



HEINRICH HEINE
UNIVERSITÄT DÜSSELDORF

**Simultane Visualisierung der IFN beta Antwort und des
zellulären Infektionsstatus während der antiviralen Immunantwort
in einem bicistronischen Fluoreszenz-Reporter-Mausmodell**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Stephanie Borkens

aus Essen

Düsseldorf, Mai 2013

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referentin: Frau Prof. Dr. Stefanie Scheu
Korreferent: Herr Prof. Dr. Peter Westhoff

Tag der mündlichen Prüfung: 16.07.2013

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	1
1 Einleitung.....	1
1.1 Das Immunsystem	1
1.1.1 Die Milz als größtes sekundäres lymphatisches Organ	2
1.1.2 Dendritische Zellen- Verbindung zwischen angeborener und erworbener Immunität	3
1.2 Die Interferone	5
1.2.1 Typ I Interferone in der Immunabwehr mikrobieller und viraler Infektionen	6
1.2.2 PRRs und IFN Induktion	7
1.2.2.1 Die Erkennung mikrobieller und viraler PAMPs via PRRs durch das angeborene Immunsystem.....	7
1.2.2.2 Der Signaltransduktionsweg zur Induktion der Typ I IFN Gene	10
1.3 Die Familie der Herpesviren	12
1.3.1 Struktur und Replikationszyklus der Cytomegaloviren	13
1.3.2 Das murine Cytomegalovirus (MCMV) als Modellsystem	15
1.3.3 Mechanismen der viralen Evasionsstrategien.....	15
1.3.3.1 Virale Evasion der IFN Antwort	15
1.3.3.2 Ly49H-Rezeptor-abhängige Resistenz gegenüber einer MCMV Infektion	16
1.3.4 Immunabwehr gegen MCMV	18
1.3.4.1 Detektion viraler PAMPs	18
1.4 Vorarbeiten mit der IFNβ Reportermaus	19
1.5 Zielsetzung der Arbeit.....	21
Abkürzungsverzeichnis	22
2 Material und Methoden.....	24
2.1 Bezugsquellennachweis	24
2.1.1 Chemikalien, Antisera und Antibiotika.....	24
2.1.2 Enzyme	25
2.1.3 Kits und Verbrauchsmaterial	25
2.1.4 Geräte und sonstige Materialien.....	26
2.2 Medien und Puffer	26
2.2.1 Stammlösungen und Puffer.....	26
2.2.2 Medien für die Zellkultur.....	28
2.3 Zelllinien	28
2.3.1 Zellen und Zelllinien	28
2.3.2 Verwendete MCMV Stämme und Virusmutanten	29
2.4 Primer und Antikörper	29
2.4.1 Oligonukleotide	29
2.4.2 Antikörper	30
2.5 Molekularbiologische Methoden	31
2.5.1 Isolierung genomischer DNA aus murinen Zellen	31
2.5.2 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	31
2.5.3 Auftrennung PCR amplifizierter Fragmente mittels Agarosegele	31
2.6 Zellbiologische Methoden.....	32
2.6.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen.....	32
2.6.2 Kryokonservierung und Lagerung eukaryotischer Zellen	32
2.6.3 Generierung GM-CSF haltigen Mediums zur DC Differenzierung	32
2.6.4 Differenzierung myeloider Zellen aus dem murinen Knochenmark	33

2.6.4.1	Präparation von Zellen aus dem Knochenmark	33
2.6.4.2	Differenzierung von GM-CSF DCs	33
2.6.4.3	Differenzierung von Flt3-L DCs	33
2.7	Immunologische Methoden.....	34
2.7.1	Organentnahme	34
2.7.2	Herstellung von Einzel-Zell-Suspensionen aus der Milz zur FACS Analyse	34
2.7.3	Zellseparation mittels MACS	34
2.7.4	Durchflusszytometrische Analysen.....	35
2.7.4.1	FACS Analyse von Fluoreszenz-markierten Zellen.....	35
2.7.4.2	Zellseparation mit Hilfe des FACS Aria I	36
2.7.4.3	Analyse generierter FACS-Daten	36
2.7.5	Immunhistochemie.....	36
2.7.5.1	Präparation von Geweben	36
2.7.5.2	Anfärben zellulärer Strukturen in Gewebeschnitten	37
2.7.5.3	Anfertigen von Deckglas- (Coverslip) Präparaten für Konfokalmikroskopie	37
2.8	Virologische Methoden	38
2.8.1	Generation von MCMV Stocks.....	38
2.8.2	Infektion mit MCMV <i>in vivo</i>	38
2.8.3	Infektion mit MCMV <i>in vitro</i>	39
2.8.4	Inaktivierung der MCMV viralen Partikel	39
2.8.5	<i>In vitro</i> und Transwell Experimente.....	40
2.9	Tierversuche	40
2.9.1	Versuchstiere.....	41
2.9.2	Die IFN β Reportermaus	41
3	Ergebnisse	43
3.1	Charakterisierung der IFNβ Antwort von MCMV infizierten IFNβ/YFP Reporterermäusen	
	<i>in vivo</i>	43
3.1.1	pDCs sind die exklusiven IFN β Produzenten 6h und 48h nach MCMV Infektion <i>in vivo</i>	43
3.1.2	Die IFN β Induktions- und MCMV Infektionskinetik <i>in vivo</i> ist biphasisch	48
3.1.3	Nach MCMV Infektion verstärkt der positive IFN β Rückkopplungsmechanismus die IFN β Antwort in pDCs <i>in vivo</i>	49
3.1.4	IFN β sezernierenden pDCs sind 48h nach MCMV Infektion an der T- /B-Zell Zone der weißen Pulpa lokalisiert	52
3.1.5	Bei erhöhter viraler Dosis wird die IFN β Antwort <i>in vivo</i> in pDCs supprimiert	54
3.1.6	Untersuchungen zu Veränderungen im Phänotyp von DCs nach MCMV Infektion	56
3.1.6.1	Bis 24h p.i sind mehrheitlich pDCs infiziert, wohingegen in der späten Infektionsphase <i>in vivo</i> insbesondere cDCs mit MCMV infiziert sind	56
3.1.6.2	Analyse des Eintrittsweges von MCMV in verschiedene Zelltypen.....	58
3.1.6.3	Herkunft infizierter pDCs und cDCs nach MCMV Infektion.....	61
3.1.6.4	Etablierung des molekularen Nachweises der IgH Rekombination.....	62
3.2	Charakterisierung des zellulären Phänotyps nach der Infektion mit einer MCMVΔm157 Mutante <i>in vivo</i>	64
3.2.1	Die Infektion mit einer MCMV Δ m157 induziert die IFN β Antwort in pDCs	65
3.2.2	Neben pDCs produzieren auch Zellen entlang der Marginal Zone IFN β	67
3.2.3	Außer pDCs sind 24h p.i. mit MCMV Δ m157 infiziert.....	68
3.3	Untersuchungen von viralen Infektionsmechanismen in der Induktion der Typ I IFN Antwort	70
3.3.1	Die Mehrzahl <i>in vitro</i> generierter Flt3-L DCs exprimiert entweder IFN β oder ist mit MCMV infiziert.....	71
3.3.2	Einzig CD11b ⁺ DCs lassen sich unter Ko-Kulturbedingungen <i>in vitro</i> mit MCMV infizierten GM-CSF DCs infizieren und zur IFN β Expression induzieren.....	74
3.3.3	Die virale Replikation ist keine Voraussetzung für die IFN β Produktion in B220 ⁺ DCs <i>in vitro</i> ..	76
3.3.4	UV inaktiviertes MCMV induziert in pDCs die IFN β Expression <i>in vivo</i>	78

3.3.5	Die Stimulation mit „Defective Interfering Particles“ resultiert in pDCs in einer verstärkten IFN β Antwort <i>in vivo</i>	80
4	Diskussion.....	83
4.1	IFNβ Expressions- und MCMV Infektionskinetik <i>in vivo</i>	83
4.1.1	Der Einfluss der IFN β Antwort im zeitlichen Kontext der MCMV Infektion	83
4.1.2	Der zelluläre Infektionsstatus nach MCMV Infektion.....	87
4.2	Der Mechanismus der IFNβ Induktion	90
4.2.1	Rezeptor-vermittelte Endozytose als Voraussetzung für die Induktion der IFN β Antwort in pDCs	91
4.2.2	MCMV infiziert unreife DCs, die daraufhin ihren Phänotyp ändern	96
4.3	Vorgeschlagenes MCMV Infektionsmodell.....	99
4.4	Ausblick	101
5	Zusammenfassung	103
	Summary.....	104
6	Literatur.....	105
7	Anhang	114
	Abbildungsverzeichnis	114
	Tabellenverzeichnis	115
	Danksagung.....	116
	Eidesstattliche Erklärung.....	117

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem ist ein biologisches Abwehrsystem höherer Lebewesen und verhindert mit seiner dualen Eigenschaft zum Einen das Eindringen und Einnisten von Krankheitserregern, zum Anderen minimiert das Immunsystem bereits etablierte Infektionen und erzeugt nach erneutem Kontakt mit den Krankheitserregern zur Vermeidung von Gewebeschädigungen immunologischen Schutz (Immunität). Durch das Zusammenspiel der angeborenen (nativen) und erworbenen (adaptiven) Immunantwort wird eine Reaktion auf körperfremde Stoffe (Pathogene) zum Schutz des Organismus gewährleistet.

Nach erfolgreichem Überwinden mechanischer und physiologischer Barrieren kommen insbesondere in der frühen Phase der Immunantwort vor allem unspezifische Abwehrmechanismen gegen die Erreger oder deren pathogene Bestandteile zum Einsatz. Ein zentraler Mechanismus ist die Phagozytose der Pathogene und deren Zerstörung durch zelluläre Bestandteile des Immunsystems wie z.B. Makrophagen ($M\Phi$), Granulozyten, Dendritische Zellen (*Dendritic cells*, DCs) und Natürliche Killerzellen (NK). Diese Zellen stellen die Hauptbestandteile des angeborenen Immunsystems dar, werden aber auch durch die Ausschüttung von Zytokinen (Botenstoffe des Immunsystems) durch Effektorzellen des adaptiven Immunsystems und Proteine des Komplementsystems in der Pathogenabwehr unterstützt. Ihre Funktion besteht u.a. in der Aktivierung naiver Lymphozyten durch Zytokine und bildet die Schnittstelle zwischen dem angeborenen und adaptiven Immunsystem. Die Rekrutierung anderer Abwehrzellen sowie immunregulatorischen Zellen zum Ort der Entzündung wird so sichergestellt. Das effektive System der adaptiven Immunabwehr existiert ausschließlich in Vertebraten und umfasst die aus dem Knochenmark entstehenden T- und B-Lymphozyten (T- und B-Zellen). Die T-Zellen vermitteln die zelluläre Immunantwort gegenüber intrazellulären Pathogenen und unterstützen die humorale Immunantwort der B-Zellen, die durch eine Sezernierung antigenspezifischer Antikörper gegenüber extrazellulärer Pathogene charakterisiert ist.

1.1.1 Die Milz als größtes sekundäres lymphatisches Organ

Als hochorganisiertes lymphatisches Organ überwacht die Milz immunologisch das zirkulierende Blut. Morphologisch und funktional lässt die Milz sich in zwei separierte Sektionen einteilen, die rote und weiße Pulpa. Die Aufgabe der roten Pulpa (RP) besteht hauptsächlich im effizienten Herausfiltern seneszenter Erythrozyten, aber auch im Recyceln von Eisen durch Makrophagen. Die immunologisch bedeutendere Struktur der Milz ist die weiße Pulpa (WP), die aus der T- und B-Zell Zone besteht. In der T-Zell Zone, die auch als PALS (*periarteriolar lymphoid sheath*) bezeichnet wird, interagieren T-Zellen mit antigen-präsentierenden DCs und passierenden B-Zellen. Die klonale Expansion der aktivierten B-Zellen hingegen findet in separaten Bereichen, den B-Zell Follikeln, statt, in der sich Isotypenklassenwechsel und somatische Hypermutation ereignen. Die Struktur der Milz ermöglicht in Zusammenarbeit der T- und B-Zell Zonen und der Marginal Zone (MZ) das Erkennen und Beseitigen von durch den Blutstrom einwandernden Pathogenen oder zellulären Debris (zusammengefasst aus Mebius and Kraal (2005), (Abb. 1-1)).

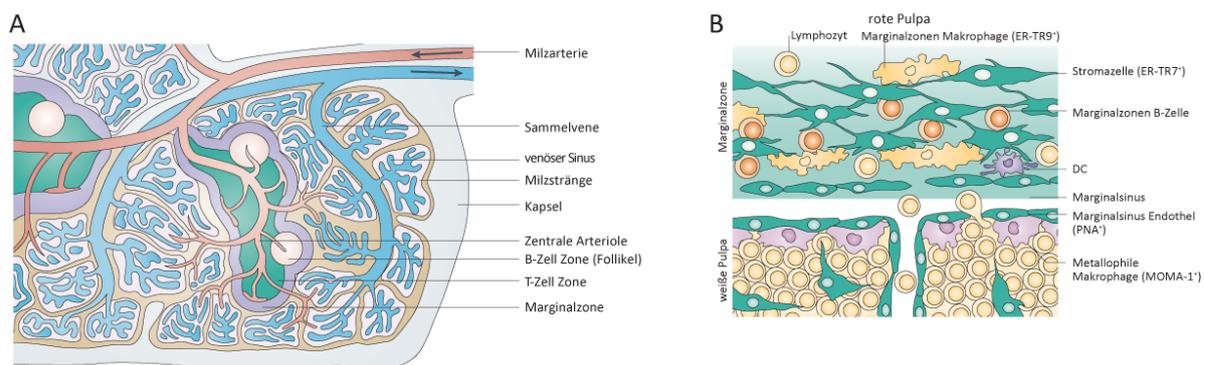


Abb. 1-1: Schematische Darstellung und Mikroarchitektur der murinen Milz.

[A] Die afferente Milzarterie verzweigt sich in die Zentralarteriolen, die von der weißen Pulpa ummantelt sind. Die weiße Pulpa besteht aus der T-Zell Zone (PALS: *periarteriolar lymphoid sheath*), Arteriolen und den B-Zell Follikeln. Das zirkulierende Blut der in den Milzsträngen der roten Pulpa endenden Arteriolen, fließt über die venösen Sinus in die Milzvene. Die größeren Arterien und Milzvenen enden schließlich kollektiv in den Bindegewebssepten (Trabeculae), die mit der die Milz umgebenden Kapsel verbunden sind. [B] Ein Netzwerk von Stromazellen bildet die Basis der Marginal Zone. Lymphozyten und DCs migrieren aus dem Blutstrom durch die rote Pulpa und gelangen vom Marginalsinus durch Passieren einer Schicht von Marginalsinus Endothelzellen in die weiße Pulpa (Editiert nach Mebius and Kraal (2005)).

1.1.2 Dendritische Zellen- Verbindung zwischen angeborener und erworbener Immunität

Die Zellen des Immunsystems entstehen im Knochenmark aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen (*hematopoietic stem cell*, HSC) und differenzieren zunächst in Vorläuferzellen der myeloiden (*myeloid progenitor*, MP) und lymphoiden (*lymphoid progenitor*, LP) Linie. T-, B- und NK Zellen leiten sich aus den lymphoiden Vorläufern ab, wohingegen sich Monozyten und Makrophagen aus den myeloiden Vorläufern (*myeloid macrophage/DC progenitor*, MDP) entwickeln. Myeloide Vorläuferzellen differenzieren in $M-CSF-R^+$ Monozyten/Makrophagen DC Vorläufer (MDP), die sich im nachfolgenden Differenzierungsschritt zu $Ly6C^{+/-}$ Monozyten, einer Subpopulation der Makrophagen, und den gemeinsamen DC Vorläufern (*common dendritic cell progenitor*, CDP) aufteilen (Abb. 1-2), (Geissmann et al., 2010).

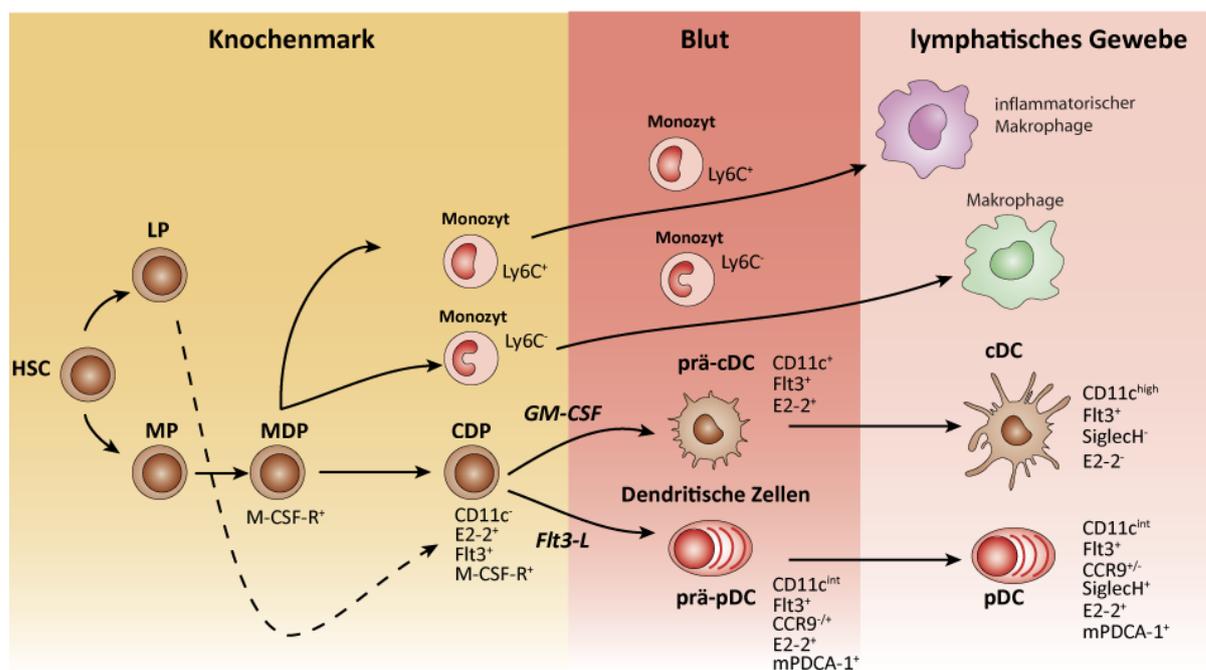


Abb. 1-2: Schematische Darstellung der Differenzierung muriner Dendritischer Zellen.

Gezeigt sind die Entwicklungswege und -orte verschiedener Typen von DCs und Makrophagen (angepasst nach Medzhitov et al. (2011); Reizis et al. (2011); Schlitzer et al. (2012)). Die Generation der lymphoiden Vorläufer (LP), aus denen T-, B- und NK Zellen hervorgehen, ist hier nicht berücksichtigt.

Dendritische Zellen sind eine heterogene Zellklasse und gehören zusammen mit Monozyten, Makrophagen und B-Zellen zu den professionellen Antigen-präsentierenden Zellen (APC) des Immunsystems. Trotz der gemeinsamen funktionalen Fähigkeiten der An-

tigenaufnahme, -prozessierung und -präsentation aller DC Subtypen unterscheiden sich die einzelnen DC Typen hinsichtlich ihrer anatomischen Lokalisation, phänotypischer Zelloberflächenmoleküle, Aktivierbarkeit und immunologischen Funktion. Klassischerweise lassen sich DCs in konventionelle Dendritische Zellen (cDCs) und plasmazytoide Dendritische Zellen (pDCs) einteilen. In der Maus werden verschiedene Zelloberflächenmoleküle als Marker zur Identifizierung der einzelnen DC Typen verwendet, darunter CD11c (Integrin α -X Kette) und CD11b (Integrin- α_M Kette von Mac-1). Auch die eigentlich „typischen“ T-Zellmarker CD4 und CD8 (CD8 auf DCs in der Form des $\alpha\alpha$ -Homodimers) sind auf DCs exprimiert und dienen als Unterscheidungsmerkmal distinkter DC Typen. In lymphoiden Organen wie z.B. der Milz naiver Mäuse existieren u.a. die DC Subtypen, die eine hohe Expression von CD11c und MHC Klasse II aufweisen: $CD4^+ CD11b^+$, $CD4^- CD8^- CD11b^+$ und $CD11b^- CD8^+$ DCs (Shortman and Liu, 2002). Sie kommen u.a. in unterschiedlichen prozentualen Mengen vor und weichen in ihrer TLR (*Toll-like receptor*) Expression voneinander ab. Anhand der $CD8\alpha$ und CD11b Expression auf cDCs werden migratorische und residente DCs voneinander unterschieden. Residente $CD8\alpha^+$ ($CD11b^-$) cDCs befinden sich hauptsächlich in den T-Zell Zonen lymphatischer Organe, während sich $CD8\alpha^-$ ($CD11b^+$) cDCs in der Marginal Zone bzw. subkapsulären Sinus der Milz aufhalten. Eine weitere Unterscheidung der $CD8\alpha^+$ und $CD8\alpha^-$ cDCs wird auch bezüglich der Fähigkeit zur T-Zellaktivierung vorgenommen. $CD8\alpha^-$ cDCs verfügen über ein erhöhtes Potential, extrazelluläres Material über MHC Klasse I an $CD8^+$ T-Zellen kreuz zu präsentieren, und sind damit essentiell für die Einleitung einer antiviralen zytotoxischen T-Zell Antwort. $CD8\alpha^+$ cDCs präsentieren Antigene vorwiegend über MHC Klasse II an $CD4^+$ T-Zellen und spielen eine wesentliche Rolle bei der Immunabwehr gegen extrazelluläre Pathogene.

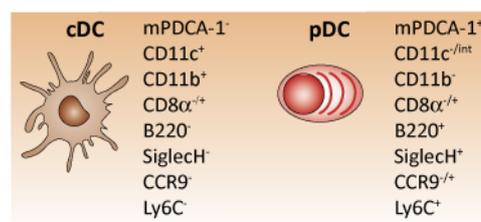


Abb. 1-3: Übersicht des Expressionsprofils der Oberflächenmarker von murinen cDCs und pDCs.

cDCs und pDCs unterscheiden sich hinsichtlich der Induktion einer T-Zell Antwort auf verschiedene Stimuli und in ihrer Fähigkeit der Zytokinproduktion als Antwort auf vielfältige Pathogene. So werden pDCs als professionelle Interferon (IFN) produzierende Zellen bezeichnet, die nach der Erkennung von Viren oder mikrobieller Infektionen innerhalb kürzester Zeit große Mengen an Typ I Interferonen produzieren. pDCs verbleiben im Knochenmark, Blut und Thymus und sind in lymphoiden Organen unter homöostatischen Bedingungen in der Haut oder anderen inflammatorisch relevanten Geweben lokalisiert. In der Milz sind pDCs in der T-Zell Zone sowie in der Marginal Zone und der roten Pulpa verstreut. Ihre Aktivierung durch pathogene Strukturen hat eine Hochregulation von MHC Molekülen und ko-stimulatorischer Proteine zur Folge, durch die ihnen eine Aktivierung naiver T-Zellen erlaubt wird. Im murinen System können pDCs durch die Koexpression der Oberflächenmarker Ly6C und B220 bei intermediärer Expression von CD11c identifiziert werden. Darüber hinaus können die Antikörper gegen CCR9 (*gut-homing-receptor*), mPDCA-1 (BST-2) und SiglecH für die Charakterisierung von pDCs genutzt werden. CD8 α wird nach Aktivierung auf pDCs hochreguliert (Colonna et al., 2004; Swiecki and Colonna, 2010; Watowich and Liu, 2010), (Abb. 1-3).

1.2 Die Interferone

Die Typ I Interferone stellen eine Familie strukturell verwandter Zytokine dar, die während der frühen Immunantwort von einer Vielzahl von Zellen auf einen pathogenen Stimulus hin exprimiert werden. Als Antwort auf virale oder mikrobielle Pathogene oder deren pathogene Bestandteile vermitteln sie einen immunmodulatorischen und anti-proliferativen Effekt. Die Gruppe der Interferone wird in drei Klassen eingeteilt: Typ I, II und III Interferone. Typ I Interferone umfassen neben multiplen IFN α s (13 im Menschen, 14 in der Maus) ein IFN β , sowie die Interferone IFN ϵ , IFN κ , IFN δ und IFN ω (ausschließlich in Schweinen), IFN τ (nur in Huftieren) und IFN ζ (nur in der Maus). Alle Typ I Interferone weisen eine gewisse strukturelle Homologie auf, unterscheiden sich aber signifikant zu den Typ II Interferonen. Die Typ II IFN Familie beinhaltet ausschließlich IFN γ , welches von einer limitierten Zahl der immunrelevanten aktivierten Lymphozyten (T-Zell-Subklassen und NK Zellen) exprimiert wird. IFN γ aktiviert unter anderem Makrophagen

und ist im Besonderen an der Induktion antimikrobieller Effektormechanismen gegenüber bakterieller Pathogene involviert. Die letzte Klasse der Interferone, Typ III IFN, umfasst IFN λ 1-3, die auch als IL-28A, IL-28B und IL-29 bezeichnet werden und, ähnlich den Typ I Interferonen, nach Erkennen viraler Infektionen exprimiert werden (Decker et al., 2005; Gonzalez-Navajas et al., 2012; Takaoka and Yanai, 2006).

1.2.1 Typ I Interferone in der Immunabwehr mikrobieller und viraler Infektionen

Typ I Interferone sind die wichtigsten Immunmodulatoren, die in der antimikrobiellen aber insbesondere in der antiviralen Immunantwort eine essentielle Rolle spielen. Als pleiotrope Immunmediatoren regulieren sie eine Vielzahl an Effekten des angeborenen und erworbenen Immunsystems (Decker et al., 2005). Im viralen Modell der Herpesvireninfektion beeinflussen sie durch Rekrutierung und Aktivierung von NK und T-Zellen deren immunregulatorische Eigenschaften und veranlassen die Maturation von cDCs und B-Zellen. Durch die Induktion stimulatorischer und inhibierender Zytokine bzw. Chemokine in den Effektorzellen verknüpfen sie das angeborene mit dem erworbenen Immunsystem und ermöglichen die Kontrolle des Virus. (Abb. 1-4).

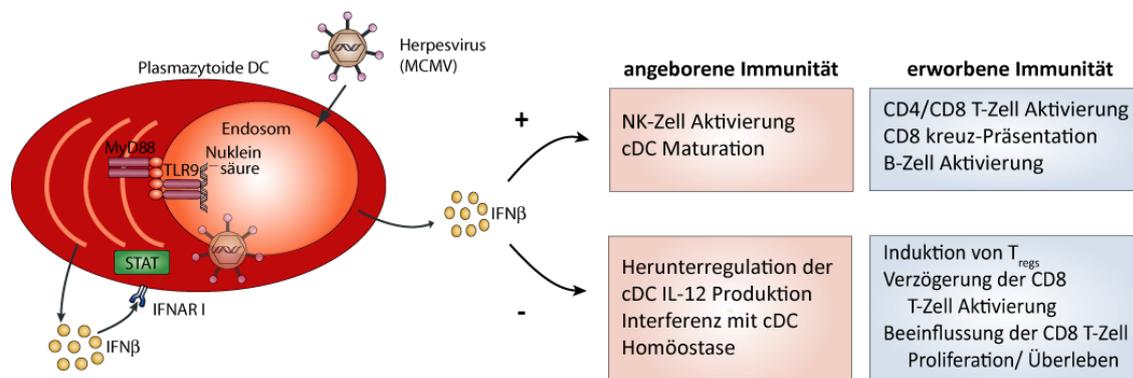


Abb. 1-4: Modulation der angeborenen und erworbenen Immunantwort durch Herpesviren aktivierte pDCs.

Modifiziert nach Baranek et al. (2009).

Der virostatistische Effekt der Typ I Interferone beruht auf der Induktion antiviral wirkender Proteine, die die Replikation und Virusverbreitung limitieren oder verhindern. Nach Bindung der Interferone an den entsprechenden Typ I Interferon Rezeptor (IFNAR) wird

so eine Vielzahl Interferon stimulierter Gene (ISG) exprimiert, die entweder direkt oder indirekt das antivirale Potential entfalten. Zu den hochregulierten IFN induzierten Genen gehören als direkt antiviral wirkende Proteine z.B. die Proteine PKR (Doppelstrang-RNA abhängige Proteinkinase R), OAS (2'-5'-Oligoadenylat-Synthetase) und die sogenannten Mx-Proteine. PKR wird in inaktiver Form synthetisiert und benötigt als ko-Faktor doppelsträngige (ds) RNA, die während viraler Replikation entsteht. Durch die Bindung der dsRNA findet eine Konformationsänderung statt, die zur Freisetzung der katalytischen Domäne und schließlich zur Aktivierung der PKR führt. Die Proteinkinase phosphoryliert den eukaryotischen Translationsinitiationsfaktor 2 (eIF2 α) und führt zum Abbruch der Translation. Die OAS wird in inaktiver Form synthetisiert und durch Bindung von dsRNA aktiviert. Die Funktion der OAS ist die Polymerisation von ATP zu Adenosinoligomeren und die Bindung an RNaseL. Die Induktion der RNaseL Enzymaktivität resultiert in Degradation zellulärer und viraler RNAs. Die Familie der Mx-Proteine kodiert für GTPasen, die IFN I induziert, Nukleokapsid-ähnliche Strukturen erkennt, dessen Lokalisation innerhalb der Zelle beeinträchtigt und dadurch auf die virale Replikation restriktiv wirkt (Randall and Goodbourn, 2008).

1.2.2 PRRs und IFN Induktion

1.2.2.1 Die Erkennung mikrobieller und viraler PAMPs via PRRs durch das angeborene Immunsystem

Die effektive Abwehr eindringender Pathogene setzt die Erkennung und Unterscheidung zwischen selbst und nicht-selbst der infizierten Zelle voraus. Die Pathogen-assoziierten molekularen Muster (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) bilden spezielle Struktur motive, die sehr charakteristisch und hochkonserviert sind. Diese spezifischen Muster und Kodierungen sind für das Überleben von Mikroben und Viren essentiell und daher schwer zu verändern. PAMPs, bei denen es sich um eine typische Anordnung von Zuckermolekülen, Komponenten der Zellwand von Bakterien (LPS), Peptiden oder um Nukleinsäuren von Viren und Bakterien handelt, werden vom angeborenen Immunsystem über eine limitierte Anzahl Keimbahn-kodierter Erkennungsrezeptoren, den PRRs (*pattern recognition receptors*) erkannt. Diese Rezeptoren sind entweder auf der Ober-

fläche bzw. an der Zellmembran von Immunzellen gebunden, sind im Zellinneren an den Endosomen oder intrazytoplasmatisch lokalisiert.

PRR	Spezies	Pathogenbestandteil	PRR Lokalisation	Assoziiertes Pathogen
TLR2	Gram-positive Bakterien Neisserien, Mykobakterien	PGN Porin Lipoarabinomannan	Zelloberfläche	Bakterien
TLR1/2	Bakterien/ Mykobakterien	Triacyl Lipopeptide		
TLR6/2	Mykoplasmen	Diacyl Lipopeptide		
TLR4	Gram-negative Bakterien	LPS		
TLR11	uropathogene Bakterien	nicht bekannt		
TLR5	Flagellaten	Flagellin	Endosom	
TLR9	Bakterien/ Mykobakterien	CpG-DNA		
TLR6/2	<i>Saccaromyces cerevisiae</i>	Zymosan		
TLR2	<i>Candida albicans</i>	Phospholipomannan	Zelloberfläche	Fungi
TLR4	<i>Candida albicans</i>	Mannan		
TLR2	Trypanosomen	tGPI-mutin		
TLR4	Trypanosomen	Glycoinositolphospholipide	Zelloberfläche	Parasiten
TLR11	<i>Toxoplasma gondii</i>	Profilin-ähnliches Molekül		
TLR9	<i>Plasmodium</i>	Hemozoin	Endosom	
TLR2	Masern Virus HCMV, HSV-1/2	Hämaglutinin Protein gB und/oder gH, Virionenkomponenten	Zelloberfläche	
TLR4	RSV, MMTV	Hüllproteine		
TLR3	Reoviren IAV, EMCV, WNV HSV-1, MCMV	dsRNA ssRNA dsDNA	Endosom	Viren
TLR7/8	MCMV, HIV	ssRNA		
TLR9	HCMV, MCMV, HSV-1/2	dsDNA (CpG-reich)		
RIG-I		kurze dsRNA, 5'ppp RNA		
MDA-5		lange dsRNA		
DAI	HSV-1, HCMV	dsDNA	Zytoplasma	Viren/ Bakterien
IFI16	HSV-1	dsDNA		
DHX9/DHX36	HSV	dsDNA		
AIM2	MCMV	dsDNA		

Tabelle 1-1: Übersicht ve rschiedener PRRs wie auch deren Liganden und Agonisten.

Ergänzend modifiziert nach Akira et al. (2006); Kawai and Akira (2011); Paludan et al. (2011).

Neben den PRR Familien der Scavenger-, β -Glukan- und Mannose-Rezeptoren, die auf der Zelloberfläche von Makrophagen, NK- und Endothelzellen lokalisiert sind und eine entscheidende Rolle in der Endozytose spielen, sind Mitglieder der TLR Familie und zytoplasmatische PRRs entscheidende Bestandteile der Immunantwort gegen einwandernde Pathogene. Mit zu den ersten entdeckten PRRs zählen TLRs. Es handelt sich dabei um Typ I Transmembran Glykoproteine, die über zahlreiche LRR (*leucin-rich repeat*) Motive der Ektodomäne die Erkennung von PAMPs vermitteln und über eine zytosolische TIR (*Toll-IL-1 receptor*) Domäne intrazelluläre Signalwege aktivieren. Bislang konnten in der Maus oder im Menschen 10-13 funktional charakterisierte TLRs identifiziert werden, die einen großen Bereich an PAMPs erkennen (Akira et al., 2006; Beutler, 2009).

Ihrer zellulären Lokalisation und der jeweiligen PAMP-Erkennung entsprechend werden die Mitglieder der TLRs in zwei Gruppen eingeteilt. TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 und TLR11 sind auf der Zelloberfläche lokalisiert und erkennen mikrobielle Membranbestandteile wie Lipide, LPS und Proteine, aber auch virale Bestandteile einschließlich Hüll- und/oder Kernproteine. Die andere Gruppe umfasst TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9, die exklusiv im Endoplasmatischen Retikulum (ER), Endosomen, Lysosomen und Endolysosomen und in Folge dessen in intrazellulären Kompartimenten lokalisiert sind (Blasius and Beutler, 2010). Diese TLRs erkennen Nukleinsäuren, die in das intrazelluläre Kompartiment nach Aufnahme von Viren und anderen Pathogenen freigesetzt werden (Tabelle 1-1).

Wenngleich TLRs eine zentrale Rolle in der Initiation der Immunantwort gegenüber verschiedenen Pathogenklassen einnehmen, konnten weitere Klassen der PRRs identifiziert werden, die NLRs (NOD (*nucleotide-binding oligomerization domain containing*)-like receptors) und RLRs (*retinoic acid-inducible gene (RIG-I)-like receptors*) (Takeuchi and Akira, 2009). Bestehend aus mehr als 20 Mitgliedern erkennt die Familie der NLRs verschiedene PAMPs und zellulären Stress und löst eine pro-inflammatorische Antwort aus, die auch die Sekretion von IL-1 β beinhaltet (Franchi et al., 2009).

Die RLRs sind RNA-Helikasen und sind im Gegensatz zu den TLRs im Zytoplasma lokalisiert. RLRs detektieren im Wesentlichen dsRNA, die bei einzelsträngigen (ss)- und doppelsträngigen RNA- und DNA-Viren als Zwischenprodukt der viralen Replikation entsteht. Die RLRs RIG-I (*retinoic acid inducible gene 1*) und MDA-5 (*melanoma-differentiation-associated gene 5*) initiieren nach der Erkennung von RNA die Typ I IFN

Antwort und ermöglichen eine rasche Immunantwort gegenüber Viren. Während RIG-I relativ kurze dsRNA und 5'-Triphosphat ssRNA erkennt, ist MDA-5 Sensor für lange dsRNA. MDA-5 ermöglicht eine schnelle inflammatorische Antwort gegen Mitglieder der Picornaviridae, denen das Encephalomyocarditis Virus (EMCV) angehört. Aufgrund fehlender Synthese von dsRNA und modifizierter 5'-Guanin-Cap mRNA des Wirtes können RLRs spezifisch virale RNA erkennen und zwischen selbst und nicht-selbst diskriminieren. Neben den RLRs existieren andere zytoplasmatische Sensoren, die pathogen-abstammende oder Wirts-dsDNA detektieren können. Zu diesen zytosolischen Nukleinsäure-Sensoren gehören AIM2 (*absent in melanoma 2*), DAI (*DNA-dependent activator of IFN-regulatory factor*, wird auch als DML-1 oder *Z-DNA binding protein 1* (ZBP1) bezeichnet) und IFI16 (*Gamma-interferon-inducible protein*, auch bekannt als *interferon-inducible myeloid differentiation transcriptional activator*). Die Bindung von dsDNA an AIM2 führt in erster Linie zu einer Caspase-1 abhängigen Produktion der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und IL-18 und weniger zur IFN I Induktion. Der Typ I IFN induzierende dsDNA Sensor DAI bindet dsDNA in ihrer Z-Konformation und induziert über die Assoziation mit dem Transkriptionsfaktor IRF3 und der Serin/Threonin Kinase TBK1 die Expression der Typ I Interferone (Takaoka et al., 2007). Das PYHIN Protein IFI16 ist ebenfalls ein intrazellulärer DNA-Sensor, der die IFN β Produktion in einer STING- (*stimulator of IFN genes*) abhängigen Weise induziert (Unterholzner et al., 2010). Des Weiteren transkribiert die RNA-Polymerase III AT-reiche DNA in 5'-Triphosphat RNA, wird nachfolgend von RIG-I detektiert und führt zur Induktion von Typ I IFN (Chiu et al., 2009).

1.2.2.2 Der Signaltransduktionsweg zur Induktion der Typ I IFN Gene

Die Initiation der intrazellulären Signalkaskaden zur Synthese von IFN I und proinflammatorischen Zytokine setzt die Erkennung bestimmter pathogener Strukturen durch TLRs oder zytoplasmatische PRRs voraus. In der Regel werden bis auf TLR3, der TRIF (*TIR domain containing adapter protein inducing IFN β*) als Adapterprotein nutzt, die Signalwege aller TLRs in MyD88- (*myeloid differentiation primary-response protein 88*) abhängiger Weise aktiviert. Die Rekrutierung des Adapterproteins an den Rezeptor bestimmt die Diskriminierung zwischen MyD88- oder TRIF-abhängigem TLR Signalweg.

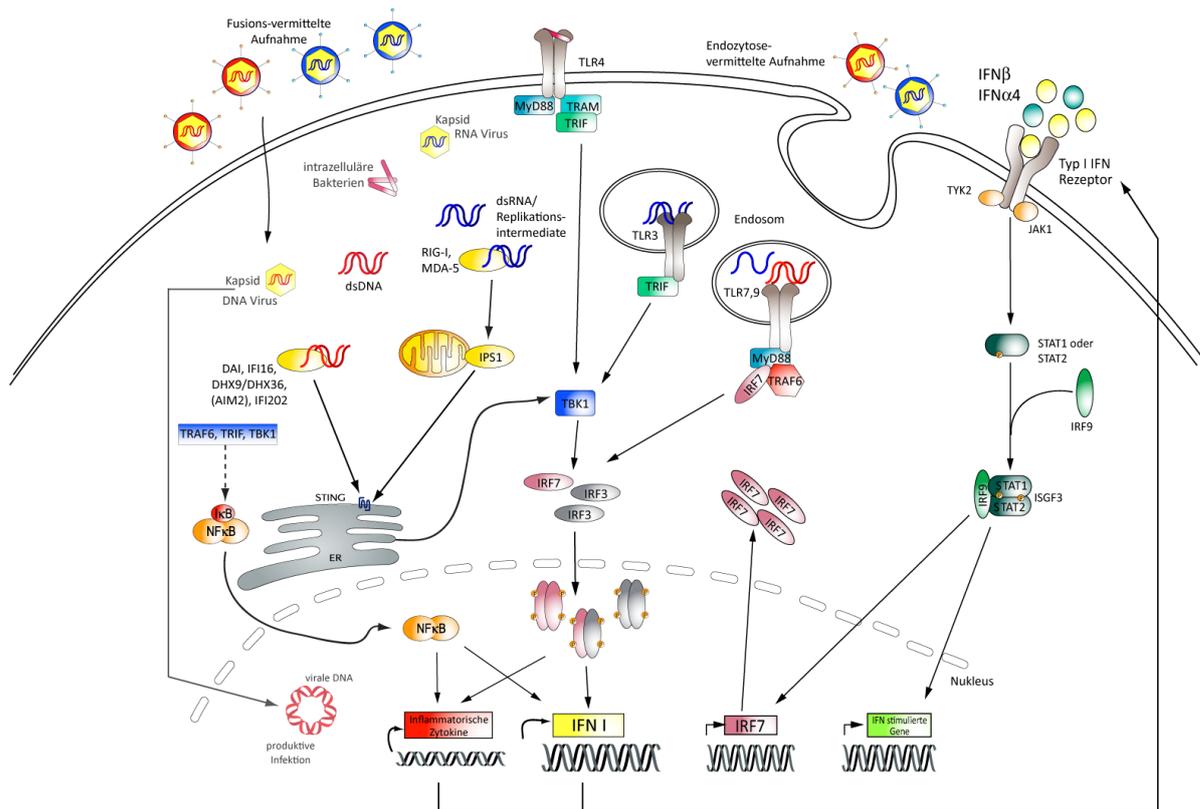


Abb. 1-5: Die frühe Interferon Typ I induzierte Signalkaskade.

Gezeigt ist die schematische Darstellung des Interferon Typ I Signalweges. Nach Bindung des Liganden an den entsprechenden PRR erfolgt die Translokation des dimerisierten Komplexes aus IRF3/7 in den Zellkern. Dort bindet der Komplex an die Typ I Interferon Transkriptionseinheit und es erfolgt die Transkription/Translation von Typ I IFN. In einem positiven Rückkopplungsmechanismus erfolgt die Bindung der IFNs an den gemeinsamen IFNAR. Nach Assoziation von phosphorylierten STAT1/2 mit IRF9 transloziert dieser ISGF3 Komplex in den Zellkern und ermöglicht dort die Transkription der IFN induzierbaren Gene. Modifiziert nach Dressing (2010); Paludan et al. (2011).

MyD88-abhängige Signalkaskaden induzieren im Wesentlichen die Produktion inflammatorischer Zytokine, wohingegen TRIF-abhängige Signalwege für die Expression von Typ I IFN sowie inflammatorischer Zytokine verantwortlich sind. Eine Besonderheit kommt den beiden Transkriptionsfaktoren IRF3 und IRF7 zu, die zu der Familie der IRFs (*interferon regulator factor*) gehören. IRF3 wird konstitutiv in nahezu allen Zelltypen exprimiert und liegt im Zytosol in latenter Form vor. IRF7 liegt dagegen nur in pDCs in hohen stöchiometrischen Konzentrationen vor und wird in allen anderen Zelltypen in geringen Mengen exprimiert. Die Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren IRF3 und IRF7 durch TBK1 (TANK (*TNF receptor associated factor (TRAF) family associated NF-κB activator*) binding kinase 1) führen zu deren Homo- und Heterodimerisierung, die daraufhin mit NF-κB, AP-1 (*activator protein 1*) und HMG (*high-mobility group*) Proteinen assoziieren. Hierdurch wird das Enhanceosom gebildet, welches an den IFNβ- bzw.

IFN α 4-Promotor bindet und die Expression der Typ I IFN Gene stimuliert (Akira et al., 2006; Decker et al., 2005; Honda and Taniguchi, 2006; Kawai and Akira, 2010) (Abb. 1-5). Durch einen autokrinen oder parakrinen positiven Rückkopplungsmechanismus bindet initial sekretiertes IFN α 4 und IFN β an den Oberflächenrezeptor IFNAR, der von allen Typ I Interferonen gleichermaßen als Bindungsrezeptor genutzt wird und zur Aktivierung der Transkription sowohl der anderen Typ I IFN als auch der IFN induzierbaren Gene führt (Abb. 1-5).

Als Heterodimer besteht der IFNAR aus den beiden Untereinheiten IFNAR1 und IFNAR2, die nach Bindung des Liganden dimerisieren. Nachfolgend assoziieren die der Familie der Januskinasen zugehörigen JAK1 (*Janus kinase 1*) und TYK2 (*Tyrosine kinase 2*) intrazellulär mit dem IFNAR-Rezeptor, was zur Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren STAT1 (*Signal Transducer and Activator of Transcription*) und STAT2 führt. Durch diese Phosphorylierung und nachstehender Heterodimerisierung erfolgt die Rekrutierung des Transkriptionsfaktors IRF9, woraufhin der gesamte Komplex ISGF3 (*Interferon-Stimulated Gene Factor 3*) in den Zellkern transloziert. Der Komplex bindet im Zellkern an das ISRE (*Interferon Stimulated Response Element*), und führt zu der Transkription verschiedenster antiviraler Gene, zu denen z.B. OAS oder aber auch der Tumor Suppressor p53 gehören. Auch kann dieser Typ I IFN Signalweg zu einer Homodimerisierung von STAT1 führen, welches an die GAS Elemente (*Interferon γ Activated Sequences*) bindet und eine differentielle Genexpression hervorruft (Honda et al., 2005b).

1.3 Die Familie der Herpesviren

Viren sind infektiöse Partikel, die sich extrazellulär durch Übertragung verbreiten und intrazellulär in geeigneten Wirtszellen vermehren können. Ihr Genom kodiert alle für das Virus essentiellen Informationen, die zum Umprogrammieren der permissiven Wirtszelle erforderlich sind, um neue Generationen von Viren zu synthetisieren. Die Familie der β -Herpesviren zeichnet sich durch eine strikte Wirtsspezifität aus, sodass sie im Regelfall nur eine bestimmte Wirtsart infizieren. Das Cytomegalovirus ist ein typischer Vertreter der Unterfamilie der *β -Herpesvirinae*.

1.3.1 Struktur und Replikationszyklus der Cytomegaloviren

Die Herpesviren sind große (~200nm), behüllte Viren mit einem doppelsträngigen, unsegmentierten Genom und einer Kodierungskapazität bis zu 240 kb. Das virale Genom beinhaltet mit seiner enormen Komplexität nach neueren Erkenntnissen zwischen 165 und 252 ORFs (*Open reading frames*) (Stern-Ginossar et al., 2012). Der virale Partikel besteht aus einer Membran mit sowohl viral-kodierten Glykoproteinen (gB, gH/gL/gO, gM/gN) als auch aus der Wirtszelle stammenden Proteinen. Diese Membranhülle, den sogenannten *envelope*, umgibt das Tegument. Das Tegument bildet eine poröse Matrix zwischen Kapsid und Membran, das aus einer Schicht amorpher Phosphoproteine besteht (z.B. humanes CMV (HCMV) pp65). Innerhalb dieser Membran befindet sich das ikosaedrische Kapsid, welches das virale Genom umgibt.

Die Fähigkeit von CMV, bestimmte Zelltypen zu infizieren und in diesen effizient zu replizieren, wird von mehreren Faktoren bestimmt. Zum Einen wird der Tropismus durch das Vorhandensein viraler Rezeptoren auf der Oberfläche der zu infizierenden Zelle (*viral entry*) bestimmt, zum Anderen muss das biochemische Equipment der Zelle so beschaffen sein, dass Replikation, Genexpression, Morphogenese (*assembly*) und letztendlich die Freisetzung (*release*) neusynthetisierter Virionen gewährleistet sind.

Die produktive Infektion von CMV beginnt mit der Adsorption des Virions an die Zellmembran der Wirtszelle (Compton et al., 1992). Die Anheftung erfolgt dabei durch eine reversible Interaktion von Glykoproteinen (gB) der Virushülle mit Heparansulfat-Proteoglykanen auf der Zelloberfläche (Compton et al., 1993). Neben gB sind auch weitere Glykoproteine (gH, gL, gM sowie gN) in die Virushüllmembran integriert, die in definierten Glykoproteinkomplexen vorliegen und den Tropismus des Virus für distinkte Zelltypen definieren. Die Infektiosität des Virus wird in verschiedenen Zelltypen durch die Bindung anderer Glykoproteinkomplexe an andere Rezeptoren vermittelt. DCs exprimieren das Lectin DC-SIGN (*DC-specific ICAM-Grabbing Nonintegrin*), welches, neben einigen anderen Viren wie z.B. dem HI-Virus, von den Glykoproteinen des HCMV zur Anheftung an die Zelle genutzt wird (Halary et al., 2002).

Viren sind obligat intrazelluläre Pathogene, deren Replikation abhängig ist von der Fähigkeit, ihre Genome von der infizierten Zelle zur nächsten uninfizierten Zelle weiterzugeben. Die Transmission beinhaltet drei wichtige Etappen: die Assemblierung der viralen

Partikel in der infizierten Zelle, dessen Freisetzung in den extrazellulären Raum und den Eintritt der Viren in neue zu infizierenden Zellen. Abhängig von ihrer Struktur, dringen Viren auf verschiedenen Wegen in die Zellen ein. Bei behüllten Viren wie MCMV erfolgt der Eintritt in die Zelle entweder durch deren Fusion mit der Plasmamembran, sodass virale Komponenten direkt in das Zytoplasma entlassen werden, oder der Eintritt der viralen Partikel ereignet sich über den Weg der Endozytose. Erniedrigt sich hier im Laufe der Reifung der Endosomen der pH-Wert, so fusioniert als direkte Folge die Virionenmembran mit der Endosomenmembran. Diese Veränderung resultiert in dem Eindringen des Virus in das zytosolische Kompartiment. Nach dem Transport des Virus entlang der Mikrotubuli gelangt das Virus bzw. Kapsid an den Nuklear-Poren-Komplex und entlässt das genetische Material in den Zellkern, wo die virale Replikation stattfindet. Erfolgt der Eintritt in die Zellen durch Fusion mit der Plasmamembran, werden virale Komponenten direkt in das Zytoplasma entlassen. Dieser Prozess ist pH-unabhängig und resultiert bei den meisten Viren in einer produktiven Replikation, nachdem das virale Genom im Kapsid durch das Zytoplasma transportiert wird und zum Zellkern gelangt (Heldwein and Krummenacher, 2008; Marsh and Helenius, 2006).

Die Genexpression und die virale Replikation erfolgen im Zellkern der infizierten Zelle. Die virale Genexpression wird in drei Phasen eingeteilt: sehr frühe (*immediate-early, IE*), frühe (*early, E*) und späte (*late, L*) Phase, die eine zeitliche Koordination der viralen Genexpression erlauben (Honest and Roizman, 1974). Die IE-Phase beginnt unmittelbar nach dem Eintritt viraler DNA in den Zellkern, und deren Expression ist unabhängig von der *de novo* Synthese viraler Proteine. Gene unter den IE-Promotoren (*MIEP, major immediate early promotor*) werden in der frühen Replikation von der Transkriptionsmaschinerie der Zelle angeschaltet (*IE1-3*). Zelluläre Transkriptionsfaktoren binden an den MIE-Promotor und leiten die Initiation der Transkription der *ie*-Gene ein. Virale Gene in der E-Phase benötigen virale Genprodukte der IE-Phase und sind vorrangig für den Beginn der DNA-Replikation essentiell. In der anschließenden L-Phase werden die Gene erst nach der DNA-Replikation angeschaltet. In ihr werden Strukturproteine (Kapsid, Tegument, *envelope*) synthetisiert, die für die Generation neuer Viruspartikel benötigt werden. Während der Morphogenese wird die Aufnahme der DNA in die Kapside in die Wege geleitet. In einem ersten Knospungsprozess werden diese durch die innere Kernmembran in den perinukleären Raum eingeschleust, bei dem sich die Laminastruktur des Zell-

kerns lokal auflöst, und die Nukleokapside werden mit Hilfe der viralen Glykoproteine mit der inneren Kernmembran umhüllt. An den Membranen der Endosomen oder des Trans-Golgi-Netzwerkes (TGN), in die zuvor virale Glykoproteine eingelagert wurden, akkumulieren die Kapside. Die entstandenen Virionen besitzen eine doppelte Hüllmembran, deren äußere Membran im weiteren Verlauf der Reifungsknospung mit der Plasmamembran fusioniert. Durch Exozytose werden anschließend aus der Zelle einfach umhüllte Viren freigesetzt (Paludan et al., 2011).

1.3.2 Das murine Cytomegalovirus (MCMV) als Modellsystem

Das Cytomegalovirus gehört einer Virusklasse an, die Spezies-spezifisch ist bzw. nur in sehr nah verwandten Spezies zu replizieren vermag. So ist zwar MCMV in der Lage in Rattenzellen zu replizieren, CMV spezifisch für Ratten dagegen repliziert jedoch nicht in murinen Zellen (Smith et al., 1986). Dennoch weist MCMV signifikante Ähnlichkeiten hinsichtlich struktureller und genomischer Eigenschaften mit dem HCMV auf, sodass MCMV als Tiermodell für HCMV Studien extensiv erforscht und eingesetzt werden kann (Hudson, 1979; Kelsey et al., 1977; Rawlinson et al., 1996; Scott et al., 2005). Vergleichbarkeiten im Infektionsverlauf, Etablierung der Latenz sowie Ähnlichkeiten der Symptomatik bei MCMV und HCMV befürworten ein Tiermodell mit MCMV und geben aufschlussreiche Erkenntnisse über Kontrollmechanismen bei Infektionen und antiviralen Immunantworten.

1.3.3 Mechanismen der viralen Evasionsstrategien

1.3.3.1 Virale Evasion der IFN Antwort

Herpesviren sind große Viren, die langsam replizieren und latente Infektionen verursachen. Zur erfolgreichen Kolonisation des Wirts benötigen Herpesviren die aktive Evasion und Modulation der zellulären Immunantwort in allen Etappen der Infektion. Multiple offensive und defensive virale Mechanismen haben sich im Laufe der Evolution entwickelt, aus denen eine Balance der Ko-Existenz zwischen Wirt und Virus resultiert. Die Mechanismen beinhalten die Vermeidung der Pathogenerkennung durch PRRs, Blockade der Aktivierung spezifischer PRRs, die Inhibition der Signaltransduktionswege und die

Genexpression durch die aktivierten PRRs (Paludan et al., 2011). Die viralen Proteine m142 und m143 verhindern die Aktivierung des PKR-vermittelten Abschaltens der Proteinsynthese in der infizierten Zelle durch Bindung an dsRNA und sorgen für die Aufrechterhaltung der Proteinsynthese (Valchanova et al., 2006).

Außerdem kodieren Viren für zahlreiche Genprodukte, die speziell die Signalwege der Typ I IFN Antwort beeinflussen und als virale IFN Antagonisten bezeichnet werden. Z.B. zielt das virale Protein m45 des MCMV auf die Signalkaskade des DAI ab (Rebsamen et al., 2009). So stellt die Inhibition NF- κ B-abhängiger Signalkaskaden ebenfalls eine effektive Methode des Virus dar, IFN α/β induzierte Signalwege und Sekretion proinflammatorischer Moleküle zu beeinflussen.

1.3.3.2 Ly49H-Rezeptor-abhängige Resistenz gegenüber einer MCMV Infektion

Verschiedene Viren sind imstande, dem Immunsystem zu entkommen, indem sie die viralen Erkennungsmechanismen der Zelle beeinflussen oder, wie bereits erwähnt, mit deren IFN-Signalwegen interferieren. Eine besondere Rolle, neben zytotoxischen T-Zellen (CTL), in der Immunantwort gegen MCMV spielen vor allem NK Zellen. Sie bieten besondere Effektorfunktionen, die zur Abwehr oder Kontrolle der viralen Infektion innerhalb der ersten Tage nach Infektion führen. Die Aktivierung von NK Zellen beruht zum Einen auf der Erkennung des „*induced-self*“, bei dem die Wirtszelle nach Aktivierung der Infektionsantwort bestimmte Proteine produziert, zum Anderen werden NK Zellen auch durch die Herunterregulation der MHC Moleküle („*missing-self*“) auf infizierten Zellen aktiviert. Das Erkennen viral exprimierter Proteine oder fremder MHC Moleküle erfolgt über spezifische NK Rezeptoren („*non-self*“). Multiple Wirtsfaktoren, die sowohl MHC-abhängig als auch MHC-unabhängig sind, werden für die Resistenz gegen MCMV verantwortlich gemacht (Adams et al., 2007; Dighe et al., 2005). Zuerst konnte das MHC-unabhängige Resistenzgen *Cmv1* auf dem distalen Mauschromosom 6 in geringer Distanz zum NK Genkomplex (NKC), der für auf NK Zellen exprimierte Rezeptoren kodiert, identifiziert werden (Scalzo et al., 1990). Klonierungen des Locus führten zur Identifizierung des Ly49H Rezeptors, der zu der Familie aktivierender *C-type lectin-like* NK Zellrezeptoren gehört. MCMV kodiert für das virale Protein m157, ein MHC Klasse I Homolog, welches nach Infektion auf der Zelle exprimiert wird (Arase et al., 2002; Smith et al.,

2002). Der NK Zellrezeptor Ly49H bindet m157 („non-self“) und löst dadurch die Rekrutierung des Adaptermoleküls DAP12 (*DNAX activation protein of 12 kDa*) aus. Die zytoplasmatische Domäne von DAP12 beinhaltet ITAMs (*Immunoreceptor tyrosine based activation motif*), die daraufhin phosphoryliert werden. Die DAP12 Signaltransduktion führt zur Rekrutierung der beiden Protein-Tyrosin Kinasen Syk (*Spleen tyrosine kinase*) und ZAP70 (*Zeta-chain-associated protein kinase 70*), was in einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration und Zytotoxizität resultiert. Aktivierte NK Zellen induzieren außerdem die Expression von IFN- γ und sezernieren Perforin und Granzyme enthaltende lytische Granula, die in den synaptischen Spalt zwischen NK Zelle und infizierter Zielzelle entlassen werden (Abb. 1-6).

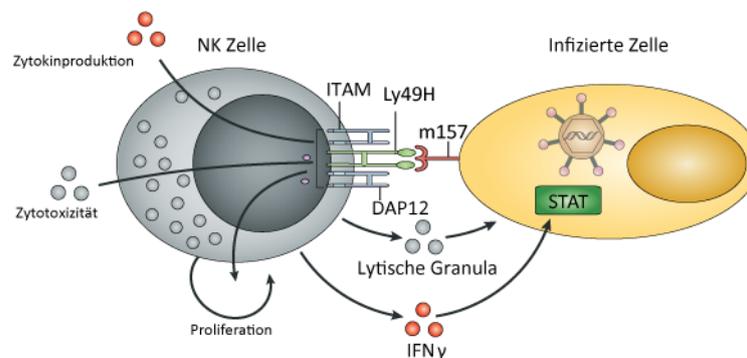


Abb. 1-6: Aktivierender Ly49H Rezeptor auf NK Zellen: Infektionsszenario in C57BL/6 Mäusen nach MCMV.

Natürliche Killer Zellen (NK) von C57BL/6 Mäusen exprimieren den DAP12-assoziierten Ly49H Rezeptor, der nach Aktivierung des viral kodierenden m157 Proteins die Zell-vermittelte Zytotoxizität (durch lytische Granula, die Perforin und Granzyme enthalten), Proliferation und Zytokinproduktion einleitet. Angepasst aus Lanier (2008).

C57BL/6 Mäuse exprimieren auf ihren NK Zellen Ly49H und sind resistent gegenüber einer MCMV Infektion, wohingegen BALB/c Mäuse diesen Rezeptor auf ihren Zellen nicht exprimieren und schneller einer MCMV Infektion erliegen (Voigt et al., 2003). Dass Ly49H für die Resistenz gegenüber MCMV essentiell ist, zeigte sich u.a. auch in einem erhöhter Virustiter in Milz und Leber von infizierten suszeptiblen Ly49H⁻ BALB/c Mäusen (Cheng et al., 2008). Die Kontrolle der MCMV Infektion durch NK Zellen ist demzufolge nicht nur durch verschiedene molekulare Mechanismen (wie IFN Produktion oder zytolytische Aktivität) gegeben, sondern ist auch abhängig vom infizierten Mausstamm. Der Unterschied in der Suszeptibilität zwischen den verschiedenen Mausstämmen ist u.a. in der Expression dieses Ly49H Rezeptors auf NK Zellen begründet.

1.3.4 Immunabwehr gegen MCMV

Die Kontrolle von MCMV erfordert sowohl das angeborene als auch das erworbene Immunsystem. Die wesentlichen Aufgaben des angeborenen Immunsystems sind in erster Linie das rasche Erkennen und Eliminieren eindringender Pathogene sowie die Signalisierung einer bestehenden Gefahr an zelluläre Bestandteile des adaptiven Immunsystems. Antivirale Zytokine wie Interferone, Interleukine (IL) und Chemokine werden als erste Effektormoleküle von Zellen des angeborenen Immunsystems als Antwort auf die virale Infektion ausgeschüttet. Interferone haben dabei einen aktivierenden Einfluss im Besonderen auf NK Zellen und induzieren in diesen Zellen die zytotoxische Aktivität. Die effiziente Kontrolle der MCMV Infektion erfordert außerdem Zellen der spezifischen Immunität, bei denen zytotoxische CD8⁺ T-Zellen eine herausragende Rolle spielen. Über ihren TCR (*T-cell receptor*)-Komplex erkennen CTLs virales Antigen im Kontext mit MHC I auf der Oberfläche anderer Zellen, werden aktiviert und lysieren die infizierte Zielzelle. Auch CD4⁺ T_H-Zellen (T-Helfer Zellen) tragen zur antiviralen Immunantwort bei, indem sie mit viralen Proteinen beladene MHC II Komplexe auf APCs erkennen und dadurch aktiviert werden. Die nachfolgende Sekretion von Interferonen und Interleukinen wirken auf die aktivierte T-Zelle selbst, aber auch auf B-Zellen, Makrophagen und CD8⁺ T-Zellen proliferativ bzw. aktivierend.

1.3.4.1 Detektion viraler PAMPs

Der IFN α/β Signalweg gilt als Schlüsselkomponente des angeborenen Immunsystems und spielt u.a. bei der Bekämpfung von Viren eine entscheidende Rolle. Verschiedene virale Komponenten werden mittels TLRs vom Immunsystem erkannt und führen in der Regel zu einer massiven Produktion von Typ I Interferonen und pro-inflammatorischen Zytokinen. Plasmazytoide Dendritische Zellen sind die prototypischen IFN Typ I sekretierenden Zellen. Einige virale Glykoproteine werden durch TLR2 und TLR4 detektiert, was im Wesentlichen eher zu einer Induktion pro-inflammatorischer Zytokine führt als zur IFN I Expression. Viren werden hauptsächlich von pDCs über den endosomalen Weg detektiert. Intrazelluläre TLRs sind TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9, die unterschiedliche Pathogenstrukturen erkennen und zunächst im Endoplasmatischen Retikulum (ER) verbleiben sowie in zytoplasmatischen Vesikeln wie den Endosomen. Sie erkennen dsRNA

und synthetische Analoge wie polyinosinic:polycytidylic acid (polyI:C), welches durch TLR3 erkannt wird. ssRNA dagegen wird über TLR7 und unmethylierte DNA mit CpG Motiven (nicht-methylierte Cytidin-Guanosin-Dinukleotide) über TLR9 erkannt (Alexopoulou et al., 2001; Diebold et al., 2004). CpG Motive kommen sehr häufig im Genom von MCMV vor, sind aber nicht strikt methyliert, sodass die immunregulatorische Kapazität von CpG vermutlich konserviert ist (Lundberg et al., 2003). TLR7 und TLR9 exprimierende pDCs haben eine herausragende Rolle in der Erkennung von MCMV. Sie sind in der Lage große Mengen an Typ I IFN als Antwort auch auf verschiedene Viren zu produzieren. Diese Spezialisierung setzt eine konstitutive Expression des Transkriptionsfaktors IRF7 voraus und möglicherweise auch die verlängerte Retention von TLR9 Liganden im endozytotischen Signalweg, die eine physikalische Begegnung zwischen TLRs und ihren Liganden ermöglicht. Obwohl der TLR9/MyD88-abhängige Signalweg für die frühe Zytokinproduktion als Antwort auf eine MCMV Infektion essentiell ist (Krug et al., 2004a), ist in Abwesenheit beider Signalkomponenten immer noch eine verminderte und verzögerte IFN Antwort detektierbar. Bis heute ist unklar, welche weiteren Sensoren für die Erkennung von MCMV eine Rolle spielen. Es wird jedoch vermutet, dass TLR3/TRIF-abhängige bzw. MyD88-unabhängige Signalwege nach MCMV Infektion für eine IFN Expression mitverantwortlich sind, wie dies in anderen TLR3 exprimierenden Zellen wie cDCs und Makrophagen der Fall ist. Wie virale DNA des MCMV Genoms in die angesäuerten endosomalen Kompartimente gelangt, um dort den TLR9/MyD88-abhängigen Signalweg zur IFN I Sekretion zu induzieren, bleibt bis heute offen, sodass weitere zytoplasmatische Sensoren wie z.B. RIG-I und MDA-5 oder DAI als mögliche Kandidaten der MCMV Erkennung nicht ausgeschlossen werden können.

1.4 Vorarbeiten mit der IFN β Reportermaus

Im MCMV Infektionsmodell konnte zunächst 36h p.i. (*post infection*) die Mehrzahl der IFN β produzierenden Zellen in *ex vivo* Experimenten in der Milz nur indirekt durch qPCR und GeneChip Analysen als pDC identifiziert werden (Zucchini et al., 2008a). Andere Studien erweiterten diesen Befund und bestimmten auf mRNA-Ebene die Milz als Hauptorgan der IFN α/β Antwort zwischen 4 und 96h p.i., wobei die IFN β Produktion einen biphasischen Charakter zeigte, die mit der viralen Expression korrelierte (Schneider et al.,

2008). Ergebnisse der eigenen Arbeitsgruppe ergänzten diese Befunde mit kürzeren Infektionszeiten und bestimmten *in vivo* die Visualisierung der IFN β Produzenten und deren Lokalisation in der Milz nach MCMV Infektion. Diese Charakterisierung der IFN β /YFP (*yellow fluorescent protein*) Expression zeigte im Modell der murinen Cytomegalovirus Infektion einen identischen Phänotyp der pDCs wie zuvor nach CpG Stimulation beobachtet. Immunhistologische Untersuchungen belegten im Vergleich zu den TLR9 Agonisten CpG jedoch eine limitierte Frequenz IFN β^+ Zellen (Scheu et al., 2008). Diese Befunde sind gut vereinbar mit der Beteiligung des TLR9 in der Erkennung von MCMV, die zu einer IFN β Expression in pDCs in der Milz führt (Krug et al., 2004a).

Aufgrund technischer Limitationen war bis zur Generation der IFN $\beta^{\text{mob/mob}}$ Reportermaus kein sensitives experimentelles Mausmodell verfügbar, welches die direkte simultane Visualisierung der IFN β Antwort und der MCMV Infektion auf zellulärer Ebene *in vivo* ermöglichte.

Die direkte Kopplung der Expression des YFP-Fluoreszenzproteins an das frühe immunrelevante Zytokin IFN β erlaubt dessen Visualisierung auf zellulärer Ebene und eröffnet umfassende Einblicke in die strukturellen Vernetzungen der an der Immunantwort beteiligten Zellen im *in vivo* bildgebenden Kontext. Fragen zur Migration können beantwortet werden, indem der Phänotyp der Zytokin-exprimierenden Zellen und deren Lokalisation in einem unmanipulierten Umfeld definiert werden.

Nach Injektion mit CpG, einem synthetischen Analogon von dsDNA mit einem erhöhten Anteil an CpG Motiven, konnten pDCs als IFN β exprimierende Zellen identifiziert werden. In den mit CpG injizierten Reportermausen konnte eine Frequenz von ca. 0,7% IFN β /YFP $^+$ pDCs festgestellt werden, die sich im histologischen Kontext der Milz aber nur bedingt darstellen ließen. In den T-Zell Zonen sekundärer lymphatischer Organe waren diese IFN β^+ pDCs lokalisiert. Darüber hinaus konnte unter Verwendung der IFN β Reportermaus im Infektionsmodell der murinen Listeriose erstmalig eine *in vivo* Charakterisierung IFN β^+ und *L. monocytogenes* $^+$ Zellen vorgenommen werden. In der Mehrheit IFN β^+ Zellen war eine produktive Listerien Infektion vorausgegangen und ~75% der IFN β /YFP $^+$ Zellen waren mit *L. monocytogenes* infiziert (Dresing et al., 2010).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Mangels geeigneter sensitiver Nachweismethoden erwiesen sich bisher lediglich *in vitro* bzw. indirekte *ex vivo* Studien als geeignet, Fragestellungen bezüglich der zellulären IFN β Quelle zu beantworten. Die Verwendung der bicistronischen IFN β /YFP Reportermaus ermöglichte eine detaillierte, zell-basierte Charakterisierung der IFN β Produzenten während der Immunantwort gegen MCMV. Obwohl vorangegangene Studien eine Beteiligung von pDCs an der IFN β Antwort nach MCMV Infektion belegten, blieb dennoch die Frage unbeantwortet, welche Zellen für die IFN β Produktion *in vivo* im gesamten zeitlichen Verlauf der MCMV Infektion verantwortlich gemacht werden konnten. Im primären wissenschaftlichen Focus der Arbeit stand zunächst, neben der Charakterisierung IFN β produzierender Zellen im zeitlichen Verlauf der MCMV Infektion, vor allem die Identifizierung beteiligter infizierter Zelltypen.

Zur Realisierung der Visualisierung IFN β produzierender Zellen sollte unter Berücksichtigung geeigneter Virusmutanten die gleichzeitige Bestimmung MCMV infizierter Zellen im immunhistologischen Kontext der Milz, im nächsten Schritt eine Validierung einer MCMV Δ m157 Mutante durchgeführt werden. So sollte nicht nur sichergestellt werden, welche Zelltypen die IFN I Antwort initiieren und wo diese Zellen lokalisieren, sondern auch die räumliche Beziehung dieser Zellen zu MCMV infizierten Zellen dargestellt werden.

Im nächsten Abschnitt dieser Arbeit sollte der Frage nachgegangen werden, welche Auslöser für die IFN β Produktion in Zellen verantwortlich gemacht werden können. *In vitro* Experimente sollten Aufschluss über mögliche Ursachen für die IFN β Induktion geben. Nach Etablierung geeigneter Detektionsverfahren sollte mit Hilfe von FACS-Sortierungen eine weitere zentrale Aufgabe dieses Projektes sein, die unterschiedliche prinzipielle Infizierbarkeit verschiedener DC Typen und den Ursprung infizierter DC Populationen zu ermitteln.

Abkürzungsverzeichnis

-	negativ(e)	(e)GFP	Verbessertes grün fluoreszierendes Protein (Enhanced green fluorescent protein)
+	positiv(e)	(e)YFP	Enhanced yellow fluorescent protein
Abb.	Abbildung	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
AIM2	Absent in melanoma 2	EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
AK	Antikörper	EGFR	epidermal growth factor receptor
APC	Antigen-präsentierende Zelle (antigen presenting cell)	EtOH	Ethanol
ATP	Adenosintriphosphat	FACS	Durchflusszytometrie (fluorescent activated cell sorting)
BAC	Bacterial artificial chromosome	Fc	Immunglobulin-Fc Teil
bio	Biotin	FKS	Fötales Kälberserum
BMDCs	aus Knochenmark gereifte dendritische Zellen	FITC	Fluoresceinisothiocyanat
bp	Basenpaar(e)	Flt3-L	FMS-like tyrosine kinase 3 ligand
BSA	Rinderserumalbumin	GAS	Interferon-Gamma Activated Sequences
bzw.	beziehungsweise	GM-CSF	Granulocyte macrophage colony stimulating factor
CARD	Caspase-recruitment domain	GTP	Guanosintriphosphat
CD	Cluster of Differentiation	h	Stunde(n) (hour(s))
cDC	Konventionelle Dendritische Zelle (conventional DC)	H ₂ O	steriles Wasser
cDNA	komplementäre DNA	HEV	hochendotheliale Venole
CFU	Kolonie bildende Einheit (Colony Forming Unit)	HSV-1/2	Herpes-Simplex-Virus 1/2
CMV	Cytomegalovirus	Ig	Immunglobulin
CTL	Zytotoxische T-Zelle (cytotoxic T-cell)	IFN	Interferon
CpG	Cytidin-Guanosin-Dinukleotide	IFI16	Interferon-inducible myeloid differentiation transcriptional activator
Cy	Cyanin	IL	Interleukin
d	Tag (day)	IRF	Interferon regulatory factor
DAI	DNA-dependent activator of IFN-regulatory factor	int	intermediär
DAPI	4',6'-Diamidin-2-phenylindol	i.p.	intraperitoneal
DC	Dendritische Zelle (dendritic cell)	ISGF3	Interferon-stimulated gene factor 3
DC-SIGN	Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin	kb	Kilobasenpaar(e)
DEPC	Diethylpyrocarbonat	ko	knock out
DIP	Defective interfering particle	LCMV	Lymphozytäres-Choriomeningitis-Virus
DMSO	Dimethylsulfoxid	LPS	Lipopolysaccharid
DNA	Desoxyribonukleinsäure	M	molar
dNTP	Desoxyribonukleotide	m	milli
ds	doppelsträngig(e) (double stranded)		

MHC	Major Histocompatibility Complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)	Poly (I:C)	Polyriboinosinsäure-Polyribocytidylsäure
MCMV	Murines Cytomegalovirus	PRR	Pattern recognition receptor
MDA-5	Melanoma Differentiation-Associated protein 5	RIG-I	Retinoic acid-inducible gene 1
μ	mikro	RLR	RIG-I-like receptor
MIEP	Major Immediate Early Promotor	RNA	Ribonukleinsäure
min	Minute(n)	rpm	Umdrehung pro Minute (rounds per minute)
MOI	Multiplicity of Infection	RT	Raumtemperatur
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)	RT-PCR	Reverse Transkription und PCR
MZ	Marginal Zone	s.	siehe
MZBC	Splenic marginal zone bridging channels	SA	Streptavidin
n	nano	SDS	Sodium-Dodecylsulfat
NDV	Newcastle-Disease-Virus	ss	einzelsträngig(e) (single-stranded)
NS	Nukleinsäure	STAT1/2	Signal Transducers and Activators of Transcription
ORF	Offener Leserahmen (open reading frame)	STING	Stimulator of IFN gene
ODN	Oligonukleotide	Taq	thermostabile DNA-Polymerase des Bakteriums <i>Thermus aquaticus</i>
p.i.	nach Infektion (post infectionem)	TCR	T-Zell Rezeptor (T-cell receptor)
PAMP	Pathogen associated molecular pattern	TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung	TLR	Toll-ähnlicher Rezeptor (Toll-like receptor)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion	TNF	Tumor Nekrose Faktor
pDC	plasmazytoide Dendritische Zelle	TRAF	TNF receptor associated factor
PDGFR	Platelet derived growth factor receptor	U	Enzymeinheit (unit)
PE	Phycoerythrin	ÜN	über Nacht
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein Complex	v/v	Volumen/Volumen
PFA	Paraformaldehyd	VSV	Vesicular-Stomatitis-Virus
PFU	Plaque Forming Unit		

2 Material und Methoden

2.1 Bezugsquellennachweis

Sämtliche Chemikalien wurden in pro Analysis Qualität bezogen. Zum Ansetzen der Lösungen wurde hochreines Wasser aus der MilliQ-Anlage (Millipore, Schwalbach) verwendet.

2.1.1 Chemikalien, Antiseren und Antibiotika

Stoff	Bezugsquelle
Agarose	Biozym, Hamburg
Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt
Amino-propyltrimethoxysilan	Merck, Darmstadt
Avidin/Biotin Blockierlösung	Vector Laboratories, Burlingame, USA
β -Mercaptoethanol	Invitrogen, Karlsruhe
2-Methylbutan	Fluka, Ulm
BSA	Sigma, Taufkirchen
CpG ODNs	TIB Molbiol, Berlin
Chloroquin	Sigma, Taufkirchen
DEPC	Sigma, Taufkirchen
Desoxynukleotide	Roche, Mannheim
destilliertes Wasser	Invitrogen, Karlsruhe
DMEM Medium VLE	Biochrom, Berlin
DMSO	Sigma, Taufkirchen
DNA Größenleiter 1 kb	Invitrogen, Karlsruhe
EGTA	Sigma, Taufkirchen
Esel-Normal Serum	Jackson Immuno Research, Suffolk, UK
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Boehringer, Mannheim
FACS Clean, Flow, Rinse Lösung	BD Biosciences, Heidelberg
FKS	PAN, Aidenbach
Ganciclovir	Roche, Mannheim
Glutamin (L-Glu)	Biochrom, Berlin
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Sigma, Taufkirchen
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Maus-Normal Serum	Jackson Immuno Research, Suffolk, UK
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Sigma, Taufkirchen
Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
Ratten-Normal Serum	Jackson Immuno Research, Suffolk, UK

Stoff	Bezugsquelle
Rekombinantes murines Flt3-L	R&D Systems, Mainz
RPMI Medium VLE	Biochrom, Berlin
SA-APC Alexa 750	Invitrogen, Karlsruhe
SA-APC	BD Biosciences, Heidelberg
Saccharose	Serva, Heidelberg
SA-Cy3	Invitrogen, Karlsruhe
Salzsäure (HCl, 37%)	Roth, Karlsruhe
SA-PE Cy7	BD Biosciences, Heidelberg
SA-PerCP Cy5.5	BD Biosciences, Heidelberg
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Serva, Heidelberg
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck, Darmstadt
Trypanblau	Sigma, Taufkirchen
Trypsin/EDTA	Biochrom, Berlin
Vectashield (Eindeckelmedium mit DAPI)	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Wasserstoffperoxid 30%ig	Merck, Darmstadt
Ziege-Normal Serum	DaKoCytomation, Hamburg

2.1.2 Enzyme

Enzym	Bezugsquelle
Collagenase Typ VIII	Sigma, Taufkirchen
DNA <i>Taq</i> -Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
DNase I	Roche, Mannheim

2.1.3 Kits und Verbrauchsmaterial

Reagenz/Verbrauchsmaterial	Bezugsquelle
α Biotin MACS Beads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
BD Compensation Beads	BD Biosciences, Heidelberg
Cryomolds	Sakura Finetek, Staufen
DakoCytomation Pen	DakoCytomation, Hamburg
LS MACS Säulen und Magnete	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Microtom Klingen	Jung-Histo Service, Nussloch
Objekträger Super Frost	Roth, Karlsruhe
Qiamp Micro DNA Kit	Qiagen, Hilden
Plastikwaren	NUNC, Wiesbaden
	BD Falcon, Heidelberg
	Eppendorf, Hamburg
	Corning, Amsterdam, Niederlande
	Neolab, Heidelberg
	BD Biosciences, Heidelberg
Siebgewebe MW= 40 & 70 μ m	Neolab, Heidelberg
Spritzen und Injektionskanülen	B. Braun, Melsungen
Tissue Tek (Einbettmedium)	Sakura Finetek, Staufen
Transwell (\varnothing 0,4 μ m, COL)	Costar
TSA FITC /Biotin System	Perkin Elmer, Rodgau

2.1.4 Geräte und sonstige Materialien

Gerät	Bezugsquelle
Axiovert 100 (Mikroskop)	Zeiss, Jena
BioDocAnalyzer (Geldokumentation)	Biometra, Göttingen
Biofuge A (Tischzentrifuge)	Heraeus, Hanau
Biofuge fresco (Tischzentrifuge)	Heraeus, Hanau
Brutschrank (Heraeus Heracell 240)	Heraeus, Hanau
Chirurgische Instrumente	Roboz, Gaithersburg, USA
Clean Air (Sterilbank)	Kendro, Wien, Österreich
Douncer	Wheaton
HM560 (Cryostat)	Thermo Fischer Scientific, Bonn
Elektrophorese Gelkammern	Hoefer, Holliston, USA
FACS Aria I	BD Biosciences, Heidelberg
FACS Canto II	BD Biosciences, Heidelberg
Hand-Dispenser Handystep	Brand, Wertheim
Heidolph Polymax 1040 (Plattformschüttler)	Heidolph Instruments, Schwabach
Heizblock Techne DB3	Biostep, Jahnsdorf
Heizrührer IKAMAG RCT	IKA, Staufen
LM750 (Konfokalmikroskop)	Zeiss, Jena
Mikrowelle	Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe
Millipore Anlage	Millipore, Schwalbach
NanoDrop 1000 (Photometer)	Peqlab, Erlangen
Neubauer Zellzählkammer	LO-Laboroptik, Friedrichsdorf
PCR Softstripes, 0,2ml	Biozym Scientific, Oldendorf
pH Meter MP 225	Mettler-Toledo, Giessen
Pipettierhilfe Pipetus	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
TE2000 (Mikroskop)	Nikon, Düsseldorf
Thermocycler T1 (PCR-Gerät)	Biometra, Göttingen
Thermomixer (Schüttel-Heiz-Inkubator)	Eppendorf, Hamburg
UV Crosslinker CL 1000	UVP, Upland, California, USA
Vortex Schüttler VVR	VWR, Darmstadt
Waage Precisa 600c	Oehmen Labortechnik, Essen
Wasserbad	Köttermann Labortechnik, Uetze/Hänigsen

2.2 Medien und Puffer

2.2.1 Stammlösungen und Puffer

PBS	13,7	mM	NaCl
	2,7	mM	KCl
	80,9	mM	Na ₂ HPO ₄
	1,5	mM	KH ₂ PO ₄ , pH = 7,4
TE-Puffer	10	mM	Tris-HCl, pH = 8,0
	1	mM	EDTA
TAE Elektrophoresepuffer	40	mM	Tris-HCl, pH = 8,0
	20	mM	Eisessig
	2	mM	EDTA

dNTP-Mix	je 1 mM	dATP, dCTP, dTTP, dGTP
10 x PCR-Puffer	500 mM	KCl
	100 mM	Tris-HCl, pH = 8,3
	25 mM	MgCl ₂
	0,1 % (w/v)	Gelatine
Erythrozyten-Lysepuffer	150 mM	NH ₄ Cl
	10 mM	KHCO ₃
	0,1 mM	EDTA, pH = 7,2-7,4
FACS-Puffer	1 x	PBS
	2 % (v/v)	FKS
	2 mM	EDTA
MACS-Puffer	1 x	PBS
	0,5 % (w/v)	BSA
	2 mM	EDTA
		steril filtriert, entgast
PFA Fixierpuffer	4 % (w/v)	Paraformaldehyd
	2 mM	MgCl ₂
	1,25 mM	EGTA
	10 % (v/v)	10 x PBS, pH = 7,5 (HCl, NaOH)
Collagenase Typ VIII	100 mg/ml	Collagenase Typ VIII in 1 x PBS
DNase I	3000 U/ml	DNase I in 1 x PBS gelöst
Organverdaupuffer	6 % (v/v)	Collagenase Typ VIII Lösung
	1 % (v/v)	DNase I Lösung
	93 % (v/v)	1 x PBS steril filtriert
TNB	0,1 M	Tris-HCl, pH = 7,5
	0,15 M	NaCl
	0,5 % (w/v)	Block Reagenz aus TSA Kits

2.2.2 Medien für die Zellkultur

	Zelltypen		
	GM-CSF DCs	Flt3-L DCs	RAW 264.7/HT1080/NIH3T3
Grundmedium	DMEM VLE	RPMI 1640 VLE	RPMI 1640 VLE
Zusätze			
GM-CSF ¹	1,5%		
Flt3-L		100ng/ml	
FKS	10%	10%	10%
L-Glutamin	enthalten	enthalten	enthalten
β-ME	0,05mM	0,05mM	0,05mM
Penicillin/Streptavidin			1%

¹GM-CSF wurde als Kulturüberstand der GM-CSF produzierenden P3X63/O-GM-CSF Hybridomzellen zugesetzt.

Tabelle 2-1: Zusammensetzung der Zellkulturmedien.

2.3 Zelllinien

2.3.1 Zellen und Zelllinien

Zellen/-linien	Charakteristika	Referenz
P3X63/O-GM-CSF	murine Myelom Zelllinie, produzieren GM-CSF	(Karasuyama and Melchers, 1988)
DC	<u>GM-CSF DCs:</u> Kultivierung aus Knochenmarkzellen mit GM-CSF <u>Flt3-L DCs:</u> Kultivierung aus Knochenmarkzellen mit rekombinantem mFlt3-L	(Inaba <i>et al.</i> , 1992) (Gilliet <i>et al.</i> , 2002)
Splenozyten	primäre Milzzellen, kultiviert nach Organhomogenisierung und Erythrozytenlyse	
A20	Murine B-Zell Lymphom abgeleitet von einem spontanem retikulärem Neoblastom	(Kim <i>et al.</i> , 1979)
RAW 264.7	Murine Monozyten/Makrophagen Leukämiezelllinie aus BALB/c Mäusen, ursprünglich aus Peritoneum	(Raschke <i>et al.</i> , 1978)
NIH3T3	Murine Embryonale Fibroblasten Zelllinie	ATCC, CRL-1658 TM

Zellen/-linien	Charakteristika	Referenz
HT1080 ²	Humane epitheliale Fibrosarkomazelllinie	DSMZ, Braunschweig (Rasheed et al., 1974)
HT1080 eYFP ²	Humane epitheliale Fibrosarkomazelllinie, exprimiert stabil das verbesserte eYFP	von Prof. Dr. I. Schmitz, HZI Braunschweig
HT1080 eGFP ²	Humane epitheliale Fibrosarkomazelllinie, exprimiert stabil das verbesserte eGFP	von Prof. Dr. I. Schmitz, HZI Braunschweig

²HT1080 Zelllinien wurden zum Einstellen des FACS bzw. zur Kompensation der GFP und YFP Fluoreszenzen verwendet.

Tabelle 2-2: Verwendete Zellen und Zelllinien.

2.3.2 Verwendete MCMV Stämme und Virusmutanten

Virus	Promotor/Charakteristika	Referenz
MCMV WT	C3X, BAC-abgeleitete wt-Rekombinante MW97.01, wt-MCMV-Eigenschaften <i>in vitro/in vivo</i>	(Wagner et al., 1999)
MCMV GFP	MIEP, <i>eGFP</i> im <i>IE2</i> Lokus von MCMV	(Henry et al., 2000)
MCMV $\Delta m157$	Deletion des <i>m157</i> Lokus	(Bubic et al., 2004)
MCMV $\Delta m157$ GFP	MIEP, <i>eGFP</i> im deletierten <i>m157</i> Lokus	generiert von PD Dr. A. Zimmermann
MCMV $\Delta m157$ dsRed Mito	MIEP, dsRed-Protein fusioniert mit Mito- Lokalisationssignal im deletierten <i>m157</i> Lokus	generiert von Dr. V.T.K. Le

Tabelle 2-3: Verwendete Stämme und Virusmutanten von MCMV.

2.4 Primer und Antikörper

2.4.1 Oligonukleotide

Die Primer wurden von der Firma Metabion (Martinsried) im lyophilisierten Zustand bezogen und zur weiteren Verwendung mit H₂O auf eine Endkonzentration von 10µM eingestellt.

Bezeichnung	Primersequenz (5'→3')	Spezifität
#MuO	CCG CAT GCC AAG GCT AGC CTG AAA GAT TAC C	<i>Intron</i> vor J1 Chr. 12 murin, 5' Bereich
#D _H L	GGA ATT CGM TTT TTG TSA AGG GAT CTA CTA CTG TG	<i>Exon D3</i> Chr. 12, 5' Bereich
#J4	TCC CTC AAA TGA GCC TCC AAA GTC C	<i>Intron J4</i> Chr. 12, 3' Bereich

Tabelle 2-4: Verwendete Primer für PCRs, qPCRs und IgH Rekombinationsnachweisen.

2.4.2 Antikörper

Für durchflusszytometrische und histologische Untersuchungen wurden Antikörper (AK) der Firmen BD Biosciences (Heidelberg), Jackson Immuno Research (Suffolk, UK), SantaCruz (Heidelberg), BioLegend (Uithoorn, Niederlande), Abcam (Cambridge, UK), BMA (Augst, Schweiz), eBioscience (San Diego, USA), AbD Serotec (Düsseldorf) und Chemicon/Millipore (Schwalbach) bezogen und in austitrierten Konzentrationen verwendet (Tabelle 2-5).

Antikörper	Klon	Fluorochrom/Konjugat	Verwendung	Bezugsquelle
Esel α Hase	polyklonal	unkonjugiert	Histologie	Jackson Immuno Research
Esel α Ziege	polyklonal	unkonjugiert	Histologie	Jackson Immuno Research
Ziege α Ratte	polyklonal	unkonjugiert	Histologie	Jackson Immuno Research
αCD3ε	145-2C11	PerCPCy5.5	FACS	BD Biosciences
αCD8α	53-6.7	PeCy7	FACS	BD Biosciences
αCD11b	M1/70	APC Cy7	FACS	BD Biosciences
αCD11c	HL3	APC	FACS	BD Biosciences
αCD16/CD32	2.4G2	unkonjugiert	FACS/Histologie	BioLegend
αCD19	1D3	PerCPCy5.5	FACS	BD Biosciences
αCD45R/B220	RA3-6B2	PerCP/Biotin	FACS/Histologie	BD Biosciences
αCD45.1	A20	Biotin	FACS	BioLegend
αCD45.2	104	Biotin/PeCy7	FACS	BioLegend
αCD49b	DX5	PeCy7	FACS	eBioscience
αCD197 (CCR7)	4B12	PeCy7	FACS	eBioscience
αCD199 (CCR9)	CW-1.2	PeCy7	FACS	eBioscience
αF4/80	BM8	Biotin	FACS	BioLegend
αGFP	Polyklonal	unkonjugiert	Histologie	Abcam
αmPDCA-1	JF05-1C2.4.1	Biotin	FACS	Miltenyi Biotec

Tabelle 2-5: Verwendete Antikörper.

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 Isolierung genomischer DNA aus murinen Zellen

Die DNA aus murinen Zellen wurde mittels Qiap Micro DNA Kit (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers extrahiert und spektrophotometrisch im Nanodrop analysiert.

2.5.2 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten mit Hilfe zweier spezifischer Primer, die zum 5'-Ende des gewünschten DNA-Abschnitts und zum 3'-Ende des entgegengesetzten Strangs komplementär sind, wurde die Polymerase-Kettenreaktion eingesetzt. Ein 50µl-Reaktionsansatz enthielt 10-100ng Matrize (50-200ng genomischer DNA, 2,5U *Taq*-Polymerase, 0,1 Volumen 10x Puffer + MgSO₄, je 330µM Desoxynukleosidtriphosphat, je 20µM 3'- und 5'-Primer. Die erforderlichen Anlagerungstemperaturen ("Annealing"-Temperaturen, TA) wurden für jedes Primerpaar individuell ausgetestet.

Die Berechnung der Schmelztemperatur der Oligonukleotide erfolgte nach der Formel von Metabion:

$$T_M = 64,9 + 41x(yG+zC-16,4)/(wA+xT+yG+zC)$$

Das PCR Profil (initiale Denaturierung 94°C 3min, 30x [Denaturierung 96°C 30sek, Annealing 68°C 1min, Elongation 72°C 1min] finale Elongation 72°C 10min, 4°C ∞) erfolgte im Biometra Cycler.

2.5.3 Auftrennung PCR amplifizierter Fragmente mittels Agarosegele

Zur Analyse von DNA-Fragmenten wurden horizontale, nicht-denaturierende Agarosegele verwendet, wobei die eingesetzte Agarosekonzentration nach den Fragmentgrößen gewählt wurde. Der Gellauf erfolgte in 1x TAE-Puffer mit Ethidiumbromid (1ng/ml) im Gel, die Proben wurden mit 6x Auftragspuffer (60% Glycerol, 60mM EDTA, 0,09% Bromphenolblau, 0,09% Xylencyanol FF) versetzt. Als Längenstandard wurden 500ng der 1kb Leiter aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Stromstärke von ~30mA, die Laufdauer richtete sich nach dem erforderlichen Trennungseffekt. Nach dem Lauf wurden die Gele mit Hilfe des BioDoc Analyze Digital (Biometra) ausgewertet.

2.6 Zellbiologische Methoden

2.6.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Die Kultivierung der Zelllinien und primären Zellen erfolgte in Petrischalen mit entsprechendem Kulturmedium in den dafür vorgesehenen Inkubatoren in feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre mit 5% CO₂. Die im Experiment eingesetzte Zell-Passage hing von der Proliferationsrate der Zellen ab und das Passagieren der Zellen erfolgte in der Regel zwei- bis dreimal pro Woche. Im Falle von adhärent wachsenden Zellen wurde dazu das Kulturmedium entfernt, die Zellen wurden mit Ca²⁺/Mg²⁺-freier Phosphat-gepufferter Saline gewaschen und für 5-10min mit einer Trypsin/EDTA-Lösung (0,05%/0,02% w/v) im Brutschrank inkubiert. Um das ablösende und zugleich toxisch-wirkende Trypsin zu inaktivieren, wurden die abgelösten Zellen in FKS-haltigem Medium resuspendiert und - bezogen auf die Ausgangszellzahl - 1:2 bis 1:10 verdünnt und in eine neue Kulturflasche überführt. Im Falle von Suspensionszellen wurde der Kulturüberstand vorsichtig entfernt, die Zellen gleichmäßig im Medium resuspendiert und im Verhältnis zur Ausgangszellzahl 1:5 bis 1:10 verdünnt und in eine neue Kulturflasche überführt. Mit Hilfe der Ausschlußfärbung durch Trypanblau erfolgte die Bestimmung der lebend-Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer.

2.6.2 Kryokonservierung und Lagerung eukaryotischer Zellen

Für die Langzeitkonservierung wurden die abtrypsinieren adhärent wachsenden Zellen oder Suspensionszellen bei 1200rpm, 5min, RT zentrifugiert, in Einfriermedium (Kulturmedium mit Zugabe von 10% FKS und 10% DMSO (Sigma)) resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Die Röhrchen wurden in Isopropanol-gefüllten Einfriercontainern (Nalgene Labware, Rochester, USA) vorerst bei -80°C eingefroren und am folgenden Tag in der Gasphase des mit flüssigem Stickstoff gefüllten Tanks weiter aufbewahrt. In einem 37°C warmen Wasserbad wurden die eingefrorenen Zellen zur Rekultivierung aufgetaut. Um das toxische DMSO zu entfernen, wurden die Zellen langsam mit Kulturmedium versetzt und zentrifugiert (1200rpm, 5min, 4°C). Das Zellpellet wurde in Kulturmedium resuspendiert und die Zellsuspension in Kulturflaschen oder Petrischalen überführt.

2.6.3 Generierung GM-CSF haltigen Mediums zur DC Differenzierung

Die murine Myelom Zelllinie P3X63/O-GM-CSF wurde für die Generierung von GM-CSF haltigem Medium verwendet. Dazu wurden 2x10⁶ der Suspensionszellen mit 50ml Medium in einer T175 Zellkulturflasche ausgesät. Der Kulturüberstand wurde nach 7 Tagen geerntet und durch Zentrifugieren (15min, 4°C, 3000rpm) von Zellrückständen gesäu-

bert. Nach Sterilfiltration (0,2µm Filter) wurde der Überstand bei -80°C gelagert. Das Austesten des GM-CSF-haltigen Überstandes erfolgte an Knochenmarkszellen, die mit unterschiedlichen Konzentrationen des GM-CSF Überstandes kultiviert wurden. Anschließend wurde der Aktivierungsstatus mittels FACS analysiert.

2.6.4 Differenzierung myeloider Zellen aus dem murinen Knochenmark

2.6.4.1 Präparation von Zellen aus dem Knochenmark

Zur Gewinnung von myeloiden Zellen aus dem Knochenmark wurden den Tieren Femur und Tibia entnommen. Nach Entfernen des umliegenden Muskelgewebes wurden die Knochen 5min in 70%igem EtOH desinfiziert und anschließend mit PBS gewaschen. Die Epiphysen wurden von den Diaphysen mit einer sterilen Schere abgetrennt und das Knochenmark mittels einer 26 Gauge Kanüle mit Medium aus der Markhöhle gespült und in eine Petrischale überführt. Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren wurde das Knochenmark resuspendiert und nach anschließender 3min Inkubation mit Erythrozyten-Lysepuffer bei RT von Erythrozyten befreit. Nach Abstoppen der Lysereaktion mit Medium wurden die Zellen abzentrifugiert (5min, 4°C, 1200 rpm) und das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert. Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit einer Neubauer Zählkammer. Die Knochenmarkszellen wurden zu myeloiden Zellen differenziert (vgl. 2.6.4.2, 2.6.4.3).

2.6.4.2 Differenzierung von GM-CSF DCs

Für die Generierung von GM-CSF DCs wurden 2×10^6 Knochenmarkszellen (vgl. 2.6.4.1) auf einer sterilen unbeschichteten 10cm Petrischale ausgesät. Nach der Zugabe von 10ml frischem Medium am Tag 3 der Differenzierung und dem Austauschen von 10ml Medium am Tag 6 waren die Zellen 8 Tage nach Kulturbeginn ausdifferenziert. Die Ernte sowohl adhärenter als auch in Suspension befindlicher Zellen erfolgte nach 20min Inkubation bei 4°C durch Abkratzen der Zellen unter Zuhilfenahme eines Zellschabers. Im Anschluss an die Zellzahlbestimmung wurden die Zellen für nachfolgende *in vitro* Versuche eingesetzt.

2.6.4.3 Differenzierung von Flt3-L DCs

Zur Generierung und Differenzierung wurden 2×10^7 Knochenmarkszellen in 10ml Medium (vgl. Tabelle 2-1) auf einer 10cm sterilen unbeschichteten Petrischale ausgesät. Am Tag 5 der Differenzierung erfolgte die Supplementation von 5ml frischem Kulturmedium. 8-9 Tage nach Kulturbeginn waren die Knochenmarkszellen zu DCs ausdifferenziert, und die Zellen wurden wie bereits beschrieben (vgl. 2.6.4.2) geerntet. Die Zellen wurden anschließend in *in vitro* Experimenten eingesetzt.

2.7 Immunologische Methoden

2.7.1 Organentnahme

Die adulte Versuchsaus wurde durch zervikale Dislokation schmerzfrei getötet und die Operationsstelle mit 70%igen EtOH desinfiziert. Milz oder Knochen wurden semisteril entnommen.

2.7.2 Herstellung von Einzel-Zell-Suspensionen aus der Milz zur FACS Analyse

Die entnommene Milz wurde in eine 5cm Petrischale überführt und 3ml Organverdaupuffer an mehreren Stellen mit einer Kanüle injiziert. Die Milz wurde unter Zuhilfenahme einer Pinzette grob zerkleinert und für 30min bei 37°C inkubiert. Durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren wurde die verdaute Milz weiterhin homogenisiert, zum Stoppen des Verdauungsprozesses mit FACS-Puffer versetzt und die Zellen (5min 4°C 1200rpm) pelletiert. Die Erythrozyten wurden durch Zugabe des Erythrozyten-Lysepuffers innerhalb weniger Minuten entfernt. Nach Abstoppen der Lysereaktion und Pelletieren der Zellen wurden diese durch ein steriles 0,2µm Filtersieb gegeben und deren Zellzahl bestimmt.

2.7.3 Zellseparation mittels MACS

Die Zellseparation mittels MACS beruht auf der spezifischen Markierung von Zellen mit Antikörpern, die mit kleinen Magneten (Beads) gekoppelt sind. Zur Aufbereitung der Proben wurden zunächst alle auf den Zellen befindlichen Fc-Rezeptoren mit α CD16/32 blockiert und bei 4°C für 20min inkubiert. Die Wahl der einzusetzenden Zellzahl richtete sich nach dem Fassungsvermögen der Magnetsäule und dementsprechend wurde die Menge der Fc-Blocks bzw. AK angepasst. Nach dem Waschen der Zellen mit MACS-Puffer (äquivalent zum FACS-Puffer) wurden die Zellen mit Primärantikörper gewünschter Spezifität bei 4°C für 30min inkubiert. Je nach Verfügbarkeit wurden Antikörper direkt mit einem Magnet-Bead gekoppelt oder SA-Magnet-Beads für biotinylierte Primärantikörper verwendet. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen in definierter Menge MACS-Puffer aufgenommen und über die magnetische Säule gegeben. Sowohl die Negativfraktion bei angelegtem Magnetfeld als auch die Positivfraktion nach Entfernung des Magnetfeldes wurden aufgefangen und zur weiteren Analyse verwendet.

2.7.4 Durchflusszytometrische Analysen

Die Methode der Durchflusszytometrie basiert auf der Grundlage von Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften der zu analysierenden Zellen. Bei dieser Methode werden fluoreszenzmarkierte Zellen in einen Flüssigkeitsstrahl vereinzelt. Bei der Passage mehrerer Laserstrahlen emittieren sie dabei vom Laser angeregtes Licht einer bestimmten Wellenlänge, welches durch sensible Photomultiplier (PMT) detektiert werden. Parameter wie Lichtstreuung, die sowohl die Größe und Granularität der passierenden Zellen erfassen, und auch die Emission der an die AK gekoppelten Fluorochrome werden durch die Photomultiplier registriert.

Fluorochrom	Ex Laser [nm]	Ex _{Max} [nm]	Em _{Max} [nm]
eYFP	488	514	527
eGFP	488	488	507
dsRed	488	558	583
FITC	488	494	520
PE	488	496	578
APC	635	650	660
Alexa647	635	650	668
PerCP Cy5.5	488	482	695
PeCy7	488	496	785
APC Cy7	635	650	785
AmCyan (DAPI)	405	457	491

Tabelle 2-6: Übersicht der verwendeten Fluorochrome mit den Maxima (Max) der Exzitation (Ex) und Emission (Em) [nm] in FACS Analysen.

Die Wellenlängen der Emissionsmaxima wurden dem Fluorochrome Reference Chart von BD Biosciences entnommen (<http://www.bdbiosciences.com/research/multicolor/spectrumguide/index.jsp>, letzter Aufruf am 24.01.2013), die Angaben von eGFP und eYFP entstammen aus Shaner et al. (2005).

Durch eine geeignete Kombination der Fluoreszenzfarbstoffe ist eine simultane Analyse multipler Oberflächenmarker möglich. Voraussetzung ist die technische Ausstattung bezüglich der Laser und PMTs des Durchflusszytometers, die die Emissionsspektren getrennt voneinander detektieren. Unter Verwendung der entsprechenden Filter können auch in ihrem Ex_{Max} ähnliche Fluorochrome wie eYFP und eGFP voneinander getrennt und simultan detektiert werden.

2.7.4.1 FACS Analyse von Fluoreszenz-markierten Zellen

Zunächst erfolgte das Blocken aller Fc-Rezeptoren auf den Zellen mit α CD16/32. Danach wurden 2×10^7 Zellen der aufgearbeiteten Milz in 100 μ l FACS-Puffer versetzt und mit entsprechenden Antikörpern (direkt Fluorochrom konjugiert und einem biotinylierten Primärantikörper) für 20min bei 4°C inkubiert. Nach Waschen der Zellen mit 2ml FACS-Puffer und anschließender Zentrifugation (5min, 4°C, 1200rpm) erfolgte die Inkubation des Sekundär-Antikörpers (SA-Fluorochrom) in 100 μ l FACS-Puffer bei 4°C für 20min. Da-

rauf wurden die Zellen erneut gewaschen, von überschüssigen AK befreit und für die durchflusszytometrische Messung in ~400-500µl FACS-Puffer (unter Zugabe von DAPI) aufgenommen. Die FACS Analyse wurde am FACS Canto II ausgestattet mit der Diva Software der Firma BD Biosciences durchgeführt. Alle verwendeten Antikörper wurden in austitrierten Konzentrationen verwendet und bei Dunkelheit inkubiert.

2.7.4.2 Zellseparation mit Hilfe des FACS Aria I

Mit Hilfe der Zellseparation lassen sich einzelne Zellen voneinander trennen. Dieses Durchflusszytometer verfügt über eine zusätzliche Sortiervorrichtung, die es nach einer laserbasierten Charakterisierung der Zellen ermöglicht, die im Probenstrahl befindlichen Zellen einem einzelnen Tropfen zuzuordnen. Beim Tropfenabriss werden die im Tropfen befindlichen Zielzellen elektrostatisch aufgeladen, sodass diese im elektrischen Spannungsfeld durch elektrische Impulse abgelenkt und separiert werden können. Die Aufarbeitung der Proben für die Zellseparation mittels Sort Aria I (BD Biosciences) erfolgte analog zu denen der FACS Analyse von Oberflächenantigenen. Zur Erhöhung der Reinheit separierter Zellen wurden die Gates vor Sortbeginn stringent festgelegt.

2.7.4.3 Analyse generierter FACS-Daten

Die Software FlowJo (Tree Star, Ashland, USA) wurde zur Analyse generierter FACS-Daten verwendet. Zur Darstellung einzelner zellulärer Charakteristika wurden 2-dimensionale Konturdiagramme (Contour-Plots) gewählt, bei denen die Zellen gleicher Eigenschaften bei erhöhter Zellzahl als topographische Höhenlinie visualisiert werden. Das Setzen von Auswertequadranten oder -gates ermöglicht eine elektronische Vorselektion der Zielpopulation. Auf diese Weise wurden in der vorliegenden Arbeit die *ex vivo* zu analysierenden Zellen elektronisch vorselektiert, indem zunächst die Dubletten über Höhe- gegen Weite-Vorwärtsverteilung sowie tote Zellen durch eine positive DAPI-Färbung ausgeschlossen wurden. T- und B-Zellen konnten durch eine positive CD3ε/CD19 Markierung von den übrigen Zellen diskriminiert werden. Tote Zellen (DAPI⁺) wurden ebenfalls in *in vitro* generierten myeloiden Zellen ausgeschlossen und anschließend auf die charakteristischen Zelloberflächenmarker gegatet. Für GM-CSF ebenso wie für Flt3-L DCs wurden die spezifischen Marker CD11c, CD11b und B220 zur Diskriminierung verwendet.

2.7.5 Immunhistochemie

2.7.5.1 Präparation von Geweben

Zur Anfertigung von Gewebeschnitten wurden die Organe nach der Präparation zunächst in 4% PFA Lösung fixiert (pro cm Schichtdicke 1h Inkubation bei RT). Danach wurden die fixierten Organen ÜN durch Inkubation in 30% Succroslösung das Wasser entzo-

gen. Das Einbetten der Organe erfolgte in Einbettmedium (Tissue Tek). Diese wurden dann in auf Trockeneis gekühltem 2-Methylbutan eingefroren. Zur längeren Aufbewahrung wurden die Gewebe bei -80°C gelagert. Es wurden Gefrierschnitte mit einer Dicke von $10\text{-}12\mu\text{m}$ angefertigt, die vor Beginn der Färbeprozedur zunächst bei -80°C zwischengelagert wurden.

2.7.5.2 Anfärben zellulärer Strukturen in Gewebeschnitten

Zu Beginn der Färbung wurden die Organe zur Begrenzung der Färbelösung mit einem Fettstift umrandet und die Gewebeschnitte zunächst in PBS für kurze Zeit rehydriert. Zur Inhibierung endogener Peroxidasen wurden die Gewebeschnitte mit 1% H_2O_2 , 0,1% NaN_3 in PBS 1h bei RT geschwenkt. Alle Färbeprozeduren wurden nachfolgend in einer feuchten Kammer bei RT im Dunkeln durchgeführt. Unter Beachtung der spezifischen Antikörper wurden die Gewebeschnitte zur Blockierung unspezifischer Bindestellen mit 2% Fc-Block, 1% Maus-/Ratte-/Esel-/Kaninchen-Normal Serum in TNB behandelt. Endogenes Biotin wurde durch einen Avidin/Biotin Block gesättigt. Spezifische Primär- und Sekundärantikörper sowie Fluorochrom-konjugiertes Biotin-Streptavidin (SA) wurden in TNB gelöst und die Organschnitte 30min inkubiert. Biotinylierte Signale wurden durch die Verwendung des Tyramid-Kits (Perkin Elmer) verstärkt indem nach erfolgter Bindung des biotinylierten AK eine 25min Inkubation mit SA-konjugierter Meerrettichperoxidase (HRP, 1:200 in TNB) erfolgte. Entweder für Biotin- oder FITC-Konjugate wurde als Verstärkungsreagenz Tyramid (1:100, 7min) eingesetzt. Am Ende der Färbeprozedur wurden die gefärbten Organschnitte mit DAPI beinhaltendem Vectashield eingedeckelt und mit Nagellack versiegelt. Die Fluoreszenzaufnahmen erfolgten am Nikon Fluoreszenzmikroskop und die Aufnahmen wurden mit Adobe Photoshop CS bearbeitet.

2.7.5.3 Anfertigen von Deckglas- (Coverslip) Präparaten für Konfokalmikroskopie

Zur verbesserten Haftung der ausdifferenzierten DCs wurden die Deckgläser zunächst mit HCl/Silan vorbehandelt. Dazu wurden die Deckgläser in 24 Lochplatten einzeln verteilt und mit 1M NaOH ÜN bei RT inkubiert. Zur Neutralisierung wurden die Deckgläser mit 1% HCl, mehrfach mit deionisiertem Wasser und abschließend mit Aceton gespült. Nach Trocknung der Deckgläser erfolgte eine 30min Inkubation mit 1% Amino-propyltrimethoxysilan (in 95% Aceton) bei RT. Im Anschluss wurden die Deckgläser mit Aceton gewaschen, ÜN getrocknet und für Immunfluoreszenzfärbungen (vgl. 2.7.5.2) eingesetzt.

2.8 Virologische Methoden

2.8.1 Generation von MCMV Stocks

Die Herstellung der verwendeten rekombinanten MCMV Mutanten sowie die Herstellung gereinigter MCMV Stocks wurden von Frau Dr. Vu Thuy Khanh Le (Institut für Virologie, Universität Düsseldorf) durchgeführt, und die Virus Stocks für unsere experimentellen Zwecke freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Dazu wurden murine embryonale Fibroblasten (MEFs) für 6-9 Tage mit MCMV infiziert und anschließend die Zellreste pelletiert (10min 6000rpm). Der Virus beinhaltende Kulturüberstand wurde für 3h, 13000rpm erneut zentrifugiert und das resultierende Virus-Pellet in 10ml Medium resuspendiert. Nach der Inkubation bei 4°C ÜN wurde die Virus-Suspension in einem „Douncer“ homogenisiert und anschließend auf ein Saccharosekissen (15% Saccharose/VSB) pipettiert. Nach erneuter Ultrazentrifugation (1h, 27000rpm, 10°C) wurde das Virus-Pellet in 3ml 15% Saccharose bei 4°C ÜN inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Viren resuspendiert und bei -80°C eingefroren. Zum Erhalt von DIPs wurden die infizierten MEFs mit Hilfe von Proteasen aufgeschlossen und anschließend derselben Aufreinigungsprozedur unterzogen.

2.8.2 Infektion mit MCMV *in vivo*

Für die intraperitoneale Injektion (i.p.) von Mäusen mit MCMV wurden 2×10^5 Plaque bildende Einheiten (PFU) in einem Gesamtvolumen von 300µl (verdünnt in PBS) in die untere Bauchhöhle der Maus appliziert. Zur Visualisierung der IFNβ Antwort wurde die Reportermaus (IFNβ^{mob/mob}) mit einem replikationskompetenten MCMV WT Stamm (C3X) infiziert. Außerdem wurde zur eindeutigen Identifizierung infizierter Zellen ein rekombinantes Virus, das das grün fluoreszierende Protein eGFP unter der Kontrolle des humanen MIEP im ie2 Locus des viralen Genoms exprimiert, für die Infektion verwendet (Henry et al., 2000). So sollte mittels der Durchflusszytometrie die simultane Visualisierung der IFNβ Antwort und des Infektionsstatus der Milz von infizierten Mäusen *in vivo* überprüft werden. An den angezeigten Zeitpunkten p.i. wurden die Milzen entnommen und für durchflusszytometrische bzw. immunhistologische Analysen aufgearbeitet (Abb. 2-1). Wenn nicht anders beschrieben, wurden diese Infektionsbedingungen in den durchgeführten *in vivo* Experimenten verwendet.



Abb. 2-1: Schematische Darstellung der experimentellen Vorgehensweise zur *in vivo* Analyse der IFN β Antwort und des infektiösen Status.

An den angegebenen Zeitpunkten nach intraperitonealer (i.p.) Injektion der 2×10^5 infektiöser Partikel MCMV erfolgte die durchflusszytometrisch Charakterisierung der IFN β produzierenden Zellen und die Bestimmung der MCMV infizierten Zelltypen in der Milz. Ergänzend zu der FACS-basierten Zelloberflächenmarker-Analyse wurden auch immunhistologische Färbungen mittels Fluoreszenzmikroskopie zur Lokalisation der IFN β /YFP $^+$ Zellen und der MCMV $^+$ Zellen in der Milz durchgeführt.

2.8.3 Infektion mit MCMV *in vitro*

Die MCMV Infektionen wurden mit *in vitro* generierten Flt3-L bzw. GM-CSF DCs sowie mit NIH3T3 Zellen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die zu infizierenden DCs in entsprechenden Loch-Platten ausgesät (in der Regel 6- oder 12-Loch-Platten). Die zur Infektion verwendeten NIH3T3 Zellen wurden am Vortag bzw. am selben Tag der Infektion mit entsprechender Zellzahl ausgesät. Nachdem die Virussuspension gemäß der einzusetzenden MOI (1 oder 3) mit Medium verdünnt und auf die Zellen gegeben worden war, wurden die Platten 2x 15min bei 800g (2000rpm) bei RT zentrifugiert. Die Inkubation der infizierten Zellen fand bei 37°C, 5% CO $_2$ statt. Wurden die zu infizierenden Zellen mit Ganciclovir (Endkonzentration 50 μ M) behandelt, so erfolgte die Zugabe des Virostatikums kurz vor der Infektion der Zellen.

2.8.4 Inaktivierung der MCMV viralen Partikel

Zur Generierung nicht-infektiöser viraler Partikel wurden die Virus Stocks mit entsprechender MOI in 1ml Medium verdünnt und durch UV-Licht (UV-Crosslinker) inaktiviert.

2.8.5 *In vitro* und Transwell Experimente

Die und Transwell Experimente wurden mit *in vitro* generierten Flt3-L DCs von $\text{IFN}\beta^{\text{mob/mob}}$ CD45.1^+ (CD45.2^-) Mäusen durchgeführt. $\text{IFN}\beta^{\text{mob/mob}}$ cDCs dienen als infizierte Monolayer, zu denen anschließend entweder direkt oder auf einer Transwellmembran $\text{IFN}\beta^{\text{mob/mob}}$ pDCs zugegeben wurden. Dazu wurden 2×10^5 GM-CSF DCs am Tag der Infektion in 6-Loch Platten ausgesät und mit MCMV GFP (MOI=3) infiziert (vgl. 2.8.3). Nach einer zwei stündigen Vorinfektion wurden auf die infizierten Monolayer (cDC CD45.2^+) pDC CD45.1^+ direkt oder auf die Transwellmembran gegeben. Die Charakterisierung der $\text{IFN}\beta$ Antwort und der MCMV infizierten Zellen erfolgte nach 24h durchflusszytometrisch. Die Verwendung kongener CD45 Hintergründe und stringentes elektronisches Vorgaten auf CD45.1^+ DCs erlaubte eine exakte Diskriminierung zwischen infizierten $\text{IFN}\beta^{\text{mob/mob}}$ cDCs (cDC CD45.2^+) und $\text{IFN}\beta^{\text{mob/mob}}$ Flt3-L generierten pDCs (B220^+ CD45.1^+ bzw. CD11b^+ CD45.1^+). Die Transwellmembran mit einer Porengröße von $0,4\mu\text{m}$ erlaubte eine Diffusion viraler Partikel und löslicher Faktoren, die Membran verhinderte jedoch Zell-Zellkontakte zwischen beiden Kulturen.

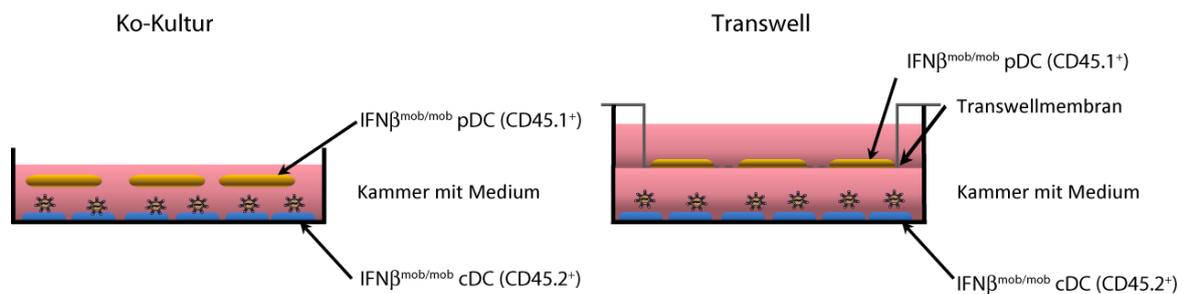


Abb. 2-2: Schematische Darstellung der Analyse der $\text{IFN}\beta$ Produktion und MCMV Infektionsstatus unter Ko-Kulturbedingungen (linke Seite) und im Transwell System (rechte Seite) *in vitro*.

2.9 Tierversuche

Alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Tierversuche erfolgten gemäß des Tierschutzgesetzes §8 und wurden vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW der Bezirksregierung Düsseldorf genehmigt. Alle Kontrolltiere (C57BL/6) für die Tierversuche wurden von Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA) bezogen und waren bei Versuchsbeginn ca. 8-10 Wochen alt.

2.9.1 Versuchstiere

In einem spezifiziert pathogen-freien (SPF)-Bereich der Tierversuchsanlage der Universität Düsseldorf wurden die verwendeten Mäuse gehalten und gezüchtet. Die $\text{IFN}\beta^{\text{mob}/\text{mob}}$ Mäuse waren zum Zeitpunkt der Arbeitsaufnahme mindestens 10 Generationen auf den C57BL/6 Hintergrund zurückgekreuzt (vgl. Tabelle 2-7).

Mauslinie	Details/Genotyp	Hintergrund	Referenz
$\text{IFN}\beta^{\text{wt}/\text{wt}}$	WT Mäuse, CD45.2 ⁺ (CD45.1 ⁻)	C57BL/6	
$\text{IFN}\beta^{\text{mob}/\text{mob}}$	IFN β Reportermaus, CD45.2 ⁺ (CD45.1 ⁻)	C57BL/6	(Scheu <i>et al.</i> , 2008)
$\text{IFN}\beta^{\text{mob}/\text{mob}}$ CD45.1⁺ (CD45.2⁻)	Verkreuzung von $\text{IFN}\beta^{\text{mob}/\text{mob}}$ Mäusen mit dem B6.SJL-Ptprc<a> Pepc/BoyJ Stamm	C57BL/6	

Tabelle 2-7: Verwendete Mauslinien.

2.9.2 Die IFN β Reportermaus

Zur Analyse der IFN β Antwort im viralen Infektionsmodell von MCMV wurde die bereits 2008 beschriebene Reportermaus verwendet (Scheu *et al.*, 2008). In dem IFN β Reporterallel wurde eine für das verbesserte gelb fluoreszierende Protein (eYFP) kodierende Expressionskassette mit separater IRES (interne ribosomale Eintrittsstelle) bicistronisch mit dem endogenen *ifnb* Locus gekoppelt. Zur Vermeidung einer Dysregulation der IFN β Produktion wurden sowohl die Expressions-Kontrollelemente als auch die Polyadenylierungssignale des endogenen *ifnb* erhalten (Scheu *et al.*, 2008). Bei Expression des Reporter-Allels, das im Folgenden als *mob* für „**m**essenger **o**f **i**nterferon **b**eta“ bezeichnet wird, wird neben IFN β simultan der Fluoreszenzmarker eYFP exprimiert. Während das Zytokin sekretiert wird, akkumuliert das eYFP im Zytoplasma der Zelle und ermöglicht den Nachweis IFN β produzierender Zellen mittels durchflusszytometrischer und immunhistologischer Methoden. Erfolgte die Stimulation von IFN β durch die Infektion des rekombinanten MCMV GFP, verbleibt eGFP analog zu eYFP im Zytoplasma der Zelle. Zu Beginn der experimentellen Arbeiten war die IFN β Reportermaus bereits generiert und auf den Hintergrund des Mausinzuchtstammes C57BL/6 zurückgekreuzt (Abb. 2-3).

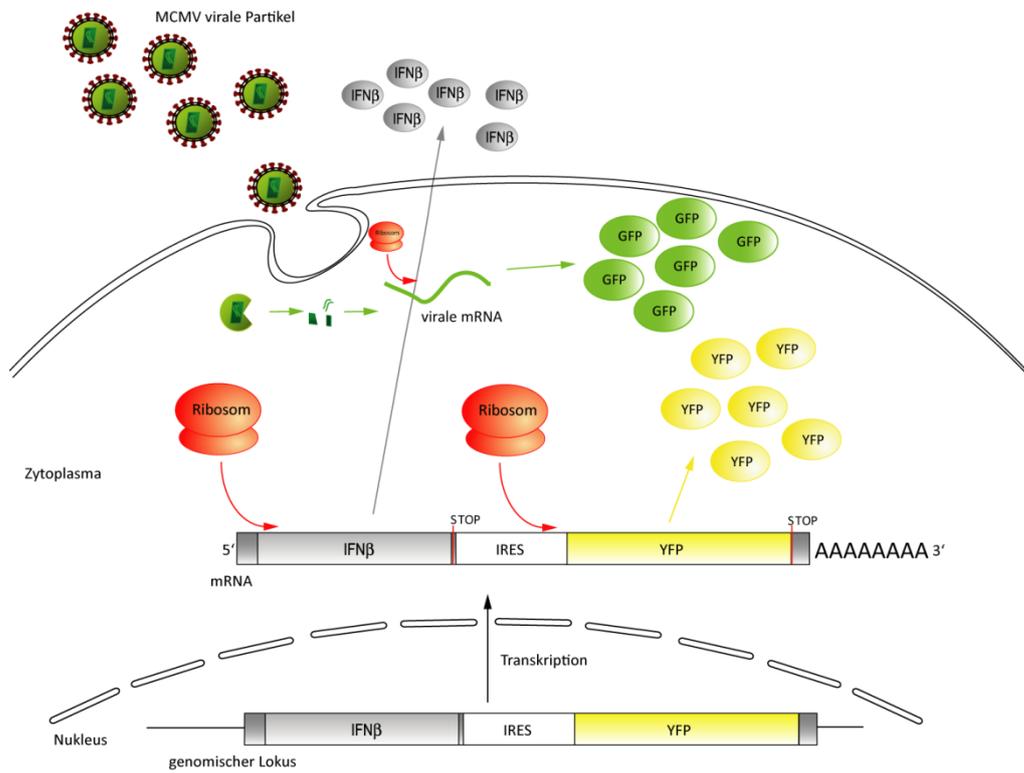


Abb. 2-3: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips der $IFN\beta^{mob/mob}$ Reportermaus im viralen Infektionsmodell von MCMV.

Ergänzt nach Dresing (2010).

3 Ergebnisse

Obwohl viele TLRs ähnliche Signalwege aufweisen, erfolgt die resultierende Immunantwort auf bestimmte PAMPs in Abhängigkeit von den spezifisch TLR-assoziierten Adapterproteinen, die die nachfolgende Signalkaskade modulieren. TLR9 wird von pDCs in den endosomalen Kompartimenten exprimiert und vermittelt die Erkennung von CpG ODNs und einigen Viren wie z.B. MCMV in einer MyD88-abhängigen Weise (Krug et al., 2004a). Während nach Stimulation der IFN β /YFP Reporter-mäuse mit dem TLR3 Agonisten Poly(I:C) eine 0,9%ige Frequenz IFN β /YFP exprimierender cDCs festgestellt werden konnte, ergab sich nach Stimulation mit den TLR9 Agonisten CpG oder der Infektion mit MCMV eine deutlich geringere Anzahl IFN β /YFP produzierender pDCs, die sich an den T- und B-Zell Zonen der Milz positionierten (Scheu et al., 2008). Obwohl in beiden Organen eine produktive virale Replikation beschrieben ist, wurde nach MCMV Infektion neben der Leber insbesondere in der Milz die höchste Typ I IFN Antwort ermittelt (Schneider et al., 2008). Aus diesem Grund lag der Focus der nachfolgenden *in vivo* Experimente in erster Linie auf IFN β /YFP exprimierenden Splenozyten.

3.1 Charakterisierung der IFN β Antwort von MCMV infizierten IFN β /YFP Reporter-mäusen *in vivo*

3.1.1 pDCs sind die exklusiven IFN β Produzenten 6h und 48h nach MCMV Infektion *in vivo*

Im MCMV Infektionsmodell wurde zunächst 36h p.i. die Mehrzahl der IFN β produzierenden Zellen in *ex vivo* Experimenten in der Milz indirekt durch qPCR und GeneChip Analysen als pDCs identifiziert (Zucchini et al., 2008a). Andere Studien erweiterten diesen Befund und bestimmten auf mRNA-Ebene die Milz als Hauptorgan der IFN α/β Antwort zwischen 4 und 96h p.i., wobei die IFN β Produktion einen biphasischen Charakter zeigte, der mit der viralen Genexpression korrelierte (Schneider et al., 2008). Zu diesem Zeitpunkt blieb dennoch die Frage unbeantwortet, welche Zellen für die IFN β Produktion *in vivo* im zeitlichen Verlauf der MCMV Infektion verantwortlich gemacht werden konnten. Mit der Annahme, dass neben Makrophagen vor allem cDCs mit MCMV infiziert werden und so den eigentlichen Replikationsort des Virus darstellen (Dalod et al., 2003), sollten

ferner die mit MCMV infizierten Zelltypen während der Infektabwehr definiert werden. Zur Visualisierung der IFN β Antwort wurde die Reportermaus (IFN $\beta^{mob/mob}$) mit dem MCMV Stamm C3X (entspricht phänotypisch MCMV WT) (Wagner et al., 1999) infiziert. Außerdem wurde zur eindeutigen Identifizierung infizierter Zellen ein rekombinantes Virus, das das grün fluoreszierende Protein eGFP unter der Kontrolle des humanen MIEPs im *ie2* Locus des viralen Genoms exprimiert (entspricht MCMV GFP), für die Infektion verwendet (Henry et al., 2000). So sollte mittels der Durchflusszytometrie die simultane Visualisierung der IFN β Antwort und der infektiöse Status in der Milz von mit MCMV infizierten IFN $\beta^{mob/mob}$ Mäusen *in vivo* überprüft werden (vgl. 2.8.2, Abb. 2-1).

Als Zytokin der frühen antiviralen Immunantwort wird IFN β rasch nach Infektion mit Viren induziert. Aus diesem Grund wurde zunächst die IFN β Antwort zu einem frühen Zeitpunkt nach MCMV Infektion durchflusszytometrisch bestimmt. Wie erwartet konnte in der Milz von WT Tieren nach 6h MCMV WT Infektion keine IFN β /YFP Expression nachgewiesen werden (Abb. 3-1, A, obere Reihe). In den infizierten IFN $\beta^{mob/mob}$ Mäusen dagegen konnte eine Frequenz von $\sim 0,04\%$ IFN β /YFP $^+$ Zellen detektiert werden. Die IFN β /YFP $^+$ Zellen hatten ein intermediäres Expressionslevel von CD11c und exprimierten den Aktivierungsmarker CD8 α . Zudem zeigten die IFN β /YFP sekretierenden Zellen ein hohes Expressionsniveau von mPDCA-1 (CD317, BST-2) und konnten dadurch den pDCs zugeordnet werden.

Die mit MCMV infizierten Zellen wiesen nach MCMV Infektion fast ausschließlich ein Oberflächenmarkerprofil von CD11c int CD8 α^{-} mPDCA-1 $^{+}$ auf, sodass diese Zellen den pDCs zugeordnet werden konnten. Infizierte cDCs konnten zu diesem Zeitpunkt der Infektion lediglich marginal festgestellt werden. Zur anschaulicheren Darstellung der IFN β /YFP $^{+}$ und MCMV $^{+}$ Zellen wurden diese in verschiedenen Auswertefenstern mit den für DC typischen Oberflächenmarkern gegeneinander aufgespannt und den übrigen Zellen überlagert (Abb. 3-1, B). Zu diesem Zeitpunkt der Infektion waren keine IFN β /YFP $^{+}$ pDCs gleichzeitig mit MCMV infiziert (Abb. 3-1, A, B).

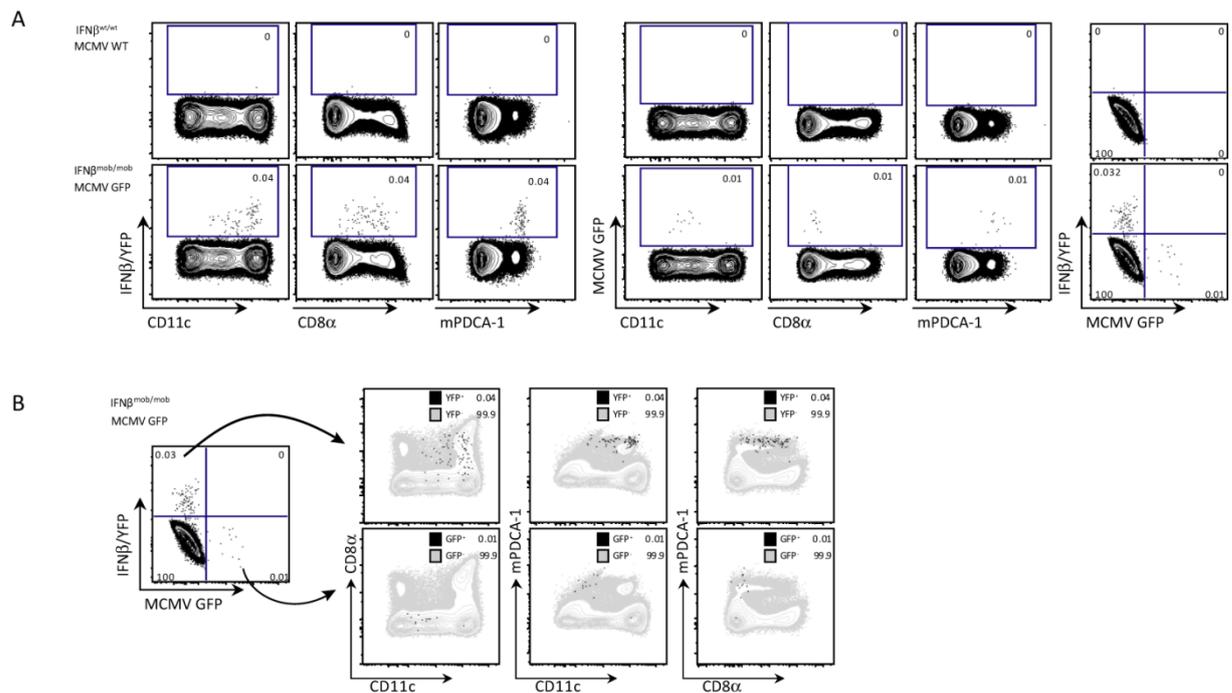


Abb. 3-1: Durchflusszytometrische Charakterisierung der Dendritischen Zellpopulation in der Milz von MCMV infizierten $IFN\beta^{mob/mob}$ Reportermäusen 6h p.i..

$IFN\beta^{wt/wt}$ Mäuse und $IFN\beta^{mob/mob}$ Reportermäuse wurden jeweils mit 2×10^5 MCMV i.p. infiziert und die Milzen der infizierten Mäuse an den angegebenen Zeitpunkten p.i. entnommen wie bereits beschrieben (vgl. 2.8.2). Im Durchflusszytometer wurden nach elektronischem Vorgaten auf die angegebenen Zellpopulationen diese bezüglich ihrer Oberflächenmarkerexpression bzw. ihrer YFP und GFP Expression analysiert (vgl. 2.7.4.3). [A] Die dargestellten Plots zeigen FACS Analysen 6h nach MCMV Infektion für die endogene $IFN\beta/YFP$ Expression (links), die GFP Expression für die infizierte Zellpopulation (Mitte) und die Gegenüberstellung der $IFN\beta/YFP$ vs. MCMV GFP exprimierenden Zellen (rechts) von sowohl MCMV WT infizierten $IFN\beta^{wt/wt}$ Proben, die zum Einstellen des Auswertequadranten dienen, als auch von MCMV GFP infizierten $IFN\beta^{mob/mob}$ Proben. Zur anschaulicheren Darstellung der $IFN\beta/YFP^+$ und $MCMV^+$ Zellen wurden diese in verschiedenen Auswertefenstern mit den DC typischen Oberflächenmarkern gegeneinander aufgespannt und den übrigen Zellen überlagert [B].

Zur Bestimmung der $IFN\beta$ Produzenten und des infizierten Zelltyps in einer späteren Infektionsphase von MCMV, nachdem ein Replikationszyklus vervollständigt war, wurde zunächst der Zeitpunkt 48h p.i. gewählt. Während Zellen aus MCMV GFP behandelten wt Versuchstieren keine $IFN\beta/YFP$ Expression aufwiesen, ergaben die durchflusszytometrischen Analysen einen identischen $IFN\beta/YFP$ Phänotyp in der Milz von MCMV GFP infizierten Mäusen wie zuvor beobachtet am Zeitpunkt 6h p.i.. Nach Ausschluss von T- und B-Zellen konnten etwa 0,1% der gemessenen Splenozyten als aktivierte $IFN\beta$ produzierende pDCs identifiziert werden. Hochgerechnet auf die Gesamtzellzahl einer Milz ($\sim 10^8$ Zellen) produzierten ~ 6000 Zellen $IFN\beta$. Diese Zellen exprimierten ein intermediäres bzw. hohes Niveau von $CD11c$ und $mPDCA-1^+$ und wiesen ebenfalls die für pDC typische Lage innerhalb der $CD11c$ - $mPDCA-1$ Verteilung auf (Abb. 3-2, A, C).

Überraschenderweise zeigte sich innerhalb der infizierten Zellpopulation 48h p.i. ein dichotomer Phänotyp. Es ließen sich nach MCMV Infektion zum Einen Zellen wie zuvor bei 6h p.i. beobachten mit dem Oberflächenmarkerprofil $CD11c^{int} CD8\alpha^{-} mPDCA-1^{+}$, die hierdurch den pDCs zugeordnet werden konnten, detektieren, zum Anderen wurden auch Zellen, die $CD11c^{hi} CD8\alpha^{+} mPDCA-1^{-}$ waren und sich als cDCs darstellten, durchflusszytometrisch als infiziert ermittelt (Abb. 3-2, A, C). Es handelte sich bei den infizierten pDCs abermals um eine weitere distinkte pDC Subpopulation, die sich von den IFN β produzierenden pDCs unterschieden, da keine dieser Zellen simultan mit MCMV infiziert waren (Abb. 3-2, B). Insgesamt waren $\sim 0,03\%$ der Splenozyten mit MCMV infiziert, was einer Gesamtzellzahl von ~ 4500 Zellen pro Milz entsprach. Daneben zeigte sich, dass diese pDCs gegenüber cDCs effizienter mit MCMV infiziert waren, was sich in einer erhöhten MFI (*Mean Fluorescence Intensity*) widerspiegelte.

Die alleinige Identifizierung von pDCs durch die Marker CD11c und B220 ist nicht ganz unproblematisch, da beide Marker auch auf anderen Leukozytenpopulation einschließlich NK Zellen zu finden sind (Blasius et al., 2007; Robbins et al., 2008; Vosshenrich et al., 2007). Auch der oft verwendete typische pDC Marker mPDCA-1/BST-2 wird z.Zt. kritisch diskutiert, denn dieser wird nach Aktivierung auf einigen Plasmazellen hochreguliert und ist demnach für eine alleinige einwandfreie Identifizierung muriner pDCs nur bedingt zu gebrauchen (Blasius et al., 2006). Eine Diskriminierung von DCs zu Natürlichen Killer Zellen (NK Zellen, $CD49b^{+} CD11b^{+}$), T- und B-Zellen ($CD3\epsilon/19^{+}$) sowie zu Makrophagen ($F4/80^{+} CD11b^{+}$) ergab zu keinem analysierten Zeitpunkt nach MCMV Infektion eine Beteiligung dieser Zellpopulationen hinsichtlich ihrer IFN β Produktion und Infektion (beispielhaft gezeigt bei 48h p.i., Abb. 3-2, B). Zu allen Zeitpunkten der Infektion konnte durch Rückgaten der IFN β /YFP $^{+}$ Zellen zweifelsfrei bewiesen werden, dass es sich bei den IFN β /YFP $^{+}$ Zellen um einen aktivierten pDCs Phänotyp handelte, der neben einer hohen mPDCA-1 Expression auch die typische Lage innerhalb der CD11c-CD11b, CD11c-B220 und CD11b-B220 Verteilung aufwies (Abb. 3-2, C).

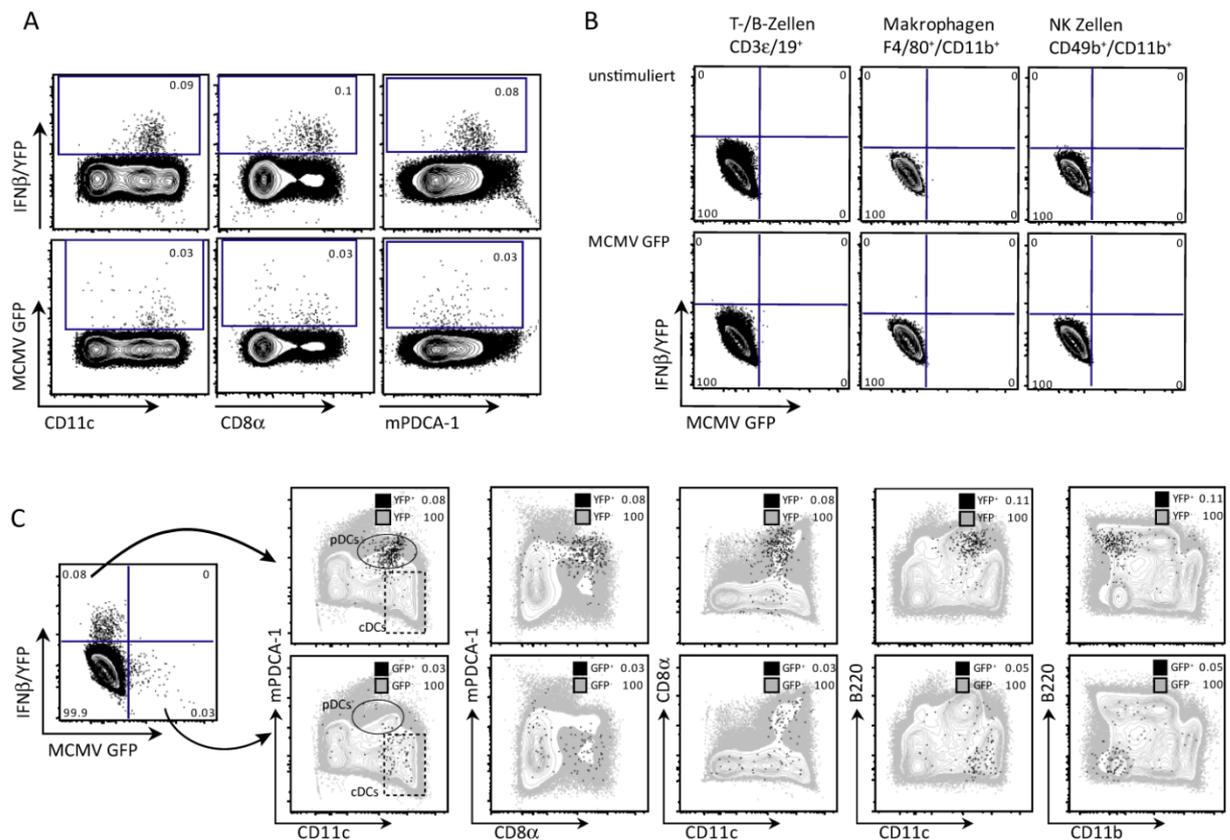


Abb. 3-2: Analyse der IFN β /YFP und MCMV GFP Expression in der Milz von MCMV infizierten IFN β ^{mob/mob} Reportermäusen *in vivo* 48h p.i..

IFN β ^{wt/wt} Mäuse und IFN β ^{mob/mob} Reportermäuse wurden jeweils mit 2×10^5 MCMV GFP i.p. infiziert und die Milzen der infizierten Mäuse bei 48h p.i. entnommen wie bereits beschrieben (vgl. 2.8.2). [A] Die dargestellten Auswertefenster zeigen FACS Analysen 48h p.i. exemplarisch einer IFN β ^{mob/mob} Reportermaus für die endogene IFN β /YFP (obere Reihe) und die GFP Expression für die tatsächlich infizierte Zellpopulation (untere Reihe) gegen die angegebenen Marker nach elektronischem Vorgaten auf die angegebenen Zellpopulationen. [B] Darstellung der durchflusszytometrischen Analyse der IFN β /YFP und MCMV GFP Expression nach elektronischem Vorgaten auf die angegebenen Zellpopulationen (vgl. 2.7.4.3). Die Analyseegates wurden anhand der entsprechenden IFN β ^{wt/wt} Referenz angepasst. [C] Gegenüberstellung der IFN β /YFP vs. MCMV GFP exprimierenden Zellen von IFN β ^{mob/mob} Proben. Zur anschaulicheren Darstellung der IFN β /YFP⁺ und MCMV⁺ Zellen wurden diese in verschiedenen Analysefenstern mit den für DC typischen Oberflächenmarkern gegeneinander aufgespannt und den übrigen Zellen überlagert.

Die Daten belegen, dass 6h und 48h nach MCMV Infektion pDCs die exklusiven IFN β produzierenden Zellen sind. Zum frühen Zeitpunkt der Infektion waren hauptsächlich pDCs mit MCMV infiziert, wohingegen nach Vollendung eines vollständigen Infektionszyklus mehr cDCs als pDCs mit MCMV infiziert sind. An keinem der gemessenen Zeitpunkte waren IFN β produzierende pDCs simultan mit MCMV infiziert.

3.1.2 Die IFN β Induktions- und MCMV Infektionskinetik *in vivo* ist biphasisch

Basierend auf der initialen Beobachtung, dass pDCs die Hauptproduzenten für IFN β im verwendeten Reportermausmodell an den Infektionszeitpunkten 6 und 48h p.i. darstellten, sollte in Anlehnung an den bereits beschriebenen biphasischen Verlauf der IFN β - und MCMV-Transkripte und zum besseren Verständnis der IFN β Rolle während einer MCMV Infektion *in vivo* eine Determinierung sowohl der IFN β Produzenten als auch der MCMV infizierten Zelltypen im zeitlichen Verlauf erfasst werden. Zu diesem Zweck wurde die Kinetik der MCMV Infektion zwischen 4h-7d *in vivo* erweitert und die Frequenzen der durchflusszytometrisch ermittelten IFN β /YFP⁺ und MCMV⁺ Zellen graphisch dargestellt (Abb. 3-3). Für keinen der gemessenen Zeitpunkte konnte in infizierten IFN β ^{wt/wt} bzw. naiven IFN β ^{mob/mob} Mäusen IFN β /YFP⁺ Zellen detektiert werden.

In der Milz von MCMV infizierten Reportermausen konnte bereits 4h nach MCMV Infektion eine IFN β /YFP Expression mittels FACS nachgewiesen werden. Der erste Höhepunkt der IFN β Produktion war bei 6h p.i. zu verzeichnen. Die Frequenz der IFN β /YFP⁺ Zellen fiel nach diesem initialen Höhepunkt auf 0,01% ab, um nachfolgend die höchste Frequenz der IFN β /YFP⁺ Zellen 48h p.i. zu erreichen. Zwei Tage (48h) nach Beginn der MCMV Infektion war die maximale IFN β Antwort in der Milz mit ~0,05% IFN β /YFP⁺ Zellfrequenz erreicht, und diese fiel bis 7d p.i. auf eine IFN β /YFP⁺ Zellfrequenz von 0,002% ab (Abb. 3-3, A).

Die Analyse der infizierten Zellen erbrachte ein vergleichbares Resultat hinsichtlich des biphasischen Charakters des IFN β Verlaufes. Die Infektion etablierte sich im Laufe der ersten 24h p.i. und erreichte an diesem Zeitpunkt den ersten Höhepunkt, bei dem sich ~0,05% als MCMV GFP⁺ Zellen darstellten. Die Frequenz der MCMV GFP⁺ Zellen fiel innerhalb der folgenden 48h p.i. rapide ab, um bei 96h p.i. einen letzten ~0,01% Peak während der gemessenen 7d zu erreichen (Abb. 3-3, B). Eine Gesamtbetrachtung der absoluten Zellzahlen korrespondierte mit den ermittelten Zellfrequenzen für IFN β /YFP⁺ und MCMV⁺ Zellen (Daten nicht gezeigt).

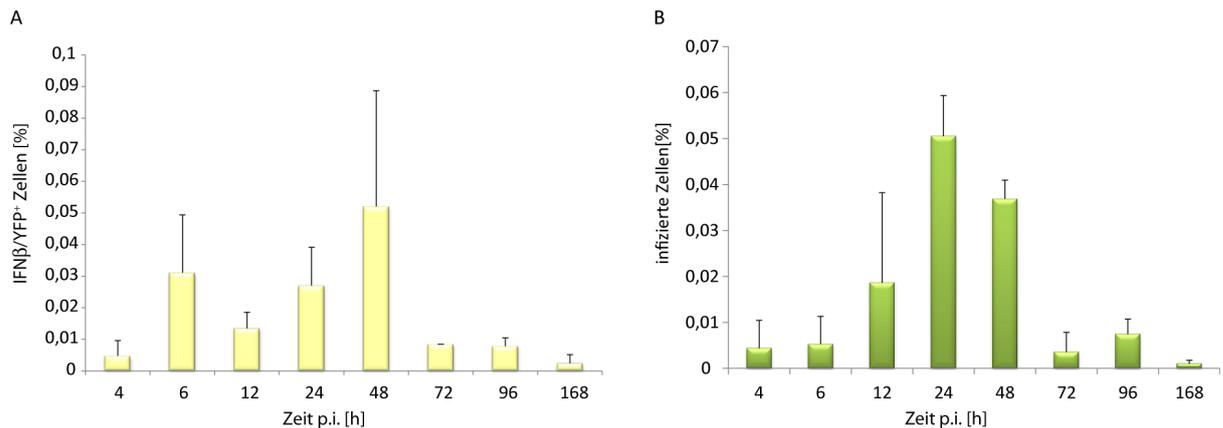


Abb. 3-3: IFNβ Induktions- und MCMV Infektionskinetik *in vivo* ist biphasisch.

Gezeigt sind die Balkendiagramme der Prozentsätze IFNβ/YFP⁺ Zellen [A] und MCMV GFP⁺ Zellen [B] innerhalb der CD11c⁺ Zellpopulation in der Milz aus den durchflusszytometrischen Analysen. Es wurden vier (für IFNβ/YFP Kinetik) bzw. zwei (für die MCMV GFP Kinetik) IFNβ^{mob/mob} Reportermäuse pro Zeitpunkt in die Statistik einbezogen. Die Ergebnisse sind als arithmetisches Mittel angegeben, wobei die Streuung der Werte jeweils als Standardfehler der Mittelwerte (*standard error of mean, SEM*) dargestellt ist.

Über den gesamten zeitlichen Verlauf hin war der pDC Phänotyp der IFNβ exprimierenden Zellen konstant (beispielhaft gezeigt am Zeitpunkt 48h p.i., (Abb. 3-2, A, C)). Hochgerechnet auf die Gesamtzellzahl einer Milz ($\sim 10^8$ Zellen) produzierten zum Höhepunkt der IFNβ Antwort ~ 6000 pDCs das Zytokin IFNβ, und ~ 4500 DCs waren mit MCMV infiziert (Daten nicht gezeigt).

Innerhalb der kinetischen Studie erwiesen sich in allen durchgeführten Experimenten pDCs als die einzigen IFNβ Produzenten innerhalb der CD11c⁺ Zellpopulation, dessen IFNβ Expressionsverlauf einen biphasischen Charakter aufzeigte und mit dem Verlauf der GFP Expression infizierter Zellen korrelierte. Die Daten belegen außerdem, dass zum Höhepunkt der Antwort (48h p.i.) gerade einmal ~ 6000 pDCs an der Bereitstellung von physiologisch relevanten Mengen des Zytokins in der antiviralen Immunantwort beteiligt sind und lediglich ~ 4500 infizierte DCs zur viralen Last in der Milz beitragen.

3.1.3 Nach MCMV Infektion verstärkt der positive IFNβ Rückkopplungsmechanismus die IFNβ Antwort in pDCs *in vivo*

Ogleich die Mechanismen für die fehlende oder reduzierte Replikation von Herpesviren in pDCs unbekannt sind, wurde bisher deren Unabhängigkeit vom autokrinen IFN I Rückkopplungsmechanismus als ursächlich hierfür erachtet. Zur detaillierten Analyse des autokrinen IFN I Rückkopplungsmechanismus *in vivo* im Kontext der Immunantwort ge-

gen MCMV wurden IFNAR^{+/+} und IFNAR^{-/-} Mäuse mit IFN β ^{mob/mob} Hintergrund mit MCMV infiziert und die Milzen 24h p.i. durchflusszytometrisch analysiert. In den Milzen von IFN β ^{mob/mob} und IFNAR^{-/-} x IFN β ^{mob/mob} Mäusen konnten 24h nach MCMV GFP Infektion IFN β /YFP⁺ Zellen nachgewiesen werden (Abb. 3-4, A), jedoch nicht in unstimulierten IFN β ^{mob/mob} Zellen (Abb. 3-4, B). Die IFN β /YFP produzierenden Zellen waren in beiden Mausgenotypen überwiegend CD11c^{int} CD8 α ⁺ und wurden durch die hohe Expression von mPDCA-1 den pDCs zugeordnet. Da, wie bereits erwähnt, mPDCA-1 unter bestimmten Stimulationsbedingungen auf cDCs hochreguliert werden kann (Teixeira et al., 2010), deutete die Koexpression von B220 auf den IFN β /YFP⁺ Zellen ebenfalls auf pDCs als IFN β Produzenten hin. Zudem zeigten die IFN β sezernierenden Zellen sich als residente pDCs, da sie nicht den Migrationsmarker CCR7 (CD197) auf ihrer Oberfläche exprimierten (Abb. 3-4, C).

Wenngleich sich die Verteilung der Zellmarker IFN β /YFP produzierender Zellen in IFNAR^{-/-} x IFN β ^{mob/mob} sich nicht änderte im Vergleich zu IFN β ^{mob/mob} Zellen, so konnte indes eine Abnahme der IFN β /YFP⁺ Zellfrequenz in IFNAR^{-/-} x IFN β ^{mob/mob} pDCs beobachtet werden (Abb. 3-4, A, C; Abb. 3-5, A). Im Hinblick auf die infizierte Zellpopulation konnte auch hier kein Unterschied bezüglich der Zellmarkerverteilung festgestellt werden. Dementsprechend stellten sich die Zellen sowohl als infizierte cDC als auch als pDC dar (Abb. 3-4, A). Durch Zurückgaten der MCMV GFP⁺ Zellen konnte dieser Befund bestätigt werden (Abb. 3-4, C). Außerdem waren zum größten Teil infizierte cDCs positiv für den Migrationsmarker CCR7 (Abb. 3-4, C).

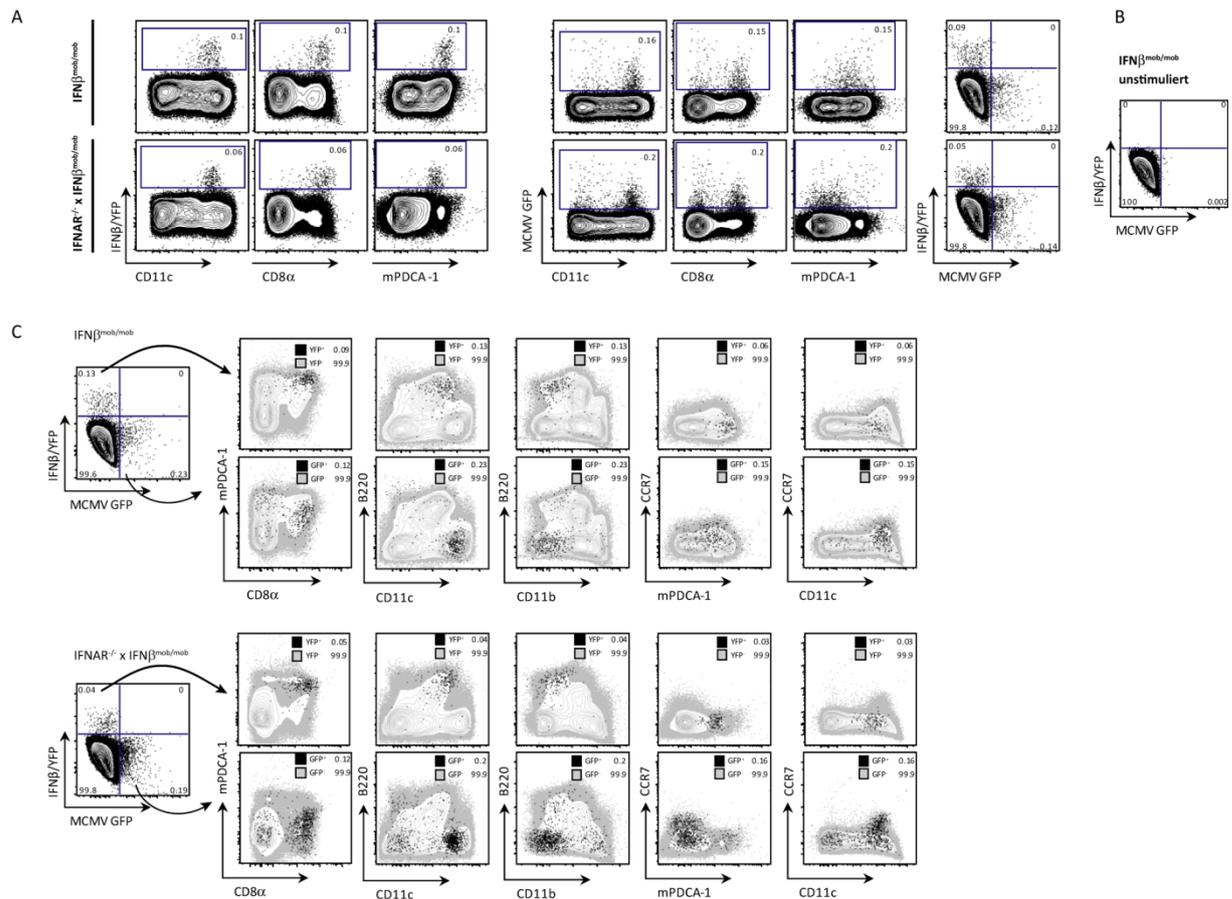


Abb. 3-4: Die Charakterisierung der IFN β Antwort und des infektiösen Status nach MCMV Infektion bei Ein- bzw. Ausschluss des IFN β -IFNAR Rückkopplungsmechanismus *in vivo*.

IFNAR^{+/+} x IFN β ^{mob/mob} und IFNAR^{-/-} x IFN β ^{mob/mob} wurden mit MCMV GFP infiziert und nach 24h die Zellen der Milzen durchflusszytometrisch analysiert (vgl. 2.7.4, 2.8.2). In [A] dargestellt sind Auswertefenster von MCMV GFP infizierten IFN β ^{mob/mob} und IFNAR^{-/-} x IFN β ^{mob/mob} Reporter-mäusen, bei denen die angezeigten Oberflächenmarker gegen IFN β /YFP (links) und MCMV GFP (rechts) aufgetragen sind. [B] Die Auswertequadranten wurden an die entsprechenden IFN β ^{wt/wt} bzw. IFNAR^{-/-} x IFN β ^{mob/mob} Kontrollen angepasst. In [C] dargestellt sind FACS Plots, bei denen IFN β /YFP⁺ und MCMV GFP⁺ (schwarz) separat mit IFN β /YFP⁻ und MCMV GFP⁻ Zellen (grau) gegen die angezeigten Marker überlagert wurden.

Eine statistische Gegenüberstellung der verschiedenen Genotypen machte den quantitativen Unterschied deutlich, dass ein Ausschluss des IFN Rückkopplungsmechanismus eine Reduktion der IFN β Antwort um ca. das zwei-fache (Abb. 3-5, A, links) bei gleichzeitiger Erhöhung der Frequenz infizierter Zellen zur Folge hatte (Abb. 3-5, A, rechts). Ein charakteristischer Vergleich beider infizierter Zelltypen veranschaulichte eine ca. zwei-fach vermehrte Infektion von cDCs gegenüber pDCs bei Abwesenheit des IFNAR Rückkopplungsmechanismus. Darüber hinaus waren nach Eliminierung des IFNAR-Rezeptors ca. drei-fach weniger pDCs mit MCMV infiziert als cDCs (Abb. 3-5, B).

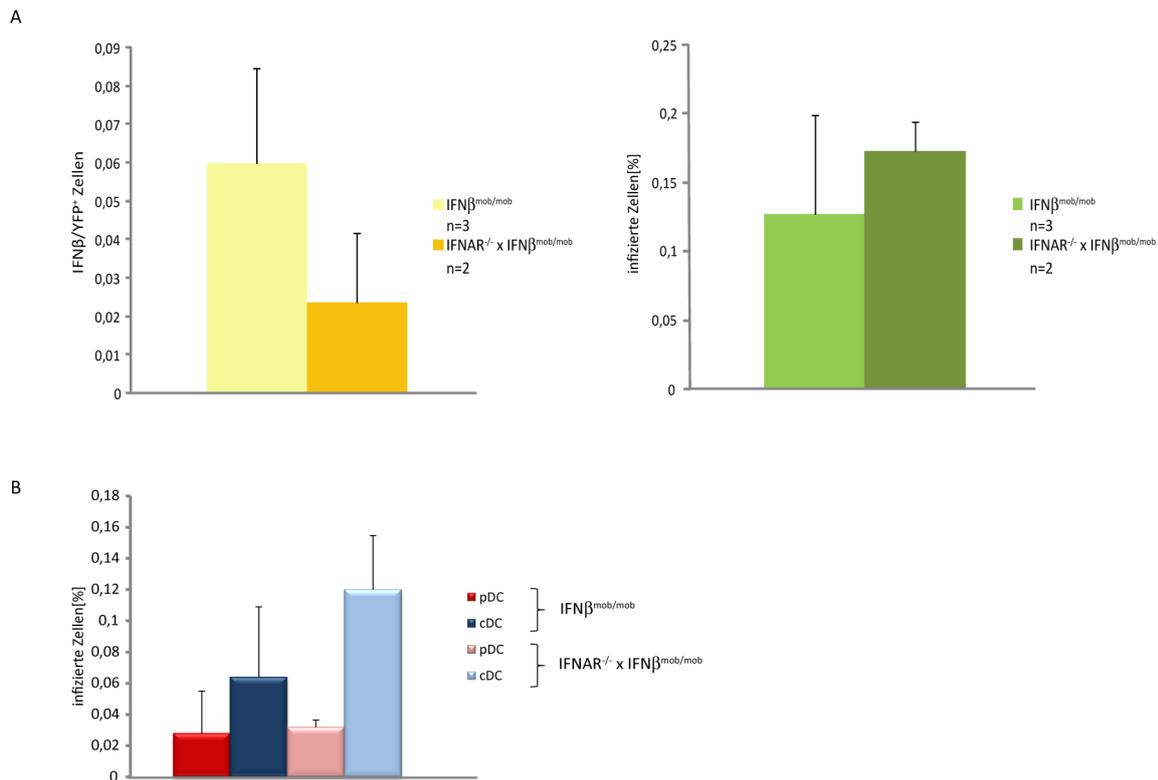


Abb. 3-5: Statistische Analyse der IFNβ und MCMV Expression 24h p.i. in Reportermäusen mit IFNAR^{+/+} bzw. IFNAR^{-/-} Hintergrund *in vivo*.

[A] zeigt die statistische Auswertung der IFNβ Antwort (links) und der infizierten Zellen (rechts) in IFNβ^{mob/mob} und IFNAR^{-/-} x IFNβ^{mob/mob} Mäusen. In die Berechnung wurden zwei bzw. drei infizierte Mäuse einbezogen. In [B] ist die quantitative Verteilung der MCMV infizierten pDC (rot) und cDC (blau) Populationen in einem Balkendiagramm von der aus Abb. 3-4 gewonnenen Daten dargestellt. Angegeben ist jeweils das arithmetische Mittel, wobei die Streuung der Werte jeweils als Standardfehler der Mittelwerte (*standard error of mean, SEM*) dargestellt ist.

Dieses Experiment demonstriert den positiven Einfluss des IFNβ Rückkopplungsmechanismus in pDCs, dessen Abwesenheit eine Reduktion der IFNβ Produktion in pDCs zur Folge hat, jedoch keinen vollständigen Verlust der IFNβ Antwort nach sich zieht. pDCs sind für eine antivirale IFNβ Produktion nicht essentiell auf die IFNβ Rückkopplungsschleife *in vivo* angewiesen, diese hat jedoch einen verstärkenden Einfluss. Die Abwesenheit des IFN I Rezeptors erlaubt eine verstärkte virale Replikation vor allem in MCMV⁺ cDCs.

3.1.4 IFNβ sezernierenden pDCs sind 48h nach MCMV Infektion an der T-/B-Zell Zone der weißen Pulpa lokalisiert

Vorarbeiten der Arbeitsgruppe erlaubten eine Bestimmung IFNβ exprimierender pDCs nach *in vivo* Stimulation mit dem molekularen pathogenen Bestandteil CpG. Zwischen 6 und 24h nach Injektion des TLR Agonisten waren IFNβ⁺ pDCs in den T-Zell Zonen der Milz

lokalisierten und konnten mit einer sehr geringen Frequenz nachgewiesen werden. *In vivo* Infektionen mit MCMV bestätigten diese Befunde und beschrieben wenige IFN β exprimierende pDCs 12h p.i. positioniert an der T- und B-Zell Zone der weißen Pulpa (Scheu et al., 2008).

Zur Visualisierung der IFN β /YFP⁺ Zellen im zellulären Gewebekontext der Milz von MCMV infizierten Mäusen zum Zeitpunkt der höchsten IFN β Antwort in der Milz (48h p.i.) wurden Immunfluoreszenzpräparate angefertigt und mikroskopisch analysiert. In Milzen von mit MCMV WT infizierten IFN β ^{wt/wt} Mäuse waren keine IFN β /YFP-Signale detektierbar (Abb. 3-6, A). IFN β /YFP⁺ Zellen waren hauptsächlich in der T- und B-Zell Zone der weißen Pulpa der Milz lokalisiert, wobei auch einige IFN β /YFP⁺ Zellen in der roten Pulpa positioniert waren. Aufgrund ihrer Koexpression mit B220, der vor allem auf B-Zellen, aber auch auf pDCs exprimiert wird, wiesen sie einen pDC-Phänotyp auf (Abb. 3-6, B, 20x Vergrößerung). Der beschriebene Umbau der T- und B-Zell Zonen (Benedict et al., 2006) war in diesen Präparaten anhand der B220-Färbung nicht festzustellen.

Die *in vivo* nachgewiesene IFN β Produktion in pDCs ergänzt die bereits beobachteten Lokalisationen IFN β ⁺ pDCs im zellulären Verbund der Milz nach MCMV Infektion und CpG Stimulation (Scheu et al., 2008).

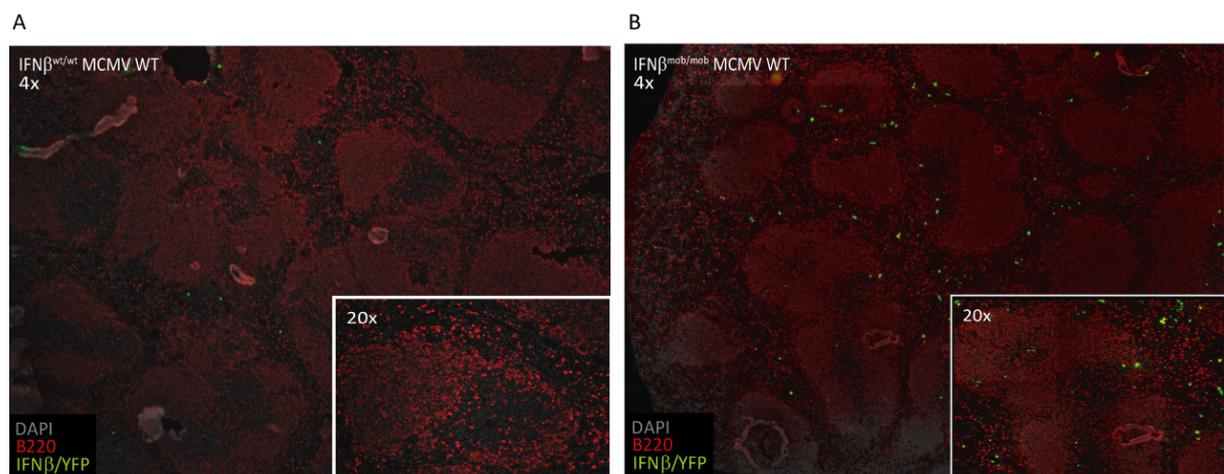


Abb. 3-6: Lokalisation der IFN β /YFP⁺ Zellen in der Milz von MCMV infizierten Mäusen 48h p.i..

IFN β ^{wt/wt} und IFN β ^{mob/mob} Mäuse wurden via der i.p. Route mit MCMV infiziert, und 48h p.i. die Milz immunhistologisch aufgearbeitet (vgl. 2.7.5, 2.8.2). Die Gewebeschnitte wurden mit einem kreuzreagierenden, polyklonalen α GFP Antikörper gegen YFP⁺ Zellen angefärbt, α B220-bio wurde zum Anfärben von B220⁺ Zellen verwendet. YFP⁺ Signale wurden durch Tyramid-FITC (grün), B220⁺ Signale durch SA-Cy3 (rot) verstärkt. DAPI (grau) wurde zur Sichtbarmachung der Nuklei verwendet. In [A] ist die Färbekontrolle einer infizierten IFN β ^{wt/wt} Maus gezeigt, die während der Färbeprozessur identisch zu den IFN β ^{mob/mob} Gewebeschnitten behandelt wurden. [B] zeigt den Gewebeschnitt einer IFN β ^{mob/mob} Maus nach Infektion mit MCMV WT. Jeweils gezeigt sind Ausschnitte mit sowohl 4x als auch 20x Vergrößerungen.

Aufgrund der beobachteten Positionierung IFN β /YFP⁺ pDCs in den T-Zell Zonen der weißen Pulpa sollte eine Kinetik der MCMV Infektion angefertigt werden. Diese Bestimmung der Lokalisation dieser Zellen im zeitlichen Verlauf der Infektion sollte Aufschluss über die mögliche Funktion der IFN β /YFP⁺ pDCs geben. Zum Zeitpunkt der frühen und späten IFN β Antwort war jedoch angesichts unzureichender Anzahl IFN β /YFP⁺ pDC eine Bestimmung der Position dieser Zellen in immunhistologischen Gewebeschnitten nicht zu realisieren.

3.1.5 Bei erhöhter viraler Dosis wird die IFN β Antwort *in vivo* in pDCs supprimiert

Die Intensität und Dauer der initialen IFN α/β -Induktion wird teilweise durch die Virusdosis bestimmt. Das wurde bei *in vitro* infizierten MEFs deutlich, in denen bei hoher MOI von MCMV eine stärkere und schnellere IFN-Expression beobachtet werden konnte, die jedoch im Vergleich zu einer Infektion mit niedriger MOI schneller abgeschaltet wurde (Le et al., 2008).

Um herauszufinden, ob *in vivo* ein starker viraler Stimulus mit einer starken IFN-Inhibition einhergeht und welchen Einfluss eine höhere virale Dosis auf die virale Replikation hat, wurden die Reporterermäuse mit unterschiedlichen Virusdosen für 24h infiziert. Durch eine direkte *ex vivo* Vielfarben-FACS Analyse der Splenozyten sollten der genaue Phänotyp sowie die Frequenz IFN β /YFP⁺ und MCMV⁺ Zellen nach MCMV Infektion definiert werden.

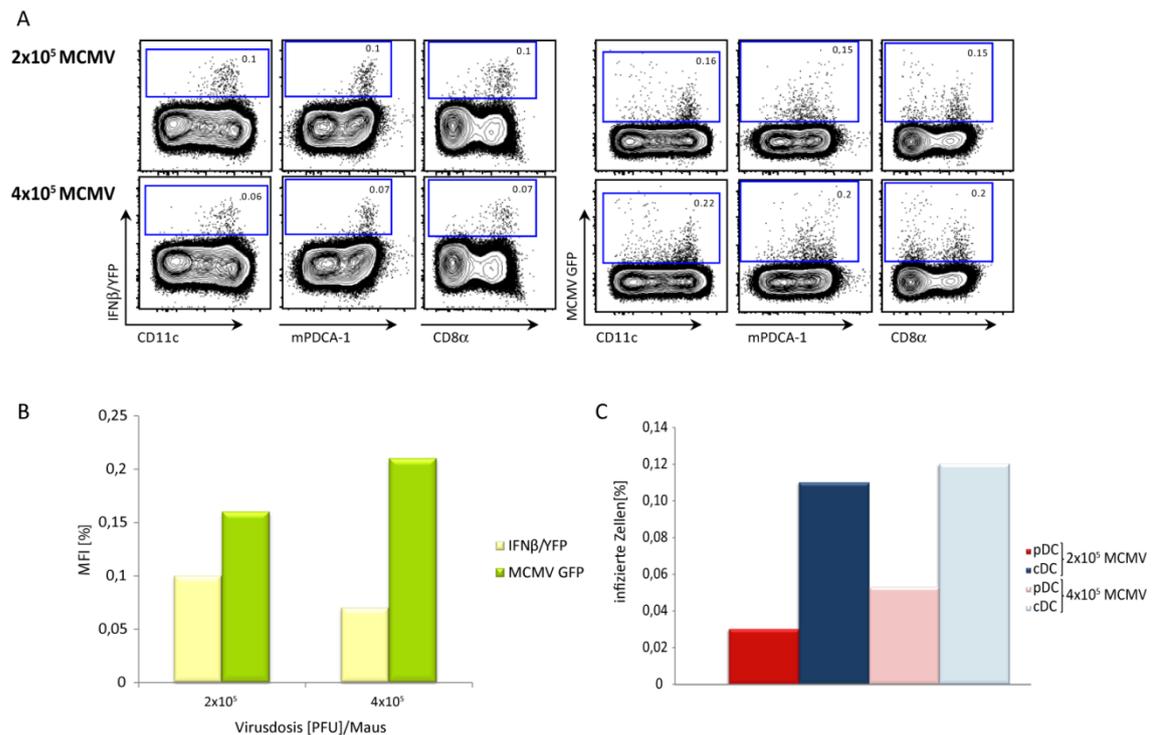


Abb. 3-7: Vergleich der IFNβ/YFP⁺ und MCMV⁺ DCs in der Milz nach Infektion verschiedener MCMV Dosen.

IFNβ^{mob/mob} Reportermause wurden mit 2x10⁵ ([A], obere Reihe) und 4x10⁵ ([A], untere Reihe) PFU MCMV GFP *in vivo* für 24h infiziert (vgl. 2.8.2). [A] Die Splenozyten wurden durchflusszytometrisch auf die Expression von YFP und GFP untersucht und die IFNβ/YFP⁺ sowie MCMV⁺ Zell-Populationen nach Gaten auf Lebendzellen und Ausschluss von T- und B-Zellen anhand der angegebenen Zellmarker charakterisiert (vgl. 2.7.1, 2.7.4). Linke Seite zeigt die IFNβ/YFP Expression, auf der rechten Seite der Abbildung ist die MCMV GFP Expression dargestellt. Die Analyse gates wurden anhand der entsprechenden IFNβ^{wt/wt} Referenz angepasst. Graphisch dargestellt in [B] sind die aus [A] gewonnenen Frequenzen IFNβ/YFP⁺ und MCMV GFP⁺ Zellen. [C] Darstellung der pDC (rot bzw. rosa) und cDC (blau bzw. hellblau) Frequenz in der Milz einer MCMV infizierten IFNβ^{mob/mob} Maus. Das Balkendiagramm zeigt die prozentuale Anzahl MCMV⁺ Zellen in der Milz.

Die IFNβ/YFP produzierenden Zellen waren ausschließlich pDCs und zeigten einen CD11c^{int}, mPDCA-1⁺ und CD8α⁺ Phänotyp. Die Frequenz IFNβ/YFP⁺ Zellen reduzierte sich bei erhöhter viraler Dosis und verringerte sich um ~30% von 0,1% auf 0,07% IFNβ/YFP⁺ Zellen (Abb. 3-7, A).

Neben infizierten CD11c^{int} mPDCA-1⁺ CD8α⁻ B220⁺ pDCs, die ~0,03% der Splenozyten in der Milz darstellten, konnte auch mit erhöhter Viruslast eine weitere MCMV⁺ Zellfraktion beobachtet werden, die den Phänotyp der cDC mit einem Expressionsprofil von CD11c⁺ mPDCA-1⁻ CD8α⁺ aufwies (Abb. 3-7, A). Bei Betrachtung der Relation zwischen infizierten pDCs und cDCs ließ sich kein Unterschied zwischen beiden Virusdosen feststellen. Bei beiden Virusdosen waren mehr cDCs als pDCs mit MCMV infiziert (Abb. 3-7, C).

Die FACS Analysen zeigten, dass unabhängig von der gewählten Viruslast die Phänotypen IFN β /YFP produzierender und MCMV infizierter Zellen identisch waren. Basierend auf der immunevasiven Eigenschaft von MCMV, die u.a. auf der Repression der IFN β Antwort beruht, führte eine Steigerung der Virusdosis zu einer Verminderung der IFN β /YFP⁺ Zellfrequenz bei gleichzeitiger Zunahme der Zellfrequenz infizierter DCs. Darüber hinaus konnte auf diese Weise keine Erhöhung der Zellfrequenz IFN β ⁺ Zellen zur Visualisierung in mikroskopischen Gewebeschnitten erreicht werden.

Trotz insgesamt geringer Frequenzen IFN β exprimierender und MCMV infizierter DC Zelltypen erlaubt die hier verwendete IFN β Reportermaus die simultane Visualisierung der IFN β Antwort und des infektiösen Status nach MCMV *in vivo*. Die IFN β ⁺ pDCs definierten sich durch das Oberflächenmarkerprofil CD11c^{-/int} CD8 α ⁺ mPDCA-1⁺ B220⁺ CCR9⁺ und konnten den aktivierten pDCs zugeordnet werden. Die simultane Infektion IFN β exprimierender pDCs konnte durchflusszytometrisch nicht festgestellt werden. Dabei war die IFN β Expression in pDCs unabhängig vom positiven Typ I IFN Rückkopplungsmechanismus. Die immunevasive Eigenschaft des MCMV, die IFN β Antwort in pDCs zu reduzieren, erweitern den *in vitro* beobachteten Mechanismus in Fibroblasten auf pDCs im *in vivo* Infektionsmodell von MCMV und läßt eine Infektion dieses IFN β exprimierenden Zelltyps erstmals als wahrscheinlich erscheinen.

3.1.6 Untersuchungen zu Veränderungen im Phänotyp von DCs nach MCMV Infektion

3.1.6.1 Bis 24h p.i sind mehrheitlich pDCs infiziert, wohingegen in der späten Infektionsphase *in vivo* insbesondere cDCs mit MCMV infiziert sind

Bemerkenswert war das Ergebnis der Untersuchungen zum viralen Zelltropismus. Neben den bereits in der Literatur beschriebenen cDCs waren in unseren Analysen auch pDCs mit MCMV infiziert. Bei genauerer Prüfung und Vergleiches der Zellfrequenzen MCMV GFP⁺ DCs wurde deutlich, dass im ersten, frühen Infektionsabschnitt mehr pDCs als cDCs von MCMV infiziert wurden und dass diese Infektiosität sich in der Progression der Infektion nach 24h p.i. in Richtung der infizierten cDCs verschob (Abb. 3-8, A, B, C). Vom Zeitpunkt 24h p.i. bis zum Endpunkt des gemessenen zeitlichen Verlaufs der Infektion waren überwiegend cDC mit MCMV infiziert. Mit ~0,04% MCMV GFP⁺ Zellen konnten 48h p.i.

etwas weniger als halb so viele infizierte pDCs beobachtet werden wie infizierte cDCs (Abb. 3-8, C).

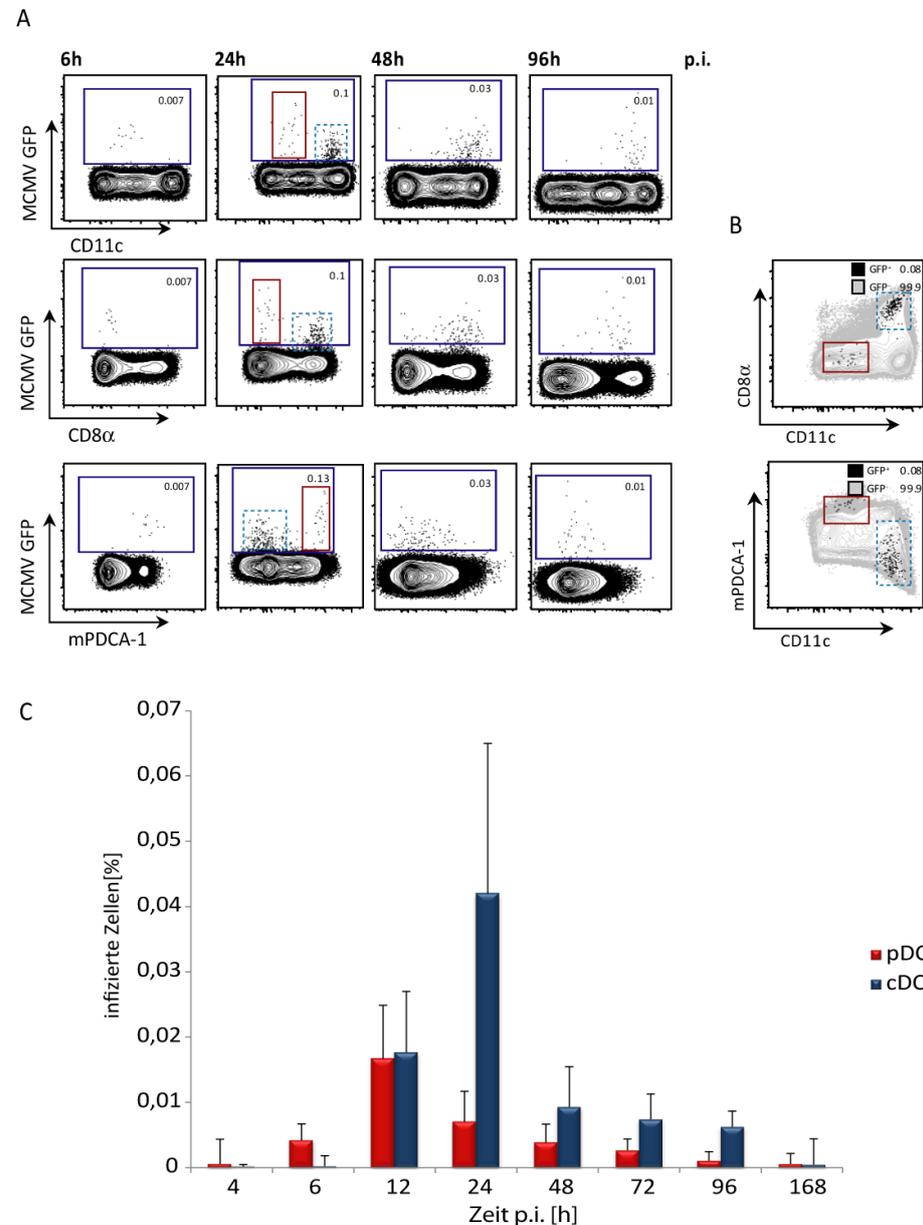


Abb. 3-8: Darstellung der infizierten Zellpopulation nach MCMV Infektion *in vivo*.

[A] In den gezeigten FACS-Plots wurde die MCMV GFP Expression gegen die angegebenen Zelloberflächenmarker zu den angegebenen Zeitpunkten p.i. aufgetragen. Die Zellen wurden wie bereits beschrieben auf lebende DCs elektronisch vorgegattet (vgl. 2.7.4, 3.1.1). Entsprechend der $IFN\beta^{wt/wt}$ Referenzprobe wurde das Auswertegate angepasst. [B] zeigt am Beispiel der höchsten MCMV GFP Expression (24h p.i.) die Oberflächenmarkerverteilung im FACS-Plot unter Zurückgaten auf pDCs (roter Kasten) und cDCs (blauer Kasten, gestrichelt), in [A] sind diese Populationen bei 24h p.i. ebenfalls hervorgehoben. In [C] ist die quantitative Verteilung der MCMV infizierten pDC (rot) und cDC (blau) Populationen in einem Balkendiagramm von den aus [A] bzw. Abb. 3-3 gewonnenen Daten dargestellt. In die Berechnung wurden drei infizierte Mäuse einbezogen. Angegeben ist das arithmetische Mittel, wobei die Streuung der Werte jeweils als Standardfehler der Mittelwerte (*standard error of mean, SEM*) dargestellt sind.

Obwohl die Frequenz der MCMV GFP⁺ Zellen in dem analysierten Zeitfenster weiterhin abnahm, blieb dieses Verhältnis bis zum Ende der Infektion konstant und es konnten

mehrheitlich MCMV⁺ cDCs beobachtet werden. Eine Kalkulation der absoluten Zellzahlen MCMV GFP⁺ Zellen reflektierte dieses Resultat (Daten nicht gezeigt), sodass die Frequenzen der MCMV GFP⁺ pDCs und cDCs zu den Gesamtzellzahlen dieser beiden Zelltypen in der Milz proportional waren. Die detaillierte Analyse der infizierten DC Population zeigte in der Gegenüberstellung, dass zu Beginn der Infektion bevorzugt pDCs mit MCMV infiziert werden, wohingegen in der späten Infektionsphase hauptsächlich in cDCs infiziert waren.

3.1.6.2 Analyse des Eintrittsweges von MCMV in verschiedene Zelltypen

Ausgehend von der Beobachtung, dass nach MCMV Infektion *in vivo* eine unterschiedliche Infektiosität festzustellen war, bei der MCMV sowohl pDCs in der frühen Phase als auch cDCs in der späten Phase der Infektion infiziert, sollte die Hypothese überprüft werden, inwieweit ein unterschiedlicher Eintrittsweg des Virus in die verschiedenen DC Typen für die distinkte Infektiosität verantwortlich gemacht werden kann.

Hierzu wurden sowohl GM-CSF DCs als auch Flt3-L DCs mit verschiedenen Konzentrationen Chloroquin, einer schwachen Base, die den endosomalen pH-Wert erhöht, behandelt und nachfolgend mit MCMV für 24h infiziert. Die von MCMV getriebene Expression von GFP und die als Kontrolle dienende endogene IFN β /YFP Expression wurden mittels FACS ermittelt. Als Kontrolle für eine erfolgreiche Inhibition der Ansäuerung der Endosomen nach Chloroquinzugabe wurden IFN β ^{mob/mob} DCs mit dem TLR9 spezifischen Typ-A Agonisten CpG 2216 stimuliert. Die Chloroquinbehandlung führte entsprechend zu einer Reduktion der IFN β /YFP⁺ Zellfrequenz (Daten nicht gezeigt).

Als Kontrolle für den Eintritt via Fusion wurden NIH3T3 Fibroblasten mit MCMV infiziert und der gleichen Chloroquin Behandlung unterzogen. Wie erwartet konnte in diesem Zelltyp keine Reduktion der MCMV GFP⁺ Zellen durch Chloroquinbehandlung erzielt werden. Die Zellen waren unempfindlich gegenüber einer Inhibition der endosomalen Ansäuerung (Abb. 3-9, E).

Bei der Verwendung von GM-CSF DCs zeigte sich ein anderes Bild bezüglich der MCMV GFP Expression in diesen Zellen. Die Frequenz der MCMV⁺ GM-CSF DCs sowohl aus IFN β ^{wt/wt} als auch IFN β ^{mob/mob} Mäusen fiel graduell mit steigender Chloroquinbehandlung ab und erreichte ausgehend von einer Frequenz unbehandelter DCs von ~45% schließ-

lich bei 100 μ M Chloroquin eine Frequenz von \sim 10% Zellen, die MCMV⁺ waren (Abb. 3-9, A, C).

Die Behandlung von MCMV infizierten Flt3-L generierten B220⁺ und CD11b⁺ DCs erbrachte ein ähnliches Ergebnis wie zuvor beobachtet bei GM-CSF DCs. Mit der Ausnahme, dass in Chloroquin-unbehandelten Flt3-L DCs, vermutlich durch die starke endogene IFN β Expression das Virus unterdrückt wurde und so zu einer geringen GFP Expression führte, konnte in beiden Flt3-L DC Typen ebenfalls eine stetige Reduktion der MCMV GFP Expression nach Inhibierung der endosomalen Ansäuerung festgestellt werden (Abb. 3-9, B, D, F).

Unter Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen eines basischen Agens stellte sich heraus, dass der Eintritt von MCMV in pDCs und cDCs auf der Ansäuerung der Endosomen beruht, was als Hinweis darauf gewertet werden kann, dass die Infektion von MCMV in beiden Zelltypen durch Rezeptor-vermittelte Endozytose erfolgt.

Bei der Verwendung von aus dem Knochenmark generierten IFN β ^{mob/mob} DCs war als bedeutsamer Nebenfund in beiden DC Typen eine graduelle Abnahme der IFN β Expression mit steigendem endosomalen pH-Wert nach MCMV Infektion zu verzeichnen (Abb. 3-9, A, B). Die Beobachtung, dass die Aufnahme von MCMV in GM-CSF DCs und Flt3-L DCs mit der Ansäuerung der Endosomen verbunden ist, wird als Hinweis darauf gewertet, dass die Infektion von MCMV durch Rezeptor-vermittelte Endozytose erfolgt und mit der so induzierten IFN β Antwort in diesen Zellen korreliert.

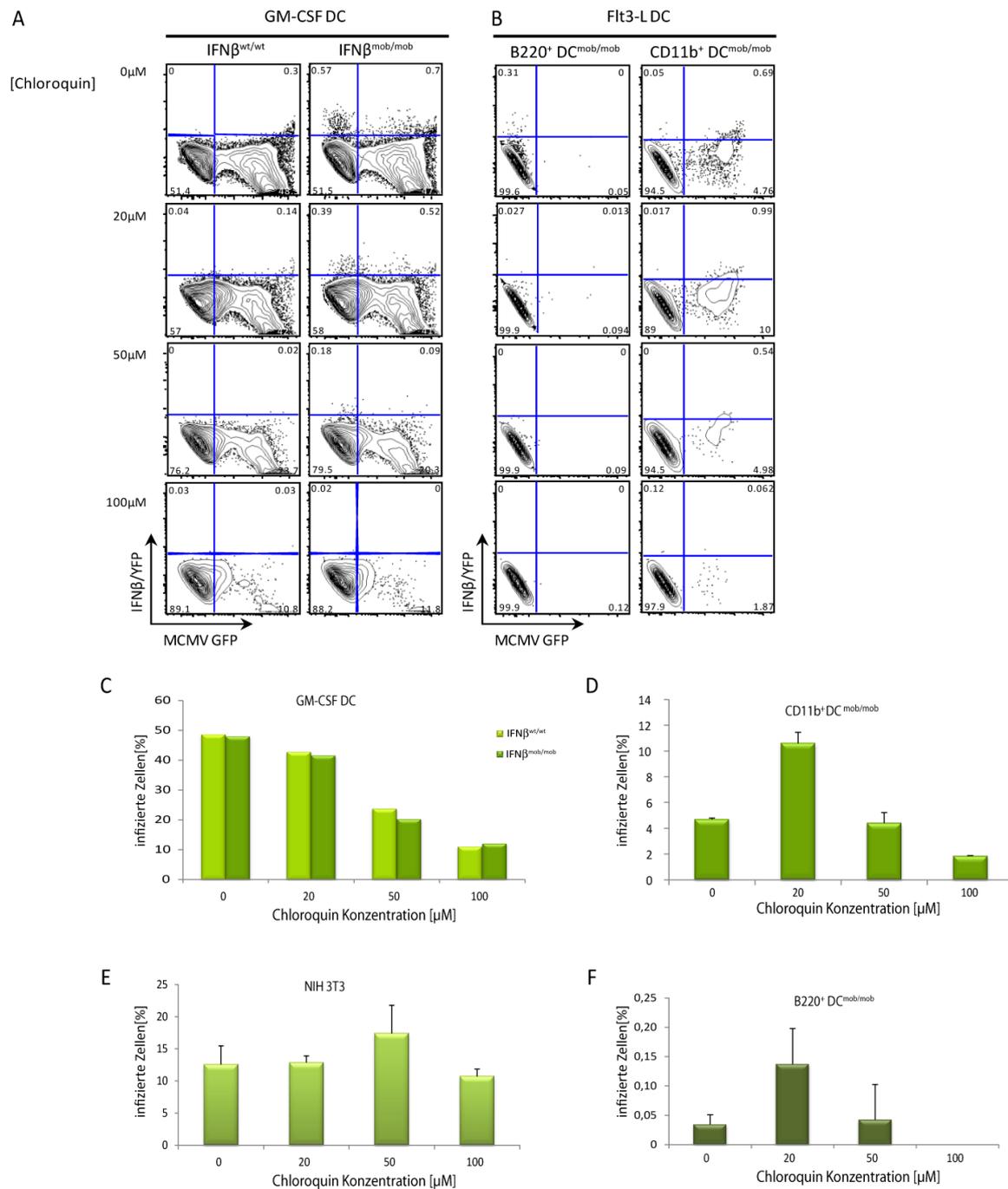


Abb. 3-9: Darstellung des Einflusses von Chloroquin auf die MCMV GFP Expression in *in vitro* generierten DCs und murinen NIH3T3 Fibroblasten 24h p.i..

IFN $\beta^{wt/wt}$ und IFN $\beta^{mob/mob}$ GM-CSF DCs und IFN $\beta^{mob/mob}$ Flt3-L DCs wurden für 24h mit MCMV (MOI=3) infiziert und gleichzeitig mit dem basischen Inhibitor der endosomalen Ansäuerung Chloroquin behandelt (vgl. 2.8.3). Die distinkten DC Zellpopulationen wurden zuvor entsprechend ihrer Oberflächenmarker elektronisch vorgegattet (vgl. 2.7.4). Gezeigt sind FACS-Plots von [A] GM-CSF DCs und [B] Flt3-L DCs, wobei die endogene IFN β /YFP gegen die MCMV Expression analysiert wurden. Die Auswertequadranten wurden an die entsprechenden IFN $\beta^{wt/wt}$ bzw. unstimulierten IFN $\beta^{mob/mob}$ Kontrollen angepasst. [C-F] zeigen die statistischen Auswertungen der ermittelten MCMV⁺ Zellfrequenzen verschiedener Zelltypen. In die Berechnung (außer GM-CSF DCs) wurden zwei unabhängige Ansätze innerhalb eines Experimentes einbezogen. Angegeben ist das arithmetische Mittel, wobei die Streuung der Werte jeweils als Standardfehler der Mittelwerte (*standard error of mean, SEM*) dargestellt ist.

Die Experimente zur Inhibierung der endosomalen Ansäuerung ergaben keinen Unterschied zwischen pDCs und cDCs im viralen Eintritt. Dies widerlegt die initiale Hypothese, dass der unterschiedliche Phänotyp von zu Beginn infizierten pDCs zu im späten Verlauf der MCMV Infektion infizierten cDCs auf einen möglichen unterschiedlichen Eintrittsweg des Virus in den verschiedenen DC Subtypen zurückzuführen ist. Es muss demnach ein anderer Mechanismus zugrunde liegen, mit der sich die unterschiedliche Infizierbarkeit beider DC Typen erklären lässt.

3.1.6.3 Herkunft infizierter pDCs und cDCs nach MCMV Infektion

pDCs produzieren große Mengen an IFN I als Antwort auf eindringende Pathogene wie Bakterien und Viren. Sie sind aber auch in der Lage, eine Immunantwort zu supprimieren oder Toleranz zu begünstigen, und stellen somit einen wichtigen Regulator der Immunantwort dar. Diese entgegengesetzten Funktionen der pDCs sind nicht auf einen singulären, phänotypisch stabilen Zelltyp zurückzuführen, sondern auf mehrere unterschiedliche Subtypen an pDCs, die sich in ihrem Phänotyp, ihrer Morphologie und Funktion voneinander unterscheiden. Vor kurzer Zeit wurde eine neue Subpopulation an pDCs definiert, die sich anhand ihrer CCR9 Expression von anderen pDCs unterscheidet (Hadeiba et al., 2008). Unter dem Einfluss löslicher Faktoren verfügen aus dem Knochenmark generierte CCR9⁻ pDCs über die Plastizität, sowohl Phänotyp als auch Funktion von CD11b⁺ CD8α⁻ cDC-ähnlichen Zellen anzunehmen (Schlitzer et al., 2011).

Die hier beobachtete Veränderung des Phänotyps infizierter DCs, der in der Kinetik durch einen initialen infizierten pDC Zelltypus und in der späten MCMV Infektion durch cDCs als zellulären Ort der viralen Replikation erkennbar war, kann durch eine Redifferenzierung von pDCs in Richtung cDC erklärt werden (Schlitzer et al., 2011).

Um weitere Schlüsse hinsichtlich des Phänotyps und der Funktion IFNβ produzierender und infizierter Zellen im viralen Infektionsmodell von MCMV ziehen zu können, wurden die Marker CD9, ein hauptsächlich auf cDCs exprimierten Ko-Rezeptor von MHC II Molekülen (Unternaehrer et al., 2007), und CCR9 in die durchflusszytometrischen Analysen eingeschlossen.

Der beobachtete Phänotyp der IFNβ/YFP⁺ Zellen war identisch in allen untersuchten Infektionszeitpunkten. Die Mehrheit der IFNβ/YFP⁺ Zellen in der Milz wies einen Phänotyp

von $CD11c^{int} CD8\alpha^+ mPDCA-1^+ CD11b^-$ auf. Eine Koexpression von B220 in den $IFN\beta/YFP^+$ Zellen bestätigte ebenfalls den pDC Phänotyp der $IFN\beta$ Produzenten (Abb. 3-10.). Die $IFN\beta$ produzierenden pDCs waren negativ für CD9 und exprimierten den Chemokinrezeptor CCR9. Es handelte sich demnach um aktivierte reife $IFN\beta$ produzierende pDCs.

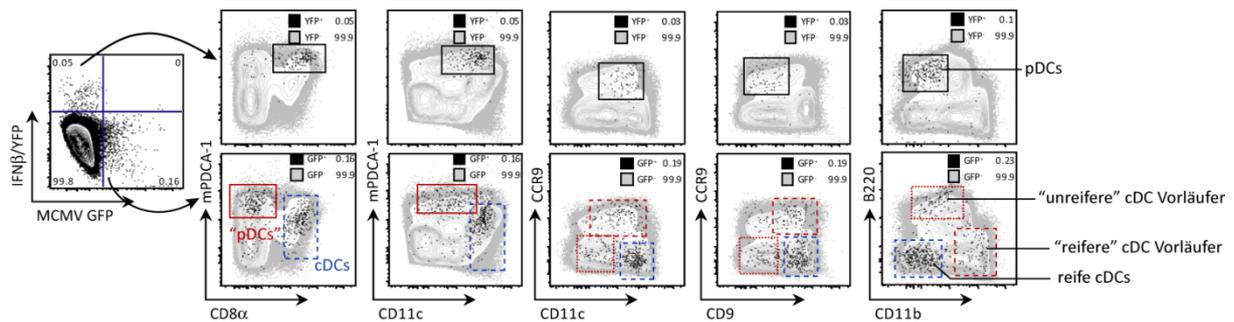


Abb. 3-10: Differenzielle CCR9 Expression innerhalb der DC Populationen in der Milz nach MCMV Infektion.

$IFN\beta^{mob/mob}$ Reportermause wurden mit 4×10^5 PFU MCMV für 24h infiziert wie bereits beschrieben (vgl. Abb. 3-7, 2.7.4). Gezeigt sind jeweils zurückgegate $IFN\beta/YFP^+$ und $MCMV GFP^+$ Zellen gegen die angegebenen Marker. Zur anschaulicheren Darstellung wurden infizierte „pDCs“ (roter Kasten, wobei die vermutlichen cDC Vorläufer mit einem gepunkteten und die „reifere“ cDCs mit einem gestrichelten Kasten umrandet sind) und cDCs (blauer Kasten) umrandet.

Interessanterweise spaltete sich die infizierte pDC Zellpopulation in zwei DC-Fractionen auf, die sich hinsichtlich der CCR9 und CD9 Expression voneinander unterschieden. Neben einer hohen pDC typischen Expression von mPDCA-1 konnte innerhalb einer Gruppe infizierter DCs die Expression von CD9 und CCR9 festgestellt werden. Diese Zellen exprimierten geringe Mengen des Integrins CD11b. Die letzte DC Fraktion wies keine Expression von CD9 und CCR9 auf, sie exprimierten CD11b auf ihrer Oberfläche (Abb. 3-10).

Der *in vivo* beobachtete heterogene Phänotyp der DC Populationen läßt eine differenzierungsbedingte Konversion von infizierten pDC-ähnlichen DCs ($mPDCA1^+ CD11c^{-/int} CD8\alpha^- B220^{-/+} CD9^- CCR9^- CD11b^+$) in Richtung $CD11b^+$ cDC-ähnliche DCs annehmen.

3.1.6.4 Etablierung des molekularen Nachweises der IgH Rekombination

Die Entwicklung von pDCs und cDCs ist abhängig von dem Zytokin Flt3-L und dessen Rezeptor Flt3 (D'Amico and Wu, 2003; Karsunky et al., 2003; Onai et al., 2006). Da ausschließlich pDCs und cDCs in Flt3-L supplementiertem Medium ausdifferenzieren, wird

angenommen, dass beide Zelltypen einen gemeinsamen Vorläufer besitzen. Dessen ungeachtet sind pDC den Lymphozyten sehr ähnlich, da sie neben dem spezifischen B-Lymphozytenmarker B220/CD45RA auch RAG-1/2 (*recombination activating gene-1/2*) exprimieren können. Bis zu 30% der pDCs sind *RAG-1⁺*, dessen Anwesenheit mit dem Ereignis der D-J Rekombination des IgH Locus korreliert (Welner et al., 2009). Die Möglichkeit der Rekombination des IgH Locus unterscheidet sie von den cDCs und stellt demzufolge ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal zwischen beiden DC-Populationen dar. Im LCMV-Infektionsmodell konnte bereits gezeigt werden, dass ein signifikanter Anteil an cDCs sich von pDCs ableitete (Liou et al., 2008).

Die durchflusszytometrischen Befunde dieser Arbeit legten die Vermutung nahe, dass es sich bei den infizierten pDC um unreife DCs bzw. Vorläufer der cDCs handelte. Um die exakte Identität MCMV infizierter DCs zu verifizieren, wurde zunächst die PCR zum Nachweis der IgH Rekombination etabliert. Dazu wurden aus Splenozyten und Knochenmarkszellen B-Zellen (*CD19⁺*) und Granulozyten (*Gr-1⁺*) mittels MACS sortiert. Die gewonnene DNA aus den Positiv- und Negativfraktionen wurde in die nachfolgende PCR zum IgH Rekombinationsnachweis eingesetzt.

Bis auf die murine B-Lymphomzelllinie A20 konnten in allen Proben die Keimbahnbande nachgewiesen werden. In den Positiv- und Negativfraktionen der Milz konnten die Rekombinationsereignisse D-J_H 1-4 detektiert werden. Im Gesamtknochenmark sowie auch in der *CD19⁺* Fraktion der Knochenmarkszellen erfolgten alle detektierbaren Rekombinationen (D-J_H 1-4) und waren durch das charakteristische Bandenmuster erkennbar. Da α Gr-1 sowohl an Ly6C als auch an Ly6G bindet, befanden sich in der *Gr-1⁺* Fraktion neben Granulozyten auch pDCs, die ein entsprechendes IgH Rekombinationssignal ergaben. Aufgrund einer geringeren MACS Reinheit der Zellpopulationen konnten auch IgH Rekombinationsereignisse in der *CD19⁻* Fraktion der Milz detektiert werden. Wie erwartet, fanden keine Rekombinationsereignisse des IgH Locus in den Makrophagen- und Fibroblastenzelllinie statt. In der Kontrollzelllinie A20 konnte das Rekombinationsereignis D-J_H3 detektiert werden (Abb. 3-11).

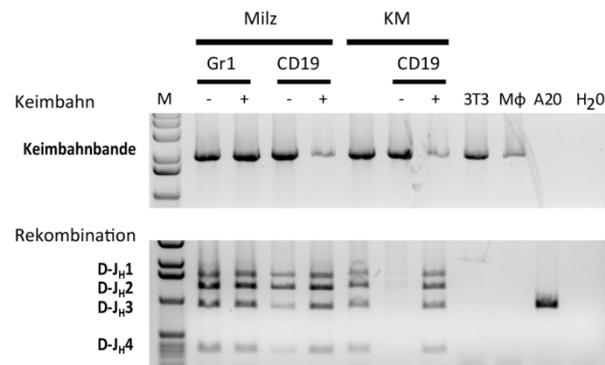


Abb. 3-11: Molekularer Nachweis der Keimbahn und IgH Rekombination in verschiedenen MACS sortierten Zelltypen aus muriner Milz und Knochenmark.

Genomische DNA wurde aus Positiv- und Negativfraktionen von Gr-1 und CD19 MACS sortierten Splenozyten und Knochenmarkszellen gewonnen (vgl. 2.5.1, 2.7.3). Die Immunglobulin D-J_H Rekombination wurde mittels PCR detektiert [B] (vgl. 2.5.2). Die Positionen der PCR Fragmente korrespondieren zu D-J_H Rekombinationen, in denen J_H-1-4 involviert ist [A]. Als Positivkontrolle des IgH Rekombinationsereignisses wurde die murine B- Lymphomzelllinie (A20) mitgeführt, als Negativkontrollen dienten die murine Fibroblastenzelllinie NIH3T3 (3T3) und Makrophagenzelllinie RAW-264.7 (MΦ).

Nach diesem Vorexperiment, in dem die IgH Rekombination in verschiedenen Zellpopulationen nachgewiesen werden konnte, sollen nun *ex vivo* Sortierungen durchgeführt werden, bei denen die Prüfung der IgH Rekombination in infizierten pDCs und cDCs erfolgen soll. Ein Nachweis zur Herkunft infizierter cDCs im *in vivo* Infektionsmodell von MCMV durch die Analyse vorsortierter infizierter pDCs und cDCs stand zur Abgabe dieser Arbeit noch aus.

3.2 Charakterisierung des zellulären Phänotyps nach der Infektion mit einer MCMV $\Delta m157$ Mutante *in vivo*

Mit dem Ziel, immunhistologisch die räumliche Position der IFN β /YFP⁺ Zellen zu den infizierten Zellen in der Milz von Reporter-mäusen simultan zu visualisieren, sollte eine MCMV Mutante generiert werden, bei der der Fluoreszenzmarker *tdTomato* innerhalb des *m157* Locus durch den humanen MIEP gesteuert wird. Die Deletion des *m157* Locus führt zu einer Umgehung der zytotoxischen NK Zell Antwort und resultiert in einer erhöhten Viruslast (Scalzo et al., 2007; Voigt et al., 2003). Eine schnelle Maturierungszeit, geringe Zytotoxizität, hohe Photostabilität und eine hohe Fluoreszenz des tdTomato sollten eine simultane Visualisierung beider Fluorochrome (YFP/GFP und tdTomato) im immunhistologischen Kontext der Milz ermöglichen (Abb. 3-12).

Fluoreszente Proteine					
Protein	Ex [nm]	Em [nm]	<i>in vivo</i> Struktur	rel. Helligkeit [% of EGFP]	$t_{0.5}$ Maturation
EGFP	484	507	monomerisch	100	20min
EYFP	514	527	monomerisch	151	30min-2h
DsRed	558	583	tetramerisch	176	10h
tdTomato	554	581	dimerisch	283	1h
mcherry	587	610	monomerisch	47	15min

Abb. 3-12: Physikalische Eigenschaften relevanter Fluorochrome zur Generierung einer MCMV Δ m157 Mutante.

Angepasst aus Biology (2006) und Shaner et al. (2005).

3.2.1 Die Infektion mit einer MCMV Δ m157 induziert die IFN β Antwort in pDCs

Um vorab zu testen, ob die zu verwendende Δ m157 Mutante einen identischen Phänotyp IFN β produzierender Zellen innerhalb der DC Population aufweist, wurde zunächst eine durchflusszytometrische Charakterisierung der IFN β /YFP Antwort in den IFN $\beta^{\text{mob/mob}}$ Reporter-mäusen vorgenommen, denen neben der in der Kinetik verwendeten MCMV WT auch die Deletionsmutante MCMV Δ m157 appliziert wurde. Als Referenzzellen wurden uninfizierte IFN $\beta^{\text{mob/mob}}$ Zellen mitgeführt, die wie zu erwarten keine Expression von IFN β aufwies (Abb. 3-13, B).

In beiden Infektionen wiesen die Zellen den Phänotyp CD11c^{int} auf und zeigten erhöhte Expressionen von CD8 α und mPDCA-1, wodurch sie den aktivierten pDCs zugeordnet werden konnten (Abb. 3-13, A, C).

Eine Beteiligung der IFN β /YFP Antwort in cDCs konnte zusätzlich durch eine fehlende Expression des für diesem Zelltyp charakteristische CD11b Expression auch hier ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt). Im Vergleich zum MCMV WT konnte durch die Applikation der MCMV Δ m157 Mutante lediglich ein geringer Anstieg der Zellfrequenz IFN β produzierender pDCs erreicht werden.

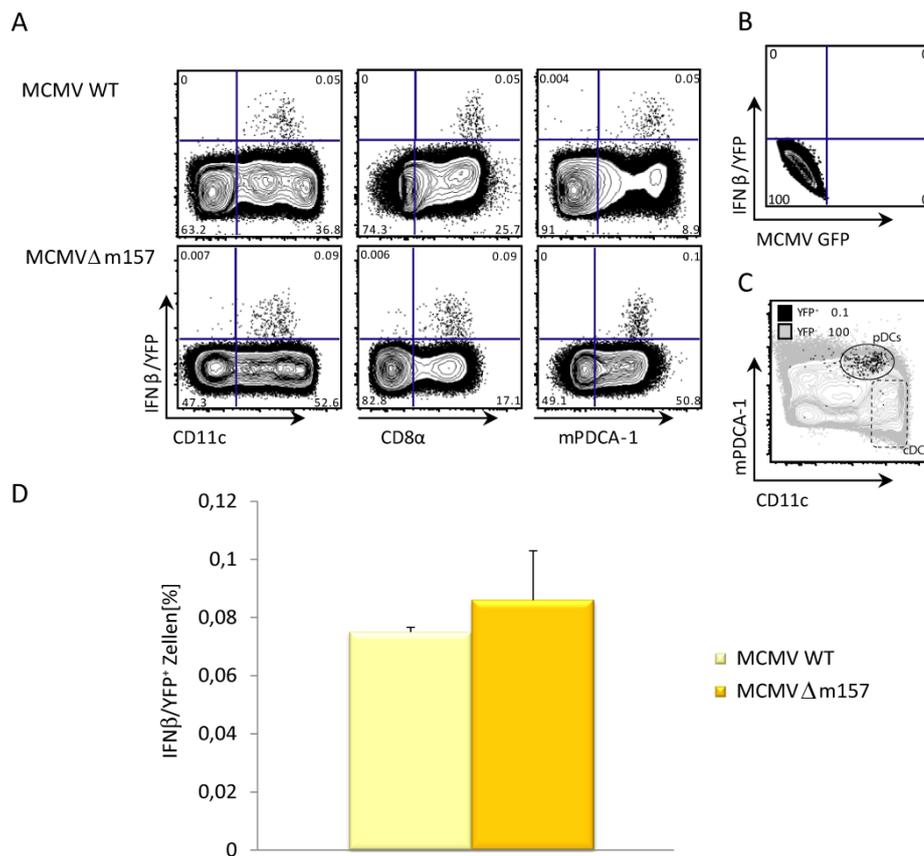


Abb. 3-13: Vergleichende Analyse der IFN β sezernierenden Dendritischen Zellpopulation nach MCMV WT und MCMV Δ m157 Infektion 24h p.i. *in vivo*.

Die Milzen wurden wie bereits beschrieben für durchflusszytometrische Analysen aufgearbeitet und auf lebende DCs elektronisch vorgegätet (vgl. 2.7.4). [A] In den gezeigten FACS-Plots der Milz von IFN $\beta^{\text{mob}/\text{mob}}$ Reporter-mäusen wurde die IFN β Produktion gegen die angegebenen Zelloberflächenmarker aufgetragen. Zur Infektion wurden MCMV WT und MCMV Δ m157 verwendet. [B] Entsprechend der IFN $\beta^{\text{wt}/\text{wt}}$ bzw. uninfizierten IFN $\beta^{\text{mob}/\text{mob}}$ Referenzproben wurde das Auswertegate angepasst. Es ist die unstimulierte Kontrolle der IFN $\beta^{\text{mob}/\text{mob}}$ Zellen mit den angegebenen Fluoreszenzen dargestellt. [C] zeigt das Zurückgaten IFN β /YFP⁺ Zellen (schwarz) gegen IFN β /YFP⁻ Zellen (grau) im Verteilungsfenster CD11c-mPDCA-1 nach MCMV Δ m157 Infektion. [D] zeigt ein Balkendiagramm aus den aus [A] entnommenen IFN β /YFP Zellfrequenzen. Es wurden je zwei Reporter-mäuse in die Statistik einbezogen. Angegeben ist das arithmetische Mittel, wobei die Streuung der Werte jeweils als Standardfehler der Mittelwerte (*standard error of mean, SEM*) dargestellt ist.

Durch die Bestätigung des Phänotyps IFN β exprimierender pDCs *in vivo* kam die Verwendung der MCMV Δ m157 Mutante für die Bestimmung IFN β^+ Zellen im immunhistologischen Kontext in Frage.

3.2.2 Neben pDCs produzieren auch Zellen entlang der Marginal Zone $\text{IFN}\beta$

Zur Bestimmung der Lokalisation $\text{IFN}\beta$ produzierender Zellen in der Milz wurden $\text{IFN}\beta$ Reporterermäuse mit MCMV Δm157 infiziert. In der immunhistologischen Untersuchung der Milzen von mit MCMV Δm157 infizierten Mäusen war auffallend, dass nicht nur $\text{IFN}\beta/\text{YFP}^+$ pDCs in erhöhter Anzahl an der Grenze der T- und B-Zell Zone lokalisiert waren, sondern auch $\text{IFN}\beta/\text{YFP}^+$ Zellen entlang der Marginal Zone akkumulierten (Abb. 3-14, A, B). Diese Zellen erschienen aufgrund ihrer langgestreckten Zellform nicht nur morphologisch andersartig als pDC, sie exprimierten zudem nicht den für pDC-typischen Marker B220. Da diese Zellen während der Aufarbeitungsprozedur für durchflusszytometrische Analysen schlecht aus dem Gewebeverband herausgelöst werden, sind diese Stromazellen der Milz nur im immunhistologischen Kontext sichtbar. Dieses Phänomen konnte bei MCMV WT nicht beobachtet werden.

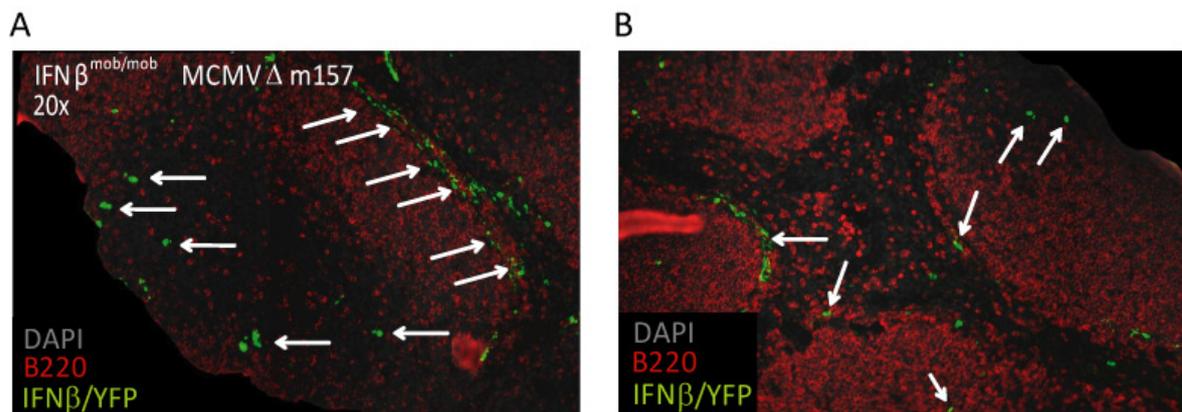


Abb. 3-14: Lokalisation der $\text{IFN}\beta$ produzierenden Zellen in der Milz von $\text{IFN}\beta^{\text{mob/mob}}$ Mäusen 24h nach MCMV Δm157 Infektion.

Die dargestellten Organschnitte von $\text{IFN}\beta^{\text{mob/mob}}$ 24h nach i.p. Infektion von MCMV Δm157 wurden wie bereits beschrieben (vgl. 2.7.5.2) für YFP gefärbt. [A] und [B] zeigen jeweils Areale aus verschiedenen Milzen. Die Pfeile deuten auf $\text{IFN}\beta/\text{YFP}^+$ Zellen. Die entsprechenden Kontrollgewebeschnitte aus mit MCMV Δm157 infizierten $\text{IFN}\beta^{\text{wt/wt}}$ oder uninfizierten $\text{IFN}\beta^{\text{mob/mob}}$ Tieren wiesen keine $\text{IFN}\beta/\text{YFP}$ Signale auf (Daten nicht gezeigt).

Offenbar handelte es sich um einen besonderen Phänotyp dieser MCMV Mutante, der nicht nur die $\text{IFN}\beta$ Expression in pDCs, sondern auch in einem für antivirale Immunantwort essentiellen Zelltyp an der Eintrittspforte des Virus in die Milz induzierte.

3.2.3 Alleinig pDCs sind 24h p.i. mit MCMV Δ m157 infiziert

Aufgrund des beobachteten Phänotyps $\text{IFN}\beta/\text{YFP}^+$ Zellen nach Infektion mit der Δ m157 Mutante erfolgte eine weiterführende durchflusszytometrische Charakterisierung unter Verwendung eines GFP-exprimierenden MCMV Δ m157 zur Identifizierung infizierter Zellpopulationen.

Die Analyse der infizierten DCs ergab ein unerwartetes Resultat. Während nach 24h p.i. eine Vielzahl der infizierten Zellen nach MCMV WT Infektion einen cDC Phänotyp aufwies, der sich durch eine $\text{CD11c}^+ \text{CD8}\alpha^+ \text{mPDCA-1}^-$ Expression kennzeichnete, und nur wenige MCMV GFP^+ Zellen einen pDC Phänotyp ($\text{CD11c}^- \text{CD8}\alpha^+ \text{mPDCA-1}^+$) zeigten, waren MCMV Δ m157 GFP^+ Zellen ausschließlich pDCs (Abb. 3-15, A, D).

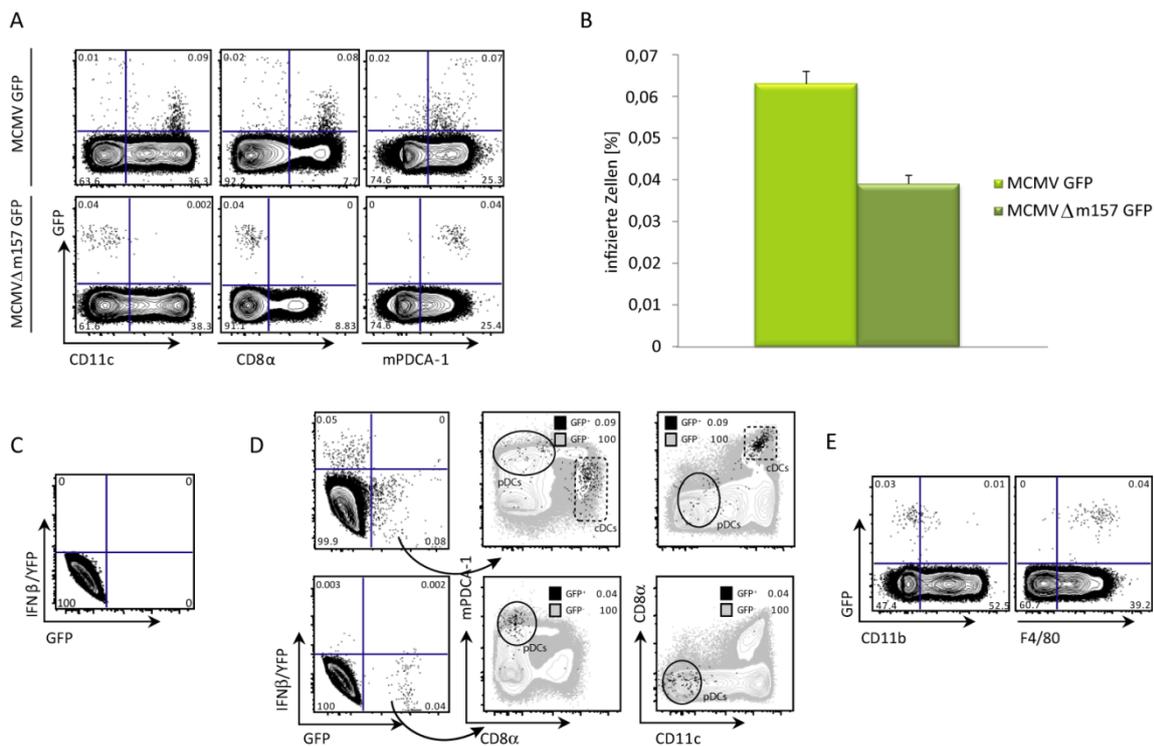


Abb. 3-15: Analyse der infizierten Dendritischen Zellpopulationen nach MCMV GFP und MCMV Δ m157 GFP Infektion *in vivo*.

$\text{IFN}\beta^{\text{mob/mob}}$ Mäuse wurden jeweils mit 2×10^5 PFU MCMV i.p. injiziert und nach 24h p.i. die Milzen für die durchflusszytometrische Analysen aufgearbeitet und analysiert (vgl. 2.7.2, 2.7.4). Verwendet wurden zur Infektion vergleichend die Virusmutanten MCMV GFP und MCMV Δ m157 GFP. In [A] sind FACS Auswertungen beider MCMV Mutanten mit den angezeigten Oberflächenmarker gegen GFP aufgetragen. [B] zeigt die statistische Auswertung zu den aus [A] gewonnenen Frequenzen GFP^+ Zellen. In die Berechnungen wurden jeweils zwei Versuchstiere einbezogen. [C] Darstellung des Auswertequadranten $\text{IFN}\beta/\text{YFP}$ gegen GFP einer mit MCMV Δ m157 infizierten $\text{IFN}\beta^{\text{wt/wt}}$ Kontrolle. In [D] wurden GFP^+ Zellen (schwarz) aus der MCMV GFP Infektion (obere Reihe) und der MCMV Δ m157 GFP Infektion (untere Reihe) den jeweils negativen Zellen (grau) gegen die angezeigten Oberflächenmarker überlagert. [E] zeigt die durchflusszytometrische Analyse nach MCMV Δ m157 GFP Infektion, wobei GFP zum Ausschluss beteiligter infizierter Makrophagen gegen die angegebenen Marker aufgetragen ist.

Sie wurden durch eine niedrige CD11c, CD11b und CD8 α , aber hohe mPDCA-1 Expression dieser Zellpopulation zugeordnet (Abb. 3-15, A, D, E). Da der für Makrophagen typische Marker F4/80 in bestimmten Stimulationssituationen ebenfalls auf pDCs hochreguliert werden kann, deutete die Abwesenheit von CD11b auf eine Nicht-Beteiligung von Makrophagen (F4/80⁺ CD11b⁺) im infektiösen Kontext mit MCMV hin (Abb. 3-15, E). Eine Gegenüberstellung der Frequenzen infizierter Zellen aus beiden Infektionsansätzen veranschaulichte, dass zu diesem Zeitpunkt p.i. mehr DCs mit MCMV GFP als mit der MCMV Δ m157 GFP Mutante infiziert wurden (Abb. 3-15, B). Das widerlegte zunächst die erwartete erhöhte Viruslast nach Infektion mit MCMV Δ m157. In mit MCMV Δ m157 infizierten WT Mäusen konnten indes keine IFN β ⁺ und MCMV⁺ Zellen beobachtet werden (Abb. 3-15, C).

Um die Infektionssituation nach einem vollständig durchlaufenen Replikationszyklus *in vivo* zu klären, wurden WT Versuchsmäuse für 48h mit MCMV Δ m157 GFP infiziert und die Milzen durchflusszytometrisch analysiert. Neben dem Befund, dass in unstimulierten Referenzzellen kein GFP Signal zu detektieren war, konnten in infizierten Tieren cDCs sowie auch pDCs in der Milz als infizierte Zellpopulationen identifiziert werden (Abb. 3-16).

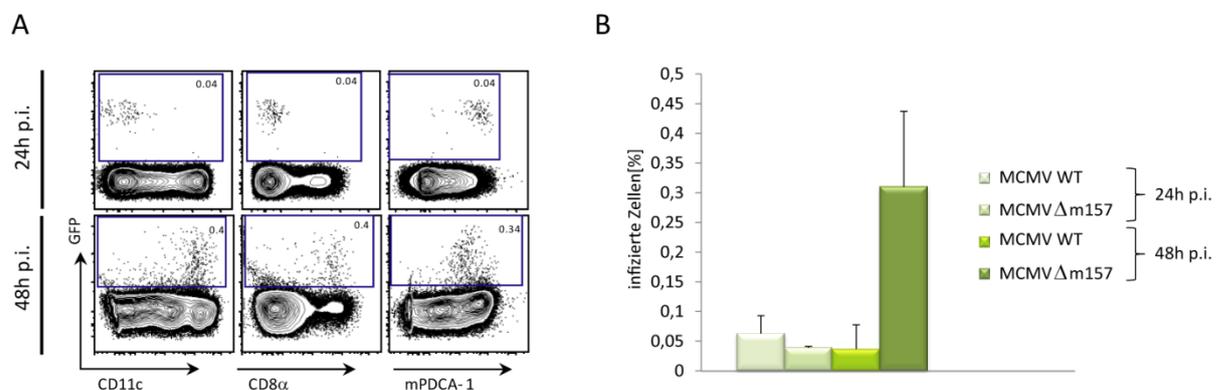


Abb. 3-16: Analyse der infizierten Dendritischen Zellpopulationen nach MCMV WT und Δ m157 GFP Infektion *in vivo*.

IFN β ^{wt/wt} (bzw. IFN β ^{mob/mob} bei 24h Infektion) Mäuse wurden jeweils mit 2×10^5 PFU MCMV Δ m157 GFP i.p. infiziert bzw. unstimuliert belassen und nach 24h und 48h p.i. die Milzen entnommen. Die durchflusszytometrische Analyse der Splenozyten erfolgte wie bereits beschrieben (vgl. 2.7.2, 2.7.4). [A] Gezeigt sind die FACS Analysen im Vergleich 24h vs. 48h p.i. nach MCMV Δ m157 GFP Infektion. Die Auswertefenster wurden nach uninfizierten IFN β ^{mob/mob} bzw. MCMV GFP infizierten IFN β ^{wt/wt} Referenzzellen gerichtet. [B] zeigt die statistische Auswertung der infizierten Zellfrequenzen mit beiden GFP exprimierenden Virusstämmen im Vergleich 24 und 48h p.i..

So war die Mehrheit der MCMV⁺ Zellen CD11c⁺ CD8 α ⁺ mPDCA1^{int} und wurden durch das zusätzliche Fehlen der B220 Expression den cDCs zugeordnet (Abb. 3-16, A, untere Rei-

he, B220 Färbung nicht gezeigt). Weit weniger als die Hälfte der GFP⁺ Zellen konnte in diesem Infektionsansatz den pDCs (CD11c⁻ CD8α⁻ mPDCA-1⁺ B220⁺) zugeordnet werden, die jedoch ein geringeres GFP-Expressionsniveau aufwiesen und offenbar weniger produktiv mit MCMV infiziert waren als cDCs. Eine direkte Gegenüberstellung der Frequenzen MCMV infizierter DCs verdeutlichte den offenbar verzögerten Replikationszyklus des MCMV Δm157, das DCs mit einer ca. 6-fach höheren Effektivität als MCMV WT DCs beobachtet nach 48h p.i. zu infizieren vermag.

Insgesamt lassen die Experimente mit der MCMV Δm157 Mutante die Schlussfolgerungen zu, dass in der frühen Infektion diese Mutante bevorzugt pDC infiziert und zu einem späteren Zeitpunkt der Infektion mehr cDCs mit MCMV Δm157 infiziert waren. Dieser Befund deutet auf einen verzögerten Infektionszyklus hin.

Mit den verfügbaren Mitteln konnte eine sensitive durchflusszytometrische Charakterisierungen von IFNβ⁺ und MCMV⁺ Zellpopulationen erfolgreich vorgenommen werden und die MCMV Δm157 Mutante erwies sich als verlässliches Instrument zur Visualisierung der IFNβ Antwort *in vivo*. Durch die beobachtete Attenuierung des Virus im zeitlichen Infektionsverlauf konnte die Mutante für die Fragestellung der räumlichen Beziehung zwischen IFNβ⁺ und MCMV⁺ Zellen nicht herangezogen werden. Eine Umsetzung in immunhistologische Parallelanalysen zur Visualisierung der räumlichen Beziehung der IFNβ/YFP⁺ Zellen und MCMV war im Rahmen dieser Arbeit nicht praktikabel.

3.3 Untersuchungen von viralen Infektionsmechanismen in der Induktion der Typ I IFN Antwort

Im Infektionsmodell der murinen Listeriose belegten durchflusszytometrische und Konfokal-immunhistologische Untersuchungen, dass mit Listerien infizierte Zellen zur IFNβ Produktion in der Lage sind (Dresing, 2010; Dresing et al., 2010). Die Infektion der IFNβ Reportermaus mit LCMV zeigte ähnliche Resultate, bei der infizierte pDCs ebenso IFNβ ko-produzierten und dabei unabhängig von einer intrinsischen viralen Replikation waren (Macal et al., 2012). Bemerkenswerterweise zeigte sich *in vivo* nach MCMV Infektion der IFNβ^{mob/mob} Reportermaus, dass nicht nur zwei verschiedene DC Zelltypen mit MCMV infiziert sind, sondern auch, dass das Virus eine Fraktion pDC infiziert und einen weiteren Prozentsatz an pDCs zur IFNβ Expression induziert ohne offensichtlich gleichzeitig

mit MCMV infiziert zu sein. Da zu keinem Zeitpunkt der Infektion IFN β ⁺ pDCs als MCMV GFP⁺ detektiert werden konnten, stellte sich nun die Frage, welcher Stimulus für die IFN β Produktion in pDCs nach MCMV Infektion verantwortlich war.

3.3.1 Die Mehrzahl *in vitro* generierter Flt3-L DCs exprimiert entweder IFN β oder ist mit MCMV infiziert

Aufgrund limitierender Frequenzen IFN β produzierender Zellen *in vivo* wurde ein *in vitro* System etabliert. Zur Charakterisierung der IFN β Antwort und der Infektion in pDCs *in vitro* wurden generierte Flt3-L DC gemäß ihrer Oberflächenmarker vorsortiert (Abb. 3-17, A) und für 24h mit verschiedenen MOI MCMV infiziert. Die Reinheit dieser gesorteten Zellpopulationen wurde durchflusszytometrisch bestimmt und lag bei ~98% (Daten nicht gezeigt). Da die Entwicklung von pDCs, aber auch von cDCs abhängig ist von dem Zytokin Flt3-L und dessen Rezeptor Flt3 (D'Amico and Wu, 2003; Karsunky et al., 2003; Waskow et al., 2008), erhält man eine heterogene DC Mischpopulation, deren Anteile erfahrungsgemäß aus ~30-40% B220⁺ CD11b⁻ (pDCs) und ~25% B220⁻ CD11b⁺ (cDCs) bestehen (Gilliet et al., 2002; Naik et al., 2007). Ein stringentes elektronisches Vorgaten erlaubte eine Diskriminierung beider DC Typen.

Während in unstimulierten IFN β ^{mob/mob} Zellen oder in MCMV WT infizierten IFN β ^{wt/wt} Zellen keine YFP oder GFP Signale festgestellt werden konnten (beispielhaft gezeigt an B220⁺ DCs, Abb. 3-17, B), waren nach MCMV Infektion ca. 4% der B220⁺ DCs (IFN β ^{wt/wt}) mit MCMV infiziert. Je höher die gewählte MOI der Virusdosen, desto höher die Frequenz der MCMV GFP⁺ B220⁺ DCs (Abb. 3-17, C oben). Analog zu IFN β ^{wt/wt} Kontrollen, waren auch IFN β ^{mob/mob} B220⁺ DCs zu etwa den gleichen Prozentsätzen mit MCMV infiziert (Abb. 3-17, C, D links). Außerdem konnte mit steigender MOI auch eine erhöhte Frequenz IFN β /YFP⁺ B220⁺ DCs nachgewiesen werden (Abb. 3-17, C unten). Im Gegensatz zu den bisherigen *in vivo* Befunden konnte hier *in vitro* eine B220⁺ DC Fraktion, die IFN β /YFP⁺ und MCMV⁺ war, beobachtet werden, deren Zellfrequenz bei Verdopplung der Virusdosis auf das zwei-fache anstieg und ~0,6-1,2% der analysierten Zellen ausmachten. Der überwiegende Teil der B220⁺ DCs war jedoch entweder IFN β /YFP⁺ oder mit MCMV infiziert (Abb. 3-17, C, D links).

Im Vergleich zu den B220⁺ DCs waren aus der Flt3-L DC Kultur gewonnenen CD11b⁺ DC zwar mit MCMV infiziert, aber nur ein sehr geringer Prozentsatz (0,09% bei MOI=1) erwies sich als IFN β Produzenten (Abb. 3-17, C, D rechts). Auch hier konnte mit steigender MOI eine erhöhte Frequenz an MCMV infizierten CD11b⁺ DC beobachtet werden, bei denen ein Maximum von ~7% an infizierten CD11b⁺ DCs bei einer MOI von 1 erzielt werden konnte (Abb. 3-17, C, D rechts). Eine Steigerung der IFN β /YFP⁺ und MCMV GFP⁺ Zellfrequenz konnte auch in dieser Zellpopulation durch eine Erhöhung der MOI erreicht werden.

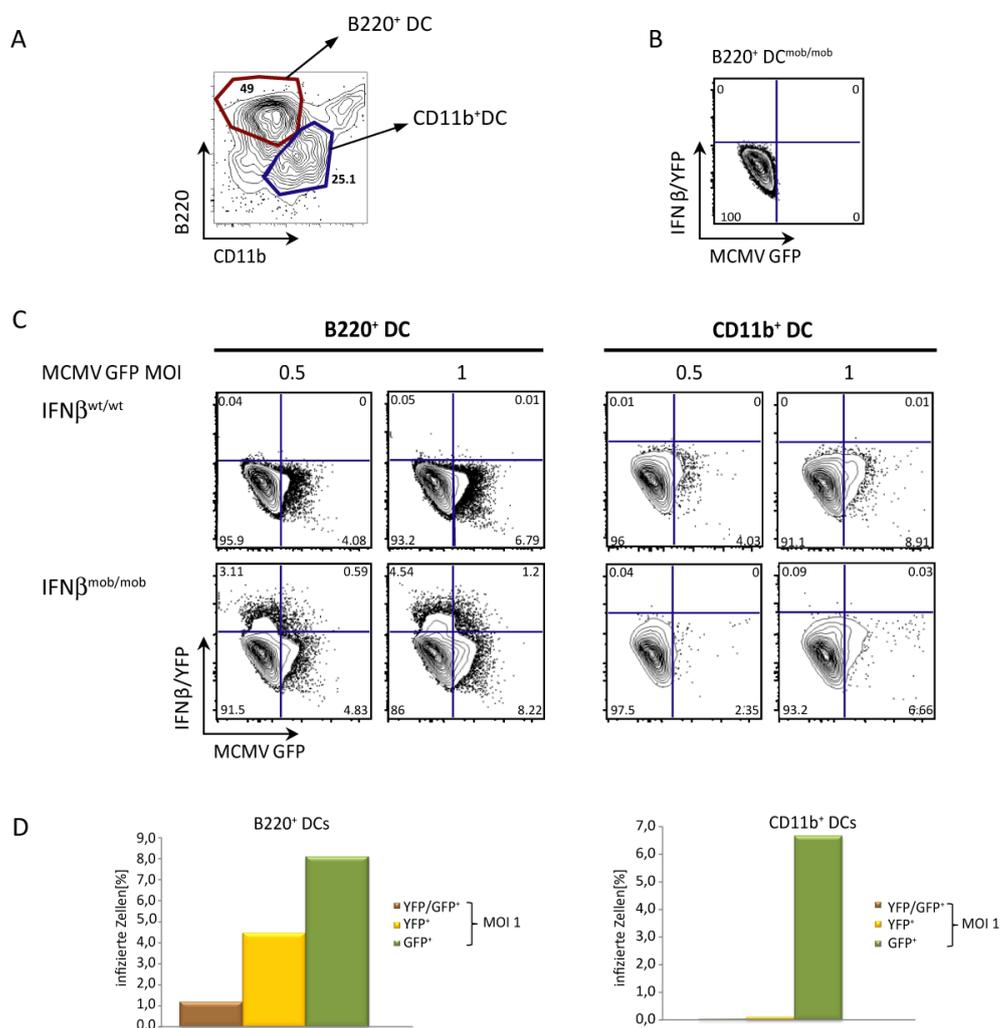


Abb. 3-17: Analyse der IFN β /YFP und MCMV GFP Expression von *in vitro* vorsortierten Flt3-L DCs 24h p.i..

B220⁺ bzw. CD11b⁺ DCs aus Flt3-L Kulturen von IFN β ^{wt/wt} und IFN β ^{mob/mob} Mäusen wurden mittels des Sort Aria I gemäß ihrer Oberflächenmarker [A] separiert (vgl. 2.7.4.2) und *in vitro* mit MCMV mit den angegebenen MOI infiziert und nach 24h durchflusszytometrisch analysiert (vgl. 2.7.4) [C]. Für das präzise Setzen der Auswertequadranten und -gates dienten jeweils die entsprechenden uninfizierten IFN β ^{mob/mob} Zellen [B]. [D] zeigt die aus [C] gewonnenen Zellfrequenzen [%] der jeweiligen Fluoreszenz⁺ Zellen.

Diese Daten bestätigen die *in vivo* Beobachtungen insofern, als dass die Mehrheit der *in vitro* generierten B220⁺ DCs entweder IFN β sezernierten oder mit MCMV infiziert waren. Eine kleine Fraktion infizierter Flt3-L DCs war unter *in vitro* Bedingungen darüber hinaus in der Lage, zeitgleich IFN β zu exprimieren. Unter Zellkulturbedingungen wurden, anders als im *in vivo* Infektionsmodell, einige CD11b⁺ DCs als IFN β Produzenten identifiziert. Dieses Experiment legte die Vermutung nahe, dass auch mit MCMV infizierte pDCs durchaus in der Lage waren, simultan IFN β zu exprimieren und diese Fraktion *in vivo* wegen eines Detektionslimits sowohl quantitativ als auch qualitativ im FACS nicht nachweisbar waren.

Ausgehend von dem Befund, dass auch infizierte pDC IFN β *in vitro* ko-exprimierten, sollten diese Zellen in hochauflösenden Konfokalanalysen dargestellt werden. Da die Zellen vor MCMV Infektion nicht vorsortiert wurden, ist der typische pDC Marker B220 in die Färbung einbezogen worden. Aufgrund der Kopplung des dsRed-Proteins an ein Mitochondrien-Lokalisationssignals im $\Delta m157$ Locus von MCMV erscheinen nur die im Zytoplasma einer infizierten Zelle Mitochondrien rot.

Während in mit MCMV $\Delta m157$ infizierten IFN $\beta^{\text{wt/wt}}$ Flt3-L DCs kein IFN β /YFP Signal zu detektieren war (Abb. 3-18, A links), konnten in infizierten Zellen desselben Genotyps dsRed nachgewiesen werden (Abb. 3-18, A rechts). Die Infektion von IFN $\beta^{\text{mob/mob}}$ Flt3-L DCs mit MCMV $\Delta m157$ dsRed zeigte, dass die Mehrzahl der Zellen entweder IFN β produzierten oder mit MCMV infiziert waren. Wie zuvor nach Infektion von vorsortierten pDCs beobachtet, waren auch wenige IFN β exprimierende Zellen gleichzeitig mit MCMV infiziert. Dabei war auffallend, dass infizierte Zellen marginal IFN β exprimierten und starke IFN β Produzenten geringfügig mit MCMV infiziert waren. Im linken Ausschnitt der Abb. 3-18, B konnte eine IFN β produzierende Zelle durch die Koexpression von B220 als pDC identifiziert werden. Zudem konnten vermehrt Ereignisse beobachtet werden, bei denen IFN β /YFP⁺ Zellen sich in unmittelbarer Nachbarschaft zu entweder infizierten Zellen oder auch infizierten IFN β /YFP⁺ Zellen befanden (Abb. 3-18, B).

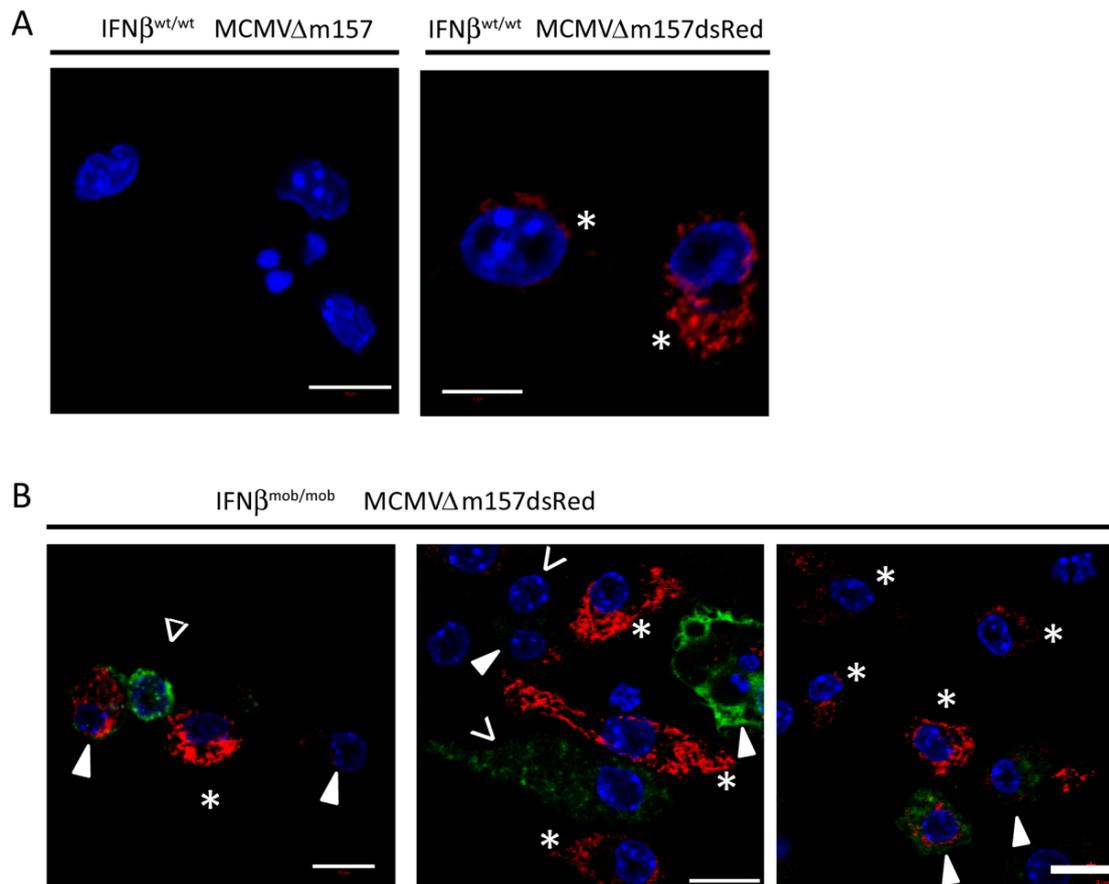


Abb. 3-18: Konfokalmikroskopie von *in vitro* generierten Flt3-L DCs 24h nach MCMV Infektion.

Dargestellt sind Konfokalaufnahmen von *in vitro* generierten Flt3-L DCs infiziert mit MCMV (MOI=3) 24h p.i.. Die Färbung erfolgte wie in 2.7.5.2 und 2.7.5.3 beschrieben. Als Kontrollen dienten jeweils mit MCMV Δ m157 infizierte IFN $\beta^{wt/wt}$ DCs und mit MCMV Δ m157dsRed infizierte IFN $\beta^{wt/wt}$ DCs [A]. In [B] sind repräsentativ mit MCMV Δ m157dsRed infizierte IFN $\beta^{mob/mob}$ DCs gezeigt. Keil: IFN β /YFP $^+$ MCMV $^+$; Pfeilspitze: IFN β /YFP $^+$ (grün); Triangel: IFN β /YFP $^+$ B220 $^+$; Stern: MCMV $^+$ (rot). Der angegebene Maßstab entspricht 10 μ m.

Wie vermutet, reflektieren diese Ergebnisse der konfokalmikroskopischen Aufnahmen die *in vitro* Sortier-Befunde, bei denen ebenfalls ein Teil der infizierten B220 $^+$ DCs IFN β exprimierten.

3.3.2 Einzig CD11b $^+$ DCs lassen sich unter Ko-Kulturbedingungen *in vitro* mit MCMV infizierten GM-CSF DCs infizieren und zur IFN β Expression induzieren

Bisher ist die Kommunikation zwischen den Zellen ausschließlich den Zytokinen zugeschrieben worden. Neuere Daten weisen jedoch verstärkt auf eine rasche, Kontakt-abhängige Informationsweiterleitung hin, die vor allem durch eine räumlich kurze Distanz zwischen den kommunizierenden Zellen gegeben ist. Die interzelluläre Kommunikation über Gap-junctions stellt eine wichtige Klasse der Kontakt-abhängigen Kommunika-

tion dar und wurde kürzlich verantwortlich für die DNA-ausgelöste Kommunikation zwischen benachbarten Zellen gemacht (Patel et al., 2009). Die in der Publikation beschriebene von Gap-junctions verstärkte Immunantwort ausgelöst durch zytosolische DNA ist auch im MCMV Modell denkbar, denn durchflusszytometrischen Analysen zeigten distinkte Zellpopulationen von IFN β Produzenten und infizierten Zellen innerhalb der pDC Population. Diese Beobachtungen führten zur Hypothese, dass pDCs einen Mechanismus entwickelt haben, virale Infektionen unabhängig von einer intrinsischen Replikation aufzuspüren.

Zur Prüfung der Annahme, ob Zytokinsekretion benachbarter Zellen oder deren Infektion mit MCMV zur Induktion der IFN β Produktion in pDCs führt, wurden Transwell Experimente etabliert, in denen sowohl die IFN β Antwort in DCs als auch deren Infektionsstatus analysiert wurden. Dazu wurden GM-CSF DCs für 24h mit MCMV infiziert und am folgenden Tag Flt3-L DCs entweder direkt (Zell-Zell Kontakte möglich) oder zur räumlichen Trennung beider DC Typen auf Transwellmembranen zugegeben und für weitere 24h inkubiert. Die Kontrolle der Infektion von GM-CSF DCs mit MCMV ist beispielhaft gezeigt (Abb. 3-19, B).

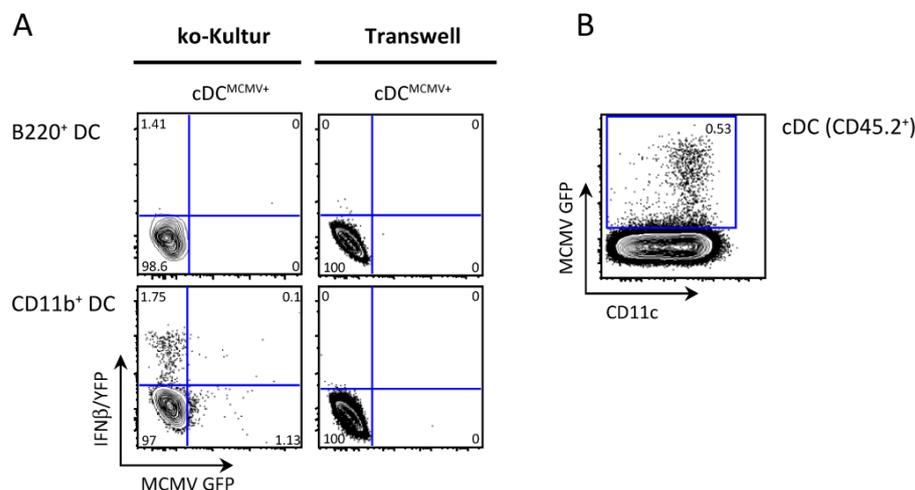


Abb. 3-19: Analyse der IFN β Produktion und MCMV Infektionsstatus unter Ko-Kulturbedingungen und im Transwell System *in vitro* 24h p.i..

Der Versuchsaufbau erfolgte wie in 2.8.5 beschrieben. [A] zeigt AuswertepLOTS verschiedener DC Zelltypen unter Ko-Kultur- oder Transwellbedingungen mit MCMV infizierten GM-CSF DCs (cDCs, CD45.2⁺) aufgetragen als IFN β /YFP gegen MCMV GFP Expression (vgl. 2.7.4). Dabei sind die Zelltypen, die als infizierte Layer als MCMV bzw. Zytokinquelle dienen, auf der horizontalen Ebene dargestellt. Die Flt3-L DC Populationen (CD45.1⁺), auf die nachfolgend gegatet wurden, sind auf der vertikalen Ebene angezeigt. Die mit MCMV infizierten GM-CSF DCs (cDCs, CD45.2⁺) sind in [B] dargestellt. Für das Setzen der Auswertequadranten wurden uninfizierte Zellen des jeweiligen Zelltyps verwendet.

Ein Vergleich beider Modelle ließ einen deutlichen Unterschied hinsichtlich der IFN β und MCMV GFP Expression in DCs erkennen. Unter Ko-Kulturbedingungen mit *in vitro* gene-

rierten GM-CSF DCs konnte die IFN β Produktion in CD11b⁺ DCs (~1,8%) nachgewiesen werden. MCMV infizierte CD11b⁺ DCs wurden unter diesen Bedingungen mit ~1,1% und sogar IFN β produzierende infizierte CD11b⁺ DCs in einer sehr geringen Zellfrequenz (0,1%) detektiert. B220⁺ DCs, die IFN β sezernieren, konnten in der Ko-Kultur mit MCMV infizierten GM-CSF DCs nicht detektiert werden.

Unter Transwellbedingungen konnten weder in B220⁺ noch in CD11b⁺ DCs eine IFN β Produktion nachgewiesen werden. Die wenigen IFN β /YFP⁺ B220⁺ DCs wurden aufgrund ihrer Anwesenheit in infizierten WT Kontrollen als autofluoreszent eingestuft und daher nicht als IFN β Produzenten identifiziert (Abb. 3-19, A, rechts).

Unter beiden getesteten Kulturbedingungen konnte keine IFN β Expression in pDCs (B220⁺ DCs) induziert werden. Den beobachteten Ko-Lokalisationen von IFN β ⁺ und MCMV⁺ Zellen in den Konfokalanalysen kann somit keine kausale Funktion zugeordnet werden. Zudem konnte nicht beobachtet werden, dass MCMV durch Zell-Zell Kontakt zu infizierten Zellen oder als freie virale Partikel an pDCs weitergeleitet wird. Die Daten deuten darauf hin, dass möglicherweise die Aufnahme viraler Partikel bzw. deren Bestandteile auf einem endozytotischen Weg oder die Infektion selbst für die IFN β Expression in pDCs verantwortlich ist ohne einen infektiösen Status dieser Zelle *in vivo* durchflusszytometrisch nachweisen zu können.

3.3.3 Die virale Replikation ist keine Voraussetzung für die IFN β Produktion in B220⁺ DCs *in vitro*

Die Expression der MCMV-Gene verläuft in der für Herpesviren typischen Weise in mehreren Stufen ab. Ganciclovir gehört zu den virostatisch wirksamen Stoffen. Es wird in virus-infizierten Zellen als Nukleosid-Analogon in die virale DNA eingebaut und führt folglich zum Abbruch der DNA-Synthese, da die virale Polymerase genau eine Base nach Einbau des Ganciclovirs die Kettenverlängerung abbricht. Um festzustellen, welchen Einfluss die virale Replikation auf die IFN β Expression in verschiedenen DC Typen hat, wurden Flt3-L und GM-CSF generierte DCs mit MCMV bei zeitgleicher Zugabe des Virostatikums infiziert.

Die anschließende durchflusszytometrische Analyse bestätigte erneut, dass beide DC Zelltypen mit unterschiedlicher Effizienz mit MCMV infiziert wurden. Während B220⁺

DCs mit einer Zellfrequenz von 0,02% mit MCMV infiziert wurden, konnten 0,17% der CD11b⁺ DCs aus derselben DC-Kulturbedingung und 13,2% der GM-CSF DCs als MCMV⁺ nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich eine ähnlich hohe Expression von GFP in den CD11b⁺ und GM-CSF DCs, demgegenüber konnte eine schwächere GFP Expression in pDCs festgestellt werden. Nach Zugabe des Polymerase-Inhibitors Ganciclovir konnte in allen drei DC Typen eine Reduktion der viralen Replikation beobachtet werden. Hinsichtlich der IFN β Produktion konnte eine Reduktion in GM-CSF DCs nach MCMV Infektion unter Behandlung mit Ganciclovir ausgemacht werden, bei der sich die Frequenz IFN β /YFP⁺ Zellen von 0,39% auf 0,18% verringerte. Überraschend war die weitestgehend unveränderte Anzahl IFN β /YFP⁺ pDCs nach Therapie mit Ganciclovir mit einer Zellfrequenz an B220⁺ mit 0,4% bzw. 0,1% CD11b⁺ DCs. Wie in vorherigen *in vitro* Analysen bereits gezeigt, waren nur wenige IFN β /YFP⁺ cDCs mit MCMV infiziert (Abb. 3-20, A, B).

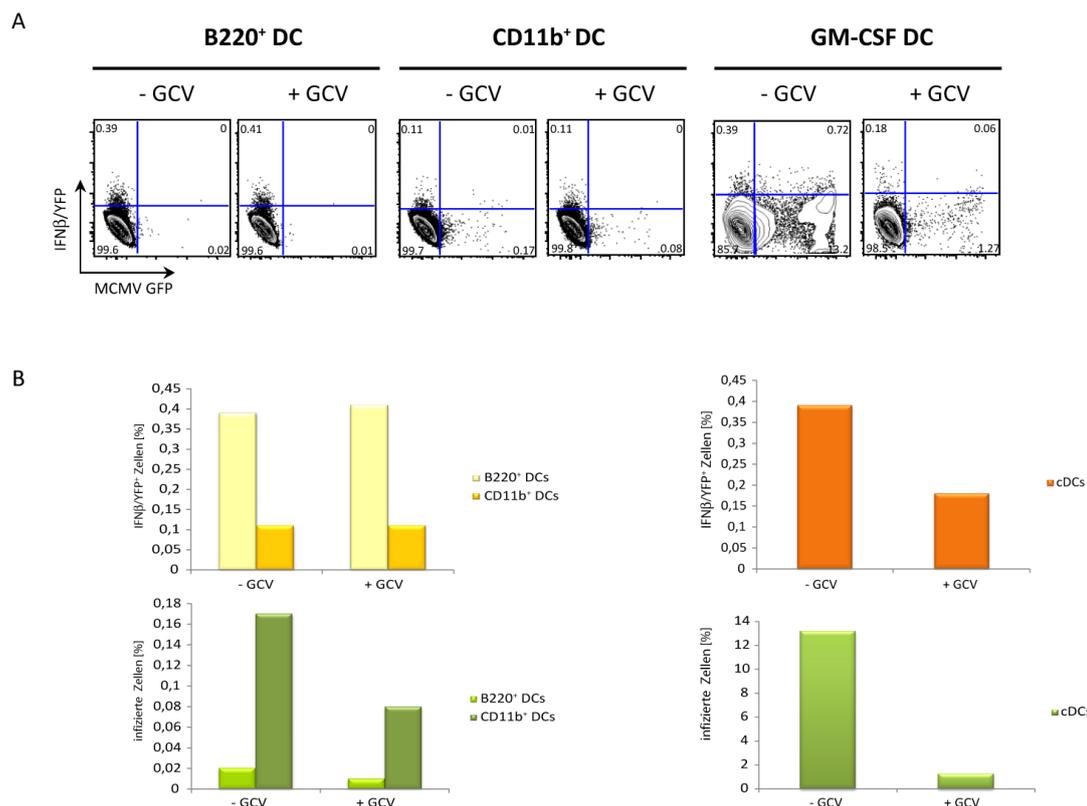


Abb. 3-20: Vergleichende Analyse der Auswirkung von Ganciclovir auf die IFN β Expression und virale GFP Expression von *in vitro* generierten DCs 24h nach MCMV Infektion.

In vitro generierte Flt3-L und GM-CSF DCs (cDCs) wurden für 24h mit MCMV GFP (MOI=3) infiziert und gleichzeitig mit bzw. ohne Virostatikum Ganciclovir behandelt (vgl. 2.8.3). Gezeigt sind elektronisch gatede B220⁺ (pDCs) und CD11b⁺ (cDCs) DCs (links) aus der Flt3-L Kultur sowie cDCs (rechts) generiert mit Zugabe von GM-CSF gegen die angegebenen Fluoreszenzen [A] (vgl. 2.7.4.1, 2.7.4.3). Als Referenz für das akkurate Setzen der Auswertegates dienten die jeweiligen Zelltypen ohne Infektion bzw. Ganciclovir (nicht gezeigt). [B] zeigt die statistische Auswertung zu den aus [A] entnommenen Frequenzen IFN β /YFP⁺ und MCMV⁺ Zellen.

Zusammenfassend belegen diese FACS basierten Analysen der IFN β Expression in verschiedenen DC Zelltypen nach MCMV Infektion mit bzw. ohne Virostatikum, dass die IFN β Expression in B220⁺ DCs alleinig durch die Aufnahme des Virus induziert wird und unabhängig von einer effizienten viralen Replikation ist. Im Gegensatz zu diesen Flt3-L DCs erfolgt eine produktive Infektion in den weitaus MCMV permissiveren cDCs, deren IFN β Expression abhängig von der intrinsischen viralen Replikation ist.

3.3.4 UV inaktiviertes MCMV induziert in pDCs die IFN β Expression *in vivo*

Die bisherigen Ergebnisse der MCMV Infektion zeigten, dass die IFN β Expression in pDCs unabhängig ist von der viralen Replikation und auch die Beteiligung von sekretierten Zytokinen bzw. eine Trans-Infektion von Virionen konnte ausgeschlossen werden. Daraus ergab sich die folgende Frage: Wenn die IFN β Expression in pDCs ohne die simultane Infektion, und daher unabhängig von einer viralen Genexpression induziert wird, werden trotzdem virale Fragmente bzw. Bestandteile von pDCs aufgenommen, die nachfolgend eine IFN β Antwort in diesem Zelltyp auslöst? Um dieser Hypothese experimentell nachzugehen, wurde das Virus mit unterschiedlichen UV-Dosen inaktiviert, den Reporter-mäusen appliziert und die Splenozyten hinsichtlich der IFN β /YFP bzw. GFP Expression durchflusszytometrisch analysiert.

Die Infektion mit UV-inaktiviertem MCMV ergab einen identischen Phänotyp IFN β produzierender Zellen von CD11c^{int} mPDCA1⁺ B220⁺ CCR9⁺ (Abb. 3-21, A, C) wie zuvor beobachtet nach Infektion mit intaktem Virus. Die Frequenz IFN β exprimierender pDCs erhöhte sich bei der Infektion mit UV-inaktivierten Viren um das ca. zwei-fache auf 0,07% im Vergleich zur Infektion mit replikationskompetenten Viren (Abb. 3-21, A, D).

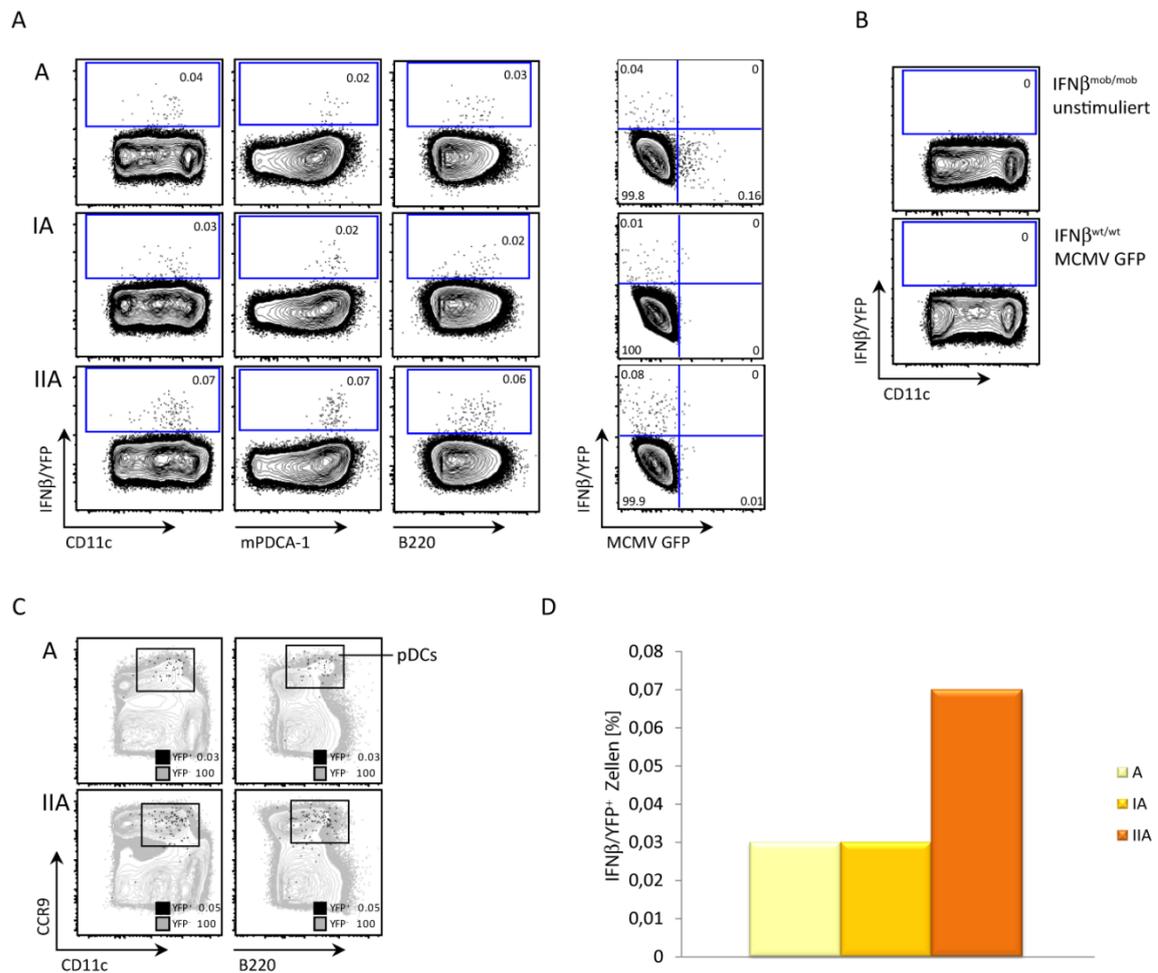


Abb. 3-21: UV-inaktiviertes MCMV induziert in pDCs eine IFN β Expression *in vivo*.

IFN $\beta^{wt/wt}$ und IFN $\beta^{mob/mob}$ Mäuse wurden mit 4×10^5 PFU MCMV GFP via der i.p. Infektionsroute für 24h infiziert. Die Milzen wurden für durchflusszytometrische Analysen aufgearbeitet (vgl. 2.8.2) und die Zellpopulationen hinsichtlich ihrer Oberflächenmarker- und endogenen IFN β /YFP bzw. GFP Expression analysiert (vgl. 2.7.4.3). Für die Infektion wurde MCMV (A=aktiviert, keine UV Bestrahlung; UV-inaktiviertes MCMV IA=mittlere UV-Dosis bzw. MCMV IIA=hohe UV-Dosis) verwendet (vgl. 2.8.4). Dargestellt sind Auswertefenster der FACS Analysen für die endogene IFN β /YFP Expression gegen die angegebenen Marker [A], deren statistische Auswertung in [D] dargestellt sind. Die Auswertegates richteten sich nach den jeweiligen Kontrollzellen [B]. Zur anschaulicheren Darstellung der IFN β /YFP⁺ Zellen (schwarz) in den Infektionen wurden diese in verschiedenen Auswertefenstern mit den DC typischen Oberflächenmarkern gegeneinander aufgespannt und den übrigen Zellen überlagert (grau) [C].

Zusammenfassend wurden pDCs als die einzigen IFN β exprimierenden Zellen 24h nach Infektion sowohl mit intaktem als auch replikationsinkompetentem MCMV identifiziert. Die geringe durchflusszytometrisch nachgewiesene Frequenz IFN β ⁺ pDCs reflektiert die bereits in immunhistologischen Untersuchungen beobachteten geringe Anzahl dieser Zellen nach Stimulation mit den TLR9 Agonisten CpG und MCMV (Scheu et al., 2008). Die Verwendung des UV-inaktivierten Virus führte zu einer erhöhten IFN β Antwort in pDCs und bestätigte infolgedessen auch den immunevasiven Mechanismus von MCMV in pDCs. Obwohl pDCs als schwache Antigen-aufnehmende Zellen beschrieben werden,

legen diese Beobachtungen nahe, dass sie im Kontext der Infektion mit Virusfragmenten von MCMV über eine phagozytotische Fähigkeit verfügen, die zur Induktion der IFN β Antwort führt.

3.3.5 Die Stimulation mit „Defective Interfering Particles“ resultiert in pDCs in einer verstärkten IFN β Antwort *in vivo*

Bei der Anzucht von Viren in Zellkulturen entstehen durch fehlerhafte oder unvollständige Verpackung viraler Genome sogenannte „defective interfering particle“ (DIP) oder „virus-like particles“ (VLP). Diese fehlerhaften Viren sind imstande, eine wirksame Infektion in der Wirtszelle hervorzurufen, vermögen aber nicht eine effektive Replikation durchzuführen.

Um aufzuklären, welchen Einfluss das erhöhte Vorhandensein von Bestandteilen unreifer Viren auf die *in vivo* IFN β Immunantwort hat, wurden neben der gängigen Viruspräparation, bei der vollständig gereifte Viren aus dem Überstand der Zellkultur aufgereinigt werden, auch direkt aus den Zellen gewonnene unreife Viren den Versuchsmäusen appliziert (vgl. 2.8.1).

Bei der Infektion mit unreifen Viren waren neben dem Phänotyp der aus Infektionsversuchen mit aufgereinigten Viruspartikeln bekannten CD11c^{int} CD8 α ⁺ mPDCA-1⁺ IFN β Produzenten auch wenige nicht-aktivierte CD8 α ⁻ IFN β ⁺ Zellen detektierbar, die jedoch aufgrund ihrer einheitlichen Expression von mPDCA-1 der pDC Population zugeordnet wurden. Durch Zurückgaten auf IFN β /YFP⁺ Zellen konnte deren Zugehörigkeit zu den pDCs durch eine geringe CD11b und hohe B220 Expression, die neben B-Zellen ebenso auf pDCs exprimiert wird, zweifelsfrei bestätigt werden. Lediglich die Frequenz der IFN β /YFP⁺ pDCs war im direkten Vergleich beider Viruspräparationen verändert. Demnach konnten bei Versuchstieren, die mit unreifen Viren infiziert wurden, prozentual ~2-3-fach mehr IFN β /YFP⁺ pDCs (~0,16% IFN β /YFP⁺) nachgewiesen werden als bei den mit intakten Viren infizierten Reporter-mäusen (~0,05% IFN β /YFP⁺) (Abb. 3-22, B).

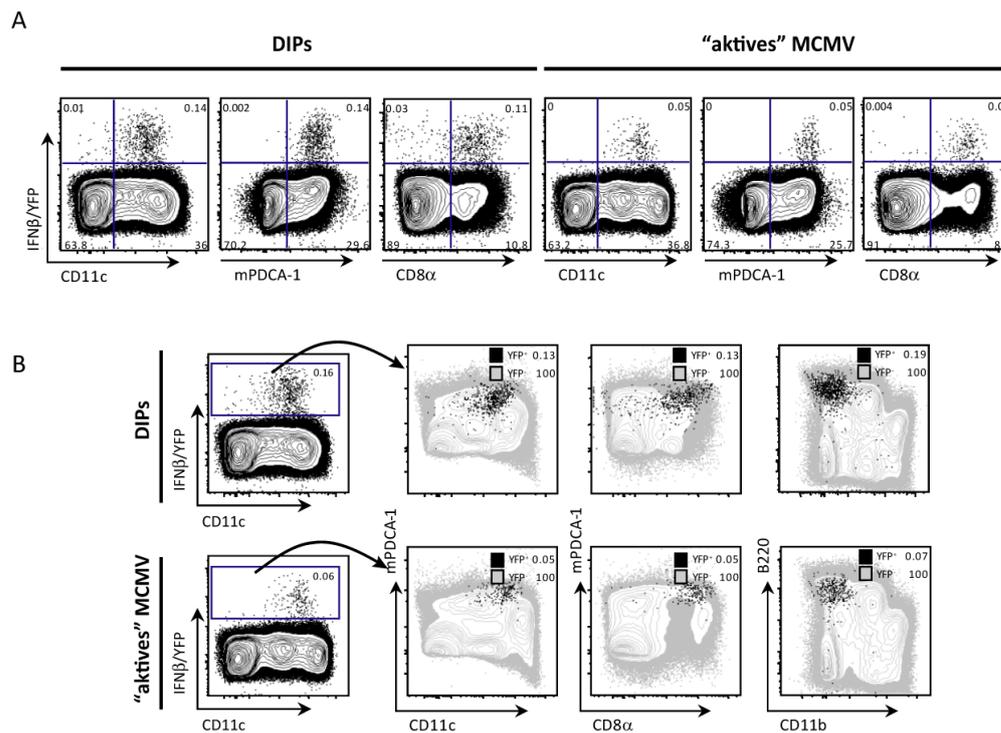


Abb. 3-22: Phänotypische Analyse der IFN β /YFP Expression 24h nach Injektion von IFN β ^{mob/mob} Reporter-mäusen mit aufgereinigten, replikationsfähigen Viren oder DIPs.

IFN β ^{mob/mob} Mäuse wurden mit 2×10^5 PFU MCMV für 24h infiziert. Die herkömmliche Viruspräparationsmethode war die Gewinnung der Virionen aus dem Zellkulturüberstand („aktives“ MCMV), während bei der alternativen Methode die Virionen direkt aus den Zellen gewonnen wurden (DIPs, unreife Viren) (vgl. 2.8.1). Die Splenozyten wurden durchflusszytometrisch hinsichtlich ihrer Expression von IFN β /YFP und Oberflächenzellmarker untersucht (vgl. 2.7.4). Das Setzen der Auswertegates erfolgte an den IFN β ^{wt/wt} Referenzproben. [A] zeigt die FACS Auswertung von Milzzellen nach charakteristischer DC Färbung. In [B] dargestellt sind FACS Auswertefenster, bei denen IFN β /YFP⁺ (schwarz) mit IFN β /YFP⁺ Zellen (grau) gegen die angegebenen Marker überlagert wurden.

In der Summe zeigte das Experiment, dass verschiedene Viruspräparationen die IFN β Expression in aktivierten pDCs induzierten. Ein erhöhter Anteil an zellulären Bestandteilen und fehlerhaften Virionen in der Viruspräparation steigerte dabei die Frequenz IFN β ⁺ pDCs, sodass Virionenfragmente und zelluläre Bestandteile als stärkere Induktoren der IFN β Expression in pDCs anzusehen sind.

In der Gesamtheit ergaben die Experimente zur Untersuchung zum auslösenden Stimulus der IFN β Antwort in pDCs erste Hinweise, dass die IFN β Expression weder durch Zytokine noch durch direkten Kontakt mit infizierten Zellen induziert wird, sondern dass virale Partikel bzw. Bestandteile durch Rezeptor-vermittelte Endozytose von pDCs internalisiert werden. Die IFN β Induktion in diesem Zelltyp ist dabei unabhängig von der viralen Replikation. Die durchgeführten Analysen stellen zudem einen indirekten Hinweis

auf die Beteiligung endosomaler Sensoren am Erkennen von MCMV in pDCs dar, die die IFN β Expression in diesen Zellen vermitteln.

4 Diskussion

Die Typ I IFN Antwort wird sehr schnell als Reaktion auf virale Infektionen in Immunzellen des angeborenen Immunsystems induziert (Stetson and Medzhitov, 2006). Sie vermittelt multiple immunmodulatorische Funktionen mit entweder dämpfender oder stimulierender Wirkung auf die antivirale Immunantwort. Die entscheidende Funktion der Typ I IFN ist hier die Inhibierung der viralen Replikation und der viralen Dissemination im infizierten Wirt (Garcia-Sastre, 2002; Garcia-Sastre and Biron, 2006). Obwohl hypothetisch jede Zelle unter bestimmten Stimulationsbedingungen zur IFN I Produktion imstande ist, konnten Infektionsstudien mit Mitgliedern der Herpesvirenfamilie fast ausschließlich pDCs als Hauptproduzenten der IFN I identifizieren (Baranek et al., 2009; Dalod et al., 2003; Dalod et al., 2002; Scheu et al., 2008; Zucchini et al., 2008a).

4.1 IFN β Expressions- und MCMV Infektionskinetik *in vivo*

4.1.1 Der Einfluss der IFN β Antwort im zeitlichen Kontext der MCMV Infektion

In dieser Arbeit wurden die IFN β produzierenden Zellen innerhalb der immunrelevanten DC Population während der MCMV Infektion *in vivo* bestimmt. Als exklusive IFN β Produzenten wurden aktivierte pDCs identifiziert, deren Frequenz sich im Verlauf der Infektion in einer biphasischen Weise darstellte. Der biphasische Verlauf wurde auch bei den von Schneider *et al.* bestimmten IFN α und IFN β Transkripten der initialen Infektionsphase in der Milz beobachtet (Schneider et al., 2008), allerdings berücksichtigte diese Arbeitsgruppe die gesamte Milz als IFN α/β Quelle und schrieben den initialen IFN β Höhepunkt hauptsächlich den von Lymphotoxin (LT) $\alpha\beta$ -abhängigen Stromazellen der Milz zu. In kultivierten Fibroblasten und auch in den meisten Organen *in vivo* benötigt MCMV für einen kompletten Replikationszyklus ca. 30-36h in (Banks et al., 2005), sodass diese initiale IFN β Antwort auf den injizierten Virus zurückzuführen ist. Die initiale Phase der IFN β Produktion nach MCMV Infektion ist von besonderer Bedeutung, da hierdurch in einem Zeitfenster, indem das Virus das Organ infiziert und eine weitere, spätere IFN β Antwort auslöst, die Induktion der Zytotoxizität von NK Zellen begünstigt wird, bevor ein weiterer

nachgelagerter Höhepunkt der IFN β Produktion in pDCs 48h nach MCMV Infektion erfolgt (Abb. 3-3). Eine Konsequenz der frühen IFN β Produktion ist eine beginnende erste Aktivierung von NK Zellen zur Kontrolle der MCMV Infektion durch entweder einen direkten oder indirekten Einfluss auf infizierte Zellen. Veröffentlichungen belegen einen dominanten Einfluss der TLR-, MyD88- und pDC-abhängigen IFN I Antwort in diesem Zeitfenster (Andoniou et al., 2005; Delale et al., 2005; Krug et al., 2004a). Dies steht im Einklang mit den hier generierten Daten, die pDCs als die einzigen IFN β Produzenten innerhalb der DC Population identifizierten. Im weiteren Verlauf der Infektion spielt dieser Einfluss offenbar eine immer „untergeordnetere“ Rolle, was sich in einer Abnahme der IFN β Expression in pDCs widerspiegelt. Das resultiert vermutlich durch eine ansteigende Frequenz infizierter Zellen, bei denen immunsuppressive Mechanismen von MCMV zur Unterdrückung einer IFN β Antwort greifen (Le et al., 2008).

Der zweite Tag nach der Infektion wird vor allem von der durch IFN I aktivierten NK-Zellantwort bestimmt. Dieser Mechanismus, in dem die virale Replikation und somit auch die Verbreitung des Virus limitiert werden, ist zwischen 36-48h nach MCMV Infektion aktiv. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit dem im Reportersystem verzeichneten zweiten IFN β Expressionshöhepunkt 48h nach MCMV Infektion. Dass pDCs eine entscheidende Rolle in der IFN I Sekretion nach MCMV Infektion einnehmen, bestätigte die *in vivo* Depletion mit α Gr-1, der sowohl pDCs als auch Granulozyten depletiert, die zeigte, dass 36h nach MCMV Infektion eine Typ I IFN Antwort abnimmt, wohin gegen das IL-12 Expressionslevel unverändert blieb und cDCs eine erhöhte IL-12 Produktion aufwiesen (Asselin-Paturel et al., 2001; Dalod et al., 2002).

Die zellulären Mechanismen zur Erkennung einer MCMV Infektion durch infizierte Zellen beinhalten eine Beteiligung vor allem von TLR3 und TLR9 (Krug et al., 2004a; Krug et al., 2004b; Tabeta et al., 2004; Wobus et al., 2004). Doch es verfestigten sich Hinweise auf einen Wechsel von einem strikt TLR9/MyD88/pDC-abhängigen 36h p.i. hin zu einem MyD88/pDC-unabhängigen 44h p.i. Erkennungsmechanismus, der für die IFN α/β Produktion verantwortlich gemacht wird (Delale et al., 2005). Offensichtlich sind neben der hier determinierten Quelle der IFN β Antwort gegen MCMV noch mindestens ein weiterer Zelltyp bzw. unbekannter Sensor in die antivirale Antwort involviert. Auch eine Deletion des TLR9 zeigte eine ca. 70%ige Reduktion der IFN I Antwort 36h p.i. (Andoniou et al., 2005; Zucchini et al., 2008b). Da bisher noch keine eindeutigen Daten zur zellulären

Identifizierung der IFN β Antwort *in vivo* in einem Zeitfenster zwischen 36-48h nach MCMV Infektion vorlagen, wurde angenommen, dass TLR3 auch eine Rolle in der IFN I Produktion nach systemischer MCMV Infektion spielen kann. Darauf deuteten TLR3^{-/-} Studien mit C57BL/6 Mäusen hin, bei denen eine moderate Reduktion der IFN I Antwort festgestellt worden war (Tabeta et al., 2004). Die hier durchgeführte *in vivo* Analyse der IFN β Antwort zeigt eindeutig keine Beteiligung an der IFN β Produktion von cDCs oder Makrophagen auf, die der Literatur nach hauptsächlich TLR3 vermittelt ist. Eine IFN β Antwort innerhalb der DC Population während einer MCMV Infektion ist ausschließlich den pDCs zu zuschreiben, bei der eine MCMV Infektion über TLR9 detektiert wird (Krug et al., 2004a). Kreuzungsmodelle mit der IFN β Reportermaus und TLR9^{-/-} bzw. MyD88^{-/-} oder TLR3^{-/-} bzw. TRIF^{-/-} könnten Aufschluss über die qualitative und quantitative Beteiligung dieser Signalwege und somit auch zellulären Ressourcen der IFN β Expression geben. Der LT $\alpha\beta$ -LT β R Signalweg ist für eine IFN α/β Antwort in der Milz nach MCMV Infektion mitentscheidend und trägt einen wesentlichen Anteil zur IFN α/β Produktion bei. B-Lymphozyten stellen hierbei die Quelle von LT β dar, das die initiale innate IFN α/β Produktion in LT β R exprimierenden Stromazellen induziert. Infizierte und IFN α/β produzierende Zellen im Kompartiment der Stromazellen sind auch beobachtet worden (Schneider et al., 2008). Die Beteiligung von Stromazellen an der IFN β Produktion in der Milz wurde durch die Verwendung der Δ m157 Mutante von MCMV deutlich, durch die eine erhöhte IFN β Expression in Zellen entlang der Marginal Zone induziert. Die LT β R-abhängige IFN β Induktion in diesen Stromazellen der Milz schützt Lymphozyten vor Apoptose während einer MCMV Infektion (Banks et al., 2005) und stellt einen wichtigen effektiven Schutzmechanismus des Immunsystems gegen eine β -Herpesvirus Infektion dar.

72h nach MCMV Infektion reduzierte sich die Frequenz IFN β produzierender pDCs. Obwohl MCMV bevorzugt cDCs infiziert und in ihnen effizient repliziert, tragen diese Zellen auch in diesem späten Zeitfenster der Infektion keinen Beitrag zur IFN β Sekretion nach MCMV Infektion bei, was in Einklang mit bereits publizierten Daten steht (Dalod et al., 2003; Dalod et al., 2002; Krug et al., 2004a; Zucchini et al., 2008a). Die Fähigkeit einiger Herpesviren vornehmlich cDCs produktiv zu infizieren, lässt u.a. die Frage aufkommen, welcher Mechanismus die pDCs vor einer produktiven viralen Infektion schützt. Dass die IFN I Antwort eine entscheidende Rolle in der Immunabwehr gegen MCMV spielt, zeigte

eine erhöhte virale Replikation in Milzen von IFNAR^{-/-} Mäusen im Vergleich zu C57BL/6 Mäusen (Banks et al., 2005; Dalod et al., 2003). Humane pDCs sind durch einen autokrinen IFN I Rückkopplungsmechanismus und durch bisher unbekannte Mechanismen vor einer HCMV Infektion geschützt (Kvale et al., 2006). Studien in murinen Infektionsmodellen ließen aber vermuten, dass die IFN I Produktion in pDCs unabhängig vom IFN I Rezeptor ist (Barchet et al., 2002). Dieser positive IFN I Rückkopplungsmechanismus ist vor allem in Zellen erforderlich, um die Expression des Transkriptionsfaktors IRF7 zu induzieren. pDCs exprimieren unter homöostatischen Bedingungen konstitutiv IRF7, jedoch ist der positive IFN Rückkopplungsmechanismus in diesen Zellen optional (Kerkmann et al., 2003). Experimente mit IFNAR^{-/-} x IFNβ^{mob/mob} Mäusen demonstrieren *in vivo* den Einfluss des positiven IFNβ Rückkopplungsmechanismus in pDCs, der bei dessen Abwesenheit lediglich eine Reduktion der IFNβ Produktion in pDCs zur Folge hat. *In vivo* war ein detektierbares IFNβ Niveau in diesen Zellen vorhanden. Die konstitutive IRF7 Expression ist in pDCs für die Aufrechterhaltung der IFNβ Antwort zur Induktion einer antiviralen Immunantwort und Protektion des infizierten Organs ausreichend. Ein Ausfall der IRF7 Expression in pDCs hatte in allen bisher getesteten Herpesvirusinfektionen eine Abnahme der Typ I IFN Antwort in pDCs zur Folge (Honda et al., 2005a; Steinberg et al., 2009). Derselbe Einfluss des autokrinen IFN I Effekt auf pDCs wurde ebenfalls im Kontext einer NDV (Newcastle Disease Virus) Infektion beschrieben, bei dem der positive IFN I Rückkopplungsmechanismus für eine Anhebung der IFN I Antwort und die Protektion vor einer Ausbreitung der viralen Infektion verantwortlich gemacht wurde (Kumagai et al., 2009). Ebenso zeigten *in vitro* Studien mit Fibroblasten oder MEFs, die mit VSV (Vesicular Stomatitis Virus) infiziert wurden, eine IFNAR-abhängige Expression von IFNα (Barchet et al., 2002). cDCs und Fibroblasten dagegen produzieren IFN I als Antwort auf virale Infektionen *in vitro* in einer RLH-abhängigen Weise. In diesen Zellen wird IFNα über die positive Rückkopplungsschleife induziert (Diebold et al., 2003; Kato et al., 2005).

Die Applikation höherer MCMV Dosen *in vivo* resultierte in einer Reduktion der IFNβ Sekretion in pDCs. Dieser immunevasive Mechanismus wurde zuerst in Fibroblasten gezeigt (Le et al., 2008). Eine Exposition von NK Zellen mit hohen IFN I Mengen im Infektionsmodell von LCMV hatte eine reduzierte Fähigkeit zur IFNγ Produktion zur Folge, was bis dato noch nicht für MCMV beschreiben wurde (Nguyen et al., 2000). Es ist denkbar,

dass sekretiertes IFN α/β in der MCMV Infektion ähnlich wie LCMV naive CD8⁺ T-Zellen gegenüber IL-2, IL-7 und IL-15 induzierter Proliferation desensibilisiert. Das würde eine Änderung der T-Zell spezifischen Immunantwort gegenüber MCMV bedeuten. Zum Einen wäre damit MCMV in der Lage, die IFN β Expression zu unterdrücken und sich so einen Replikationsvorteil zu verschaffen, zum Anderen wird dadurch eine IFN β bedingte Schädigung des Gewebes verhindert, was wiederum zur Etablierung einer latenten Infektion beiträgt. So moduliert MCMV indirekt die virale Last im infizierten Organ und trägt zu einer moderaten Replikation des Virus bei. Offenbar existiert ein bestimmter Schwellenwert, bei dem MCMV seine Existenz im infizierten Organ sicherstellt. Zudem trägt ein erhöhtes Niveau an endogenem IFN β Level zu einer Aufrechterhaltung der cDC Anzahl in der Milz bei (Banks et al., 2005), sodass kurz darauf eine vermehrte MCMV spezifische CD8⁺ T-Zell eintritt.

Die Positionierung IFN β ⁺ pDCs nahe der T- und B-Zell Grenze in der weißen Pulpa der Milz bestätigte zum Einen vorangehende Experimente mit dem molekularen Stimulus CpG, zum Anderen wies die Bereitstellung von physiologisch relevanten Mengen des Zytokins in der antiviralen Immunantwort durch eine äußerst geringe Anzahl IFN β produzierender pDCs auf eine regulatorische Funktion innerhalb der antiviralen Immunantwort gegen MCMV hin. Vergleichbare *in vivo* Ergebnisse zeigten auch die Stimulation von CpG oder die Verwendung der IFN α 6^{wt/GFP} Reportermaus zur Visualisierung der IFN α Expression (Kumagai et al., 2007). Unter homöostatischen Bedingungen befinden sich pDCs in einer geringen Zahl hauptsächlich in der roten Pulpa und T-Zell Zonen der Milz. Durch MCMV aktivierte IFN α ⁺ pDCs migrieren einem chemotaktischen Gradienten folgend in die T-Zell Zone (Asselin-Paturel et al., 2005). Der Befund, dass IFN β produzierende pDCs nach MCMV Infektion in den T-Zell Zonen der weißen Pulpa lokalisiert sind, deutet auf eine funktionale Beteiligung dieser Zellen an der Aktivierung antiviraler Effektorzellen hin (Scheu et al., 2008).

4.1.2 Der zelluläre Infektionsstatus nach MCMV Infektion

Die Kontrolle von MCMV wird vermittelt sowohl von Zellen des angeborenen als auch des adaptiven Immunsystems. Typ I IFN spielt bei der Bekämpfung von Herpesviren eine herausragende Rolle, vermag die virale Replikation in infizierten Zellen direkt zu inhibie-

ren und reguliert so das Überleben und die Differenzierung an der Immunantwort beteiligter Effektorzellen wie NK Zellen und T-Zellen sowie die Reifung von APC (Banks et al., 2005; Schneider et al., 2008). Der Mechanismus, nach dem die virale Verbreitung nach i.p. Infektion erfolgt, beinhaltet den Transport freier Virionen zu den mediastinalen Lymphknoten und die anschließende systemische Zirkulation bis hin zu Milz und Leber (Hsu et al., 2009). Obwohl MCMV einen breiten Zelltropismus aufweist und verschiedene Zelltypen infiziert, erfolgt nach der Dissemination freier viraler Partikel eine selektive Infektion von Stromazellen. Vor allem ER-TR7⁺ CD29⁺ retikuläre Fibroblasten, die der Marginal Zone und der roten Pulpa ihre Struktur geben, sind in der Milz zu Beginn der Infektion (6h p.i.) die ersten von MCMV infizierten Zellen. Obwohl angenommen wurde, dass während der frühen akuten MCMV Infektion DCs effizient infiziert werden (Andoniou et al., 2005; Andrews et al., 2001; Andrews et al., 2005), traten im Infektionsmodell von Hsu *et al.* die ersten infizierten CD11c⁺ Zellen relativ spät, erst nach 48h p.i. auf und waren in der weißen Pulpa der Milz positioniert (Hsu et al., 2009). Sensitive durchflusszytometrische Analysen dieser Arbeit erweiterten diese Befunde, identifizierten die ersten infizierten DCs als pDCs bereits 4h nach MCMV Infektion und widersprechen damit der Beobachtung, dass die ersten infizierten Ly6C/G⁺ pDCs erst 36h nach MCMV Infektion zu identifizieren sind (Dalod et al., 2003). cDCs waren in diesem verwendeten Reportersystem zu diesem Zeitpunkt (4h p.i.) nur marginal mit MCMV infiziert. Für die initial stark reduzierte MCMV Produktion in infizierten Organen wurde als Erklärungsmöglichkeit die frühe IFN I Antwort genannt, die eine virale Replikation verhindert und die Effektorzellen des Immunsystems sowie NK Zellen aktiviert (Dalod et al., 2003). Diese Spekulation konnte durch die dargelegten FACS-basierten Analysen entkräftet werden, da in der frühen Infektionsphase infizierte pDCs identifiziert wurden.

Im gesamten zeitlichen Verlauf der MCMV Infektion *in vivo* zeigten sich zwei MCMV Infektionshöhepunkte, die mit der IFN β Produktion korrelierten. Im Verlauf der Infektion zeigte sich die antivirale Aktivität der IFN β Expression darin, dass zunächst die initiale IFN β Expression die Etablierung einer frühen Infektion verlangsamt. Nach einer ersten hohen viralen Last innerhalb der DC Population erfolgte ein weiterer Höhepunkt der IFN β Produktion, der in der späten Phase die Infektion supprimierte. Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen, dass pDCs ein sehr frühes Ziel für die MCMV Infektion darstellen, wodurch diese Zellen in das Zentrum der Immunantwort gegen MCMV positioniert

werden. Es ist im Interesse des Virus, besonders Zellen des Immunsystems, deren Zytokinausschüttung und funktionale Effektoreigenschaften zur Reduktion der viralen Last in den infizierten Organen führen, in der initialen Phase der Infektion zu kontrollieren. Trotzdem bleibt es weiterhin offen, ob pDCs einen produktiven Infektionszyklus unterstützen. Durch infektiöse Center Assays könnte bestimmt werden, ob pDCs signifikant höhere Levels an infektiösen Partikeln als andere infizierte Zellen produzieren, was eine Aussage hinsichtlich ihres infektiösen Potentials in der frühen Infektionsphase von MCMV erlauben würde.

Die Marginal Zone der Milz spielt in systemischen Virusinfektionen eine entscheidende Rolle. Sie befindet sich zwischen roter und weißer Pulpa und filtert über das Blut verbreitete Pathogene. Mäuse mit einer defekten Marginal Zone konnten nach viraler Infektion keine angemessene IFN α Antwort induzieren (Louten et al., 2006). Zwar wandern durch die Marginal Zone viele verschiedene Zelltypen, myeloide DCs und MZ B-Zellen sind jedoch in dieser Region stabil lokalisiert. Einige Viren nutzen in der frühen Infektion MZ Zellen als Ort ihrer Replikation. Unter homöostatischen Bedingungen sind pDC ungleichmäßig in der Milz verteilt und befinden sich hauptsächlich in der roten Pulpa und den PALS der weißen Pulpa, aber sind in niedrigen Frequenzen auch in der Marginal Zone zu finden (Asselin-Paturel et al., 2005). Die Chemokinrezeptoren CCR7 und CXCR4 sind als essentielle Sensoren für chemotaktische Signale identifiziert worden. Sie sind involviert in das Einschleusen bzw. Positionieren der pDCs innerhalb der Milz oder in deren Migrationspfad in die speziellen lymphoiden Kompartimente. Dabei wird angenommen, dass DCs ihre Signale von den beiden distinkten Stroma-assoziierten Chemokinliganden CCL21 und CXCL12, die auf den Zellen der Marginal Zonen-Brückenkanäle (*splenic marginal zone bridging channels*, MZBCs) exprimiert werden (Umemoto et al., 2012). Die MZBCs bilden Durchgänge im Marginalsinus (bestehend aus Endothelzellen). ER-TR7⁺ retikuläre Fibroblasten (FRCs) kleiden diese MZBCs aus und fungieren als eine Art Verbindungsstraße von der MZ zu den PALS. pDCs gelangen über die Blutgefäße in die Milz und deren Migration von den MZBCs in die weiße Pulpa wird vermutlich über die CXCL12 exprimierenden FRCs geleitet und unterstützt. Da retikuläre Fibroblasten permissiver gegenüber MCMV sind als DCs und durch ihre ideale Positionierung innerhalb der Milz als erste Zellpopulation mit MCMV infiziert wird, werden einwandernde DCs mit MCMV möglicherweise durch die Passage der MZBCs infiziert. Diese

Trans-Infektion wurde bereits für MDDCs beschrieben, bei der infizierte MDDCs CMV Partikel durch engen Kontakt zwischen Membran-gebundenem Virionen und der Plasmamembran der Zielzelle als primärer Mechanismus übermitteln (Haspot et al., 2012). *In vitro* Experimente mit Fibroblasten als MCMV infizierte Monolayer können diese Zellen als Signalübermittler identifizieren, die imstande sind, pDCs mit MCMV zu infizieren (*Trans*-Infektion) bzw. zur IFN β Expression anzuregen. Da ein Migrieren von infizierten DCs aus anderen Organen ausgeschlossen wurde (Hsu et al., 2009), regulieren diese Zellen offenbar die Expression des Migrationsmarkers CCR7 hoch, um von der Marginal Zone, wo sie unter zunächst nicht-infektiösen Bedingungen lokalisiert sind und auch dort infiziert werden, durch die weiße Pulpa bis hin zu den T-Zell Arealen zu gelangen. Dort angekommen, können sie eine T-Zell spezifische Antwort gegen MCMV induzieren. Die biologischen Konsequenzen der IFN I Antwort *in vivo* hängen nicht nur von der produzierten Zytokinmenge ab, wobei niedrige IFN I Niveaus eher immunstimulatorisch und höhere Level immunsuppressiv wirken, sondern auch aus der daraus resultierenden T-Zell Antwort.

4.2 Der Mechanismus der IFN β Induktion

Generell verfügen Zellen über ein komplexes, meist überlappendes molekulares Netzwerk, um das schnelle Erkennen von viralen Pathogenen und deren Bestandteilen sicherzustellen. pDCs besitzen die einzigartige Fähigkeit, virale Infektionen zu detektieren ohne gleichzeitig mit dem Virus infiziert zu sein (Dalod et al., 2003; Romani et al., 2007). Sie müssen demnach in der Lage sein, Oligonukleotide von Viren direkt oder von infizierten Zellen aufzunehmen, um ein Auslösen der IFN β Produktion über TLR7 und/oder TLR9 zu induzieren. Der von pDCs exprimierte TLR9 erkennt unmethylierte CpG Motive wie sie in bakterieller DNA und immunstimulatorischer Oligonukleotide vorkommen (Hemmi et al., 2000; Krieg, 2002). CpG Motive kommen ebenso im Genom der α - und β -Herpesviren wie HSV und MCMV in großen Mengen vor (Lundberg et al., 2003). Da deren Genom nicht besonders methyliert ist, wurde bereits gezeigt, dass TLR9-vermittelte Erkennung von MCMV Genomen über unmethylierte CpG Motive stattfindet (Krug et al., 2004a). Bis heute ist nicht ganz klar, wie DNA in die Endosome gelangt, wo TLR9 einen MyD88-abhängigen Signalweg initiiert.

Die IFN β Produktion in pDCs erfordert keine endogene virale Replikation (Dalod et al., 2003; Romani et al., 2007), wie auch die *in vitro* Experimente mit Ganciclovir bestätigen. Die Detektion von aufgenommenen Oligonukleotiden anderer infizierter Zellen oder der Viren selbst in den Endosomen induziert vielmehr die IFN β Produktion in diesen Zellen. Die Beobachtung, dass *in vivo* keine IFN β exprimierende pDC mit MCMV infiziert war, führte zu der Frage, welche Auslöser für die IFN β Produktion verantwortlich gemacht werden können.

4.2.1 Rezeptor-vermittelte Endozytose als Voraussetzung für die Induktion der IFN β Antwort in pDCs

Welchen Eintrittsweg MCMV in verschiedene Zelltypen benutzt, hat nicht nur Einfluss auf die produktive Infektion, sondern bestimmt auch den Signalweg, der zur Aktivierung der antiviralen Antwort in diesen Zellen führt. Zur effizienten Infektion müssen Viren zunächst an die Zelloberfläche der zu infizierenden Zellen binden. Generell können dabei zelluläre Strukturen als sogenannte „*attachment factors*“ dienen, die eine nicht-spezifische Bindung des Virus vermitteln und für dessen Akkumulierung an der Zelloberfläche sorgen. Virusrezeptoren und virale Glykoproteine dagegen fördern aktiv den viralen Eintritt in die Zellen. Die Hülle des Cytomegalovirus ist eine Lipiddoppelmembran, die sich vom Trans-Golgi-Netzwerk der infizierten Zelle ableitet und neben zelleigenen Lipiden auch 11 virale Glykoproteine beinhaltet. Für die Bindung der CMV Partikel sind sowohl gB als auch gH/gL essentiell. Dabei bindet gB an verschiedene Integrine über eine konservierte Disintegrin-ähnliche Domäne oder an den *epidermal growth factor receptor* (EGFR), um den Eintritt in die Zelle zu gewährleisten (Compton, 2004; Feire et al., 2004; Wang et al., 2003), während die Glykoproteine gH/gL ausschließlich an Integrine binden. Für das virale Glykoprotein gB ist auch gezeigt, dass HCMV an den Membranrezeptor DC-SIGN auf Mo-DCs bindet (Halary et al., 2002). Verschiedene HCMV Isolate können unterschiedliche Komplexe ausbilden, die für den Eintritt in diverse Zelltypen verantwortlich gemacht werden. Während der Komplex gH/gL für eine Infektion essentiell ist, definiert der Komplex gH/gL/gO den Zelltropismus für bestimmte Zelltypen und verbessert die Bindung spezifischer Rezeptoren. Daneben ist der pentamerische Komplex gH/gL/pUL(128, 130, 131A) erforderlich für die Infektion von Endothel- und Epithelzel-

len, DCs und Leukozyten (Scrivano et al., 2010). Während HCMV in die Mehrzahl von Zellen mittels Fusion gelangt, ist die Infektion von MDDCs mit HCMV unabhängig von der Ansäuerung der Endosomen. Vielmehr ist die Makropinozytose, ein Aktin-abhängiger endozytotischer Prozess, an der Aufnahme von HCMV in MDDCs verantwortlich (Haspot et al., 2012). Vor allem in unreifen DCs ist dieser Prozess der Makropinozytose in hohem Maße zu beobachten (Sallusto et al., 1995).

Im bakteriellen Infektionsmodell waren ~80% der IFN β produzierenden Zellen mit *Listeria* infiziert (Dresing et al., 2010). Während der Untersuchung im zeitlichen Verlauf der MCMV Infektion konnte die unerwartete Beobachtung gemacht werden, dass in mit MCMV infizierten DCs keine IFN β Expression auszumachen war bzw. in IFN β exprimierenden pDCs kein GFP nachgewiesen wurde. Daraus lässt sich die Hypothese ableiten, dass MCMV schnell und effektiv die IFN β Expression abschalten kann (Le et al., 2008). Das bedeutet, dass infizierte DCs kein IFN β exprimieren, weil sie mit MCMV infiziert sind. Diese Annahme bestätigen die hier gezeigten *in vitro* Daten (vgl. Konfokal 3.3.1, Sort 3.3.1). Aus der Beobachtung, dass überhaupt IFN β produzierende pDCs während der MCMV Infektion identifiziert wurden, ergab sich die These, dass diese IFN β exprimierenden pDCs MCMV durch Rezeptor-vermittelte Endozytose aufgenommen haben, was vereinbar ist mit dem Auslösen der TLR9-vermittelten IFN β Antwort im Endosom. Während der Mechanismus des HCMV Eintritts in Endothelzellen, Fibroblasten und Epithelzellen bereits gezeigt ist, ist die Datenlage über den Eintrittsweg von MCMV in DCs kaum beschrieben. Die hier beschriebenen Experimente zur Anhebung des endosomalen pH-Wertes von *in vitro* generierten DCs zeigten in beiden DC Typen eine Beteiligung der endosomalen Sensoren bei Induktion der IFN β Antwort auf, wobei die Änderung des endosomalen pH-Wertes in GM-CSF DCs in einer deutlicheren Reduktion der viralen Genexpression resultierte als bei es Flt3-L DC zu beobachten war. Die IFN β Expression in Flt3-L DCs war jedoch insgesamt pH-Wert-abhängig. Ob der Eintritt von MCMV tatsächlich ein pH-abhängig Prozess ist, werden weitere Experimente mit anderen endosomalen Inhibitoren wie Ammoniumchlorid und Bafilomycin A1 zeigen. Für makropinozytotische Prozesse kann die Verwendung des Aktin Inhibitors Cytochalasin D Aufschluss über die Art der Internalisierung von MCMV geben und auch Hinweise über MCMV-induzierte Signalwege. Kürzlich wurde erfolgreich ein mit Kapsid-Fluorochrom getaggttes MCMV konstruiert, welches die Studie des Transports des Kapsids durch das Zytoplasma der

infizierten Zelle ermöglichte. Das sogenannte „*single particle tracking*“ zeigte einen intrazellulären Transport von MCMV Partikel in einem direkten, Mikrotubuli-abhängigen Weg in murinen Fibroblasten (Bosse et al., 2012).

Wie bereits erwähnt, sind für die Bindung von HCMV mehrere Rezeptoren, einschließlich EGFR, PDGFR (*Platelet derived growth factor receptor*) und Integrine (CD11b) beschrieben, die die Adsorption und den Eintritt der viralen Partikel vermitteln. Neben der Bindung des viralen Glykoproteins gB an das auf MDDCs exprimierte DC-SIGN Rezeptor (Halary et al., 2002) können zusätzlich zu Oberflächenrezeptoren auch TLR als Eintrittspforte für HCMV fungieren. Obwohl TLRs durch Erkennen pathogener Bestandteile als Initiatoren der angeborenen Immunantwort agieren und die Hochregulation kostimulatorischer Moleküle, die IFN I Produktion und die Sekretion inflammatorischer Zytokine induzieren, wurde TLR2 als Bindungspartner der HCMV kodierenden gB und gH identifiziert. Offensichtlich verwendet HCMV distinkte Oberflächenrezeptoren für das Andocken an unterschiedliche Zellen oder die Vermittlung des viralen Eintritts in die Zelle. TLR2 ist zwar nicht auf reifen murinen pDCs exprimiert, ist jedoch auf unreifen DCs zu finden und stellt damit einen potentiellen Internalisierungsrezeptor für MCMV dar. Kürzlich wurde der dendritische Endozytose Rezeptor Dec205 als Eintrittspforte von CpG Oligonukleotide beschrieben, der präferenziell CpG Typ-B (1668) bindet (Lahoud et al., 2012). Nach der Internalisierung gelangt CpG zu den Endosomen, wo TLR9 die Signalkaskade der IFN I Antwort in Gang setzt.

Es existieren demzufolge multiple Invasionsmöglichkeiten des Virus, virale Komponenten in das Zellinnere einzuschleusen, die nicht nur die virale Vermehrung begünstigen, sondern auch potentielle Sensoren zur Induktion der antiviralen Immunantwort darstellen.

Immunhistochemische Konfokalanalysen zeigten, dass zum Einen die meisten IFN β produzierenden Zellen nicht mit MCMV infiziert waren, zum Anderen IFN β ⁺ Zellen aber in direkter Nachbarschaft zu infizierten Zellen lokalisiert waren. Dieses Resultat deutete erstmalig auf eine Beteiligung einer „Bystander“ Aktivierung der IFN β Produktion im infektiösen Kontext mit MCMV durch Zytokin-produzierende Nachbarzellen hin. Alternativ können infizierte cDCs oder auch Stromazellen in der Milz über virale Bestandteile (dsDNA) an residente pDCs weiterleiten. Diese produktiv nicht-infizierten pDCs sezernieren daraufhin IFN β .

Die Kommunikation ist bisher zwischen den Zellen ausschließlich den Zytokinen zugeschrieben worden, obwohl Kontakt-vermittelte Kommunikation zwischen den Zellen einen räumlich-zeitlichen Vorteil bringen würde. Beispiele hierfür sind vor allem die Aktivierung von T-oder NK Zellen durch APCs. Eine rasche, Kontakt-abhängige Informationsweiterleitung ist vor allem gegeben bei räumlich kurzen Distanzen zwischen den kommunizierenden Zellen, wohingegen eine kontakt-unabhängige Signalweiterleitung für große Distanzen geeignet ist und dementsprechend mehr Zeit zur Weiterleitung in Anspruch nimmt. Eine andere Hypothese ist, dass der Austausch viraler Partikel über Verbindungskanäle zwischen benachbarten Zellen stattfindet, der im Folgenden zur IFN β Induktion führt. Aufgrund biochemischer Eigenschaften und einem Durchmesser von 2,5nm dieser Gap-junctions ist nicht davon auszugehen, dass ca. 200nm große virale MCMV Partikel den Kanal zu benachbarte Zellen als ganze Partikel passieren können, was eine Infektion der umliegenden Zelle zur Folge haben würde. Im Grunde wäre lediglich eine Weitergabe viraler Bestandteile wie z.B. DNA von einer infizierten Zelle zu der benachbarten Zelle über eine Gap-junction-abhängige Kommunikation denkbar. Analog hierzu stellt die intrazelluläre Kommunikation über Gap-junctions eine wichtige Klasse der Kontakt-abhängigen Kommunikation dar und wurde kürzlich verantwortlich für die DNA-ausgelöste Kommunikation zwischen benachbarten Zellen gemacht (Patel et al., 2009). Der in der Publikation beschriebene Beweis für die von Gap-junctions verstärkte Immunantwort ausgelöst durch zytosolische DNA wäre auch im MCMV Modell denkbar, denn durchflusszytometrischen Analysen zeigten distinkte Zellpopulationen von IFN β Produzenten und infizierten Zellen innerhalb der pDC Population. Eine Ko-Kultivierung von pDCs mit infizierten Fibroblasten, die nach erfolgter Infektion mit dem MCMV Replikationsinhibitor Ganciclovir behandelt werden, kann Aufschluss über die Induktion der IFN β Expression in den pDCs geben. Dadurch, dass keine infektiösen Partikel entstehen, müssten in diesem Fall virale Partikel oder genomische Bestandteile für eine „trans“-IFN β Expression in angrenzenden pDCs verantwortlich gemacht werden. Dass diese „trans“-Aktivierung *per se* möglich ist, zeigen u.a. Studien mit weiteren Mitgliedern der Herpesfamilie. Basierend auf bisherigen Veröffentlichungen und der Gegebenheit, dass die Replikation von Herpesviren offenbar nach Initiierung einer Immunantwort erfolgt, beruht die Erkennung durch PRRs von DNA Viren hauptsächlich auf eingehendes genomisches Material (Paludan et al., 2011). Zudem wurde kürzlich gezeigt, dass virale

RNA von HCV über Zell-Zell Kontakt in pDCs transferiert wird, die auf diesen Stimulus hin IFN I produzieren, ohne direkt infiziert zu sein (Takahashi et al., 2010). Diese Beobachtungen ließen vermuten, dass pDCs einen Mechanismus entwickelt haben, virale Infektionen aufzuspüren unabhängig von einer intrinsischen Replikation. Von Lui *et al.* konnte 2009 erstmals gezeigt werden, dass humane pDCs Antigene von Influenza Viren von Zellen, die diesem Virus ausgesetzt waren, aufnehmen und kreuzpräsentieren können (Lui et al., 2009). Obwohl pDCs über eine geringe Fähigkeit der Aufnahme endogener löslicher oder zellulärer Antigene verfügen, zeigte diese Arbeitsgruppe, dass pDCs die Antigene nicht durch Antigenaufnahme apoptotischer oder nekrotischer Zellbestandteile entstammten, sondern dass pDCs speziell Zell-abgeleitetes Material von benachbarten mit Influenza infizierten Zellen aufnehmen. Ein ähnlicher Prozess könnte auch die *in vivo* beobachtete hohe IFN β Expression nach Infektion mit UV-inaktiviertem MCMV erklären, bei der pDCs virale Fragmente durch Rezeptor-vermittelte Endozytose aufnehmen, was zur IFN β Expression in pDCs führt. Jedoch konnten keine IFN β ⁺ cDCs detektiert werden, die in Infektionsbedingungen über eine verstärkte Antigenaufnahmekapazität verfügen und eine Erkennung pathogener Bestandteile durch zytoplasmatische Sensoren stattfindet. Durch die molekulare Ausstattung dieser Zellen ist trotz hoher Antigenaufnahmekapazität eine rasche IFN β Expression als Antwort auf pathogene Stimuli in cDCs nicht zu erwarten. Die hier beschriebenen Experimente mit UV-inaktivierten Viren bzw. DIPs und die Untersuchungen zum viralen Eintrittsweg in *in vitro* Experimenten geben nun erste Hinweise, dass IFN β produzierende Zellen durch Rezeptor-vermittelte Endozytose virale Bestandteile bzw. Partikel aufnehmen und auf diesem Stimulus folgend in den IFN β Aktivierungszustand gelangen. Möglicherweise sind diese Zellen ggf. in der Lage, diese aufgenommenen Antigene an CD8⁺ T-Zellen kreuzpräsentieren, da berichtet wurde, dass durch TLR aktivierte pDCs in der Lage sind, effizient Antigene an T-Zellen kreuz zu präsentieren. Es wird vermutet, dass die Antigen-präsentierenden Wege in pDCs an Proteasom-unabhängigen und endosomalen Wegen gekoppelt sind, die virale Antigene an CTLs kreuzpräsentieren (Di Pucchio et al., 2008; Mouries et al., 2008).

4.2.2 MCMV infiziert unreife DCs, die daraufhin ihren Phänotyp ändern

Im zeitlichen Verlauf der MCMV Infektion zeigte sich überraschenderweise, dass in der frühen Infektionsphase (4h p.i.) mehr pDCs mit MCMV infiziert waren als cDCs, wohingegen in der Infektionsphase zwischen 6-24h p.i. etwa zu gleichen Teilen cDCs (CD11c^{hi} CD8α⁺ mPDCA-1⁻) und nicht aktivierte pDCs (CD11c^{int} CD8α⁻ mPDCA-1⁺) mit MCMV infiziert waren. 48h-168h p.i. schließlich konnten mehr cDCs als pDCs als infizierte Zellen identifiziert werden. Die absolute Zahl der infizierten pDCs verringerte sich in diesem analysierten Zeitfenster kontinuierlich. Diese Beobachtung führte zu der Annahme, dass unterschiedliche Eintrittswege des Virus die distinkte Infektiosität erklärbar machen. Abhängig vom Virustyp und von der Struktur des aufzunehmenden Partikels, werden grundlegend zwei verschiedene Möglichkeiten des Eintritts in die Zelle unterschieden. Zum Einen binden vor allem nicht-behüllte Viren an spezifische Oberflächenrezeptoren der Plasmamembran, zum Anderen dringen Viren, bevorzugt komplexere Viren wie Herpesviren, die von einer Hüllmembran umgeben sind, in die Zelle durch klassische Endozytose ein (Akhtar and Shukla, 2009). Während die Fusion einen pH-unabhängigen Prozess darstellt und in einer produktiven Replikation endet, ist die Endozytose gebunden an einen niedrigen pH-Wert der Endosomen. Beide Strategien dienen der Vermeidung von lysosomaler Degradation innerhalb der klassischen Endozytose, die die virale Replikation und somit die Verbreitung der Viren begrenzen. HCMV sowie MCMV gelangen in permissive Zellen wie Fibroblasten durch eine pH-unabhängige Fusion zwischen dem viralen Hüllproteinen und der zellulären Plasmamembran (Compton et al., 1992).

Die Untersuchungen unter Verwendung eines basischen Inhibitors der endosomalen Ansäuerung widerlegten diese Hypothese und wiesen in beiden DC Typen auf eine Rezeptor-vermittelte Endozytose hin, sodass ein anderer Mechanismus für diesen unterschiedlichen zellulären Infektionsstatus in Betracht gezogen werden muss. Möglicherweise erfolgt die frühe MCMV Infektion in DCs, die unterschiedliche Reifezustände aufweisen. 2002 wurden CD11c⁺ B220⁺ pDCs als unreife APC beschrieben, die nach Stimulation mit CpG eine Änderung des Phänotyps erfahren. Ihre Fähigkeit zur Migration war erhöht und machte sie zu potenten T-Zell Stimulatoren (Brawand et al., 2002). Eine vor kurzem veröffentlichte Publikation unterstützte diesen Befund und beschrieb CD11c⁺ B220⁺ CCR9⁻ mPDCA-1⁺ Zellen aus der Milz als eine DC Population, die mehr cDC Vorläu-

fer sind als „*bona fide*“ pDCs (Segura et al., 2009). Diese Population entsprach den *in vitro* infizierten DCs sowohl in Sort- als auch Konfokal-Experimenten, da reife pDCs sehr schlecht mit MCMV infizierbar sind (Dalod, M., mündliche Mitteilung, eigene Beobachtung). Etwa zeitgleich wurden neue Subpopulationen von pDCs definiert, die sich anhand ihrer CCR9 Expression voneinander unterscheiden (Hadeiba et al., 2008). Unter dem Einfluss löslicher Faktoren verfügen aus dem Knochenmark generierte CCR9⁻ pDCs über die Plastizität, sowohl Phänotyp als auch Funktion von CD11b⁺ CD8α⁻ cDC-ähnlichen Zellen anzunehmen (Schlitzer et al., 2011). Die finale Differenzierung von pDCs ist somit nicht auf das Knochenmark beschränkt, sondern findet in peripheren Geweben statt. Dabei entscheidet die lokale Mikroumgebung über die Entwicklung von CCR9⁻ pDC-ähnlichen Vorläufern (Schlitzer et al., 2012). Solange sie im Knochenmark verbleiben exprimieren beide pDC Population den MHC II Ko-Rezeptor CD9. Sobald sie das Knochenmark verlassen und die lymphoiden Organe infiltrieren, verlieren diese pDCs den Rezeptor auf ihrer Oberfläche (Björck et al., 2011). Die von MCMV infizierten DC Populationen zeigten u.a. den cDC (CD11c⁺ CD8α⁺ B220⁻ mPDCA-1⁻ CD9⁺ CCR9⁻ CD11b^{-/+}) Phänotyp. Infizierte pDCs dagegen charakterisierten sich einerseits durch einen CD11c⁻ CD8α⁻ B220⁺ mPDCA-1⁺ CD9^{-/+} CCR9⁺ CD11b⁻ Phänotyp, der den von Björck *et al.* beschriebenen „reifen“ pDC Phänotyp entspricht. Diese CD9⁻ pDCs produzieren sehr geringe Mengen an IFNα, dafür konnten sie aber eine FoxP3⁺ CD4⁺ T-Zell Antwort induzieren und gelten demnach als toleranzbildend (Björck et al., 2011). Obwohl unter *in vitro* Bedingungen infizierte pDCs IFNβ sezernieren, konnten durchflusszytometrisch *in vivo* keine MCMV infizierten IFNβ⁺ pDCs erfasst werden. Da IFNβ antivirale Eigenschaften besitzt, konnte vermutlich wegen Unterschreitung des Detektionslevels intrazellulären MCMV GFP Fluoreszenzsignals keine simultane Expression von IFNβ/YFP und MCMV GFP ermittelt werden. Andererseits waren auch MCMV infizierte pDCs detektiert worden, die einen CD11c^{int/+} CD8α⁻ B220⁺ mPDCA-1⁺ CD9^{-/int} CCR9⁻ CD11b⁺ Phänotyp aufwiesen korrespondierend zu den von Björck *et al.* beschriebenen „unreifen“, pro-inflammatorischen pDCs, die eine CTL Antwort induzieren können. In diesem Artikel wiesen diese Zellen u.a. einen zusätzlichen Phänotyp von CCR9⁻ E2-2⁺ IRF7⁺, aber SiglecH⁻ und mPDCA-1⁻ auf und entsprechen den von Schlitzer *et al.* beschriebenen CCR9⁻ pDCs, die ebenfalls eine starke IFNα Antwort induzieren. Wie bereits erwähnt konvertieren diese Zellen in einem bestimmten Zytokinumfeld in CD11b⁺ cDC-ähnliche DCs (Schlitzer et al., 2011). Eine erhöh-

te Frequenz von mit MCMV infizierter cDCs zu einem späten Zeitpunkt der Infektion spricht für diesen phänotypischen Wechsel von unreifen, CCR9⁻ infizierten pDCs hin zu CD11b⁺ cDC-ähnlichen cDCs, die auf dem Weg ihrer Differenzierung den MHC II Ko-Rezeptor CD9 hochregulieren und die pDC-typischen Marker in ihrer Expression herunterregulieren.

Neben der phänotypischen Charakterisierung erlaubt eine Begutachtung auf molekularer Basis eine Diskriminierung zwischen pDCs und cDCs. pDCs sind den Lymphozyten sehr ähnlich, da sie neben dem spezifischen B-Lymphozytenmarker B220/CD45R auch RAG-1/2 (*recombination activating gene -1/2*) exprimieren. Bis zu 30% der pDCs sind RAG-1⁺, dessen Anwesenheit mit dem Ereignis der D-J Rekombination des IgH Lokus korreliert (Welner et al., 2009). Die Möglichkeit der Rekombination des IgH Lokus unterscheidet sie von den cDCs und stellt demzufolge ein wichtiges Entscheidungsmerkmal zwischen beiden DC-Populationen dar. Der Nachweis einer erfolgten D_H-J_H Rekombination in cDCs ist damit ein Hinweis darauf, dass diese Zellen von ehemals infizierten pDCs abstammen. Diese für den Wirt vorteilhafte Flexibilität der infizierten pDCs ergänzt die Möglichkeit, die antivirale Immunantwort gegenüber einer MCMV Infektion zu modulieren. Während pDCs in ihrer Antigen-präsentierenden Fähigkeit limitiert sind, ermöglicht eine Änderung zu CD11b⁺ cDCs eine erhöhte Beteiligung der Expansion MCMV spezifischer T-Zellen.

Dass CMV sowohl reife als auch unreife DCs zu infizieren vermag, ist schon seit längerem bekannt. Hierbei vollzieht sich in unreifen DCs ein vollständiger Replikationszyklus, der mit der Freisetzung viraler Nachkommen endet, im Gegensatz zu reifen DCs, die keine Virionen freisetzen (Mathys et al., 2003). Andere Studien dagegen berichteten, dass MCMV auch in reifen DC repliziert, jedoch in einem reduzierten und zeitlich verzögerten Umfang (Andrews et al., 2001). Durch die Infektion von unreifen DCs steigert MCMV die Chance, produktiv zu replizieren. Ob in diesem Infektionsmodell in cDCs tatsächlich eine produktive Infektion stattfindet, kann aufgrund des gewählten MCMV Reportersystems nicht festgestellt werden, da die unter dem humanen MIEP exprimierte Reporterfluoreszenz keine Auskunft über die Expression späterer Gene von MCMV gibt, die für die Assemblierung der Virionen eine entscheidende Rolle spielen. Offensichtlich infiziert MCMV vornehmlich unreife DCs. Wie die meisten Viren wie HIV, Masernvirus oder HCMV, die DCs infizieren, hat MCMV möglicherweise Mechanismen entwickelt, die es den Viren

erlauben, deren Funktion z.B. durch Inhibition ihrer Reifung und ihrer Fähigkeit zur Zytokinproduktion zu beeinträchtigen. Das beinhaltet auch MCMV bedingtes selektives Herunterregulieren einiger Oberflächenmarker, wie z.B. von CD11b innerhalb der infizierten cDC Population oder auch die Hochregulation von CD9 zur Induktion einer verbesserten T-Zell Antwort nach Differenzierung in cDC-ähnlichen DCs.

Die Balance zwischen produktiver Infektion in unreifen DCs und deren phänotypischen Konversion in Richtung der die adaptive Immunantwort aktivierenden cDCs, aber auch ein ausgewogenes Verhältnis der IFN β Produktion sind entscheidend für Wirt und Virus zur Aufrechterhaltung dieses Systems.

4.3 Vorgeschlagenes MCMV Infektionsmodell

Aus den Daten dieser Arbeit und unter Einbeziehung der aktuellen Fachliteratur lässt sich folgendes Infektionsmodell vorschlagen:

Im Organismus kommen Dendritische Zellen in zwei unterschiedlichen funktionalen Zuständen vor: als unreife und reife DCs (Banchereau et al., 2000). Während reife DCs in den peripheren Geweben residieren, patrouillieren unreife DCs unaufhörlich durch den Körper und nehmen kontinuierlich Antigene auf. In der Milz von C57BL/6 Mäusen nehmen in der frühen Phase der Infektion vor allem diese unreifen pDC-ähnlichen DCs in einem Endozytose-abhängigen Mechanismus MCMV oder defekte Viruspartikel (DIPs) auf. Je nach Menge und Aktivität der aufgenommenen Viren oder DIPs spaltet sich die DC Population in zwei Fraktionen auf:

In einem Szenario nehmen diese unreifen, plastischen pDC-ähnlichen DCs durch Rezeptor-vermittelte Endozytose virale, unreife bzw. defekte Partikel auf, die zum Erkennen dieser pathogenen Bestandteile antiviralen Mechanismen in Gang setzen und als Konsequenz IFN β produzieren. Zusätzlich ist eine latente Infektion durch Rezeptor-vermittelte Endozytose von aktiven Viren möglich, die durch die konstitutive IRF7 Expression zu einer raschen IFN β Antwort führt und unter Aktivierung des autokrinen IFN I Rückkopplungsmechanismus eine produktive Replikation in diesen Zellen verhindert. Diese IFN β produzierenden pDC-ähnlichen DCs differenzieren durch Hochregulation von CCR9 zu reifen, aktivierten pDCs und migrieren in Richtung der T- und B-Zell Zone der weißen Pulpa der Milz. Die IFN β produzierenden pDCs verbleiben in der Milz, warnen in einer

parakrinen Weise umliegende Zellen vor einer Virusinfektion bzw. sind an der Aktivierung der NK Zell-vermittelten antiviralen Antwort beteiligt, die zur Lyse infizierter Zellen führt (Abb. 4-1, rechts).

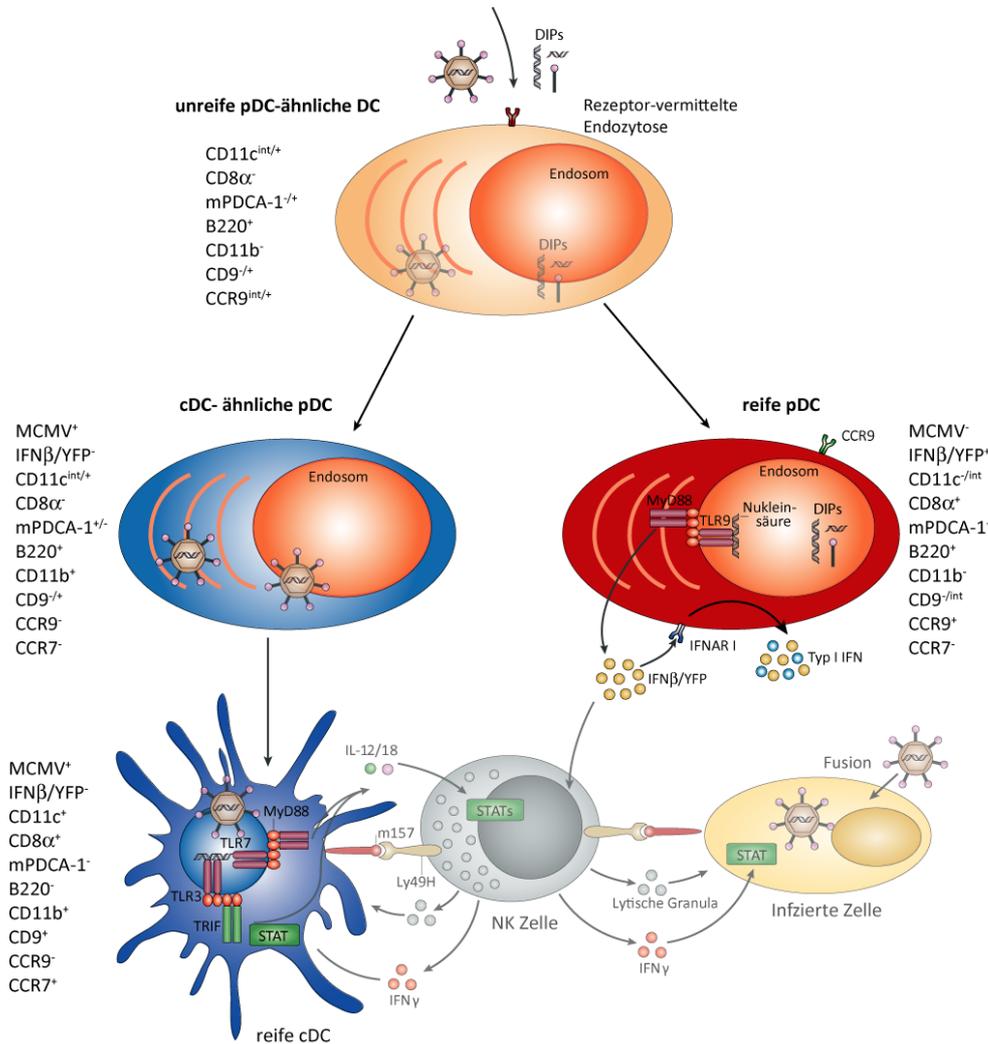


Abb. 4-1: Modell für eine effiziente IFNβ Aktivierung der antiviralen Immunantwort.

Eine andere Fraktion unreifer, plastischer DCs nimmt ebenfalls durch Rezeptor-vermittelte Endozytose „aktive“ Viren auf, die im Sinne der viralen Genexpression zur Replikation fähig sind. Diese DCs exprimieren in diesem Zwischenstadium sowohl für pDCs als auch cDCs typische Marker. Als Konsequenz der viralen Internalisierung sezernieren diese pDC-ähnlichen DCs kein IFNβ. Diese Hauptfraktion infizierter DCs stellen unreife CCR9⁻ CD9⁻ pDCs dar, die als Antwort auf die Infektion ein genetisches Programm aktivieren, das in ihnen die Konversion zu einem infizierten cDC-ähnlichen Phänotyp auslöst (Abb. 4-1, links). Diese phänotypische Redifferenzierung kann in weiterführenden

den Experimenten nachgewiesen werden durch Rekombinationsereignisse im IgH Locus in diesen Zellen. Als Folge der Infektion wird die Expression des MHC II Ko-Rezeptor CD9 hochreguliert und sie erlangen den Phänotyp und die Funktion der reifen cDCs. Ggf. durch weitere phänotypische Modulationen wird die Induktion der CTL Antwort ermöglicht.

Als fein abgestimmte Balance gelingt es MCMV auf diese Weise, die eigene Replikation durch gezielte Infektion unreifer DCs zu begünstigen, und auf der anderen Seite durch Infektion der immunmodulatorisch wichtigen Zelltypen diese zu kontrollieren und eine produktive Infektion ohne Schädigung des infizierten Organs zu ermöglichen. Durch die Sekretion von IFN β sind andere NK Zellen in der Lage, durch ihre zytotoxische Eigenschaft die virale Replikation zu minimieren und die Ausbreitung des Virus im infizierten Organ zu beeinflussen.

4.4 Ausblick

Immunevasive Mechanismen von MCMV, die zu einer Reduktion der Frequenz IFN β produzierender pDCs führt und die Kapazität des Virus, in infizierten DCs einen phänotypischen Wechsel zu induzieren, erschweren *in vivo* Analysen zur eindeutigen Identifizierung zum einen der Herkunft infizierter DCs aber auch der exakteren Bestimmung des Stimulus der IFN β Expression in pDCs. Dazu ist es zunächst unabdingbar, IFN β /YFP⁺ pDCs nach *in vivo* MCMV Infektion zu sortieren und deren DNA hinsichtlich auf Gehalt MCMV Genome zu überprüfen. Entsprechende molekularbiologische Verfahren zur Bestimmung viraler Genome auf zellulärer Ebene sind diesbezüglich bereits etabliert. Die vorgestellten Transwell- bzw. Ko-Kulturrexperimente mit infizierten cDCs gaben erste Hinweise darauf, dass diese infizierten Zellen in beiden Systemen keinen Einfluss auf die IFN β Induktion in pDCs haben. Der bevorzugte Tropismus von MCMV, in retikulären Fibroblasten der Milz zu replizieren, lassen diese als adäquate Signaldonatoren erscheinen. Die Infektion dieser Zellen in Transwell- und Ko-Kulturrexperimenten mit pDCs geben erste Hinweise darauf, ob pDCs während ihrer Migration durch die Milz durch Kontakt mit Fibroblasten infiziert oder zur IFN β Induktion veranlasst werden. Ein weiterer essentieller Versuch ist die Sortierung infizierter DCs zu verschiedenen Zeitpunkten der Infektion MCMV, um den Differenzierungszustand infizierter pDCs und cDCs durch die Be-

stimmung der Rekombination des IgH Locus zu erfassen. Zusätzlich können diese infizierten DCs auch in sogenannten „*Infectious Center Assays*“ eingesetzt werden, um die Zahl produktiv infizierter Zellen zu bestimmen. Diese Experimente können zusätzlich Anhaltspunkte auf die Art des IFN β Stimulus geben. Um Einschränkungen in der Zellzahl IFN β produzierender pDCs *in vivo* zu umgehen, sollen ferner pDCs von naiven Reporter-mäusen gemäß ihrer Oberflächenmarker sortiert und nachfolgend mit aktivem bzw. UV-inaktiviertem MCMV infiziert werden. Diese Experimente geben vorerst Aufschluss über die phänotypische Charakterisierung IFN β exprimierender DCs in *ex vivo* Experimenten. Nachfolgend sind weitere Analysen zur Induktion der IFN β Antwort in verschiedenen DC Populationen von Bedeutung, in denen nach zusätzlichen Sortierexperimenten Infektionen mit MCMV unter der Verwendung verschiedener endosomalen Inhibitoren durchgeführt werden, die eine exaktere Charakterisierung des IFN β Stimulus und des viralen Eintrittsweges ggf. auch in unterschiedlichen Reifestadien der sortierten DCs aufweisen. Im Anschluss dazu geben bei ausreichender Zellzahl IFN β exprimierender pDCs T-Zell Proliferationsassays Auskunft über eine MCMV spezifische Kapazität einer CD8 $^+$ T-Zell induzierten Immunantwort. Diese Frage ist von bedeutender Relevanz, da eine Kreuzpräsentation von MCMV Antigenen z. Zt. kontrovers diskutiert wird. Die Generation einer geeigneten MCMV Mutante ermöglicht außerdem eine eindeutige Bestimmung zur Position IFN β exprimierender pDCs und infizierter Zelltypen nach MCMV Infektion *in vivo* und erweitert die *ex vivo* generierten T-Zellstimulationsexperimente. Die Verwendung von sortierten DCs aus IFN β ^{mob/mob} x TLR9 $^{-/-}$ bzw. x TLR7 $^{-/-}$ oder x TLR3 $^{-/-}$ und die nachfolgende MCMV Infektion ergänzen ferner die Befunde zum Regulations- und Induktionsweg von IFN β nach MCMV Infektion (Krug et al., 2004a; Zucchini et al., 2008b).

Mit Hilfe der IFN β Reportermaus im Infektionsmodell mit MCMV kann in weiterführenden experimentalen Ansätzen eine funktionale Charakterisierung vorgenommen werden, die sowohl die Konditionen der IFN β Antwort als auch die Auswirkungen der MCMV Infektion von DCs determinieren.

5 Zusammenfassung

Die Kontrolle viraler Infektionen erfordert das effektive Zusammenwirken von Zellen sowohl des angeborenen als auch des adaptiven Immunsystems. Der IFN α/β Signalweg als Schlüsselkomponente des angeborenen Immunsystems spielt bei der Bekämpfung von MCMV eine entscheidende Rolle. Bisher bekannte Daten über die zelluläre IFN I Induktion zu verschiedenen Zeitpunkten ergaben nur bruchstückhafte Mosaik im Infektionsverlauf von MCMV. Mit der Zielsetzung, das Gesamtbild der IFN β Antwort in der MCMV Infektion darzustellen, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein bicistronisches IFN β /YFP Reportermausmodell genutzt, das die exakte Identifizierung der IFN β produzierender Zellen auf zellulärer Ebene durch die Koexpression von YFP ermöglicht. Im gesamten Verlauf der MCMV Infektion konnte eine niederfrequente Fraktion an pDCs als alleinige IFN β produzierende Zellpopulation durchflusszytometrisch identifiziert werden, deren IFN β Produktion dabei unabhängig vom Typ I IFN Rezeptor-vermittelten Rückkopplungsmechanismus war. Die Lokalisation an der Grenze der T- und B-Zell Zone der weißen Pulpa in der Milz positioniert diese Zellen als Verbindung zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort. *In vitro* Studien unter Verwendung eines Inhibitors der endosomalen Ansäuerung zur Aufklärung des Initiationsmechanismus der IFN β Produktion in pDCs ergaben Hinweise darauf, dass Rezeptor-vermittelte Endozytose als Aufnahmemechanismus viraler Partikel für die IFN β Produktion in pDCs verantwortlich ist. Dieser Aufnahmeweg ermöglicht die rasche Erkennung viraler Bestandteile, die zur Induktion der IFN β Produktion in diesen Zellen führt. Die Erkennung von MCMV in pDCs und somit die Induktion der IFN β Expression findet unabhängig von viraler Replikation statt, was mit der Beobachtung, dass viral infizierte Zellen nie gleichzeitig als IFN β Produzenten identifiziert wurden, gut vereinbar ist. Neben der Identifizierung IFN β exprimierender pDCs konnten mit Hilfe eines viralen Reportersystems sowohl pDCs als auch cDCs als MCMV infizierte Zellpopulationen mit unterschiedlichen Zeitverläufen bestimmt werden. Aus diesen Ergebnissen ist ein Modell ableitbar, nach dem der Reifezustand der betroffenen DC ausschlaggebend dafür ist, ob eine mit MCMV in Kontakt getretene unreife pDC den aktivierten Zustand einer IFN β produzierenden pDC erreicht und es in dieser Zelle zu keiner viralen Replikation kommt oder das aktive Virus der endogenen IFN β Antwort in dieser Zelle entkommt. Im letzteren Fall durchlaufen diese infizierten, unreife

fen DCs eine phänotypische Konversion, die nachfolgend mutmaßlich die Induktion einer verbesserten MCMV spezifischen T-Zell Antwort ermöglicht.

Summary

The control of viral infections requires the effective coordination of the native as well as the adaptive immune system. The IFN α/β signaling pathway as a key component of the native immune system plays the major role in the control of invading pathogens like MCMV. To date only incomplete evidences about the cellular induction of IFN β during infection are published. With the aim to illustrate the overall picture of the IFN β response after MCMV infection, a bicistronic IFN β /YFP mRNA reporter mouse model was used allowing for the exact identification of IFN β producing cells on a cellular level via the co-expression of YFP. During 4h – 7d p.i., pDCs are identified as the exclusive IFN β producing cell type with low frequencies after MCMV infection *in vivo*. In this process, the IFN β expression in pDCs is independent of the type I IFN feedback loop. The localization of IFN β producing pDCs at the T- and B-cell border of the white pulp in the spleen positions these cells at the interface between the native and adaptive immune response. *In vitro* studies using an endosomal acidification inhibitor further revealed that the IFN β induction in pDCs depends on the uptake of virus or viral particles via endocytosis. The pathway of viral uptake facilitates a rapid recognition of viral particles and leads to the induction of IFN β production in these cells. The recognition of MCMV in pDCs and therefore the induction of IFN β expression takes place in a replication independent manner which is in agreement with the observation that virus infected cells are at no time coincidental IFN β producers. Besides the identification of IFN β producing cells, the usage of a GFP expressing viral reporter system revealed pDCs as well as cDCs as MCMV infected cell populations with different kinetics. Based on these results a model is proposed in which the maturation status of the affected DC is decisive if a immature pDCs after contact with MCMV acquires an activated state of an IFN β producing pDC followed by a suppression of viral replication or the active virus escape from the host IFN β response. In the last case, these immature DCs undergo a phenotypical conversion assuming that this cell type is involved in an enhanced T-cell specific response against MCMV.

6 Literatur

- Adams, EJ, Juo, ZS, Venook, RT, Boulanger, MJ, Arase, H, Lanier, LL, and Garcia, KC (2007): Structural elucidation of the m157 mouse cytomegalovirus ligand for Ly49 natural killer cell receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 10128-33.
- Akhtar, J, and Shukla, D (2009): Viral entry mechanisms: cellular and viral mediators of herpes simplex virus entry. *FEBS J* **276**, 7228-36.
- Akira, S, Uematsu, S, and Takeuchi, O (2006): Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**, 783-801.
- Alexopoulou, L, Holt, AC, Medzhitov, R, and Flavell, RA (2001): Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* **413**, 732-8.
- Andoniou, CE, van Dommelen, SL, Voigt, V, Andrews, DM, Brizard, G, Asselin-Paturel, C, Delale, T, Stacey, KJ, Trinchieri, G, and Degli-Esposti, MA (2005): Interaction between conventional dendritic cells and natural killer cells is integral to the activation of effective antiviral immunity. *Nat Immunol* **6**, 1011-9.
- Andrews, DM, Andoniou, CE, Granucci, F, Ricciardi-Castagnoli, P, and Degli-Esposti, MA (2001): Infection of dendritic cells by murine cytomegalovirus induces functional paralysis. *Nat Immunol* **2**, 1077-84.
- Andrews, DM, Andoniou, CE, Scalzo, AA, van Dommelen, SL, Wallace, ME, Smyth, MJ, and Degli-Esposti, MA (2005): Cross-talk between dendritic cells and natural killer cells in viral infection. *Mol Immunol* **42**, 547-55.
- Arase, H, Mocarski, ES, Campbell, AE, Hill, AB, and Lanier, LL (2002): Direct recognition of cytomegalovirus by activating and inhibitory NK cell receptors. *Science* **296**, 1323-6.
- Asselin-Paturel, C, Boonstra, A, Dalod, M, Durand, I, Yessaad, N, Dezutter-Dambuyant, C, Vicari, A, O'Garra, A, Biron, C, Briere, F, and Trinchieri, G (2001): Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. *Nat Immunol* **2**, 1144-50.
- Asselin-Paturel, C, Brizard, G, Chemin, K, Boonstra, A, O'Garra, A, Vicari, A, and Trinchieri, G (2005): Type I interferon dependence of plasmacytoid dendritic cell activation and migration. *J Exp Med* **201**, 1157-67.
- Banchereau, J, Briere, F, Caux, C, Davoust, J, Lebecque, S, Liu, YJ, Pulendran, B, and Palucka, K (2000): Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* **18**, 767-811.
- Banks, TA, Rickert, S, Benedict, CA, Ma, L, Ko, M, Meier, J, Ha, W, Schneider, K, Granger, SW, Turovskaya, O, Elewaut, D, Otero, D, French, AR, Henry, SC, Hamilton, JD, Scheu, S, Pfeffer, K, and Ware, CF (2005): A lymphotoxin-IFN-beta axis essential for lymphocyte survival revealed during cytomegalovirus infection. *J Immunol* **174**, 7217-25.
- Baranek, T, Zucchini, N, and Dalod, M (2009): Plasmacytoid dendritic cells and the control of herpesvirus infections. *Viruses* **1**, 383-419.
- Barchet, W, Cella, M, Odermatt, B, Asselin-Paturel, C, Colonna, M, and Kalinke, U (2002): Virus-induced interferon alpha production by a dendritic cell subset in the absence of feedback signaling in vivo. *J Exp Med* **195**, 507-16.
- Benedict, CA, De Trez, C, Schneider, K, Ha, S, Patterson, G, and Ware, CF (2006): Specific remodeling of splenic architecture by cytomegalovirus. *PLoS Pathog* **2**, e16.

- Beutler, BA (2009): TLRs and innate immunity. *Blood* **113**, 1399-407.
- Biology, CPiC (2006): *Current Protocols in Cell Biology*.
- Bjorck, P, Leong, HX, and Engleman, EG (2011): Plasmacytoid dendritic cell dichotomy: identification of IFN-alpha producing cells as a phenotypically and functionally distinct subset. *J Immunol* **186**, 1477-85.
- Blasius, AL, Barchet, W, Cella, M, and Colonna, M (2007): Development and function of murine B220+CD11c+NK1.1+ cells identify them as a subset of NK cells. *J Exp Med* **204**, 2561-8.
- Blasius, AL, and Beutler, B (2010): Intracellular toll-like receptors. *Immunity* **32**, 305-15.
- Blasius, AL, Giurisato, E, Cella, M, Schreiber, RD, Shaw, AS, and Colonna, M (2006): Bone marrow stromal cell antigen 2 is a specific marker of type I IFN-producing cells in the naive mouse, but a promiscuous cell surface antigen following IFN stimulation. *J Immunol* **177**, 3260-5.
- Bosse, JB, Bauerfeind, R, Popilka, L, Marcinowski, L, Taeglich, M, Jung, C, Striebinger, H, von Einem, J, Gaul, U, Walther, P, Koszinowski, UH, and Ruzsics, Z (2012): A beta-herpesvirus with fluorescent capsids to study transport in living cells. *PLoS One* **7**, e40585.
- Brawand, P, Fitzpatrick, DR, Greenfield, BW, Brasel, K, Maliszewski, CR, and De Smedt, T (2002): Murine plasmacytoid pre-dendritic cells generated from Flt3 ligand-supplemented bone marrow cultures are immature APCs. *J Immunol* **169**, 6711-9.
- Bubic, I, Wagner, M, Krmpotic, A, Saulig, T, Kim, S, Yokoyama, WM, Jonjic, S, and Koszinowski, UH (2004): Gain of virulence caused by loss of a gene in murine cytomegalovirus. *J Virol* **78**, 7536-44.
- Cheng, TP, French, AR, Plougastel, BF, Pingel, JT, Orihuela, MM, Buller, ML, and Yokoyama, WM (2008): Ly49h is necessary for genetic resistance to murine cytomegalovirus. *Immunogenetics* **60**, 565-73.
- Chiu, YH, Macmillan, JB, and Chen, ZJ (2009): RNA polymerase III detects cytosolic DNA and induces type I interferons through the RIG-I pathway. *Cell* **138**, 576-91.
- Colonna, M, Trinchieri, G, and Liu, YJ (2004): Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol* **5**, 1219-26.
- Compton, T (2004): Receptors and immune sensors: the complex entry path of human cytomegalovirus. *Trends Cell Biol* **14**, 5-8.
- Compton, T, Nepomuceno, RR, and Nowlin, DM (1992): Human Cytomegalovirus Penetrates Host Cells By pH-Independent Fusion at the Cell Surface. *Virology* **191**, 387-395.
- Compton, T, Nowlin, DM, and Cooper, NR (1993): Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate. *Virology* **193**, 834-41.
- D'Amico, A, and Wu, L (2003): The early progenitors of mouse dendritic cells and plasmacytoid predendritic cells are within the bone marrow hemopoietic precursors expressing Flt3. *J Exp Med* **198**, 293-303.
- Dalod, M, Hamilton, T, Salomon, R, Salazar-Mather, TP, Henry, SC, Hamilton, JD, and Biron, CA (2003): Dendritic cell responses to early murine cytomegalovirus infection: subset functional specialization and differential regulation by interferon alpha/beta. *J Exp Med* **197**, 885-98.
- Dalod, M, Salazar-Mather, TP, Malmgaard, L, Lewis, C, Asselin-Paturel, C, Briere, F, Trinchieri, G, and Biron, CA (2002): Interferon alpha/beta and interleukin 12 responses to viral infections: pathways regulating dendritic cell cytokine expression in vivo. *J Exp Med* **195**, 517-28.

- Decker, T, Muller, M, and Stockinger, S (2005): The yin and yang of type I interferon activity in bacterial infection. *Nat Rev Immunol* **5**, 675-87.
- Delale, T, Paquin, A, Asselin-Paturel, C, Dalod, M, Brizard, G, Bates, EE, Kastner, P, Chan, S, Akira, S, Vicari, A, Biron, CA, Trinchieri, G, and Briere, F (2005): MyD88-dependent and -independent murine cytomegalovirus sensing for IFN-alpha release and initiation of immune responses in vivo. *J Immunol* **175**, 6723-32.
- Di Pucchio, T, Chatterjee, B, Smed-Sorensen, A, Clayton, S, Palazzo, A, Montes, M, Xue, Y, Mellman, I, Banchereau, J, and Connolly, JE (2008): Direct proteasome-independent cross-presentation of viral antigen by plasmacytoid dendritic cells on major histocompatibility complex class I. *Nat Immunol* **9**, 551-7.
- Diebold, SS, Kaisho, T, Hemmi, H, Akira, S, and Reis e Sousa, C (2004): Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* **303**, 1529-31.
- Diebold, SS, Montoya, M, Unger, H, Alexopoulou, L, Roy, P, Haswell, LE, Al-Shamkhani, A, Flavell, R, Borrow, P, and Reis e Sousa, C (2003): Viral infection switches non-plasmacytoid dendritic cells into high interferon producers. *Nature* **424**, 324-8.
- Dighe, A, Rodriguez, M, Sabastian, P, Xie, X, McVoy, M, and Brown, MG (2005): Requisite H2k role in NK cell-mediated resistance in acute murine cytomegalovirus-infected MA/My mice. *J Immunol* **175**, 6820-8.
- Dresing, P (2010): In vitro und in vivo Charakterisierung von IFN beta exprimierenden Zellen mittels eines bicistronischen Fluoreszenz-Reporter-Mausmodells: *Dissertation*.
- Dresing, P, Borkens, S, Kocur, M, Kropp, S, and Scheu, S (2010): A fluorescence reporter model defines "Tip-DCs" as the cellular source of interferon beta in murine listeriosis. *PLoS One* **5**, e15567.
- Feire, AL, Koss, H, and Compton, T (2004): Cellular integrins function as entry receptors for human cytomegalovirus via a highly conserved disintegrin-like domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 15470-5.
- Franchi, L, Eigenbrod, T, Munoz-Planillo, R, and Nunez, G (2009): The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis. *Nat Immunol* **10**, 241-7.
- Garcia-Sastre, A (2002): Mechanisms of inhibition of the host interferon alpha/beta-mediated antiviral responses by viruses. *Microbes Infect* **4**, 647-55.
- Garcia-Sastre, A, and Biron, CA (2006): Type 1 interferons and the virus-host relationship: a lesson in detente. *Science* **312**, 879-82.
- Geissmann, F, Manz, MG, Jung, S, Sieweke, MH, Merad, M, and Ley, K (2010): Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* **327**, 656-61.
- Gilliet, M, Boonstra, A, Paturel, C, Antonenko, S, Xu, XL, Trinchieri, G, O`Garra, A, and Liu, YJ (2002): The Development of Murine Plasmacytoid Dendritic Cell Precursors Is Differentially Regulated by FLT3-ligand and Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor. *J Exp Med* **195**, 953-958.
- Gonzalez-Navajas, JM, Lee, J, David, M, and Raz, E (2012): Immunomodulatory functions of type I interferons. *Nat Rev Immunol* **12**, 125-35.
- Hadeiba, H, Sato, T, Habtezion, A, Oderup, C, Pan, J, and Butcher, EC (2008): CCR9 expression defines tolerogenic plasmacytoid dendritic cells able to suppress acute graft-versus-host disease. *Nat Immunol* **9**, 1253-60.

- Halary, F, Amara, A, Lortat-Jacob, H, Messerle, M, Delaunay, T, Houles, C, Fieschi, F, Arenzana-Seisdedos, F, Moreau, JF, and Dechanet-Merville, J (2002): Human cytomegalovirus binding to DC-SIGN is required for dendritic cell infection and target cell trans-infection. *Immunity* **17**, 653-64.
- Haspot, F, Lavault, A, Sinzger, C, Laib Sampaio, K, Stierhof, YD, Pilet, P, Bressolette-Bodin, C, and Halary, F (2012): Human cytomegalovirus entry into dendritic cells occurs via a macropinocytosis-like pathway in a pH-independent and cholesterol-dependent manner. *PLoS One* **7**, e34795.
- Heldwein, EE, and Krummenacher, C (2008): Entry of herpesviruses into mammalian cells. *Cell Mol Life Sci* **65**, 1653-1668.
- Hemmi, H, Takeuchi, O, Kawai, T, Kaisho, T, Sato, S, Sanjo, H, Matsumoto, M, Hoshino, K, Wagner, H, Takeda, K, and Akira, S (2000): A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* **408**, 740-5.
- Henry, SC, Schmader, K, Brown, TT, Miller, SE, Howell, DN, Daley, GG, and Hamilton, JD (2000): Enhanced green fluorescent protein as a marker for localizing murine cytomegalovirus in acute and latent infection. *J Virol* **89**, 61-73.
- Honda, K, and Taniguchi, T (2006): IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nat Rev Immunol* **6**, 644-58.
- Honda, K, Yanai, H, Negishi, H, Asagiri, M, Sato, M, Mizutani, T, Shimada, N, Ohba, Y, Takaoka, A, Yoshida, N, and Taniguchi, T (2005a): IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature* **434**, 772-7.
- Honda, K, Yanai, H, Takaoka, A, and Taniguchi, T (2005b): Regulation of the type I IFN induction: a current view. *Int Immunol* **17**, 1367-78.
- Honess, RW, and Roizman, B (1974): Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. I. Cascade regulation of the synthesis of three groups of viral proteins. *J Virol* **14**, 8-19.
- Hsu, KM, Pratt, JR, Akers, WJ, Achilefu, SI, and Yokoyama, WM (2009): Murine cytomegalovirus displays selective infection of cells within hours after systemic administration. *J Gen Virol* **90**, 33-43.
- Hudson, JB (1979): The murine cytomegalovirus as a model for the study of viral pathogenesis and persistent infections. *Arch Virol* **62**, 1-29.
- Karsunky, H, Merad, M, Cozzio, A, Weissman, IL, and Manz, MG (2003): Flt3 ligand regulates dendritic cell development from Flt3+ lymphoid and myeloid-committed progenitors to Flt3+ dendritic cells in vivo. *J Exp Med* **198**, 305-13.
- Kato, H, Sato, S, Yoneyama, M, Yamamoto, M, Uematsu, S, Matsui, K, Tsujimura, T, Takeda, K, Fujita, T, Takeuchi, O, and Akira, S (2005): Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity* **23**, 19-28.
- Kawai, T, and Akira, S (2010): The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* **11**, 373-84.
- Kawai, T, and Akira, S (2011): Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity* **34**, 637-50.
- Kelsey, DK, Olsen, GA, Overall, JC, Jr., and Glasgow, LA (1977): Alteration of host defense mechanisms by murine cytomegalovirus infection. *Infect Immun* **18**, 754-60.
- Kerkmann, M, Rothenfusser, S, Hornung, V, Towarowski, A, Wagner, M, Sarris, A, Giese, T, Endres, S, and Hartmann, G (2003): Activation with CpG-A and CpG-B oligonucleotides reveals two distinct

- regulatory pathways of type I IFN synthesis in human plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* **170**, 4465-74.
- Kim, KJ, Kanellopoulos-Langevin, C, Merwin, RM, Sachs, DH, and Asofsky, R (1979): Establishment and characterization of BALB/c lymphoma lines with B cell properties. *J Immunol* **122**, 549-54.
- Krieg, AM (2002): CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol* **20**, 709-60.
- Krug, A, French, AR, Barchet, W, Fischer, JA, Dzionek, A, Pingel, JT, Orihuela, MM, Akira, S, Yokoyama, WM, and Colonna, M (2004a): TLR9-dependent recognition of MCMV by IPC and DC generates coordinated cytokine responses that activate antiviral NK cell function. *Immunity* **21**, 107-19.
- Krug, A, Luker, GD, Barchet, W, Leib, DA, Akira, S, and Colonna, M (2004b): Herpes simplex virus type 1 activates murine natural interferon-producing cells through toll-like receptor 9. *Blood* **103**, 1433-7.
- Kumagai, Y, Kumar, H, Koyama, S, Kawai, T, Takeuchi, O, and Akira, S (2009): Cutting Edge: TLR-Dependent viral recognition along with type I IFN positive feedback signaling masks the requirement of viral replication for IFN- α production in plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* **182**, 3960-4.
- Kumagai, Y, Takeuchi, O, Kato, H, Kumar, H, Matsui, K, Morii, E, Aozasa, K, Kawai, T, and Akira, S (2007): Alveolar macrophages are the primary interferon-alpha producer in pulmonary infection with RNA viruses. *Immunity* **27**, 240-52.
- Kvale, EO, Dalgaard, J, Lund-Johansen, F, Rollag, H, Farkas, L, Midtvedt, K, Jahnsen, FL, Brinchmann, JE, and Olweus, J (2006): CD11c+ dendritic cells and plasmacytoid DCs are activated by human cytomegalovirus and retain efficient T cell-stimulatory capability upon infection. *Blood* **107**, 2022-9.
- Lahoud, MH, Ahmet, F, Zhang, JG, Meuter, S, Policheni, AN, Kitsoulis, S, Lee, CN, O'Keeffe, M, Sullivan, LC, Brooks, AG, Berry, R, Rossjohn, J, Mintern, JD, Vega-Ramos, J, Villadangos, JA, Nicola, NA, Nussenzweig, MC, Stacey, KJ, Shortman, K, Heath, WR, and Caminschi, I (2012): DEC-205 is a cell surface receptor for CpG oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 16270-5.
- Lanier, LL (2008): Evolutionary struggles between NK cells and viruses. *Nat Rev Immunol* **8**, 259-68.
- Le, VT, Trilling, M, Zimmermann, A, and Hengel, H (2008): Mouse cytomegalovirus inhibits beta interferon (IFN-beta) gene expression and controls activation pathways of the IFN-beta enhanceosome. *J Gen Virol* **89**, 1131-41.
- Liou, LY, Blasius, AL, Welch, MJ, Colonna, M, Oldstone, MB, and Zuniga, EI (2008): In vivo conversion of BM plasmacytoid DC into CD11b+ conventional DC during virus infection. *Eur J Immunol* **38**, 3388-94.
- Louten, J, van Rooijen, N, and Biron, CA (2006): Type 1 IFN deficiency in the absence of normal splenic architecture during lymphocytic choriomeningitis virus infection. *J Immunol* **177**, 3266-72.
- Lui, G, Manches, O, Angel, J, Molens, JP, Chaperot, L, and Plumas, J (2009): Plasmacytoid dendritic cells capture and cross-present viral antigens from influenza-virus exposed cells. *PLoS One* **4**, e7111.
- Lundberg, P, Welander, P, Han, X, and Cantin, E (2003): Herpes simplex virus type 1 DNA is immunostimulatory in vitro and in vivo. *J Virol* **77**, 11158-69.
- Macal, M, Lewis, GM, Kunz, S, Flavell, R, Harker, JA, and Zuniga, EI (2012): Plasmacytoid Dendritic Cells Are Productively Infected and Activated through TLR-7 Early after Arenavirus Infection. *Cell Host Microbe* **11**, 617-30.
- Marsh, M, and Helenius, A (2006): Virus entry: open sesame. *Cell* **124**, 729-40.

- Mathys, S, Schroeder, T, Ellwart, J, Koszinowski, UH, Messerle, M, and Just, U (2003): Dendritic cells under influence of mouse cytomegalovirus have a physiologic dual role: to initiate and to restrict T cell activation. *J Infect Dis* **187**, 988-99.
- Mebius, RE, and Kraal, G (2005): Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol* **5**, 606-16.
- Medzhitov, R, Shevach, EM, Trinchieri, G, Mellor, AL, Munn, DH, Gordon, S, Libby, P, Hansson, GK, Shortman, K, Dong, C, Gabrilovich, D, Gabrysova, L, Howes, A, and O'Garra, A (2011): Highlights of 10 years of immunology in Nature Reviews Immunology. *Nat Rev Immunol* **11**, 693-702.
- Mouries, J, Moron, G, Schlecht, G, Escriou, N, Dadaglio, G, and Leclerc, C (2008): Plasmacytoid dendritic cells efficiently cross-prime naive T cells in vivo after TLR activation. *Blood* **112**, 3713-22.
- Naik, SH, Sathe, P, Park, HY, Metcalf, D, Proietto, AI, Dakic, A, Carotta, S, O'Keeffe, M, Bahlo, M, Papenfuss, A, Kwak, JY, Wu, L, and Shortman, K (2007): Development of plasmacytoid and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived in vitro and in vivo. *Nat Immunol* **8**, 1217-26.
- Nguyen, KB, Cousens, LP, Doughty, LA, Pien, GC, Durbin, JE, and Biron, CA (2000): Interferon alpha/beta-mediated inhibition and promotion of interferon gamma: STAT1 resolves a paradox. *Nat Immunol* **1**, 70-6.
- Onai, N, Obata-Onai, A, Tussiwand, R, Lanzavecchia, A, and Manz, MG (2006): Activation of the Flt3 signal transduction cascade rescues and enhances type I interferon-producing and dendritic cell development. *J Exp Med* **203**, 227-38.
- Paludan, SR, Bowie, AG, Horan, KA, and Fitzgerald, KA (2011): Recognition of herpesviruses by the innate immune system. *Nat Rev Immunol* **11**, 143-54.
- Patel, SJ, King, KR, Casali, M, and Yarmush, ML (2009): DNA-triggered innate immune responses are propagated by gap junction communication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 12867-72.
- Randall, RE, and Goodbourn, S (2008): Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *J Gen Virol* **89**, 1-47.
- Raschke, WC, Baird, S, Ralph, P, and Nakoinz, I (1978): Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. *Cell* **15**, 261-7.
- Rasheed, S, Nelson-Rees, WA, Toth, EM, Arnstein, P, and Gardner, MB (1974): Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT-1080). *Cancer* **33**, 1027-33.
- Rawlinson, WD, Farrell, HE, and Barrell, BG (1996): Analysis of the Complete DNA Sequence of Murine Cytomegalovirus. *J Virol* **70**, 8833-8849.
- Rebsamen, M, Heinz, LX, Meylan, E, Michallet, MC, Schroder, K, Hofmann, K, Vazquez, J, Benedict, CA, and Tschopp, J (2009): DAI/ZBP1 recruits RIP1 and RIP3 through RIP homotypic interaction motifs to activate NF-kappaB. *EMBO Rep* **10**, 916-22.
- Reizis, B, Bunin, A, Ghosh, HS, Lewis, KL, and Sisirak, V (2011): Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions. *Annu Rev Immunol* **29**, 163-83.
- Robbins, SH, Walzer, T, Dembele, D, Thibault, C, Defays, A, Bessou, G, Xu, H, Vivier, E, Sellars, M, Pierre, P, Sharp, FR, Chan, S, Kastner, P, and Dalod, M (2008): Novel insights into the relationships between dendritic cell subsets in human and mouse revealed by genome-wide expression profiling. *Genome Biol* **9**, R17.

- Romani, L, Bistoni, F, Montagnoli, C, Gaziano, R, Bozza, S, Bonifazi, P, Zelante, T, Moretti, S, Rasi, G, Garaci, E, and Puccetti, P (2007): Thymosin alpha1: an endogenous regulator of inflammation, immunity, and tolerance. *Ann N Y Acad Sci* **1112**, 326-38.
- Sallusto, F, Cella, M, Danieli, C, and Lanzavecchia, A (1995): Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* **182**, 389-400.
- Scalzo, AA, Corbett, AJ, Rawlinson, WD, Scott, GM, and Degli-Esposti, MA (2007): The interplay between host and viral factors in shaping the outcome of cytomegalovirus infection. *Immunol Cell Biol* **85**, 46-54.
- Scalzo, AA, Fitzgerald, NA, Simmons, A, La Vista, AB, and Shellam, GR (1990): Cmv-1, a genetic locus that controls murine cytomegalovirus replication in the spleen. *J Exp Med* **171**, 1469-83.
- Scheu, S, Dresing, P, and Locksley, RM (2008): Visualization of IFNbeta production by plasmacytoid versus conventional dendritic cells under specific stimulation conditions in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 20416-21.
- Schlitzer, A, Heiseke, AF, Einwachter, H, Reindl, W, Schiemann, M, Manta, CP, See, P, Niess, JH, Suter, T, Ginhoux, F, and Krug, AB (2012): Tissue-specific differentiation of a circulating CCR9- pDC-like common dendritic cell precursor. *Blood*.
- Schlitzer, A, Loschko, J, Mair, K, Vogelmann, R, Henkel, L, Einwachter, H, Schiemann, M, Niess, JH, Reindl, W, and Krug, A (2011): Identification of CCR9- murine plasmacytoid DC precursors with plasticity to differentiate into conventional DCs. *Blood* **117**, 6562-70.
- Schneider, K, Loewendorf, A, De Trez, C, Fulton, J, Rhode, A, Shumway, H, Ha, S, Patterson, G, Pfeffer, K, Nedospasov, SA, Ware, CF, and Benedict, CA (2008): Lymphotoxin-mediated crosstalk between B cells and splenic stroma promotes the initial type I interferon response to cytomegalovirus. *Cell Host Microbe* **3**, 67-76.
- Scott, GM, Ng, HL, Morton, CJ, Parker, MW, and Rawlinson, WD (2005): Murine cytomegalovirus resistant to antivirals has genetic correlates with human cytomegalovirus. *J Gen Virol* **86**, 2141-51.
- Scrivano, L, Esterlechner, J, Muhlbach, H, Ettischer, N, Hagen, C, Grunewald, K, Mohr, CA, Ruzsics, Z, Koszinowski, U, and Adler, B (2010): The m74 gene product of murine cytomegalovirus (MCMV) is a functional homolog of human CMV gO and determines the entry pathway of MCMV. *J Virol* **84**, 4469-80.
- Segura, E, Wong, J, and Villadangos, JA (2009): Cutting edge: B220+CCR9- dendritic cells are not plasmacytoid dendritic cells but are precursors of conventional dendritic cells. *J Immunol* **183**, 1514-7.
- Shaner, NC, Steinbach, PA, and Tsien, RY (2005): A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat Methods* **2**, 905-9.
- Shortman, K, and Liu, YJ (2002): Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* **2**, 151-61.
- Smith, CB, Wei, LS, and Griffiths, M (1986): Mouse cytomegalovirus is infectious for rats and alters lymphocyte subsets and spleen cell proliferation. *Arch Virol* **90**, 313-23.
- Smith, HR, Heusel, JW, Mehta, IK, Kim, S, Dorner, BG, Naidenko, OV, Iizuka, K, Furukawa, H, Beckman, DL, Pingel, JT, Scalzo, AA, Fremont, DH, and Yokoyama, WM (2002): Recognition of a virus-encoded ligand by a natural killer cell activation receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 8826-31.

- Steinberg, C, Eisenacher, K, Gross, O, Reindl, W, Schmitz, F, Ruland, J, and Krug, A (2009): The IFN regulatory factor 7-dependent type I IFN response is not essential for early resistance against murine cytomegalovirus infection. *Eur J Immunol* **39**, 1007-18.
- Stern-Ginossar, N, Weisburd, B, Michalski, A, Le, VT, Hein, MY, Huang, SX, Ma, M, Shen, B, Qian, SB, Hengel, H, Mann, M, Ingolia, NT, and Weissman, JS (2012): Decoding human cytomegalovirus. *Science* **338**, 1088-93.
- Stetson, DB, and Medzhitov, R (2006): Type I interferons in host defense. *Immunity* **25**, 373-81.
- Swiecki, M, and Colonna, M (2010): Unraveling the functions of plasmacytoid dendritic cells during viral infections, autoimmunity, and tolerance. *Immunological Reviews* **234**, 142-162.
- Tabeta, K, Georgel, P, Janssen, E, Du, X, Hoebe, K, Crozat, K, Mudd, S, Shamel, L, Sovath, S, Goode, J, Alexopoulou, L, Flavell, RA, and Beutler, B (2004): Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 3516-21.
- Takahashi, K, Asabe, S, Wieland, S, Garaigorta, U, Gastaminza, P, Isogawa, M, and Chisari, FV (2010): Plasmacytoid dendritic cells sense hepatitis C virus-infected cells, produce interferon, and inhibit infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 7431-6.
- Takaoka, A, Wang, Z, Choi, MK, Yanai, H, Negishi, H, Ban, T, Lu, Y, Miyagishi, M, Kodama, T, Honda, K, Ohba, Y, and Taniguchi, T (2007): DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature* **448**, 501-5.
- Takaoka, A, and Yanai, H (2006): Interferon signalling network in innate defence. *Cell Microbiol* **8**, 907-22.
- Takeuchi, O, and Akira, S (2009): Innate immunity to virus infection. *Immunol Rev* **227**, 75-86.
- Teixeira, L, Botelho, AS, Mesquita, SD, Correia, A, Cerca, F, Costa, R, Sampaio, P, Castro, AG, and Vilanova, M (2010): Plasmacytoid and conventional dendritic cells are early producers of IL-12 in *Neospora caninum*-infected mice. *Immunol Cell Biol* **88**, 79-86.
- Umemoto, E, Otani, K, Ikeno, T, Verjan Garcia, N, Hayasaka, H, Bai, Z, Jang, MH, Tanaka, T, Nagasawa, T, Ueda, K, and Miyasaka, M (2012): Constitutive plasmacytoid dendritic cell migration to the splenic white pulp is cooperatively regulated by CCR7- and CXCR4-mediated signaling. *J Immunol* **189**, 191-9.
- Unterholzner, L, Keating, SE, Baran, M, Horan, KA, Jensen, SB, Sharma, S, Sirois, CM, Jin, T, Latz, E, Xiao, TS, Fitzgerald, KA, Paludan, SR, and Bowie, AG (2010): IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA. *Nat Immunol* **11**, 997-1004.
- Unternaehrer, JJ, Chow, A, Pypaert, M, Inaba, K, and Mellman, I (2007): The tetraspanin CD9 mediates lateral association of MHC class II molecules on the dendritic cell surface. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 234-9.
- Valchanova, RS, Picard-Maureau, M, Budt, M, and Brune, W (2006): Murine cytomegalovirus m142 and m143 are both required to block protein kinase R-mediated shutdown of protein synthesis. *J Virol* **80**, 10181-90.
- Voigt, V, Forbes, CA, Tonkin, JN, Degli-Esposti, MA, Smith, HR, Yokoyama, WM, and Scalzo, AA (2003): Murine cytomegalovirus m157 mutation and variation leads to immune evasion of natural killer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 13483-8.

- Vosshenrich, CA, Lesjean-Pottier, S, Hasan, M, Richard-Le Goff, O, Corcuff, E, Mandelboim, O, and Di Santo, JP (2007): CD11cIöB220+ interferon-producing killer dendritic cells are activated natural killer cells. *J Exp Med* **204**, 2569-78.
- Wagner, M, Jonjic, S, Koszinowski, UH, and Messerle, M (1999): Systematic excision of vector sequences from the BAC-cloned herpesvirus genome during virus reconstitution. *J Virol* **73**, 7056-60.
- Wang, X, Huong, SM, Chiu, ML, Raab-Traub, N, and Huang, ES (2003): Epidermal growth factor receptor is a cellular receptor for human cytomegalovirus. *Nature* **424**, 456-61.
- Waskow, C, Liu, K, Darrasse-Jeze, G, Guermontprez, P, Ginhoux, F, Merad, M, Shengelia, T, Yao, K, and Nussenzweig, M (2008): The receptor tyrosine kinase Flt3 is required for dendritic cell development in peripheral lymphoid tissues. *Nat Immunol* **9**, 676-83.
- Watowich, SS, and Liu, YJ (2010): Mechanisms regulating dendritic cell specification and development. *Immunol Rev* **238**, 76-92.
- Welner, RS, Esplin, BL, Garrett, KP, Pelayo, R, Luche, H, Fehling, HJ, and Kincade, PW (2009): Asynchronous RAG-1 expression during B lymphopoiesis. *J Immunol* **183**, 7768-77.
- Wobus, CE, Karst, SM, Thackray, LB, Chang, KO, Sosnovtsev, SV, Belliot, G, Krug, A, Mackenzie, JM, Green, KY, and Virgin, HW (2004): Replication of Norovirus in cell culture reveals a tropism for dendritic cells and macrophages. *PLoS Biol* **2**, e432.
- Zucchini, N, Bessou, G, Robbins, SH, Chasson, L, Raper, A, Crocker, PR, and Dalod, M (2008a): Individual plasmacytoid dendritic cells are major contributors to the production of multiple innate cytokines in an organ-specific manner during viral infection. *Int Immunol* **20**, 45-56.
- Zucchini, N, Bessou, G, Traub, S, Robbins, SH, Uematsu, S, Akira, S, Alexopoulou, L, and Dalod, M (2008b): Cutting edge: Overlapping functions of TLR7 and TLR9 for innate defense against a herpesvirus infection. *J Immunol* **180**, 5799-803.

7 Anhang

Abbildungsverzeichnis

ABB. 1-1: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG UND MIKROARCHITEKTUR DER MURINEN MILZ.	2
ABB. 1-2: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER DIFFERENZIERUNG MURINER DENDRITISCHER ZELLEN.....	3
ABB. 1-3: ÜBERSICHT DES EXPRESSIONSPROFILS DER OBERFLÄCHENMARKER VON MURINEN CDCS UND PDCs.	4
ABB. 1-4: MODULATION DER ANGEBORENEN UND ERWORBENEN IMMUNANTWORT DURCH HERPESVIREN AKTIVIERTE PDCs.	6
ABB. 1-5: DIE FRÜHE INTERFERON TYP I INDUZIERTER SIGNALKASKADE.	11
ABB. 1-6: AKTIVIERENDER LY49H REZEPTOR AUF NK ZELLEN: INFEKTIONSSZENARIO IN C57BL/6 MÄUSEN NACH MCMV.	17
ABB. 2-1: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER EXPERIMENTELLEN VORGEHENSWEISE ZUR <i>IN VIVO</i> ANALYSE DER IFN β ANTWORT UND DES INFEKTIOSEN STATUS.	39
ABB. 2-2: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER ANALYSE DER IFN β PRODUKTION UND MCMV INFEKTIONSSTATUS UNTER KO-KULTURBEDINGUNGEN (LINKE SEITE) UND IM TRANSWELL SYSTEM (RECHTE SEITE) <i>IN VITRO</i>	40
ABB. 2-3: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES FUNKTIONSPRINZIPIES DER IFN β ^{MOB/MOB} REPORTERMÄUSE IM VIRALEN INFEKTIONSMODELL VON MCMV.	42
ABB. 3-1: DURCHFLUSSZYTOTOMETRISCHE CHARAKTERISIERUNG DER DENDRITISCHEN ZELLPOPULATION IN DER MILZ VON MCMV INFIZIERTEN IFN β ^{MOB/MOB} REPORTERMÄUSEN 6H P.I.....	45
ABB. 3-2: ANALYSE DER IFN β /YFP UND MCMV GFP EXPRESSION IN DER MILZ VON MCMV INFIZIERTEN IFN β ^{MOB/MOB} REPORTERMÄUSEN <i>IN VIVO</i> 48H P.I.	47
ABB. 3-3: IFN β INDUKTIONS- UND MCMV INFEKTIONSKINETIK <i>IN VIVO</i> IST BIPHASISCH.	49
ABB. 3-4: DIE CHARAKTERISIERUNG DER IFN β ANTWORT UND DES INFEKTIOSEN STATUS NACH MCMV INFEKTION BEI EIN- BZW. AUSSCHLUSS DES IFN β -IFNAR RÜCKKOPPLUNGSMECHANISMUS <i>IN VIVO</i>	51
ABB. 3-5: STATISTISCHE ANALYSE DER IFN β UND MCMV EXPRESSION 24H P.I. IN REPORTERMÄUSEN MIT IFNAR ^{+/+} BZW. IFNAR ^{-/-} HINTERGRUND <i>IN VIVO</i>	52
ABB. 3-6: LOKALISATION DER IFN β /YFP ⁺ ZELLEN IN DER MILZ VON MCMV INFIZIERTEN MÄUSEN 48H P.I.	53
ABB. 3-7: VERGLEICH DER IFN β /YFP ⁺ UND MCMV ⁺ DCs IN DER MILZ NACH INFEKTION VERSCHIEDENER MCMV DOSEN.	55
ABB. 3-8: DARSTELLUNG DER INFIZIERTEN ZELLPOPULATION NACH MCMV INFEKTION <i>IN VIVO</i>	57
ABB. 3-9: DARSTELLUNG DES EINFLUSSES VON CHLOROQUIN AUF DIE MCMV GFP EXPRESSION IN <i>IN VITRO</i> GENERIERTEN DCs UND MURINEN NIH3T3 FIBROBLASTEN 24H P.I.	60
ABB. 3-10: DIFFERENZIELLE CCR9 EXPRESSION INNERHALB DER DC POPULATIONEN IN DER MILZ NACH MCMV INFEKTION.	62
ABB. 3-11: MOLEKULARER NACHWEIS DER KEIMBAHN UND IGH REKOMBINATION IN VERSCHIEDENEN MACS SORTIERTEN ZELLTYPEN AUS MURINER MILZ UND KNOCHENMARK.	64
ABB. 3-12: PHYSIKALISCHE EIGENSCHAFTEN RELEVANTER FLUOROCHROME ZUR GENERIERUNG EINER MCMV Δ M157 MUTANTE.	65
ABB. 3-13: VERGLEICHENDE ANALYSE DER IFN β SEZERNIERENDEN DENDRITISCHEN ZELLPOPULATION NACH MCMV WT UND MCMV Δ M157 INFEKTION 24H P.I. <i>IN VIVO</i>	66
ABB. 3-14: LOKALISATION DER IFN β PRODUZIERENDEN ZELLEN IN DER MILZ VON IFN β ^{MOB/MOB} MÄUSEN 24H NACH MCMV Δ M157 INFEKTION.	67
ABB. 3-15: ANALYSE DER INFIZIERTEN DENDRITISCHEN ZELLPOPULATIONEN NACH MCMV GFP UND MCMV Δ M157 GFP INFEKTION <i>IN VIVO</i>	68
ABB. 3-16: ANALYSE DER INFIZIERTEN DENDRITISCHEN ZELLPOPULATIONEN NACH MCMV WT UND Δ M157 GFP INFEKTION <i>IN VIVO</i>	69
ABB. 3-17: ANALYSE DER IFN β /YFP UND MCMV GFP EXPRESSION VON <i>IN VITRO</i> VORSORTIERTEN FLT3-L DCs 24H P.I.	72
ABB. 3-18: KONFOKALMIKROSKOPIE VON <i>IN VITRO</i> GENERIERTEN FLT3-L DCs 24H NACH MCMV INFEKTION.	74
ABB. 3-19: ANALYSE DER IFN β PRODUKTION UND MCMV INFEKTIONSSTATUS UNTER KO-KULTURBEDINGUNGEN UND IM TRANSWELL SYSTEM <i>IN VITRO</i> 24H P.I.	75
ABB. 3-20: VERGLEICHENDE ANALYSE DER AUSWIRKUNG VON GANCICLOVIR AUF DIE IFN β EXPRESSION UND VIRALE GFP EXPRESSION VON <i>IN VITRO</i> GENERIERTEN DCs 24H NACH MCMV INFEKTION.	77
ABB. 3-21: UV-INAKTIVIERTES MCMV INDUZIERT IN PDCs EINE IFN β EXPRESSION <i>IN VIVO</i>	79
ABB. 3-22: PHÄNOTYPISCHE ANALYSE DER IFN β /YFP EXPRESSION 24H NACH INJEKTION VON IFN β ^{MOB/MOB} REPORTERMÄUSEN MIT AUFGEREINIGTEN, REPLIKATIONSFÄHIGEN VIREN ODER DIPS.	81
ABB. 4-1: MODELL FÜR EINE EFFIZIENTE IFN β AKTIVIERUNG DER ANTIVIRALEN IMMUNANTWORT.....	100

Tabellenverzeichnis

TABELLE 1-1: ÜBERSICHT VON VERSCHIEDENEN PRRs WIE AUCH DEREN LIGANDEN UND AGONISTEN.....	8
TABELLE 2-1: ZUSAMMENSETZUNG DER ZELLKULTURMEDIEEN.....	28
TABELLE 2-2: VERWENDETE ZELLEN UND ZELLINIEN.....	29
TABELLE 2-3: VERWENDETE STÄMME UND VIRUSMUTANTEN VON MCMV.....	29
TABELLE 2-4: VERWENDETE PRIMER FÜR PCRS, QPCRS UND IGH REKOMBINATIONSNACHWEISEN.....	30
TABELLE 2-5: VERWENDETE ANTIKÖRPER.....	30
TABELLE 2-6: ÜBERSICHT DER VERWENDETEN FLUOROCHROME MIT DEN MAXIMA (MAX) DER EXZITATION (EX) UND EMISSION (EM) [NM] IN FACS ANALYSEN.....	35
TABELLE 2-7: VERWENDETE MAUSLINIEN.....	41

Danksagung

Diesen Mount Everest des Promovierens wird von vielen besonderen Helfern unterstützt, bei denen ich mich herzlich für ihre Begleitung während dieser Tour bedanken möchte.

Frau Prof. Dr. Stefanie Scheu für die Überlassung des interessanten Themas und die stetige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

Bei Herrn Prof. Dr. Klaus Pfeffer bedanke ich mich für die Möglichkeit, diese Arbeit am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene unter exzellenten, inspirierenden und wissenschaftlichen Arbeitsbedingungen anfertigen zu können.

Herrn Prof. Dr. Peter Westhoff für die freundliche Übernahme der Betreuung von Seiten der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät.

Jens Bauer, Dr. Philipp Dresing, Regine Dress, Andreas Humbert, Regina Jakubiak, Dr. Magdalena Kocur, Sonja Kropp und Ann-Kathrin Pulm danke ich sehr für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre, ungebrochenen Teamspirit und die charmante Zusammenarbeit.

Dr. Vu Thuy Khanh Le und Dr. Mirko Trilling bedanke ich mich für ihre hervorragenden virologischen Gedankeneinflüsse und ihre stetige Hilfsbereitschaft während dieser Arbeit.

Meinen Mentoren PD Dr. Sandra Beer-Hammer, Prof. Dr. Ingo Schmitz, und besonders Prof. Dr. Karl Lang und PD Dr. Albert Zimmermann danke ich für ihre Mentorenbetreuung während dieser Arbeit und für die anregenden Diskussionen und Ideen für dieses Projekt.

Allen ehemaligen und derzeitigen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Medizinischen Mikrobiologie danke ich für die freundliche Unterstützung, angenehme Arbeitsatmosphäre sowie ihre geistige und praktische Hilfsbereitschaft. Im Besonderen aus dem Office 14... Dr. Simone Brandt, Dr. Cornelia Beuter-Gunia, David Finkenstädt, Julia Hartmann, Dr. Eric Keil, Verena Klümpers, Stefanie Kurig, Nicole Küpper, Sarah Lahme, Pia Liebfried und Dr. Ursula Sorg.

Meinen langjährigen Freunden, vor allem Dr. Karen Alt, Christa Broermann, Sandra Exterkate, Stefanie Jeschke und Corinna Strolz, die mir nicht nur während der Promotion tapfer und mit viel Humor zur Seite standen, danke ich für ihre aufrichtige Freundschaft.

Meinen Eltern und meiner Schwester für ihre moralische Unterstützung und die aufbauenden Worte im richtigen Moment.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Düsseldorf, den 16.07.2013

Stephanie Borkens