirt verursacht wird, kann die gemessene zytotoxische Immunantwort als Hinweis auf LSEC vermittelte Immuntoleranz gewertet werden (Kapitel 3.8). Diese Interpretation wird durch die Daten der Restimulation untermauert, in denen ein Verlust der IFN $\gamma$  Sekretion derjenigen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen gemessen werden konnte, die durch MCMV-OVA infizierte LSEC stimuliert worden waren. Im Gegensatz dazu konnte in einem anderen Versuchsansatz beobachtet werden, dass die systemische Infektion zu einer zytotoxischen Immunantwort führt, die in Form von IFN $\gamma$  nach Restimulation der spezifischen T-Zellen gemessen werden konnte. Der Transfer Ovalbumin beladener LSEC deckt sich mit den publizierten Daten von Limmer *et al.* und entspricht dem Versuchsansatz MCMV-OVA infizierter LSEC (Limmer 2000). Die Infektion von LSEC würde damit einen passiven Mechanismus viraler Immunevasion durch Toleranzinduktion gegenüber viralen Antigenen darstellen.

Betrachtet man die dargestellten Ergebnisse zusammenfassend, so zeigt sich, dass LSEC permissiv für eine Infektion mit MCMV sind. Die Infektion von LSEC bietet dem Virus einen entscheidenden strategischen Vorteil im Kampf gegen das Immunsystem des infizierten Wirtsorganismus. Durch ihre zentrale anatomische Position im Organismus stehen LSEC in direktem Kontakt mit im Blut zirkulierenden Immunzellen. Dadurch stellen LSEC ideale

Kandidaten zur Ausbreitung der viralen Infektion innerhalb des Wirtsorganismus dar. Doch nicht nur ihre Funktion als virale Propagationsplattform machen LSEC zu einem attraktiven Ziel. Durch ihre tolerogenen Eigenschaften bieten LSEC ein ideales Versteck vor der drohenden Immunantwort des infizierten Wirtsorganismus. Zytomegalieviren haben im Laufe der Koevolution mit ihrem spezifischen Wirt zahlreiche Strategien entwickelt, um die Induktion einer antiviralen Immunantwort zu sabotieren. In diesem Zusammenhang konnten drei virale Gene in MCMV entdeckt werden, die aktiv in den MHC-Klasse-I Antigenpräsentationsweg eingreifen und die Entdeckung infizierter Zellen durch das Immunsystem des Wirtsorganismus verhindern.

Die Expression dieser Immunevasine in MCMV infizierten DC führt zu deren funktionellem Unvermögen, antivirale Immunantworten zu induzieren. Antigenpräsentierende Zellen wie LSEC dagegen behalten nach Infektion mit MCMV ihre tolerogenen Eigenschaften bei und stellen MCMV dadurch einen passiven Immunevasionsmechanismus zur Verfügung. Offensichtlich eine perfekte virale Strategie im fortwährenden Kampf zwischen Wirtsorganismus und pathogenem Mikroorganismus.

Welche pathophysiologische Rolle spielt die Infektion von LSEC mit MCMV innerhalb des infizierten Wirtsorganismus und welche Bedeutung kann ihr zugemessen werden?

MCMV verbreitet sich nach Primärinfektion über den Blutstrom im infizierten Wirtsorganismus. Damit ist der Kontakt mit LSEC in den hepatischen Sinusoiden gewährleistet. Es ist anzunehmen, dass eine Primärinfektion von wenigen Viren ausgeht. Die zahlenmäßige Unterlegenheit des Virus in der frühen Phase der Infektion liefert dem Wirtsorganismus einen empfindlichen Angriffspunkt. Die Gefahr der vollständigen Elimination in der frühen Phase stellt eine ernstzunehmende Bedrohung für das Virus dar. Die angesprochenen viralen Immunevasine werden zu diesem Zeitpunkt noch nicht exprimiert und stehen somit auch nicht als Schutzmechanismus für das Virus zur Verfügung. Dadurch können infizierte Zellen während dieser Phase vom Immunsystem des Wirts erkannt und eliminiert werden.

MCMV verfolgt jedoch in der frühen Phase der Infektion nur ein einziges Ziel: sich möglichst schnell in geeigneten Wirtszellen zu verstecken. LSEC können dabei eine Schlüsselrolle spielen. Die Analyse infizierter LSEC hat gezeigt, dass eine Infektion mit MCMV keinen

negativen Einfluss auf deren tolerogenes Potential hat. Die lokale Infektion von LSEC würde MCMV den entscheidenden Vorteil in der frühen Phase der Infektion liefern. Die *in vitro* Analysen nach MCMV Infektion haben gezeigt, dass LSEC sowohl gegenüber exogenen, als auch viral kodierten endogenen Antigenen Immuntoleranz in CD8<sup>+</sup>-T-Zellen induzieren. Im Gegensatz zu LSEC induzieren MCMV infizierte DC in der frühen Phase nach Infektion (2 Tage nach Infektion) antivirale CD8<sup>+</sup>-Immunantworten. Die infektionsbedingte Paralyse MCMV infizierter DC (4 Tage nach Infektion) schließt jedoch nicht die Induktion von Immunität durch kreuzpräsentierende nicht-infizierte DC aus.

Die Beobachtungen, dass Zytomegalieviren einen natürlichen Tropismus für Endothelzellen aufweisen, der im viralen Genom verankert ist, sprechen im Vergleich zu DC für eine bevorzugte Infektion von LSEC während der frühen Phase einer MCMV Infektion. In LSEC angekommen, profitiert das Virus von der tolerogenen Grundstimmung des hepatischen Mikromilieus. Die immunsuppressive Umgebung der Leber bietet dem Virus ausreichend Zeit, sich ausgehend von der Leber im Organismus auszubreiten. Die Infektion von im Blut zirkulierenden Immunzellen durch LSEC *in trans* ermöglicht eine effiziente Propagation, ohne sich dabei der Gefahr einer antiviralen Immunantwort auszusetzen. Die Analyse MCMV-infizierter LSEC hat gezeigt, dass die Präsentation viraler IE-Antigene *in vitro* und *in vivo* über MHC-Klasse-I zur Induktion von CD8<sup>+</sup>-T-Zelltoleranz führt. Die Induktion von Immuntoleranz gegenüber viralen Antigenen durch MCMV infizierte LSEC stellt einen einzigartigen passiven viralen Evasionsmechanismus dar. LSEC bieten MCMV in der frühen Phase einer Infektion den nötigen Schutz, den es braucht, um in permissiven Zellen ungehindert replizieren zu können.

Die Präsentation viraler Antigene durch MCMV infizierte LSEC stellt selbstverständlich auch ein gewisses Gefahrenpotential dar, da LSEC selbst zu einem Ziel der antiviralen Immunantwort werden könnten. Während der akuten Phase der Infektion sind ausreichend Virionen im Wirtsorganismus vorhanden. Mit zunehmender Anzahl an Viren, nimmt auch das Ausmaß der systemisch induzierten antiviralen Immunantwort durch infizierte und kreuzpräsentierende DC zu. Die daraus resultierende Präsenz zytotoxischer antiviraler Effektorzellen könnte eine Endothelitis mit folgenschwerer Hepatitis nach sich ziehen.

Die Entscheidung darüber, ob Immunität oder Toleranz gegenüber viralen Antigenen dominiert, scheint jedoch vom Ort der initialen Stimulation spezifischer CD8<sup>+</sup>-T-Zellen

abhängig zu sein. Bowen *et al.* konnten in einem transgenen Mausmodell zeigen, dass CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, die in den Lymphknoten aktiviert worden waren, zytotoxische Effektorfunktionen aufwiesen. Die Primärstimulation von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in der Leber hingegen führte zum Verlust der zytotoxischen Effektorfunktionen sowie zu verkürzter Lebensdauer der Zellen (Bowen 2004). Damit induziert die Leber bei Primärstimulation von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen antigenspezifische systemische Immuntoleranz, wohingegen die Stimulation in den peripheren lymphoiden Organen zu Immunität führt.

Überträgt man die Befunde von Bowen *et al.* auf den Verlauf einer MCMV-Infektion, so zeigt sich, dass die Primärinfektion von LSEC durch MCMV einen bedeutsamen Schritt innerhalb des Infektionsverlaufs darstellen könnte. Die initiale lokale Präsentation viraler Antigene durch LSEC während der frühen Phase einer MCMV Infektion induziert Immuntoleranz, dagegen resultiert die späte Phase der Infektion in einer systemisch induzierten antiviralen Immunantwort.

Die vorgestellten Daten lassen daher den Schluss zu, dass die Infektion von LSEC einen neuartigen passiven Evasionsmechanismus beschreibt. Die Infektion von LSEC während der frühen Phase einer MCMV-Infektion führt zur Induktion von Immuntoleranz gegenüber viralen Antigenen. Dadurch kann sich das Virus ausgehend von der Leber im Wirtsorganismus ausbreiten. Sowohl die effiziente Funktion als virale Propagationsplattform, als auch ihre tolerogenen Eigenschaften machen LSEC zum attraktiven Ziel einer Infektion mit MCMV. Die Infektion von LSEC bietet MCMV einen entscheidenden Vorteil gegenüber der drohenden Immunantwort des infizierten Wirtsorganismus. LSEC scheinen eine Brückenfunktion wahrzunehmen, indem sie den Übergang von früher zu später Infektionsphase sicherstellen.

## LITERATURVERZEICHNIS

- Ahn, K., A. Gruhler, et al. (1997). "The ER-luminal domain of the HCMV glycoprotein US6 inhibits peptide translocation by TAP." *Immunity* **6**(5): 613-21.
- Aichele, P., Brduscha-Riem, K., Oehen, S., Odermatt, B., Zinkernagel, R. M., Hengartner, H., and Pircher, H. (1997). Peptide antigen treatment of naive and virus-immune mice: antigen-specific tolerance versus immunopathology. *Immunity* **6**, 519-529.
- Andrews, D. M., C. E. Andoniou, et al. (2001). "Infection of dendritic cells by murine cytomegalovirus induces functional paralysis." *Nat Immunol* **2**(11): 1077-84.
- Ausubel, F. A., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K. (1999). *Current protocols in molecular biology* (New York, John Wiley & Sons).
- Bashirova, A. A., T. B. Geijtenbeek, et al. (2001). "A dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin (DC-SIGN)-related protein is highly expressed on human liver sinusoidal endothelial cells and promotes HIV-1 infection." *J Exp Med* **193**(6): 671-8.
- Beck, K., U. Meyer-Konig, et al. (2003). "Human cytomegalovirus impairs dendritic cell function: a novel mechanism of human cytomegalovirus immune escape." *Eur J Immunol* **33**(6): 1528-38.
- Bevan, M. J. (1976). "Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay." *J Exp Med* **143**(5): 1283-8.
- Bevan, I. S., M. R. Walker, et al. (1993). "Detection of human cytomegalovirus DNA in peripheral blood leukocytes by the polymerase chain reaction." *Transfusion* **33**(9): 783-4.
- Biron, C. A., K. S. Byron, et al. (1989). "Severe herpesvirus infections in an adolescent without natural killer cells." *N Engl J Med* **320**(26): 1731-5.
- Bissinger, A. L., H. Oettle, et al. (2004). "Cytomegalovirus infection after orthotopic liver transplantation is restricted by a pre-existing antiviral immune response of the recipient." *J Med Virol* **73**(1): 45-53.
- Boeckx, W., H. Sobis, et al. (1975). "Prolongation of allogeneic heart graft survival in the rat after implantation on portal vein." *Transplantation* **19**(2): 145-9.
- Boppana, S. B., L. B. Rivera, et al. (2001). "Intrauterine transmission of cytomegalovirus to infants of women with preconceptional immunity." *N Engl J Med* **344**(18): 1366-71.
- Bowen, D. G., M. Zen, et al. (2004). "The site of primary T cell activation is a determinant of the balance between intrahepatic tolerance and immunity." *J Clin Invest* **114**(5): 701-12.
- Boyle, K. A., R. L. Pietropaolo, et al. (1999). "Engagement of the cellular receptor for glycoprotein B of human cytomegalovirus activates the interferon-responsive pathway." *Mol Cell Biol* **19**(5): 3607-13.
- Britt, W. J. and L. G. Vugler (1990). "Antiviral antibody responses in mothers and their newborn infants with clinical and subclinical congenital cytomegalovirus infections." *J Infect Dis* **161**(2): 214-9.
- Brune, W., C. Menard, et al. (2001). "A ribonucleotide reductase homolog of cytomegalovirus and endothelial cell tropism." *Science* **291**(5502): 303-5.
- Bukowski, J. F., B. A. Woda, et al. (1984). "Pathogenesis of murine cytomegalovirus infection in natural killer cell-depleted mice." *J Virol* **52**(1): 119-28.
- Calne, R. Y., R. A. Sells, et al. (1969). "Induction of immunological tolerance by porcine liver allografts." *Nature* **223**(205): 472-6.
- Calne, R. Y., R. A. Sells, et al. (1969). "Toleragenic effects of porcine liver allografts." *Br J Surg* **56**(9): 692-3.

- Cantor, H. M. and A. E. Dumont (1967). "Hepatic suppression of sensitization to antigen absorbed into the portal system." Nature **215**(102): 744-5.
- Chee, M. S., A. T. Bankier, et al. (1990). "Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169." Curr Top Microbiol Immunol **154**: 125-69.
- Coles, R. M., Mueller, S. N., Heath, W. R., Carbone, F. R., and Brooks, A. G. (2002). Progression of armed CTL from draining lymph node to spleen shortly after localized infection with herpes simplex virus 1. J Immunol **168**, 834-838.
- Compton, T., D. M. Nowlin, et al. (1993). "Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate." Virology **193**(2): 834-41.
- Crnkovic-Mertens, I., M. Messerle, et al. (1998). "Virus attenuation after deletion of the cytomegalovirus Fc receptor gene is not due to antibody control." J Virol **72**(2): 1377-82.
- Dahmen, U., S. Qian, et al. (1994). "Split tolerance induced by orthotopic liver transplantation in mice." Transplantation **58**(1): 1-8.
- Dankner, W. M., J. A. McCutchan, et al. (1990). "Localization of human cytomegalovirus in peripheral blood leukocytes by in situ hybridization." J Infect Dis **161**(1): 31-6.
- Davis, B. J. (1964). Disc electrophoresis - II. Method and application to human serum proteins. Ann. N. Y. Acad. Sci., 404.
- Davis-Poynter, N. J., D. M. Lynch, et al. (1997). "Identification and characterization of a G protein-coupled receptor homolog encoded by murine cytomegalovirus." J Virol **71**(2): 1521-9.
- de Jong, M. D., G. J. Galasso, et al. (1998). "Summary of the II International Symposium on Cytomegalovirus." Antiviral Res **39**(3): 141-62.
- de Jong, M. D., C. A. Boucher, et al. (1998). "Summary of the international consensus symposium on management of HIV, CMV and hepatitis virus infections." Antiviral Res **37**(1): 1-16.
- Dorner, B. G., H. R. Smith, et al. (2004). "Coordinate expression of cytokines and chemokines by NK cells during murine cytomegalovirus infection." J Immunol **172**(5): 3119-31.
- Einhorn, L. and A. Ost (1984). "Cytomegalovirus L infection of human blood cells." J Infect Dis **149**(2): 207-14.
- Farrell, H. E., H. Vally, et al. (1997). "Inhibition of natural killer cells by a cytomegalovirus MHC class I homologue in vivo." Nature **386**(6624): 510-4.
- Fey, G. H. and J. Gauldie (1990). "The acute phase response of the liver in inflammation." Prog Liver Dis **9**: 89-116.
- Figdor, C. G., Y. van Kooyk, et al. (2002). "C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells." Nat Rev Immunol **2**(2): 77-84.
- Fish, K. N., W. Britt, et al. (1996). "A novel mechanism for persistence of human cytomegalovirus in macrophages." J Virol **70**(3): 1855-62.
- Fraser, R., B. R. Dobbs, et al. (1995). "Lipoproteins and the liver sieve: the role of the fenestrated sinusoidal endothelium in lipoprotein metabolism, atherosclerosis, and cirrhosis." Hepatology **21**(3): 863-74.
- Geijtenbeek, T. B., R. Torensma, et al. (2000). "Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses." Cell **100**(5): 575-85.
- Geijtenbeek, T. B., P. C. Groot, et al. (2002). "Marginal zone macrophages express a murine homologue of DC-SIGN that captures blood-borne antigens in vivo." Blood **100**(8): 2908-16.

- Gilbert, M. J., S. R. Riddell, et al. (1996). "Cytomegalovirus selectively blocks antigen processing and presentation of its immediate-early gene product." Nature **383**(6602): 720-2.
- Gold, M. C., M. W. Munks, et al. (2002). "The murine cytomegalovirus immunomodulatory gene m152 prevents recognition of infected cells by M45-specific CTL but does not alter the immunodominance of the M45-specific CD8 T cell response in vivo." J Immunol **169**(1): 359-65.
- Gonczol, E., E. Danczig, et al. (1985). "In vivo model for the acute, latent and reactivated phases of cytomegalovirus infection." Acta Microbiol Hung **32**(1): 39-47.
- Gorczynski, R. M., Z. Chan, et al. (1994). "Prolongation of rat small bowel or renal allograft survival by pretransplant transfusion and/or by varying the route of allograft venous drainage." Transplantation **58**(7): 816-20.
- Gribaudo, G., L. Riera, et al. (2000). "Murine cytomegalovirus stimulates cellular thymidylate synthase gene expression in quiescent cells and requires the enzyme for replication." J Virol **74**(11): 4979-87.
- Gribaudo, G., L. Riera, et al. (2001). "The anticytomegaloviral activity of raltitrexed is abrogated in quiescent mouse fibroblasts that overexpress thymidylate synthase." Virus Res **73**(1): 57-65.
- Gribaudo, G., L. Riera, et al. (2002). "Human cytomegalovirus infection induces cellular thymidylate synthase gene expression in quiescent fibroblasts." J Gen Virol **83**(Pt 12): 2983-93.
- Hahn, G., H. Khan, et al. (2002). "The human cytomegalovirus ribonucleotide reductase homolog UL45 is dispensable for growth in endothelial cells, as determined by a BAC-cloned clinical isolate of human cytomegalovirus with preserved wild-type characteristics." J Virol **76**(18): 9551-5.
- Hahn, G., M. G. Revello, et al. (2004). "Human cytomegalovirus UL131-128 genes are indispensable for virus growth in endothelial cells and virus transfer to leukocytes." J Virol **78**(18): 10023-33.
- Halary, F., A. Amara, et al. (2002). "Human cytomegalovirus binding to DC-SIGN is required for dendritic cell infection and target cell trans-infection." Immunity **17**(5): 653-64.
- Harder, R., H. Uhlig, et al. (1991). "Dissection of murine lymphocyte-endothelial cell interaction mechanisms by SV-40-transformed mouse endothelial cell lines: novel mechanisms mediating basal binding, and alpha 4-integrin-dependent cytokine-induced adhesion." Exp Cell Res **197**(2): 259-67.
- Hengel, H., J. O. Koopmann, et al. (1997). "A viral ER-resident glycoprotein inactivates the MHC-encoded peptide transporter." Immunity **6**(5): 623-32.
- Hengel, H., U. Reusch, et al. (2000). "Macrophages escape inhibition of major histocompatibility complex class I-dependent antigen presentation by cytomegalovirus." J Virol **74**(17): 7861-8.
- Hernandez, J., Aung, S., Marquardt, K., and Sherman, L. A. (2002). Uncoupling of proliferative potential and gain of effector function by CD8(+) T cells responding to self-antigens. J Exp Med **196**, 323-333.
- Hertel, L., V. G. Lacaille, et al. (2003). "Susceptibility of immature and mature Langerhans cell-type dendritic cells to infection and immunomodulation by human cytomegalovirus." J Virol **77**(13): 7563-74.
- Ho, M. (1991), Cytomegalovirus: Biology and Infection, 2.Edition (Kluwer Academic Pub)
- Hogquist, K. A., S. C. Jameson, et al. (1994). "T cell receptor antagonist peptides induce positive selection." Cell **76**(1): 17-27.
- Holtappels, R., J. Podlech, et al. (2004). "Cytomegalovirus misleads its host by priming of CD8 T cells specific for an epitope not presented in infected tissues." J Exp Med **199**(1): 131-6.

- Huber, M. T., R. Tomazin, et al. (2002). "Human cytomegalovirus US7, US8, US9, and US10 are cytoplasmic glycoproteins, not found at cell surfaces, and US9 does not mediate cell-to-cell spread." *J Virol* **76**(11): 5748-58.
- Hummel, M. and M. M. Abecassis (2002). "A model for reactivation of CMV from latency." *J Clin Virol* **25 Suppl 2**: S123-36.
- Ibanez, C. E., R. Schrier, et al. (1991). "Human cytomegalovirus productively infects primary differentiated macrophages." *J Virol* **65**(12): 6581-8.
- Jahn, G., W. Pohl, et al. (1988). "[Congenital cytomegalovirus infection with fatal outcome]." *Dtsch Med Wochenschr* **113**(11): 424-7.
- Jarvis, M. A. and J. A. Nelson (2002). "Mechanisms of human cytomegalovirus persistence and latency." *Front Biosci* **7**: d1575-82.
- Jarvis, M. A. and J. A. Nelson (2002). "Human cytomegalovirus persistence and latency in endothelial cells and macrophages." *Curr Opin Microbiol* **5**(4): 403-7.
- Jones, T. R., E. J. Wiertz, et al. (1996). "Human cytomegalovirus US3 impairs transport and maturation of major histocompatibility complex class I heavy chains." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(21): 11327-33.
- Jones, T. R. and L. Sun (1997). "Human cytomegalovirus US2 destabilizes major histocompatibility complex class I heavy chains." *J Virol* **71**(4): 2970-9.
- Kalejta, R. F. and T. Shenk (2002). "Manipulation of the cell cycle by human cytomegalovirus." *Front Biosci* **7**: d295-306.
- Karlin, S., E. S. Mocarski, et al. (1994). "Molecular evolution of herpesviruses: genomic and protein sequence comparisons." *J Virol* **68**(3): 1886-902.
- Kavanagh, D. G., M. C. Gold, et al. (2001). "The multiple immune-evasion genes of murine cytomegalovirus are not redundant: m4 and m152 inhibit antigen presentation in a complementary and cooperative fashion." *J Exp Med* **194**(7): 967-78.
- Kavanagh, D. G., U. H. Koszinowski, et al. (2001). "The murine cytomegalovirus immune evasion protein m4/gp34 forms biochemically distinct complexes with class I MHC at the cell surface and in a pre-Golgi compartment." *J Immunol* **167**(7): 3894-902.
- Kempka, G. and V. Kolb-Bachofen (1988). "Binding, uptake, and transcytosis of ligands for mannose-specific receptors in rat liver: an electron microscopic study." *Exp Cell Res* **176**(1): 38-48.
- Kleijnen, M. F., J. B. Huppa, et al. (1997). "A mouse cytomegalovirus glycoprotein, gp34, forms a complex with folded class I MHC molecules in the ER which is not retained but is transported to the cell surface." *Embo J* **16**(4): 685-94.
- Knolle, P. A., E. Schmitt, et al. (1999). "Induction of cytokine production in naive CD4(+) T cells by antigen-presenting murine liver sinusoidal endothelial cells but failure to induce differentiation toward Th1 cells." *Gastroenterology* **116**(6): 1428-40.
- Knolle, P. A., T. Germann, et al. (1999). "Endotoxin down-regulates T cell activation by antigen-presenting liver sinusoidal endothelial cells." *J Immunol* **162**(3): 1401-7.
- Knolle, P. A. and G. Gerken (2000). "Local control of the immune response in the liver." *Immunol Rev* **174**: 21-34.
- Knolle, P. A. and A. Limmer (2001). "Neighborhood politics: the immunoregulatory function of organ-resident liver endothelial cells." *Trends Immunol* **22**(8): 432-7.
- Koffron, A. J., K. H. Mueller, et al. (1995). "Direct evidence using in situ polymerase chain reaction that the endothelial cell and T-lymphocyte harbor latent murine cytomegalovirus." *Scand J Infect Dis Suppl* **99**: 61-2.
- Koffron, A. J., M. Hummel, et al. (1998). "Cellular localization of latent murine cytomegalovirus." *J Virol* **72**(1): 95-103.
- Koszinowski, U. H., G. M. Keil, et al. (1987). "A nonstructural polypeptide encoded by immediate-early transcription unit 1 of murine cytomegalovirus is recognized by cytolytic T lymphocytes." *J Exp Med* **166**(1): 289-94.



- Koszinowski, U. H., M. J. Reddehase, et al. (1987). "Molecular analysis of herpesviral gene products recognized by protective cytolytic T lymphocytes." Immunol Lett **16**(3-4): 185-92.
- Krmpotic, A., D. H. Busch, et al. (2002). "MCMV glycoprotein gp40 confers virus resistance to CD8+ T cells and NK cells in vivo." Nat Immunol **3**(6): 529-35.
- Kwon, D. S., G. Gregorio, et al. (2002). "DC-SIGN-mediated internalization of HIV is required for trans-enhancement of T cell infection." Immunity **16**(1): 135-44.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 680-685.
- Lathey, J. L. and S. A. Spector (1991). "Unrestricted replication of human cytomegalovirus in hydrocortisone-treated macrophages." J Virol **65**(11): 6371-5.
- Lehner, P. J., J. T. Karttunen, et al. (1997). "The human cytomegalovirus US6 glycoprotein inhibits transporter associated with antigen processing-dependent peptide translocation." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(13): 6904-9.
- Lembo, D., M. Donalizio, et al. (2004). "The ribonucleotide reductase R1 homolog of murine cytomegalovirus is not a functional enzyme subunit but is required for pathogenesis." J Virol **78**(8): 4278-88.
- Limmer, A., T. Sacher, et al. (1998). "Failure to induce organ-specific autoimmunity by breaking of tolerance: importance of the microenvironment." Eur J Immunol **28**(8): 2395-406.
- Limmer, A., J. Ohl, et al. (2000). "Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8+ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance." Nat Med **6**(12): 1348-54.
- LoPiccolo, D. M., M. C. Gold, et al. (2003). "Effective inhibition of K(b)- and D(b)-restricted antigen presentation in primary macrophages by murine cytomegalovirus." J Virol **77**(1): 301-8.
- MacPhee, P. J., E. E. Schmidt, et al. (1992). "Evidence for Kupffer cell migration along liver sinusoids, from high-resolution in vivo microscopy." Am J Physiol **263**(1 Pt 1): G17-23.
- MacPhee, P. J., E. E. Schmidt, et al. (1995). "Intermittence of blood flow in liver sinusoids, studied by high-resolution in vivo microscopy." Am J Physiol **269**(5 Pt 1): G692-8.
- Maidji, E., S. Tugizov, et al. (1996). "Accessory human cytomegalovirus glycoprotein US9 in the unique short component of the viral genome promotes cell-to-cell transmission of virus in polarized epithelial cells." J Virol **70**(12): 8402-10.
- Maidji, E., S. Tugizov, et al. (1998). "A novel human cytomegalovirus glycoprotein, gpUS9, which promotes cell-to-cell spread in polarized epithelial cells, colocalizes with the cytoskeletal proteins E-cadherin and F-actin." J Virol **72**(7): 5717-27.
- Mathys, S., T. Schroeder, et al. (2003). "Dendritic cells under influence of mouse cytomegalovirus have a physiologic dual role: to initiate and to restrict T cell activation." J Infect Dis **187**(6): 988-99.
- Matsuno, K. and T. Ezaki (2000). "Dendritic cell dynamics in the liver and hepatic lymph." Int Rev Cytol **197**: 83-136.
- Michelson, S., J. Alcamì, et al. (1994). "Human cytomegalovirus infection induces transcription and secretion of transforming growth factor beta 1." J Virol **68**(9): 5730-7.
- Misra, V., M. T. Muller, et al. (1978). "Regulation of murine cytomegalovirus gene expression. I. Transcription during productive infection." J Virol **27**(2): 263-8.
- Mocarski, E.S.(1993)Cytomegalovirus biology and replication. In: The Human Herpesviruses (Roizman, B., Whitley, R.J. and Lopez, C., Eds), pp. 173-226. Raven Press, New York, USA)

- Mocarski, E.S., Fields in Virology, Kapitel 76, 4. Auflage (Lippincott Williams & Wilkins; Bk&CD-Rom edition (August 1, 2001)
- Moon, H. M., V. J. Sapienza, et al. (1976). "DNA synthesis in mouse embryo fibroblast cells infected with murine cytomegalovirus." *Virology* **75**(2): 376-83.
- Mosmann, T. R., and Fong, T. A. T. (1989). Specific assays for cytokine production by T cells. *J Immunol Methods* **116**, 151-158.
- Navarro, D., P. Paz, et al. (1993). "Glycoprotein B of human cytomegalovirus promotes virion penetration into cells, transmission of infection from cell to cell, and fusion of infected cells." *Virology* **197**(1): 143-58.
- Norris, S., C. Collins, et al. (1998). "Resident human hepatic lymphocytes are phenotypically different from circulating lymphocytes." *J Hepatol* **28**(1): 84-90.
- Oda, M., J. Y. Han, et al. (2000). "Local regulators of hepatic sinusoidal microcirculation: recent advances." *Clin Hemorheol Microcirc* **23**(2-4): 85-94.
- Ornstein, L. (1964). Disc electrophoresis - I. Background and theory. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 321.
- Park, C. G., K. Takahara, et al. (2001). "Five mouse homologues of the human dendritic cell C-type lectin, DC-SIGN." *Int Immunol* **13**(10): 1283-90.
- Pohlmann, S., E. J. Soilleux, et al. (2001). "DC-SIGNR, a DC-SIGN homologue expressed in endothelial cells, binds to human and simian immunodeficiency viruses and activates infection in trans." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(5): 2670-5.
- Polic, B., H. Hengel, et al. (1998). "Hierarchical and redundant lymphocyte subset control precludes cytomegalovirus replication during latent infection." *J Exp Med* **188**(6): 1047-54.
- Rasmussen, A., H. F. Davies, et al. (1995). "Combined transplantation of liver and kidney from the same donor protects the kidney from rejection and improves kidney graft survival." *Transplantation* **59**(6): 919-21.
- Rawlinson, W. D., H. E. Farrell, et al. (1996). "Analysis of the complete DNA sequence of murine cytomegalovirus." *J Virol* **70**(12): 8833-49.
- Reddehase, M. J., F. Weiland, et al. (1985). "Interstitial murine cytomegalovirus pneumonia after irradiation: characterization of cells that limit viral replication during established infection of the lungs." *J Virol* **55**(2): 264-73.
- Reddehase, M. J., J. Podlech, et al. (2002). "Mouse models of cytomegalovirus latency: overview." *J Clin Virol* **25 Suppl 2**: S23-36.
- Redpath, S., A. Angulo, et al. (1999). "Murine cytomegalovirus infection down-regulates MHC class II expression on macrophages by induction of IL-10." *J Immunol* **162**(11): 6701-7.
- Reis e Sousa, C. and R. N. Germain (1995). "Major histocompatibility complex class I presentation of peptides derived from soluble exogenous antigen by a subset of cells engaged in phagocytosis." *J Exp Med* **182**(3): 841-51.
- Reusch, U., W. Muranyi, et al. (1999). "A cytomegalovirus glycoprotein re-routes MHC class I complexes to lysosomes for degradation." *Embo J* **18**(4): 1081-91.
- Reyburn, H. T., O. Mandelboim, et al. (1997). "The class I MHC homologue of human cytomegalovirus inhibits attack by natural killer cells." *Nature* **386**(6624): 514-7.
- Rice, G. P., R. D. Schrier, et al. (1984). "Cytomegalovirus infects human lymphocytes and monocytes: virus expression is restricted to immediate-early gene products." *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**(19): 6134-8.
- Rock, K. L., S. Gamble, et al. (1990). "Presentation of exogenous antigen with class I major histocompatibility complex molecules." *Science* **249**(4971): 918-21.
- Rock, K. L. (1996). "A new foreign policy: MHC class I molecules monitor the outside world." *Immunol Today* **17**(3): 131-7.

- Salazar-Mather, T. P., T. A. Hamilton, et al. (2000). "A chemokine-to-cytokine-to-chemokine cascade critical in antiviral defense." J Clin Invest **105**(7): 985-93.
- Salazar-Mather, T. P., C. A. Lewis, et al. (2002). "Type I interferons regulate inflammatory cell trafficking and macrophage inflammatory protein 1alpha delivery to the liver." J Clin Invest **110**(3): 321-30.
- Salazar-Mather, T. P. and K. L. Hokeness (2003). "Calling in the troops: regulation of inflammatory cell trafficking through innate cytokine/chemokine networks." Viral Immunol **16**(3): 291-306.
- Saltzman, R. L., M. R. Quirk, et al. (1988). "Disseminated cytomegalovirus infection. Molecular analysis of virus and leukocyte interactions in viremia." J Clin Invest **81**(1): 75-81.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, Vol 2nd (New York).
- Scalzo, A. A., N. A. Fitzgerald, et al. (1992). "The effect of the Cmv-1 resistance gene, which is linked to the natural killer cell gene complex, is mediated by natural killer cells." J Immunol **149**(2): 581-9.
- Shahgasempour, S., S. B. Woodroffe, et al. (1997). "Alterations in the expression of ELAM-1, ICAM-1 and VCAM-1 after in vitro infection of endothelial cells with a clinical isolate of human cytomegalovirus." Microbiol Immunol **41**(2): 121-9.
- Shanley, J. D., M. C. Jordan, et al. (1979). "Pathogenesis of reactivated latent murine cytomegalovirus infection." Am J Pathol **95**(1): 67-80.
- Simmen, K. A., J. Singh, et al. (2001). "Global modulation of cellular transcription by human cytomegalovirus is initiated by viral glycoprotein B." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(13): 7140-5.
- Sinzger, C., A. Grefte, et al. (1995). "Fibroblasts, epithelial cells, endothelial cells and smooth muscle cells are major targets of human cytomegalovirus infection in lung and gastrointestinal tissues." J Gen Virol **76** ( Pt 4): 741-50.
- Sinzger, C. and G. Jahn (1996). "Human cytomegalovirus cell tropism and pathogenesis." Intervirology **39**(5-6): 302-19.
- Sinzger, C., B. Plachter, et al. (1996). "Tissue macrophages are infected by human cytomegalovirus in vivo." J Infect Dis **173**(1): 240-5.
- Sinzger, C., K. Schmidt, et al. (1999). "Modification of human cytomegalovirus tropism through propagation in vitro is associated with changes in the viral genome." J Gen Virol **80** ( Pt 11): 2867-77.
- Smedsrod, B., H. Pertoft, et al. (1990). "Scavenger functions of the liver endothelial cell." Biochem J **266**(2): 313-27.
- Smedsrod, B. (1990). "Receptor-mediated endocytosis of connective tissue macromolecules in liver endothelial cells." Scand J Clin Lab Invest Suppl **202**: 148-51.
- Smith MG: Propagation of salivary gland virus of the mouse in tissue culture. Proc Soc Exp Biol Med 1954; 86:435-440
- Smith MG: Propagation in tissue cultures of a cytopathogenic virus from human salivary gland virus (SGV) disease. Proc Soc Exp Biol Med 1956; 92:424-430
- Song, B. H., G. C. Lee, et al. (2001). "Human cytomegalovirus binding to heparan sulfate proteoglycans on the cell surface and/or entry stimulates the expression of human leukocyte antigen class I." J Gen Virol **82**(Pt 10): 2405-13.
- Spear, G. T., N. S. Lurain, et al. (1995). "Host cell-derived complement control proteins CD55 and CD59 are incorporated into the virions of two unrelated enveloped viruses. Human T cell leukemia/lymphoma virus type I (HTLV-I) and human cytomegalovirus (HCMV)." J Immunol **155**(9): 4376-81.
- Spiller, O. B., S. M. Hanna, et al. (1997). "Neutralization of cytomegalovirus virions: the role of complement." J Infect Dis **176**(2): 339-47.

- Stoddart, C. A., R. D. Cardin, et al. (1994). "Peripheral blood mononuclear phagocytes mediate dissemination of murine cytomegalovirus." J Virol **68**(10): 6243-53.
- Tailleux, L., O. Schwartz, et al. (2003). "DC-SIGN is the major Mycobacterium tuberculosis receptor on human dendritic cells." J Exp Med **197**(1): 121-7.
- Tailleux, L., B. Gicquel, et al. (2003). "[DC-SIGN, a key receptor of Mycobacterium tuberculosis?]." Med Sci (Paris) **19**(6-7): 658-60.
- Taylor-Wiedeman, J., J. G. Sissons, et al. (1991). "Monocytes are a major site of persistence of human cytomegalovirus in peripheral blood mononuclear cells." J Gen Virol **72** ( Pt **9**): 2059-64.
- Taylor-Wiedeman, J., P. Sissons, et al. (1994). "Induction of endogenous human cytomegalovirus gene expression after differentiation of monocytes from healthy carriers." J Virol **68**(3): 1597-604.
- Thale, R., P. Lucin, et al. (1994). "Identification and expression of a murine cytomegalovirus early gene coding for an Fc receptor." J Virol **68**(12): 7757-65.
- Thale, R., U. Szepan, et al. (1995). "Identification of the mouse cytomegalovirus genomic region affecting major histocompatibility complex class I molecule transport." J Virol **69**(10): 6098-105.
- Thomson, A. W., M. L. Drakes, et al. (1999). "Hepatic dendritic cells: immunobiology and role in liver transplantation." J Leukoc Biol **66**(2): 322-30.
- Van Bleek, G. M. and S. G. Nathenson (1990). "Isolation of an endogenously processed immunodominant viral peptide from the class I H-2Kb molecule." Nature **348**(6298): 213-6.
- Volkmer, H., C. Bertholet, et al. (1987). "Cytolytic T lymphocyte recognition of the murine cytomegalovirus nonstructural immediate-early protein pp89 expressed by recombinant vaccinia virus." J Exp Med **166**(3): 668-77.
- Wagner, M., A. Gutermann, et al. (2002). "Major histocompatibility complex class I allele-specific cooperative and competitive interactions between immune evasion proteins of cytomegalovirus." J Exp Med **196**(6): 805-16.
- Waldman, W. J., W. H. Roberts, et al. (1991). "Preservation of natural endothelial cytopathogenicity of cytomegalovirus by propagation in endothelial cells." Arch Virol **117**(3-4): 143-64.
- Waldman, W. J., D. A. Knight, et al. (1995). "Bidirectional transmission of infectious cytomegalovirus between monocytes and vascular endothelial cells: an in vitro model." J Infect Dis **171**(2): 263-72.
- Wang, Q. C., Z. H. Feng, et al. (2004). "DC-SIGN: binding receptors for hepatitis C virus." Chin Med J (Engl) **117**(9): 1395-400.
- Weinshenker, B. G., S. Wilton, et al. (1988). "Phorbol ester-induced differentiation permits productive human cytomegalovirus infection in a monocytic cell line." J Immunol **140**(5): 1625-31.
- Welsh, R. M., J. O. Brubaker, et al. (1991). "Natural killer (NK) cell response to virus infections in mice with severe combined immunodeficiency. The stimulation of NK cells and the NK cell-dependent control of virus infections occur independently of T and B cell function." J Exp Med **173**(5): 1053-63.
- Wiertz, E. J., T. R. Jones, et al. (1996). "The human cytomegalovirus US11 gene product dislocates MHC class I heavy chains from the endoplasmic reticulum to the cytosol." Cell **84**(5): 769-79.
- Wisse, E., R. B. De Zanger, et al. (1985). "The liver sieve: considerations concerning the structure and function of endothelial fenestrae, the sinusoidal wall and the space of Disse." Hepatology **5**(4): 683-92.

- Woodroffe, S. B., J. Hamilton, et al. (1997). "Comparison of the infectivity of the laboratory strain AD169 and a clinical isolate of human cytomegalovirus to human smooth muscle cells." J Virol Methods **63**(1-2): 181-91.
- Yan, Q. G., G. S. Huang, et al. (2003). "[Inclusion bodies of human cytomegalovirus are composed of the DNA and immediately early and early antigens of the virus]." Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi **17**(3): 262-5.
- Ziegler, H., R. Thale, et al. (1997). "A mouse cytomegalovirus glycoprotein retains MHC class I complexes in the ERGIC/cis-Golgi compartments." Immunity **6**(1): 57-66.
- Ziegler, H., W. Muranyi, et al. (2000). "The luminal part of the murine cytomegalovirus glycoprotein gp40 catalyzes the retention of MHC class I molecules." Embo J **19**(5): 870-81.