Aus dem Medizinischen Zentrum für Hygiene und
Medizinische Mikrobiologie mit Medizinaluntersuchungsamt
der Philipps-Universität Marburg
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. H.-D. Klenk
Institut für Immunologie
Leiter: Prof. Dr. D. Gemsa

Molekulare Wechselwirkungen zwischen Influenza A-Viren und humanen Monozyten: Genregulation und Signalübertragung

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie (Theoretische Medizin)
Dr. rer. physiol.

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
Claudia Pauligk
aus Weilburg

Marburg 2002

UNIVERSITÄTSBIBLIOTHEK
MARBURG

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philippsuniversität Marburg am

4. 3. 2003

Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. B. Maisch
Referent: Prof. Dr. D. Gemsa
Coreferent:

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung 1

1. Allgemeines zum Immunsystem 1
1.1. Die angeborene Immunität 1
1.2. Pattern-recognition receptors 2
1.3. CD 14 4
1.4. Toll-like receptors (TLR) 5
1.4.1. Expression und Signaltransduktion 6
1.4.2. TLR-Liganden und Rezeptor-Spezifität 8
1.4.3. TLRs und Viren 9

2. Monozyten / Makrophagen 10
2.1. Entwicklung und Struktur der Monozyten/Makrophagen 11
2.2. Funktionen der mononuklearen Phagozyten 12
2.3. Aktivierung von Monozyten/Makrophagen 13
2.4. Wechselwirkungen zwischen Influenza A-Viren und Monozyten / Makrophagen 14

3. Influenza A-Viren 16
3.1. Taxonomie 16
3.2. Struktur und Charakterisierung von Influenza A-Viren 17
3.3. Funktionen der viralen Proteine 17
3.3.1. Nukleoproteine 18
3.3.2. Hüllproteine 18
3.3.3. Nicht-glykosylierte Proteine 19
3.3.4. Nicht-Strukturproteine 20
3.3.5. PB1-F2 20
3.4. Vermehrungszyklus von Influenza A-Viren 20
3.5. Antigendrift und Antigenshift 22
3.6. Pathogenese und Klinik der Erkrankung 23
3.7. Allgemeine Reaktionen des Immunsystems gegen Influenza-Viren 24

4.	**Chemokine**	**24**
4.1.	Struktur und Funktion der Chemokine	25
4.2.	Chemokinproduzierende Zellen	29
4.3.	Chemokine vermitteln Leukozytenwanderung und -aktivierung	30
4.4.	Chemokinrezeptoren	31
4.4.1.	CXC-Chemokinrezeptoren	31
4.4.2.	CC-Chemokinrezeptoren	32
5.	**Zytokine**	**33**
5.1.	TNF-α	34
5.2.	IL-6	35
5.3.	IL-10	35
6.	**Proteasom und Immunproteasom**	**36**
6.1.	Struktur und Funktion des 20S Proteasoms	36
6.2.	Immunproteasomen	37
6.3.	Induktoren der Komponenten LMP 2, LMP 7 und MECL-1	38
6.4.	Proteasomen und Virusantigene	39
7.	**Hitzeschock-Proteine (hsp)**	**40**
7.1.	hsp 40	41
7.2.	hsp 60	41
7.3.	hsp 70	42
7.4.	hsp 90	43
8.	**LPS**	**43**
9.	**Polymyxin B**	**44**
10.	**Zielsetzung**	**45**
II.	**Material und Methoden**	**47**
1.	**Medien, Zellkulturen und Virusstamm**	**47**
1.1.	Medien	47
1.2.	Zellen	48
1.2.1.	Primäre Zellen	48

1.2.2.	MDCK II	48
1.3.	Testsysteme in der Zellkultivierung	49
1.3.1.	Überprüfung der Zellkulturen auf Mycoplasmen	49
1.3.2.	LAL-Test (Limulus amoebocyte lysate- test) zum Nachweis von Endotoxin	49
1.4.	Knockout-Mäuse	50
1.5.	Virusstamm	50
2.	**Methoden**	**50**
2.1.	Isolierung und Anreicherung humaner Blutmonozyten	50
2.1.1.	Elutriation ("Counter flow-Zentrifugation")	51
2.2.	Reinheit der isolierten Monozyten	54
2.3.	Überprüfung der Zellvitalität	54
2.4.	Stimulation und Infektion der Monozyten mit LPS und Zymosan bzw. Influenza A/PR/8	54
2.5.	Stimulation und Infektion von Makrophagen aus knockout-Mäusen	55
2.6.	FACS-Analyse, Durchflusszytometrie	55
2.7.	Vermehrung und Reinigung von Influenza-Viren	57
2.7.1.	Vorbereitung der Eier und Beimpfung	57
2.7.2.	Ernte der Allantoisflüssigkeit	58
2.7.3.	Reinigung der Influenza A-Viren	58
2.7.4.	Dialyse und Lagerung	59
2.8.	Hämagglutinationstest (HA-Test)	59
2.9.	Plaque-Test	60
2.10.	Inaktivierung von Influenza A-Viren	61
2.10.1.	Inaktivierung von A/PR/8 bei 56°C	61
2.10.2.	Inaktivierung von A/PR/8 durch UV-Bestrahlung	61
2.11.	ELISA-Technik (Enzyme linked Immunosorbent Assay)	62
2.11.1.	IL-8-ELISA	63
2.11.2.	GRO-α-ELISA	63
2.11.3.	MCP-1 ELISA	64
2.11.4.	MIP-1α-ELISA	64
2.11.5.	MIP-1β-ELISA	65
2.11.6.	RANTES-ELISA	65

2.11.7. IL-6-ELISA 66
2.11.8. IL-10-ELISA 66
2.11.9. TNF-α-ELISA 67
2.11.10. ELISAs für den Nachweis muriner Chemokine 67
2.12. RNA-Isolierung 67
2.13. Northern Blot 68
2.13.1. Präparation von RNA 68
2.13.2. Herstellung DIG-markierter RNA-Sonden 68
2.13.3. Agarose-Gelelektrophorese für RNA 69
2.13.4. Blotting 71
2.13.5. Nicht radioaktive Hybridisierung 72
2.13.6. Detektion der hybridisierten RNA 74
2.14. cDNA-Synthese 75
2.15. Amplifizierung von DNA durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) 76
2.15.1. Primerauswahl 77
2.15.2. Amplifizierungsreaktion 79
2.15.3. Elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte 79
2.16. cDNA-Subtraktion 80
2.16.1. Umschreiben der RNA in cDNA mittels SMART PCR cDNA Synthesis Kit 81
2.16.2. Clontech PCR-Select cDNA Subtraction Kit 82
2.16.3. Darstellung der cDNA-Fragmente nach der Subtraktion 84
2.16.4. Kontrolle der Subtraktions-Effizienz 86
2.16.5. Klonierung der cDNA-Fragmente 88
2.16.6. Sequenzierung der einklonierten Fragmente 89
2.17. cDNA-Expressions Array Atlas™ 90

III. Ergebnisse 91

1. Differenzielle Genexpression in Monozyten nach Influenza A-Infektion 91
1.1. Untersuchung regulierter Gene in humanen Monozyten nach A/PR/8-Infektion durch cDNA-Subtraktion 91
1.1.1. Induktion von Genen in infizierten Monozyten 91
1.1.2. Suppression von Genen in infizierten Monozyten 92
1.1.3. Induktion von cig 5 und cig 33 in humanen Monozyten durch Infektion mit dem Influenza-Virus A/PR/8 93
1.1.3.1 Nachweis von cig 5 und cig 33 in Monozyten nach Infektion mit A/PR/8 mittels PCR 94
1.1.3.2 Untersuchung der cig 5 und cig 33-Expression in Monozyten nach A/PR/8-Infektion im Northernblot 95
1.1.4. Expression von CBP in Monozyten nach Infektion mit A/PR/8 96
1.1.4.1 CBP-Northernblot 97
1.2. cDNA-Expressions-Array Atlas™ 98
1.2.1. Darstellung von regulierten Genen nach Infektion mit A/PR/8 an einem Spender 98
1.2.2. Untersuchung regulierter Gene nach Influenza A-Infektion in weiteren Spendern 112
1.2.3. Regulation von Genen in humanen Monozyten nach LPS-Stimulation 112
2. Expression von Hitzeschock-Proteinen nach Influenza A-Infektion 116
3. Proteasom und Immunproteasom 117
3.1. Austausch der Komponenten X, Y und Z gegen LMP 7, LMP 2 und MECL-1 durch A/PR/8 117
3.2. Einfluss von LPS und inaktivierten Influenza A-Viren auf die Expression der Proteasomen-Komponenten 119
4. Signalvermittlung von Influenza A-viren über pattern recognition receptors 122
4.1. CD 14 122
4.1.1. Blockierung von CD 14 durch monoklonale Antikörper 122
4.1.1.1 Freisetzung von CXC-Chemokinen aus Monozyten nach CD 14-Blockierung 123
4.1.1.2 Freisetzung von CC-Chemokinen aus Monozyten nach CD 14-Blockierung 124

4.1.1.3 Freisetzung von Zytokinen aus Monozyten nach CD 14-Blockierung 127

4.1.2. Funktion des CD 14-Rezeptormoleküls bei der Infektion mit inaktiviertem A/PR/8 128

4.1.3. CD 14- knockout Maus 130

4.2. Influenza A-Infektion und Toll-like receptors (TLR) 133

4.2.1. TLR 2 und TLR 4 knockout-Mäuse 134

4.2.1.1 Freisetzung von Chemokinen aus Makrophagen einer TLR 2 knockout-Maus 134

4.2.1.2 Freisetzung von Chemokinen aus Makrophagen einer TLR 4-defizienten Maus (C3H/HeJ) 136

5. Einfluss von Influenza A-Viren auf die Expression von pattern-recognition receptors 139

5.1. Regulation der CD 14-Expression 139

5.1.1. Regulation der CD 14-Transkription durch A/PR/8 139

5.1.2. Regulation der CD 14-Oberflächenexpression durch A/PR/8 140

5.2. Regulation der TLR 2- und TLR 4- Expression 143

5.2.1. Einfluss von LPS und A/PR/8 auf die Transkription von TLR 2 und TLR 4 143

5.2.2. Regulation der Expression von TLR 2 und TLR 4 nach Inkubation mit infektiösem und inaktiviertem A/PR/8 144

6. Hemmung der Zytokin- und Chemokinsynthese durch Polymyxin B nach A/PR/8- Infektion 146

6.1. Freisetzung von CXC-Chemokinen aus Monozyten nach Inkubation mit Polymyxin B 147

6.2. Freisetzung von CC-Chemokinen aus Monozyten nach Inkubation mit Polymyxin B 147

6.3. Freisetzung des Zytokins TNF-α aus Monozyten nach Inkubation mit Polymyxin B 149

6.4. Hemmung der Zytokin- und Chemokinsynthese durch Polymyxin B nach Infektion mit inaktiviertem A/PR/8 149

6.4.1. Hemmung der CC-Chemokinfreisetzung aus Monozyten durch Polymyxin B nach Infektion mit inaktiviertem Influenza A-Virus 150

6.4.2. Hemmung der Freisetzung von TNF-α aus Monozyten durch Polymyxin B nach Inkubation mit inaktiviertem A/PR/8 151

6.5. Fehlende Inhibition der Freisetzung von TNF-α und MIP-1β durch Polymyxin B nach Stimulation mit Zymosan 151

IV. Diskussion 153

1. Transkriptionsregulation in Monozyten nach Infektion mit dem Influenza-Virus A/PR/8 153

1.1. Analyse der Genexpression in Influenza-infizierten Monozyten mithilfe der cDNA-Subtraktion 154

1.2. Analyse der Genexpression in Monozyten nach Influenza-Infektion mithilfe der cDNA-Microarray-Technologie (Atlas) 156

1.2.1. Erhöhung der Transkriptionsaktivität in Monozyten nach Stimulation mit LPS 158

2. Induktion von Hitzeschockprotein (hsp)-Genen in Monozyten nach Infektion mit A/PR/8 159

3. A/PR/8-induzierte Veränderungen der Proteasomen-spezifität in Monozyten 161

3.1. Einfluss von inaktivierten Viren und LPS auf die Induktion von Immunproteasomen 163

4. Übertragung virusinduzierter Signale über pattern recognition receptors (PRR) 165

4.1. Influenza-Viren induzieren Signale in Monozyten mithilfe von CD 14 166

4.2. Vermittlung von Signalen in Monozyten über CD 14 durch inaktiviertes A/PR/8 169

4.3. TLR 2 und TLR 4 induzieren keine Influenza A-vermittelte Signaltransduktion in murinen Makrophagen 171

5. Einfluss von A/PR/8 auf die Expression von pattern recognition receptors 173

5.1. Regulation der CD 14-Expression durch A/PR/8 173

5.2. Regulation der TLR 2- und TLR 4-Expression durch A/PR/8 175

5.3. Regulation der TLR-Expression durch inaktivierte Viren und Kostimulation mit LPS 177

6. Interaktion von Polymyxin B mit dem Influenza-Virus A/PR/8 179

V. Zusammenfassung 182

VI. Literaturverzeichnis 185

Abkürzungen

Abb	Abbildung
A.dest	entionisiertes Wasser
A/PR/8	Influenza A Virus, Stamm Puerto Rico 8 (Erstisolation 1934)
AK	Antikörper
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
CBP	cap binding protein
CCL	CC-Chemokinligand
CCR	CC-Chemokinrezeptor
CD	cluster of differentiation
cDNA	complementäre DNA
cig	cytomegalovirus induced gene
CXCL	CXC-Chemokinligand
CXCR	CXC-Chemokinrezeptor
DI	defective interfering particles
DIG	Digoxigenin
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
ELR	Glutaminsäure-Leucin-Arginin
EtOH	Ethanol
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	fetal calf serum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GRO	growth-related oncogene
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HAU	hemagglutination units
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazine-N´-2-ethanesulfonic acid
Hsp	Hitzeschockprotein
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IP	Immunproteasom
IP-10	interferon γ inducible protein-10
kD	Kilodalton

LAL	Limulus amebocyte lysate
LBP	LPS-binding protein
LMP	low molecular protein
LPS	Lipopolysaccharid
M-Protein	Matrix-Protein
MALP-2	Makrophagen-aktivierendes Protein 2
MCP	monocyte chemoattractant protein
M-CSF	macrophage-colony stimulating factor
MDCK	Madin and Darby canine kidney cell
MECL	multicatalytic endopeptidase complex-like
MHC	major histocompatibility complex
min	Minute
MIP	macrophage inflammatory protein
MOI	multiplicity of infection
mRNA	messenger RNA
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid
MW	Mittelwert
NA	Neuraminidase
NF-κB	nukleärer Faktor κB
NP	Nukleoprotein
OD	optische Dichte
OPD	o-Phenylendiamin-dihydrochlorid
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PE	Phycoerythrin
PFU	plaque forming units
p.i.	post infectionem
POD	Peroxidase
PRR	pattern recognition receptor
RANTES	regulated on activation normal T-cell expressed and secreted
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	revolutions per minute
RSV	respiratory syncytial virus
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkriptase-PCR
SD	Standardabweichung
sup	supplementiert
Tab	Tabelle
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TLR	toll-like receptor
UV	ultraviolett
ZNS	zentrales Nervensystem

I. Einleitung

1. Allgemeines zum Immunsystem

Das Immunsystem wird traditionell eingeteilt in angeborene und erworbene Immunität, beide erfüllen verschiedene, spezifische Funktionen bei der Abwehr von Krankheitserregern. Die erworbene (adaptive) Immunität wird charakterisiert durch die Erkennung von Antigenen über spezifische Rezeptoren, die zu einer klonalen Expansion einzelner Lymphozyten (T- und B-Zellen) führt. Diese ist Voraussetzung für eine effektive Immunantwort, in deren Verlauf die entsprechenden Klone in Effektorzellen ausdifferenzieren und mittels Antikörperproduktion oder über Abtötungsmechanismen die Erreger eliminieren. Allerdings vergehen bis dahin drei bis fünf Tage, in denen die Pathogene dem Wirtsorganismus bereits großen Schaden zufügen können.
Die angeborene Immunität gewährleistet dagegen eine frühe Abwehr von Erregern direkt nach der Infektion und kontrolliert deren Vermehrung. Verschiedenste Mechanismen wie Phagozytose, Freisetzung antimikrobieller Peptide und Aktivierung des Komplementsystems über den alternativen Weg spielen dabei eine Rolle. Es gibt jedoch zunehmend Hinweise darauf, dass eine weitere entscheidende Funktion der angeborenen Immunität in der Kontrolle und Interaktion mit der erworbenen Immunität besteht.

1.1. Die angeborene Immunität

Die angeborene Immunität erschien in der Evolution lange vor der adaptiven, sie ist vermutlich in allen mehrzelligen Organismen zu finden. Ein Hauptunterschied zur erworbenen Immunität liegt in der Art der Erkennung von Fremdantigenen. T- und B-Zellrezeptoren werden während der Entwicklung in den einzelnen Lymphozyten quasi zufällig durch somatische Rekombination gebildet, was jede

Zelle mit einem strukturell einzigartigen Rezeptor ausstattet. Dieser erkennt zwar hochspezifisch "sein" Antigen, aber nur wenige weitere mit niedriger Affinität. Dagegen wird die Erkennung in der angeborenen Immunität über Rezeptoren vermittelt, die durch Gene der Keimbahn kodiert werden, somit ist deren Spezifität bereits genetisch determiniert. Diese Rezeptoren haben sich aufgrund einer natürlichen Selektion herausgebildet und ermöglichen die Erkennung bestimmter, hochkonservierter Strukturen auf infektiösen Mikroorganismen. Der Nachteil liegt auf der Hand: aufgrund der limitierten Größe des Genoms liegt die Zahl der verschiedenartigen Rezeptoren in der angeborenen Immunität nur bei einigen hundert. Diese stehen einer Überzahl von Fremdantigenen gegenüber, die sich zudem durch Mutationen ständig verändern können. Das Immunsystem löst dieses Problem, indem es auf Spezifität zugunsten von Vielfältigkeit in der Erkennung verzichtet. Es werden also nicht einzelne Antigene erkannt, sondern wenige, aber hochkonservierte Strukturen in großen Gruppen von Mikroorganismen. Diese werden unter dem Begriff pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) zusammengefasst und die entsprechenden Rezeptoren als pattern-recognition receptors bezeichnet.

1.2. Pattern-recognition receptors

Allen pattern associated molecular patterns, die von den pattern-recognition receptors erkannt werden, sind bestimmte Eigenschaften gemeinsam, obwohl die chemischen Strukturen ein breites Spektrum aufweisen. Sie werden ausschließlich von mikrobiellen Pathogenen synthetisiert, nicht aber vom Wirtsorganismus, so dass sie von den Rezeptoren der angeborenen Immunität als "fremd" erkannt werden können. Es handelt sich meist um Strukturen, die essentiell für das Überleben oder die Pathogenität des Erregers sind. PAMPs sind darüberhinaus so invariant, dass sie in ganzen Gruppen von Pathogenen auftreten, hier sind z.B. die Lipopolysaccharide zu nennen, die Bestandteil aller gramnegativer Bakterien sind. Erkennt ein Rezeptor LPS, können somit nahezu alle Infektionen durch diese Bakterienklasse detektiert werden (Medzhitov et al., 2000).

Im Gegensatz zu den Rezeptoren der erworbenen Immunität, die nur auf T- oder B-Lymphozyten exprimiert sind, finden sich pattern-recognition receptors auf einer Vielzahl von Immunzellen, vor allem auf den professionellen antigenpräsentierenden Zellen wie Makrophagen, dendritischen Zellen und B-Lymphozyten. Erkennt der Rezeptor ein Pathogen, werden die Zellen unmittelbar aktiviert, ihre Effektorfunktion auszuführen, so dass die Immunantwort ohne Verzögerung eintritt (Medzhitov et al., 2000). Hier liegt ein deutlicher Vorteil gegenüber der erworbenen Immunität, in der für eine effektive Antwort zunächst eine klonale Proliferation der antigenspezifischen Lymphozyten Voraussetzung ist, die mehrere Tage benötigt.

Strukturell lassen sich die pattern-recognition receptors verschiedenen Proteinfamilien zuordnen. Besonders häufig findet man Leucin-reiche, Calcium-abhängige oder scavenger-receptor Protein-Domänen. Funktionell gliedern sich die Rezeptoren in drei Klassen: sezernierte, Endozytose-vermittelnde und signalgebende Rezeptoren (Medzhitov et al., 2000). Sezernierte pattern-recognition receptors wirken als Opsonine, die durch die Bindung an mikrobielle Zellwände eine Markierung darstellen, die durch Komplement und Phagozyten erkannt werden kann. Das am besten charakterisierte Mitglied dieser Klasse ist das Mannan-bindende Lektin, das in der Leber synthetisiert und als Komponente der Akuten-Phase-Antwort ins Serum sezerniert wird. Es bindet an Kohlenhydrate auf gramnegativen und grampositiven Bakterien und Hefen sowie an einige Viren und Parasiten. Endozytose-vermittelnde pattern-recognition receptors sind auf der Oberfläche von Phagozyten exprimiert. Bei der Erkennung von PAMPs auf einer mikrobiellen Zelle vermitteln sie die Endozytose und anschließende Zerstörung des Pathogens in Lysosomen. Dabei generierte Antigene werden auf MHC II-Molekülen an die Zelloberfläche transportiert und dort präsentiert. Vertreter dieser Klasse sind der Mannose-Rezeptor und der scavenger receptor auf Makrophagen. Die dritte Gruppe der pattern-recognition receptors aktiviert nach der Erkennung von Pathogenen Signaltransduktionswege, die die Expression einer Vielzahl von Genen der Immunantwort induziert, unter anderem inflammatorische Zytokine (Medzhitov et al., 2000). Dazu gehören die Rezeptoren der toll-Familie, auf die noch näher eingegangen wird. Zwar ohne Signalfunktion, aber unmittelbar mit den toll-like receptors (TLR) verbunden, ist das Molekül CD

14, das aufgrund seiner Fähigkeit LPS zu erkennen auch zu diesen pattern-recognition receptors gehört.

1.3. CD 14

CD 14 ist ein Glycoprotein mit 356 Aminosäuren. Nach der Translation wird es entweder im endoplasmatischen Retikulum mit einem GPI-Anker verbunden und als membranständige Form (mCD 14) an die Zelloberfläche transportiert oder als lösliches Molekül (sCD 14) freigesetzt. Das membranständige Molekül wird vor allem auf Monozyten und Makrophagen exprimiert, die lösliche Form findet man im Serum und im Liquor. Th2-Zytokine führen zu einer Verringerung der Expression, IFN-γ, TNF und bakterielle Liganden dagegen zu einer Steigerung. Eine Hoch- bzw. Herab-Regulation wird auch in verschiedenen Krankheitsbildern wie z.B. bei bakteriellen und viralen Infektionen beobachtet (Antal-Szalmas, 2000; Landmann et al., 2000).

Als pattern-recognition receptor bindet CD 14 eine Vielzahl von Liganden, denen eine bestimmte Struktur gemeinsam sein muss. Deren chemischer Charakter ist bis jetzt unbekannt, es könnte sich um hydrophile phosphorylierte Hexose-Reste oder alternativ um Phosphatidylinsositol und Phosphatidylserin handeln. Eine Bindung an CD 14 konnte unter anderem für Zellwandkomponenten aus gramnegativen und grampositiven Bakterien, LTA (aus S. aureus), Osp (B. burgdorferi), Pilz- sowie Hefebestandteile nachgewiesen werden. In der Folge kommt es zur Aktivierung der Zellen und zur Freisetzung verschiedener Zytokine, außerdem zur Phagozytose durch Monozyten (Landmann et al., 2000). Weitere CD 14-vermittelte Funktionen in polymorphkernigen Leukozyten sind die Integrin-abhängige Adhäsion an Fibrinogen oder Endothelzellen, die Phagozytose apoptotischer Zellen und gramnegativer Bakterien. Sogar eine Beteiligung des CD 14-Moleküls an der Regulation des programmierten Zelltods (Apoptose) in Monozyten wird in der Literatur diskutiert (Antal-Szalmas 2000).

Der sicherlich am besten beschriebene funktionelle Zusammenhang in bezug auf CD 14 ist die Interaktion mit dem bakteriellen Endotoxin LPS. Dieses Molekül

kann bei einer Infektion mit gramnegativen Bakterien die Pathophysiologie des septischen Schocks induzieren, der durch eine übermäßige Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren ausgelöst wird. Eine Beteiligung von CD 14 wurde schon früh durch Versuche mit LPS in CD 14 knockout-Mäusen gefunden, die sich gegenüber den letalen Folgen eines solchen Schocks als resistent erwiesen. Ein weiterer Faktor ist notwendig für die Bindung von LPS an CD 14: das LPS bindende Protein (LBP). Dieses ebenfalls den pattern recognition receptors zugehörige Molekül transportiert LPS-Monomere im Plasma zur Bindungsstelle des membranständigen CD 14, die einer definierten Position zugeordnet werden kann (AS 39-44 und 57-64). Sowohl CD 14 als auch LBP binden dabei an die Lipid A-Komponente des LPS, obwohl sie untereinander keine Sequenzhomologien zeigen (Schütt, 1999). CD 14 besitzt selbst keine intrazelluläre Domäne, über die durch die Bindung eines Liganden ausgelöste Signale ins Zytoplasma weitergeleitet werden könnten. Es muss also ein weiterer Faktor unmittelbar an der Interaktion zwischen LPS/LBP und CD 14 beteiligt sein, den man nun im TLR 4 gefunden hat, einem Mitglied der immer noch wachsenden Familie der toll-like receptors.

1.4. Toll-like receptors (TLR)

Der erste Rezeptor der toll-Familie wurde in Drosophila als Komponente eines Signalwegs identifiziert, der die Entwicklung der dorsoventralen Polarität während der Embryogenese kontrolliert (Hashimoto et al., 1988). Das toll-Molekül ist ein Transmembranprotein, das eine große extrazelluläre, Leucin-reiche Domäne aufweist. Überraschenderweise ähnelte die Sequenz der zytoplasmatischen Domäne stark derjenigen des humanen Interleukin 1-Rezeptors. Zudem induzieren beide Signaltransduktionswege, die letztlich zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren der NF-κB-Familie führen, welche eine Schlüsselposition bei der Induktion von Immun- und Entzündungsantworten einnehmen. Diese Beobachtung veranlasste weitere Untersuchungen des toll-Rezeptors, die zeigten, dass das Molekül (wie auch Homologe, die mittlerweile charakterisiert wurden) in der Tat in adulten Drosophila eine wichtige Komponente bei der

Erkennung von Pilzen und anderen Pathogenen mit nachfolgender Induktion einer entsprechenden Immunantwort darstellt (Means et al., 2000).

1.4.1. Expression und Signaltransduktion

Als toll-like receptors (TLRs) wurde die Familie bezeichnet, deren Mitglieder im Menschen aufgrund von Sequenzhomologien zum toll der Drosophila identifiziert werden konnten. Diese Familie umfasst zum heutigen Zeitpunkt mindestens 12 Mitglieder, von denen TLR 1-10 bereits genauer beschrieben sind (Takeuchi et al., 2001). Das charakteristische Kennzeichen dieser Typ I-Transmembran-Rezeptoren ist, wie bei toll, die zytoplasmatische TIR-Domäne (Toll/IL-1R) sowie das extrazelluläre LRR (leucin-rich repeat)-Motiv. Dieses umfasst 20-29 Aminosäuren und findet sich in einer großen Gruppe von Proteinen, unter anderem auch im CD 14-Molekül. Das Vorkommen des Motivs im Menschen, der Fruchtfliege und sogar in Pflanzen lässt vermuten, dass es sich bei LRR-Proteinen um evolutionär besonders früh entwickelte Rezeptoren der primitiven Abwehr handelt. Die zytoplasmatische TIR-Domäne weist eine hohe Homologie zu der der IL-1 Rezeptor-Familie auf, die sich von den TLRs durch ihre extrazelluläre Immunglobulin-Domäne unterscheidet. Dies lieferte bereits einen Hinweis auf den ebenfalls gemeinsamen Signalweg, der zur Aktivierung von NF-κB führt. Die Domäne findet sich außerdem in MyD88, dem eine entscheidende Funktion als Adaptormolekül bei der Erkennung von Pathogenen über TLRs zukommt (Takeuchi et al., 2001).

Die Expression der TLR-Moleküle beschränkt sich nicht auf myeloide Zellen, vielmehr finden sich die Rezeptoren auch auf Endothelzellen in Mikrogefäßen der Haut und im Darm, auf Herzmuskelzellen und γδ T-Lymphozyten. Dies lässt vermuten, dass bakterielle Komponenten direkt verschiedenste Wirtszellen über TLRs aktivieren, was eine schnelle Antwort gegen Mikroorganismen gewährleistet. TLR 3 ist das einzige Mitglied der Rezeptorfamilie, dessen Expression auf einen einzigen Zelltyp limitiert ist: es findet sich ausschließlich auf dendritischen Zellen (Takeuchi et al., 2001).

Aufgrund der Ähnlichkeit der intrazellulären TIR-Domäne gibt es große Gemeinsamkeiten zwischen den Signaltransduktionswegen von TLRs und IL-1R (s. Abb. 1). Die Aktivierung des Rezeptors führt zunächst zur Rekrutierung des zytoplasmatischen Adaptormoleküls MyD88, das ebenfalls eine TIR-Domäne besitzt. Die Interaktion findet zwischen den beiden Domänen statt, umfasst eventuell noch ein weiteres Molekül (Tollip) und führt im weiteren zur konstitutiven Bindung der Serin/Threoninkinase IRAK über den N-Terminus des MyD88-Moleküls, der einer death-domain entspricht. Das aktivierte IRAK interagiert mit Traf 6 (tumor necrosis factor-associated factor), das die Verbindung zu den Proteinkinasen NIK und IKKβ herstellt. Die folgende Phosphorylierung von I-κB führt dann zur Freisetzung des aktiven NF-κB und dessen Translokation in den Zellkern (Takeuchi et al., 2001).

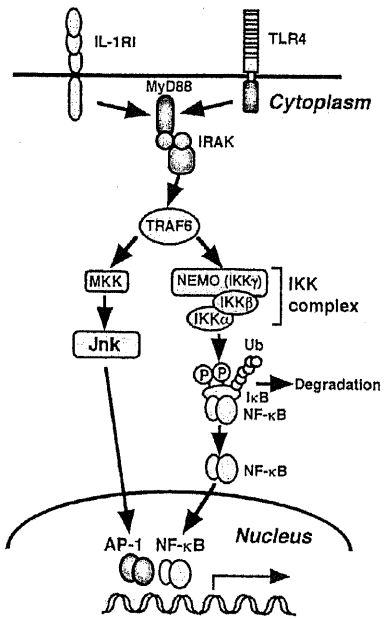


Abb. 1: Signalweg des Toll-like receptor 4 und des IL-1-Rezeptors.

Es finden sich zunehmend Hinweise darauf, dass dieser MyD88-abhängige Signalweg nicht der einzige ist. Diskutiert wird unter anderem eine Alternative, in

der das Molekül Tollip eine Rolle spielt, das ebenfalls mit der TIR-Domäne interagiert und eine kostitutive Assoziation mit IRAK eingeht. Auch ein Weg, der über Mitglieder der MAP-Kinase-Familie und JNK führt und in der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren c-jun, c-fos und AP1 (möglicherweise auch weiterer Faktoren) mündet, wird postuliert. Solche parallelen Kaskaden könnten erklären, wie durch die Bindung der Liganden an denselben Rezeptor dennoch unterschiedliche Immunantworten generiert werden können (Underhill et al., 2002).

Die Bandbreite der durch die TLR-Aktivierung ausgelösten Immunantworten ist vermutlich erst in Ansätzen aufgeklärt. Neben der Freisetzung wichtiger inflammatorischer Mediatoren wie TNF-α und IL-12 werden Mechanismen zur Abtötung mikrobieller Organismen induziert, z.B. die Bildung von NO (Underhill et al., 2002). Eine entscheidende Funktion kommt den TLR-Signalwegen wohl auch bei der Regulation bzw. Initiation der adaptiven Immunität zu. In MyD88-defizienten Mäusen beispielsweise fehlt die Antigen-spezifische T-Zellproliferation und Antikörperproduktion. Bestimmte Antworten sind spezifisch durch bestimmte TLRs induziert, so ist die Freisetzung von IP-10, IFN-β und IL-12p70 für eine Aktivierung von TLR 4 charakteristisch, die Synthese von IL-8, IL-23 und der inhibitorischen Form von IL-12 dagegen auf TLR 2 beschränkt (Re et al., 2001). Möglicherweise sind für eine solche Spezifität nicht die TLRs selbst verantwortlich, sondern zusätzliche akzessorische Moleküle. Eine Differenzierung der Antwort wird vermutlich auch durch die Expression verschiedener Kombinationen von TLRs auf verschiedenen Populationen dendritischer Zellen erreicht, die durch die Favorisierung einer Th1- oder Th2- dominierten Antwort die Richtung der adaptiven Immunität beeinflusst.

1.4.2. TLR-Liganden und Rezeptor-Spezifität

Der erste Ligand, der mit einem toll-like Rezeptor assoziiert werden konnte, war das bakterielle Endotoxin LPS. Seit langem wusste man zwar, dass CD 14 einen wesentlichen Faktor bei der Übertragung LPS-vermittelter Signale darstellt, erst in TLR 4 identifizierte man jedoch die bis dahin fehlende Komponente, die aufgrund

ihrer zytoplasmatischen TIR-Domäne die Signaltransduktion induzieren kann. Weiterhin ist das Molekül MD 2 für die Bindung von LPS an CD 14 und TLR 4 notwendig. Die intensiven Studien an den verschiedenen Vertretern der toll-Familie führten zur Charakterisierung weiterer Liganden, deren Auflistung mit Sicherheit im Lauf der nächsten Jahre noch erweitert werden muss. So stellen verschiedene bakterielle Lipoproteine, Peptidoglycan, Zymosan, Lipoarabinomannan, MALP-2 und bestimmte LPS-Varianten Stimuli dar, die eine Aktivierung der Signalkaskade durch TLR 2 verursachen (Akira et al., 2001). TLR 3 erkennt spezifisch dsRNA, wie sie bei der Replikation von Viren entsteht (Alexopoulou et al., 2001). Eine Signalinduktion über TLR 4 erfolgt neben LPS auch durch Taxol, hsp 60, hsp 70, Fibronectin EDA und das F-Protein des respiratory syncytial virus (RSV). Als einziger Ligand für TLR 5 wurde bisher bakterielles Flagellin identifiziert, für TLR 9 unmethylierte CpG-Motive, die man vor allem in bakterieller DNA findet (Underhill et al., 2002).
Es ist bis jetzt unklar, in welcher Form die Interaktion von Ligand und TLR genau stattfindet. Die Daten deuten in vielen Fällen darauf hin, dass eine echte Bindung im chemischen Sinn nicht vorliegt.

Die Heterogenität der aufgezählten TLR-Liganden wirft zwangsläufig eine Frage auf: wie kann trotz der Erkennung so unterschiedlicher pathogener und z.T. endogener Faktoren eine spezifische und dem jeweiligen Fall angemessene Antwort induziert werden? Eine mögliche Erklärung, die zunehmend durch Daten gestützt wird, ist die Bildung von TLR-Heterodimeren, die je nach Kombination verschiedene Signalwege in der Zelle aktivieren. Eine Dimerisierung von TLR 2 mit TLR 6 bzw. TLR 1 wurde bereits gezeigt und mit der Bindung ganz bestimmter Liganden in Zusammenhang gebracht (Ozinsky et al., 2000). Die spezifische Regulation über weitere, bis jetzt nicht identifizierte Hilfsmoleküle, wird ebenfalls postuliert.

1.4.3. TLRs und Viren

Vor der Entdeckung der TLRs ging man davon aus, dass Viren vor allem einer adaptiven Immunantwort begegnen, die angeborenen Abwehrmechanismen jedoch umgehen. Heute häufen sich die Hinweise, dass TLRs im Zusammenhang

mit einer Virusinfektion durchaus eine Rolle spielen. So vermittelt RSV über TLR 4 eine Zellaktivierung, die zur Freisetzung typischer Zytokine, einer Beeinflussung der NK-Zellen und einer verbesserten Virus-clearance führt (Kurt-Jones et al., 2000). Eine B-Zellaktivierung, ebenfalls über TLR 4, konnte für Retroviren beobachtet werden (Rassa et al., 2002). In dendritischen Zellen führte die Interaktion zwischen dsRNA und TLR 3 zur NFκB-Aktivierung und Interferon-Freisetzung (Alexopoulou et al., 2001). Es überrascht nicht, dass verschiedene Viren auch gegenüber dieser frühen Immunantwort Mechanismen entwickelt haben, die zu einer Resistenz führen. Dies wird möglich durch Virusproteine, die die toll- oder IL-1-Rezeptoren bzw. die TIR-Domäne der TLRs imitieren und dadurch eine Inhibition der TLR-vermittelten Signaltransduktion bewirken können. Das Vaccinia-Virus exprimiert zwei solcher Komponenten, dem N-Protein des Tabakmosaikvirus wird ebenfalls eine entsprechende Funktion zugeschrieben (Bowie et al, 2000; Whitham et al., 1994).

2. Monozyten / Makrophagen

Das menschliche Immunsystem besteht aus ca. 1 Billion Zellen, die zwischen Blut und Lymphe zirkulieren, in anatomisch definierten Ansammlungen der lymphoiden Organe vorkommen oder als vereinzelte Zellen in fast allen Geweben anzutreffen sind. Die Fähigkeit dieser Zellen zu zirkulieren und der ständige Austausch zwischen Blut, Lymphe und Gewebe ist von entscheidender Bedeutung für die Erkennung körperfremder Stoffe, insbesondere von Krankheitserregern, und deren Elimination. Während Lymphozyten Träger der spezifischen Immunität sind, vermitteln Phagozyten, natürliche Killerzellen und lösliche Faktoren wie z.B. Lysozym, Komplement oder Akute-Phase-Proteine die Funktionen der unspezifischen Immunabwehr. Diese bildet eine erste Verteidigungslinie gegen die Krankheitserreger und eliminiert die meisten Pathogene, bevor sie eine erkennbare Infektion verursachen. Zu den Phagozyten gehören neben den Granulozyten die Monozyten bzw. Makrophagen.

Unter dem Begriff mononukleares Phagozytensystem (MPS) sind alle von Monozyten abstammenden, phagozytisch aktive Zellen zusammengefasst, also die Makrophagen der verschiedenen Körperhöhlen und Gewebe, Kupffer-Zellen der Leber, Alveolarmakrophagen der Lunge, Histiozyten, Osteoklasten und Mikrogliazellen im ZNS. Die Zellen des MPS spielen eine wichtige Rolle bei Entzündungsreaktionen und der Abwehr von Krankheitserregern (Paul et al., 1993). Sie besitzen die Fähigkeit, durch Freisetzung modulatorischer Moleküle wie z.B. IL-1, IL-6 oder TNF-α die Regulation der Immunantwort zu beeinflussen. Durch die Sekretion chemotaktisch wirkender Proteine wird die weitere Einwanderung immunkompetenter Zellen gesteuert. Ihre wichtige Funktion als Effektorzellen wird zudem durch die Fähigkeit zur Präsentation von prozessierten Antigenen über MHC II-Moleküle an CD 4^+ T-Lymphozyten erfüllt.

2.1. Entwicklung und Struktur der Monozyten/Makrophagen

Die Vorläuferzellen der Monozyten entwickeln sich aus pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks, die sich wiederum aus dem embryonalen Mesenchym ableiten (Volkman et al., 1963). Unter dem Einfluss von Wachstums- bzw. Differenzierungsfaktoren (colony-stimulating factors, CSF), welche die weitere Entwicklung steuern, entstehen aus den pluripotenten Zellen lymphozytäre und myeloische Stammzellen. Letztere gliedern sich durch IL-3 in vier Entwicklungslinien auf: die erythrozytäre Linie, die megakaryozytäre Linie, die Linie der eosinophilen Granulozyten und die granulozytär-monozytäre Linie. M-CSF (Makrophagen-CSF oder CSF-1) differenziert die Vorläuferzellen der granulozytär-monozytären Linie zu Monoblasten, aus diesen gehen die Promonozyten hervor und werden nach der letzten Zellteilung als Monozyten in die Blutzirkulation entlassen. Nach ca. 24 Stunden verlassen die Monozyten die Blutbahn und emigrieren in das umliegende Gewebe, wo die weitere Differenzierung zu Makrophagen stattfindet. Unter normalen Umständen sind Monozyten und Makrophagen nicht mehr teilungsfähig (Gemsa et al., 1997).

Monozyten sind mit einem Durchmesser von etwa 10-15 µm die grössten Zellen des Blutes. Sie werden durch eine unregelmässige Zellbegrenzung, Vakuolen als

Zeichen einer gut ausgebildeten Phagozytosefähigkeit, einen meist eingebuchteten, ovalen oder hufeisenförmigen Kern, locker strukturiertes Chromatin und ein Zytoplasma mit azurophilen Granula charakterisiert (Junqueira et al., 1986). Werden Monozyten aus dem Blut isoliert und in ein Kulturgefäss gegeben, adhärieren sie und breiten sich über die Oberfläche aus. Im Blut eines Erwachsenen zirkulieren etwa $1{,}7 \times 10^9$ Monozyten und repräsentieren damit 2-8% aller Blutleukozyten. Wichtig zu bemerken ist, dass Monozyten keine unreifen Vorläuferzellen sind, sondern gut phagozytieren können, zytotoxische Aktivität entfalten und bereits viele biologisch aktive Mediatoren sezernieren (Gemsa et al., 1997). Makrophagen unterscheiden sich von Monozyten in ihrer Enzymaktivität, ihren stärker ausgeprägten phagozytotischen Fähigkeiten und ihren Zelloberflächen-Charakteristika wie z.B. der erhöhten Expression von CD 16 und der Adhäsionsmoleküle der β_2 –Integrinfamilie.

2.2. Funktionen der mononuklearen Phagozyten

Die Zellen des MPS antworten in zweifacher Weise auf verschiedene Stimuli. Zum einen werden extrazelluläre Signale über Rezeptoren gebunden, internalisiert und im endozytotischen Stoffwechselweg abgebaut; zum anderen wird die Expression bioaktiver Moleküle induziert, die die Makrophagenantwort auf die wechselnde Umgebung anpassen. Durch diese beiden Grundmechanismen sind Makrophagen in der Lage, Entzündungsprozesse und immunologische Reaktionen aktiv zu beeinflussen.

Spezifische Rezeptoren für Immunglobuline (FcγR, FcμR) und Komplementfaktoren (C3bR) auf den Makrophagen sind von entscheidender Bedeutung für den Abbau von Mikroorganismen und Immunkomplexen. Weiterhin werden Rezeptoren für IFN-γ, IL-1, IL-6, TNF-α, M-CSF, Lipoproteine, Peptide und Polysaccharide exprimiert (Gemsa et al., 1997). Diese ermöglichen die Kommunikation mit der Umgebung und versetzen die Makrophagen in die Lage, sich den ständig wechselnden Bedingungen anzupassen und entsprechend auf sie zu reagieren.

Von entscheidender Bedeutung ist die Interaktion zwischen MPS und spezifischem Immunsystem. Die Antigenpräsentation und die Sekretion von Monokinen durch Monozyten/Makrophagen führt zur Aktivierung von T-Lymphozyten. Diese wiederum setzen Produkte zur B-Lymphozyten- und Makrophagenaktivierung frei (Abbas et al., 1994). Über diesen Mechanismus besteht eine wechselseitige Regulation des unspezifischen mit dem spezifischen Immunsystem.

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

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

Makrophagen gehören zu den sekretorisch aktivsten Zellpopulationen (Nathan et al., 1987). Die meisten der sezernierten Moleküle werden nach Stimulation und Aktivierung freigesetzt, z.B. durch bakterielle Produkte oder Zytokine. Die Menge der sezernierten Moleküle ist abhängig vom Grad der Differenzierung und Gewebslokalisation.

2.3. Aktivierung von Monozyten/Makrophagen

Während einer Entzündung kann die Transitzeit der Monozyten im Blut von normalerweise ca. 24 Stunden auf ca. 10 Stunden verkürzt werden. Nach dem Auswandern differenzieren die Monozyten im Gewebe und den Körperhöhlen zu Makrophagen aus. Ohne ihre typischen Eigenschaften zu verlieren, werden sie

durch das umliegende Wirtsgewebe für zusätzliche, spezielle Funktionen geprägt (z.B. Alveolarmakrophagen der Lunge, Osteoklasten des Knochens). Als residente (ruhende) Zellen im nicht-entzündeten Organismus besteht die Hauptaufgabe dann in der Entfernung untergegangener Zellen (scavenger cells). Während eines Entzündungsprozesses werden sowohl die chemotaktisch angelockten Monozyten, als auch die residenten Makrophagen für den Empfang von Aktivierungssignalen sensibilisiert. Der höchste Aktivierungsgrad von Makrophagen wird in der Regel erst durch die Einwirkung von 2 Signalen erreicht (2 Signalhypothese) (Hamilton et al., 1987; Gemsa et al., 1984). Das erste Signal ("Priming-Signal") versetzt die Zellen in einen rezeptiven Zustand, es wird z.B. durch Lymphokine wie IFN-γ, GM-CSF oder verschiedene makrophagenaktivierende Faktoren (MAFs) bewirkt. Durch ein zweites, auslösendes Signal wie z.B. Endotoxin oder eine Kombination aus IL-1 und TNF-α wird der Makrophage dazu veranlasst, volle Aktivierung zu zeigen ("Trigger-Signal").
Bei der Regulation der Makrophagenaktivierung spielt das von den Makrophagen selbst produzierte Prostaglandin E eine wesentliche Rolle, indem es die durch IFN-γ induzierte Makrophagenaktivierung inhibiert (Taffet et al., 1981). Was mit Makrophagen nach ihrer Aktivierung geschieht, wird bis heute kontrovers diskutiert. Zum einen besteht die Annahme, dass einmal aktivierte Makrophagen nach Erfüllung ihrer Aufgabe zu lokalen Lymphknoten wandern und dort sterben (van Furth 1982), zum anderen wird eine Deaktivierung der Zellen für möglich gehalten. Ob der Zelltod aktivierter Makrophagen genetisch programmiert ist oder auf die von den Zellen selbst sezernierten toxischen Produkte zurückzuführen ist, ist bisher nicht weiter untersucht worden.

2.4. Wechselwirkungen zwischen Influenza A-Viren und Monozyten / Makrophagen

Humane Monozyten und Makrophagen sind durch das Influenza A-Virus infizierbar. Obwohl eine kurzzeitige de novo-Proteinsynthese in den Zellen stattfindet, wird nicht einmal der erste Replikationszyklus des Virus vollendet, d.h. es werden nur geringe Mengen infektiöser Viren freigesetzt (Nain et al., 1990).

Nach 24-48 Stunden sterben 80-90% der infizierten Monozyten / Makrophagen durch Apoptose. Davor sind sie jedoch entscheidend an der Bildung einer zellspezifischen Immunantwort gegen das Virus beteiligt. So werden die Freisetzung von verschiedenen proinflammatorischen Zytokinen, deren verstärkte Transkription, Aktivierung und Translokation verschiedener Transkriptionsfaktoren sowie die selektive Synthese von Chemokinen beobachtet (Kaufmann et al., 2001).

Die Infektion humaner Monozyten mit dem Influenza-Virus A/PR/8 induziert neben anderen Zytokinen u.a. IFN-α und aktiviert die TNF-α -, IL-1β - und IL-6-Gentranskription. Die Akkumulation der mRNA der zuletzt genannten drei Zytokine kann noch verstärkt werden durch Kostimulation der Zellen mit LPS und GM-CSF. Außerdem triggert die Kombination beider Stimuli eine effiziente Translation und Freisetzung der biologisch aktiven Proteine (Bender et al., 1993). In den letzten Jahren konzentrierten sich die meisten Studien über A/PR/8–bedingte Veränderungen der Zytokinexpression in Monozyten und Makrophagen auf TNF-α. Übereinstimmungen zwischen klinischen Symptomen einer Influenza A-Infektion und Wirkungen von TNF-α lassen eine Bedeutung dieses Proteins bei der viralen Infektion vermuten. Verschiedene Typen mononuklearer Phagozyten einschließlich der Monozyten antworten innerhalb von 3 bis 9 Stunden nach einer Influenza A-Infektion mit starker TNF-α mRNA-Akkumulation, die aber von einer nur geringen TNF-α -Produktion begleitet wird. Vermutlich aktiviert eine Infektion mit diesem Virus die Makrophagen erst bei Einwirkung von sekundären, triggernden Signalen wie z.B. LPS zu einer starken TNF-α -Freisetzung (Gong et al., 1991; Sprenger et al., 1994).
Eine entscheidende Rolle in der Antwort gegen Influenza A spielt vermutlich die selektive Freisetzung von Chemokinen aus infizierten Monozyten. Es wird ausschließlich eine verstärkte Expression der auf mononukleäre Zellen wirkenden CC-Chemokine beobachtet, während die auf neutrophile Granulozyten wirkenden Chemokine IL-8/CXCL8 und GRO-α/CXCL1 durch das Virus deutlich supprimiert werden (Sprenger et al., 1996). Diese differenzierte Induktion könnte verantwortlich dafür sein, dass man im Influenza A-infizierten Lungengewebe überwiegend mononukleäre Leukozyten vorfindet.

Eine Infektion mit Influenza A beeinträchtigt verschiedene Effektormechanismen humaner Monozyten, u.a. die chemotaktische Reaktion, die Phagozytosefähigkeit und die intrazelluläre Abtötung von Candida albicans, während die Zelladhäsion nicht beeinflusst wird (Gardner et al., 1982).

3. Influenza A-Viren

Bereits in der Antike wurden grippeähnliche Epidemien beschrieben, die man heute den Influenza-Virusinfektionen zuschreibt. Mit der Isolierung der Erreger durch Wilson Smith et al. (1933) wurde die exakte Zuordnung dieser Erkrankung als Virusinfektion des Respirationstraktes möglich. In jedem Jahr fordern diese Erreger der "echten" Grippe viele Todesopfer, während der 1918/19 aufgetretenen Pandemie starben schätzungsweise 20 bis 30 Millionen Menschen

3.1. Taxonomie

Bis 1962 gehörten die Influenzaviren mit den Paramyxoviren in die Familie der Myxoviridae (Waterson, 1962) und wurden dann aufgrund der unterschiedlichen Morphologie, Genstruktur und biochemischen Eigenschaften in eine eigene Familie, die Orthomyxoviridae, eingeordnet. Innerhalb dieser Familie unterscheidet man drei Genera (White und Fenner, 1994): Influenza A, B und C. Die Klassifizierung erfolgt aufgrund der Unterschiede im Nukleoprotein (NP) und Matrixprotein (M). Influenza A-Viren werden weiter in Subtypen unterteilt, da sie sich in den Hämagglutinin- (HA oder H) und / oder Neuraminidaseproteinen (NA oder N) unterscheiden. Bisher sind 14 Subtypen des HA (H1-H14) und 9 des NA (N1-N9) aus Vögeln isoliert worden. Einige dieser in unterschiedlichen Kombinationen auftretenden Subtypen finden sich auch in Säugetieren einschließlich des Menschen. Benannt werden die Subtypen mit der Typenbezeichnung A, B oder C, der Spezies aus der die Erstisolation erfolgte, dem Ort der Erstisolation und den HA- und NA-Subtypen. So wurde das Influenza

Virus A/PR/8/34 mit den HA- und NA-Subtypen H1/N1 1934 in Puerto Rico aus dem achten Isolat gewonnen.

3.2. Struktur und Charakterisierung von Influenza A-Viren

Influenza A-Viren sind RNA-Viren mit pleomorpher, kugeliger oder schlauchförmiger Gestalt, einem Durchmesser von 80-120 nm und helikaler Kapsidsymmetrie. Die Außenhülle stellt eine Lipiddoppelschicht dar; sie stammt von der Wirtszellmembran ab und wird bei der Virusreifung von dieser übernommen. Während die Innenseite der Außenhülle von dem viralen Matrixprotein (M_1) gebildet wird, finden sich auf der Oberfläche des Viruspartikels die stachelartig angeordneten Glykoproteine (Spikes, Peplomere) Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA). Ein weiteres Matrixprotein (M_2) bildet eine geringe Anzahl von Poren innerhalb der Außenhülle (Fields et al., 1991).
Influenza A-Viren besitzen eine lineare Negativ-Einzelstrang RNA (ssRNA), die aus acht Segmenten besteht. Jedes der Gensegmente ist mit einem eigenen Nukleokapsid aus dem Nukleoprotein (NP) und einem RNA-Polymerasekomplex (Transkriptase) assoziiert. Die acht Segmente kodieren für elf Proteine, wobei die beiden kleinsten Segmente 7 und 8 jeweils für zwei Proteine kodieren, die durch alternatives Splicing der mRNA entstehen.

3.3. Funktionen der viralen Proteine

Die Proteine der Influenza A-Viren werden eingeteilt in Nukleoproteine, Hüllproteine, nicht-glykosylierte Proteine und Nicht-Srukturproteine (White und Fenner,1994). Ein erst kürzlich entdecktes Protein, PB1-F2, wird hier gesondert dargestellt.

3.3.1. Nukleoproteine

a) Nukleoprotein (NP)

Das NP ist gemeinsam mit dem Matrixprotein das typenspezifische Antigen. Es bildet das Nukleokapsid und bewirkt das Umschalten von der Transkription zur Replikation.

b) Polymerasekomplex (P)

Der Polymerasekomplex besteht aus drei Proteinen, dem basischen Protein 1 (PB1), dem basischen Protein 2 (PB2) und dem sauren Protein (PA), die alle Kernsignale besitzen. Die Polymerase ist sowohl für die Transkription als auch für die Replikation der viralen RNA verantwortlich. Weiterhin spaltet sie neusynthetisierte zelluläre mRNAs ca. 12 Nukleotide vom 5'Cap entfernt, um den für die virale mRNA-Synthese erforderlichen Primer zu beschaffen ("cap-stealing").

3.3.2. Hüllproteine

a) Hämagglutinin (HA)

Das HA liegt als Homotrimer vor. Es ist für die Erkennung eines sialinsäurehaltigen Rezeptors (N-acetylneuraminsäure) zuständig. Das HA-Molekül wird posttranslational nach dem Einbau in die Membran durch Endoproteasen (Furine) des Wirtes (Stieneke-Grober et al., 1992) in HA_1 und HA_2 gespalten, die über eine Disulfidbrücke assoziiert bleiben. Die proteolytische Spaltung des HA-Moleküls ist Voraussetzung für die Infektiosität der Viren. Hierdurch kann die Wirtsspezifität und Gewebeverteilung der Influenza A-Viren erklärt werden. HA_1 ist eine globuläres Molekül und bildet am distalen Ende die Rezeptorbindungsstelle. HA_2 ist helikal und ist mit hydrophoben Enden in der Virusmenmbran verankert und gewährleistet zudem die Fusion mit der Wirtszelle (Fusionspeptid am N-Terminus).

b) Neuraminidase (NA)

Das Glykoprotein Neuraminidase ist ein Homotetramer. Es besteht aus dem substratbindenden, enzymatisch aktiven Kopfteil und einem Stiel, der mit dem N-Terminus als Verankerungs- und Signaldomäne dient. Die Neuraminidase ermöglicht eine Abspaltung terminaler Sialinsäuren von Oligosacchariden und Glykolipiden auf Zelloberflächen. Sie ist dafür verantwortlich, dass Influenzaviren die Schleimschicht auf Epithelien durchdringen können. Zudem verhindert es die Selbstaggregation von Viruspartikeln und erleichtert damit die Freisetzung aus infizierten Zellen.

Die beiden viralen Oberflächenglykoproteine HA und NA tragen die wichtigsten antigenen Determinanten, welche die Ausbildung von humoralen und zellulären Immunreaktionen im infizierten Organismus bewirken. Antikörper, die gegen Hämagglutinin gerichtet sind, können das Virus neutralisieren und eine Infektion verhindern. Antikörper gegen Neuraminidase verhindern zumindest die Virusausbreitung. Sekretorische Antikörper der Klasse IgA spielen hierbei eine wichtige Rolle.

3.3.3. Nicht-glykosylierte Proteine

Matrixproteine (M_1 und M_2)

Die Proteine M_1 und M_2 sind auf dem bicistronischen Segment 7 kodiert. Sie entstehen durch alternatives Splicing durch Wirtsenzyme. Das M_1-Protein ist der Innenseite der Lipidhülle angelagert und reguliert die Ausknospung der Virionen. Das M_2-Protein ist ein Transmembranprotein und bildet innerhalb der Membran Ionenkanäle aus, deren Funktion vermutlich darin besteht, eine Ansäuerung des Viruspartikels im Endosom zu ermöglichen, wodurch eine Konformationsänderung des Nukleokapsids auftritt und zur Dissoziation desselben führt. Die Funktion der Kanäle kann durch Amantadin gehemmt werden.

3.3.4. Nicht-Strukturproteine

Nicht-Strukturproteine (NS_1 und NS_2)

Die genetische Information für NS_1 und NS_2 ist auf dem Segment 8 lokalisiert; beide Proteine entstehen durch alternatives Splicing, wobei NS_1 nicht im Virion selbst gefunden wird, sondern nur in der infizierten Wirtszelle. NS_1 hemmt das Ausschleusen der viralen und zellulären mRNA aus dem Zellkern und verhindert das Splicing der unreifen mRNA (Lamb & Krug; Fields Virology, 1996).

3.3.5. PB1-F2

Nachdem das Genom der Influenza A-Viren bereits seit 20 Jahren bekannt war und auch die zugehörigen Proteine vollständig identifiziert zu sein schienen, fand man im Dezember 2001 überraschend ein weiteres Translationsprodukt: PB1-F2. Dieses entsteht durch einen zweiten open reading frame (ORF) des PB1-Gens auf der bicistronischen mRNA und weist ungewöhnliche Eigenschaften auf. Es ist überwiegend in den Mitochondrien der infizierten Zelle lokalisiert, wird rasch durch Proteasomen degradiert und kann vermutlich Apoptose vermitteln (Chen et al., 2001).

3.4. Vermehrungszyklus von Influenza A-Viren

Orthomyxoviren und Retroviren stellen insofern eine Besonderheit unter den RNA-Viren dar, als dass ihre Transkription und Replikation im Zellkern der infizierten Zelle und nicht im Zytoplasma stattfindet.

Die Adsorption erfolgt über eine Bindungsstelle im HA_1, das sialinsäurehaltige Glykoproteine oder Glykolipide auf der Zelloberfläche erkennt. Nach rezeptorvermittelter Endozytose gelangen die Viren in Endolysosomen, in denen ein saures Milieu herrscht (pH 5,5). Die dadurch verursachte Konformationsänderung des HA_2 führt zur Freilegung unpolarer Aminosäuren am N-Terminus. Die viralen und zellulären Membranen verschmelzen. Durch

Ionenkanäle, die vom viralen M_2-Protein geformt werden, gelangen Protonen in das Virion und das M_1-Protein löst sich vom Ribonukleoprotein. Das Nukleokapsid gelangt ins Zytoplasma ("Uncoating") und der Nukleokapsid-Polymerasekomplex wird in den Zellkern transportiert.

Als Negativstrang-RNA-Virus wird die Transkription des Influenza A-Virus hauptsächlich von dem viralen, RNA-abhängigen RNA-Polymerasekomplex durchgeführt. Allerdings ist dieser nicht in der Lage, die mRNA-Synthese zu initiieren oder das 5'-Ende von mRNA-Molekülen durch Capping und Methylierung zu modifizieren. Der initiale Schritt der mRNA-Synthese wird durch eine speziellen Mechanismus der Influnza-Viren ermöglicht: der virale Polymerasekomplex spaltet einen Primer in Form eines 5'-Cap-Endes von wirtseigener, zellulärer mRNA etwa 12 Nukleotide vom 5'-Cap entfernt ab. Die virale mRNA kann nun ins Zytoplasma transportiert werden, wo an den Ribosomen die Translation in virale Proteine erfolgt.

Das Umschalten von der Transkription zur Replikation wird durch die Konzentration an synthetisierten Nukleoproteins gesteuert. Im ersten Schritt der replikativen RNA-Synthese entstehen komplementäre Kopien von allen viralen RNA-Segmenten. Diese Positivstränge unterscheiden sich von den Positivstrangkopien der Transkription (mRNA) durch die Struktur ihrer Enden: den Replikationskopien fehlt sowohl das Cap als auch das Poly-A-Ende. Sie dienen als Matrizen für die Synthese von Minustrang-RNA-Segmenten, die mit den ursprünglichen viralen RNAs identisch sind.

Die Nukleoproteine werden aufgrund basischer Sequenzen ("nuclear transport sequence") in den Zellkern transportiert. Das Matrixprotein M_1 besitzt ein Zinkfingermotiv (Bindung von Nukleinsäuren) und bindet im Zellkern an den Komplex, der aus Nukleoprotein, Transkriptase und der Minusstrang-RNA besteht. Die Glykoproteine HA und NA werden am rER translatiert. Die Glykosylierung erfolgt im Lumen des ER und wird im Golgiapparat vervollständigt bzw. modifiziert (Polymerisation, Acylierung). In permissiven Zellen wird das Hämagglutinin in HA_1 und HA_2 gespalten, wofür zelluläre Proteasen wie z.B. Furin verantwortlich sind. HA, NA und M_2 wandern bevorzugt zur apikalen Zellmembran,

der Komplex aus dem Zellkern bindet über M_1 an das HA-Trimer. M_1 vermittelt das Abschnüren der Viruspartikel von der Zellmembran ("Budding"). Die Ausknospung der Viruspartikel am apikalen Zellpol wird durch die enzymatische Aktivität der Neuraminidase unterstützt (Lamb & Krug; Fields Virology 1996). Die Mechanismen, die das ordnungsgemäße Einfügen jedes der 8 Nukleokapsid-Fragmente ermöglichen, sind noch unbekannt.

3.5. Antigendrift und Antigenshift

Influenza A-Viren können wegen ihrer hohen antigenen Variabilität immer wieder Epidemien auslösen, indem neu auftretende Virustypen auf eine nicht immunisierte Bevölkerung treffen. Die kleineren Antigenveränderungen (Antigendrift) können mit der Selektion von Punktmutationen im HA-Molekül unter immunologischem Druck erklärt werden, zumal wahrscheinlich überwiegend Antikörper gegen das Hämagglutinin einen vollständigen und bleibenden Impfschutz gewährleisten. Diese Punktmutationen können zu einer Veränderung der Epitopregion führen, indem zusätzliche Asparaginreste eingefügt werden. Durch die Anlagerung einer neuen Seitenkette bei der N-Glykosylierung des Asparaginrestes wird die Antikörpererkennungsstelle maskiert. Antikörper gegen Neuraminidase gewährleisten einen nur partiellen Impfschutz. Die Matrix- und Nukleoproteine regen zwar auch die Bildung von Antikörpern an, da sie jedoch im Inneren des Viruspartikels liegen, liefern sie für die Neutralisation keinen Ansatzpunkt und sind für einen Impfschutz nicht von Bedeutung.
Größere genetische Veränderungen hingegen resultieren aus dem Antigenshift, der alle 10-40 Jahre auftritt. Unter diesem Begriff versteht man den Austausch von ganzen RNA-Gensegmenten zwischen verschiedenen Influenzastämmen bei einer Doppelinfektion einer Zelle (Reassortment). Aufgrund des segmentierten Genoms tritt dieses Ereignis erheblich häufiger auf, als eine "klassische" genetische Rekombination.

3.6. Pathogenese und Klinik der Erkrankung

Die Übertragung der Influenzaviren von Mensch zu Mensch erfolgt über Aerosole. Das Virus kann die Mukosa des gesamten Respirationstraktes infizieren, wo es sich über einen Zeitraum von 4-6 Tagen vermehrt. Das Spektrum der Erkrankung reicht von einer asymptomatischen Infektion bis hin zur seltenen primären Viruspneumonie, die zum Tode führen kann (Stuart-Harris, 1961). In der Regel verlaufen Infektionen mit Influenza A-Viren bei seronegativen, gesunden Personen entweder subklinisch oder als "Erkältungskrankheit" mit den dazugehörigen Allgemeinsymptomen wie Fieber, Husten, Kopf- und Gliederschmerzen. Bei Kindern treten Komplikationen in Form einer Otitis media, Sinusitis oder Tracheitis auf. Die gefürchteten Pneumonien haben entweder eine rein virale Ätiologie oder sind Folge einer bakteriellen Superinfektion, da es aufgrund der Zerstörung mukoziliarer Funktionen leichter zu Bakterienansiedlungen kommen kann. Derartige kombinierte viral-bakterielle Pneumonien treten häufiger auf als rein virale Pneumonien. Die am häufigsten nachzuweisenden Keime sind Streptococcus pneumoniae, Staphylococcus aureus und Hämophilus influenzae (Schwarzmann et al., 1971). Bakterielle Proteasen begünstigen die Virusausbreitung durch Spaltung des Hämagglutinins in HA_1 und HA_2.

Neben dem Respirationstrakt können auch innere Organe durch eine Infektion mit Influenzaviren in Mitleidenschaft gezogen werden. So können eine Pleuritis, Myocarditis, Myositis, Meningitis und sogar Embryopathien verursacht werden. Besonders gefährdet sind ältere Menschen, Menschen mit chronischen Grunderkrankungen, Patienten mit zystischer Fibrose und Immundefizienzen und andere Immunsupprimierte wie Organtransplantierte.

Bisher sind nur akute Infektionen beobachtet worden, für eine Persistenz von Influenza A-Viren im menschlichen Wirtsorganismus gibt es keine Hinweise.

3.7. Allgemeine Reaktionen des Immunsystems gegen Influenza-Viren

Die Oberflächenglykoproteine Hämagglutinin und Neuraminidase sind geeignet, eine effiziente Antikörperantwort auszulösen. Dabei sind IgA-Antikörper gegen Hämagglutinin, die auf die Oberflächen des respiratorischen Traktes sezerniert werden, von entscheidender Bedeutung. Sie spielen bei einer Reinfektion die Schlüsselrolle. Eine lokale IgM-Antikörper-Sekretion wird ebenso beobachtet, wie Serumantikörper der Klassen IgM, IgG und IgA nachweisbar sind. Die Lyse der infizierten Zellen wird durch zytotoxische T-Zellen und NK-Zellen vermittelt, aber auch durch Antikörper-vermittelte Komplementaktivierung.

4. Chemokine

Die Bezeichnung "Chemokine" leitet sich aus "*chemo*attractant cyto*kines*" ab und benennt solche Zytokine, die die Funktion der Anlockung von Leukozyten erfüllen, also chemotaktisch wirksam sind. Die Zahl der beschriebenen Chemokine ist inzwischen auf über 60 angestiegen. Chemokine werden von den unterschiedlichsten Zellen sezerniert und bilden im Extrazellulärraum einen Gradienten aus, an dem sich Leukozyten entlangbewegen, um an den Ort der Entzündung zu gelangen. Dabei sind die Chemokine an Molekülen der extrazellulären Matrix fixiert (Haptotaxis) (Tanaka et al., 1993). Proteoglykanbindungsstellen (beispielsweise für Heparin) der Chemokine gewährleisten die Retention in der extrazellulären Matrix. Chemokine leiten Signale weiter, die zur Reorganisation des Zytoskeletts führen, sie aktivieren Integrine und andere Rezeptoren, die zur erhöhten Adhäsion an Endothelzellen und Migration der Zellen führen (Schall et al., 1994; Imhof et al., 1995). Sie können Zellen zu erhöhter Funktion aktivieren und induzieren die Degranulation.

4.1. Struktur und Funktion der Chemokine

Chemokine sind Moleküle aus ungefähr 70-80 Aminosäuren, deren Tertiärstruktur durch die Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen dem ersten und dritten bzw. zweiten und vierten Cysteinrest bestimmt wird. Die Sequenzhomologie zwischen den Familien der Chemokine CC und CXC beträgt lediglich 20%, aber dennoch weisen Strukturanalysen auf ähnliche dreidimensionale Strukturen hin (Gronenenborn et al., 1991).

Die vier Familien der Chemokine unterscheiden sich in den Cystein-Resten am Amino-Terminus des Moleküls. Üblicherweise werden die Chemokine anhand der Position der ersten beiden Cystein-Reste unterteilt (Baggiolini et al., 1994): C-, CC-, CXC-und CX_3C-Chemokine.

Den Vertretern der C-Familie fehlen der erste und dritte der vier konservierten Cystein-Reste. Als einziger Vertreter der C-Chemokine ist bis heute das Lymphotaktin bekannt, es wirkt ausschließlich auf Lymphozyten chemotaktisch (Kelner et al., 1994).

Die CXC-Familie besitzt im Gegensatz zu den Mitgliedern der CC-Familie eine beliebige Aminosäure zwischen den zwei Cysteinen. Die strukturelle Einteilung der Chemokine scheint im wesentlichen mit dem Wirkungsspektrum übereinzustimmen: die meisten CXC-Chemokine attrahieren neutrophile Granulozyten, während CC-Chemokine vorwiegend mononukleäre Zellen anlocken.

Innerhalb der CXC-Gruppe unterscheidet man die Proteine mit ELR-Motiv (Glutaminsäure-Leucin-Arginin) in der aminoterminalen Region der konservierten Cysteinreste von denen ohne ELR-Motiv, wobei die Vertreter der CXC-ELR-Gruppe auf neutrophile Granulozyten chemotaktisch wirken (z.B. IL-8/CXCL8, GRO-α/CXCL1), die chemotaktische Wirkung der Proteine ohne ELR-Motiv (z.B. IP-10/CXCL10, MIG/CXCL9) dagegen gleicht der der CC-Chemokine (z.B. MCP-

1/CCL2, MIP-1α/CCL3, RANTES/CCL5), die vorzugsweise auf mononukleäre Zellen wirken.

Die Familie der CX_3C-Chemokine weist entsprechend drei Aminosäuren zwischen den ersten beiden Cystein-Resten auf und verfügt weiterhin über die Besonderheit der Membranständigkeit. Die zuerst als voneinander unabhängige Vertreter der CX_3C-Gruppe beschriebenen Chemokine Fractalkine, das auf aktivierten humanen Endothelzellen entdeckt wurde (Bazan et al., 1997) und Neurotactin (Pan et al., 1997), welches verstärkt auf aktivierten murinen Mikrogliazellen des Gehirns gefunden wurde, erwiesen sich als identische Moleküle (CX_3CL1). Fractalkine weist eine 18 Aminosäuren lange, hydrophobe Sequenz auf, welche den Membrananker bildet. Membranständiges Fractalkine kann auf primären Endothelzellen durch proinflammatorische Zytokine induziert werden und bindet dann Monozyten und T-Lymphozyten. Auch die lösliche Form des Fractalkins zeigt deutlichen, chemotaktischen Einfluss auf diese Zellen. Die Chemokindomäne des als Neurotactin bezeichneten Moleküls wurde von Pan et al. als ausschließlich auf neutrophile Granulozyten wirkend beschrieben. Bereits Ende des Jahres 1997 konnte der CX_3C-Rezeptor für Fractalkine beschrieben werden (Imai et al., 1997).

Neben der klassischen Einteilung der Chemokine anhand ihrer Struktur ist man dazu übergegangen, die allgemeine Funktion der Chemokine als Kriterium heranzuziehen. Die eine Gruppe wird von Chemokinen vertreten, die durch inflammatorische Stimuli induziert oder hochreguliert werden und somit in entzündlichen Reaktionen involviert sind, sie werden als "inflammatorische Chemokine" beschrieben. Dazu gehören die oben genannten Chemokine wie IL-8/CXCL8, GRO-α/CXCL1, MCP-1/CCL2, -2/CCL8, -3/CCL7, -4/CCL13, RANTES/CCL5, MIP-1α/CCL3 und MIP-1β/CCL4.
Die zweite Gruppe sind die sogenannten "konstitutiven Chemokine"; diese werden im Knochenmark, im Thymus und in sekundären lymphatischen Organen gebildet und sind verantwortlich für die Kontrolle der Leukozytenwanderung und die Regulation der miteinander kommunizierenden Zellen, die eine Immunantwort ausbilden sollen (Yoshie et al., 1997). Vertreter dieser Gruppe sind SLC (secondary lymphoid tissue chemokine) /CCL21, ELC (EBV-induced molecule 1

ligand chemokine = MIP-3β)/CCL19, DC-CK1 (dendritic cell chemokine 1) /PARC (pulmonary and activation-regulated chemokine) /CCL18, MDC (macrophage-derived chemokine) /CCL22 und TARC (thymus and activation-regulated chemokine) /CCL17.

Eine neue Nomenklatur wurde 2000 von Zlotnick et al. vorgeschlagen, in der die Chemokine wie die Rezeptoren durchnummeriert werden. Entsprechend der Familienzugehörigkeit werden die Moleküle als CCL (CC-Chemokin-Ligand) + Nummer, CXCL+Nummer oder CX_3CL+Nummer eingeordnet. In dieser Arbeit werden sowohl der alte Name als auch die neue Bezeichnung verwendet.

Tab. 1: Chemokin-Familien und eine Auswahl ihrer Vertreter.

Familie	Chemokin	Abkürzung für	Produzenten	Zielzellen
C	LTN	Lymphotactin	T, NK, Mast	T, NK
CC	MIP-1α/ CCL3	Macrophage Inflammatory Protein –1α	M, T, B, F	M, T, NK, N, Baso, Eo, Mast, DC, B
	MIP-1β/ CCL4	-1β	M, T; B; F	M, T, NK, DC
	MCP-1/ CCL2	Monocyte Chemoattractant Protein-1	M, N, F, Kera, Endo	M, T, B, DC, NK
	MCP-2/ CCL8	-2	M	M, T, Eo, Mast
	MCP-3/ CCL7	-3	M	M, T, Baso, Eo, DC
	MCP-4/ CCL13	-4	F, Endo	
	RANTES/ CCL5	Regulated on Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted	T, M, P	M, T, NK, Eo, DC, Baso
	TARC/ CCL17	Thymus and Activation-Regulated Chemokine	DC, Kera	T
	PARC/ CCL18	Pulmonary and Activation-Regulated Chemokine	M, DC	T
	MDC/ CCL22	Macrophage-Derived Chemokine	M, DC	T
CXC	IL-8/ CXCL8	Interleukin-8	M, N, T, F, Endo, Kera	N, T M, NK, Baso, Eo
	GRO-α/ CXCL1	Growth Related Oncogene-α	M, N, F, Kera, Endo	N, T
	GRO-β/ CXCL2	-β	M, N, F, Endo	N
	GRO-γ/ CXCL3	-γ	M, N, F, Endo	N
	NAP-2/ CXCL7	Neutrophil Activating protein-2	M, Endo	N
	IP-10/ CXCL10	IFN-γ–inducible Protein-10	M, F, Kera, Endo,	T, NK, M, Kera
	MIG/ CXCL9	Monokine Induced by IFN-γ	T	T, M, Endo

	SDF-1/ CXCL12	Stromal Cell Derived Factor-1	M, Endo	B, T, M, P
CX_3C	**Fractalkine/ Neurotactin/ CX_3CL1**		Endo, Mikroglia	T, M, N, NK

Abkürzungen: B: B-Lymphozyten; Baso: basophile Granulozyten; DC: dendritische Zellen; Endo: Endothelzellen; Eo: eosinophile Granulozyten; F: Fibroblasten; Kera: Keratinozyten; M: Monozyten; Mast: Mastzellen; N: neutrophile Granulozyten; NK: natürliche Killerzellen; P: Thrombozyten; T: T-Lymphozyten.

4.2. Chemokinproduzierende Zellen

Monozyten und Makrophagen können sowohl CC- als auch CXC-Chemokine sezernieren; dazu gehören IL-8/CXCL8 (Schröder et al., 1987), MCP-1/CCL2 (Colotta et al., 1992), MIP-1α/CCL3, MIP-β/CCL4 und RANTES/CCL5. Die Produktion kann beispielsweise durch proinflammatorische Zytokine wie IL-1 und TNF-α induziert werden, ebenso durch LPS und andere mikrobielle Produkte.

Lymphozyten produzieren RANTES/CCL5, MIP-1α/CCL3 und MIP-1β/CCL4, also vor allem CC-Chemokine.
Neutrophile Granulozyten können durch Stimuli wie LPS, PAF oder fMLP (formyl-methionyl-leucyl-Phenylalanin) zur Chemokinproduktion angeregt werden. Dabei handelt es sich um IL-8/CXCL8 (Bazzoni et al., 1991), MCP-1/CCL2 und MIP-1α/CCL3 (Kasama et al.; Pauligk, 1997).

Auch in den meisten Gewebezellen sind Chemokine induzierbar; insbesondere proinflammatorische Zytokine wie IL-1 und TNF-α und mikrobielle Produkte bewirken eine Induktion von CC- und CXC-Chemokinen (Baggiolini et al., 1994).

4.3. Chemokine vermitteln Leukozytenwanderung und -aktivierung

Die Voraussetzungen, die zur Wanderung von Leukozyten aus dem Gefäßsystem an den Ort der Entzündung erfüllt sein müssen, sind das Vorhandensein entsprechender Adhäsionsmoleküle auf Endothelzellen, die Adhärenz der Leukozyten auf Endothelzellen, die Diapedese und die Einwanderung der Zellen ins Gewebe entlang eines chemotaktischen Gradienten.

Diese Vorgänge laufen in drei Stufen ab ("three step model"; Butcher, 1991): Schwache Interaktionen von Selektinen auf der Endotheloberfläche mit den entsprechenden Rezeptoren (Kohlenhydratepitope von Glykoproteinen) auf Leukozyten erlauben ein "Rollen" der Leukozyten auf dem Endothel ("Rolling"). Die Expression von Adhäsionsmolekülen der β_2-Integrinfamilie (z.B. ICAM-1) kann zum Beispiel durch Zytokine und Chemokine verstärkt werden ("Aktivierung"). Dies führt zu einer verstärkten Adhärenz von Leukozyten an die Endothelzellen und das Entlangrollen endet. Die Leukozyten durchqueren das Endothel (Diapedese) und wandern zum Entzündungsherd ("Extravasation").

Chemokine wirken selektiv auf verschiedene Subpopulationen von Leukozyten; CXC-Chemokine wirken auf neutrophile Granulozyten, CC-Chemokine sowohl auf Monozyten, Lymphozyten und NK-Zellen, als auch auf basophile und eosinophile Granulozyten (Schall et al., 1994). Diese Selektivität gegenüber den Zielzellen ist eine wichtige Voraussetzung für die Regulation einer gerichteten, differentiellen Leukozytenwanderung.
Für das CX_3C-Chemokin Fractalkine konnte gezeigt werden, dass die auf aktivierten Endothelzellen exprimierte Form eine verstärkte Adhärenz der Zielzellen vermittelt (Bazan et al., 1997). Somit ist es in der Lage, direkt auf den Schritt der Leukozytenextravasation einzuwirken.
Chemokine binden an Proteoglykanmoleküle in der extrazellulären Matrix und auf Endothelzellen. Auf diese Weise werden sie nicht vom Blutstrom weitergespült, sondern bilden einen immobilisierten chemotaktischen Gradienten aus, an dem die Leukozyten entlangwandern können (Haptotaxis).

Chemokine bewirken nicht nur die Chemotaxis von Leukozyten, sondern können diese zusätzlich aktivieren. Dazu gehören die Freisetzung intrazellulärer Granula, erhöhte Rezeptorexpression, die Bildung von bioaktiven Lipiden des Arachidonsäurestoffwechsels und die Freisetzung toxischer Sauerstoffmetabolite. IL-8/CXCL8 und GRO-α/CXCL1 werden, in Kombination mit Wachstumsfaktoren, eine Wirkung auf die Regeneration von Geweben zugeschrieben.

Chemokine sind vermutlich auch an der Ausprägung einiger Erkrankungen beteiligt. So ist beispielsweise bei der Psoriasis eine Überproduktion von IL-8/CXCL8 nachgewiesen worden, die für die massive Infiltration mit neutrophilen Granulozyten verantwortlich ist (Schröder et al., 1992). Das IL-8/CXCL8 stammt aus den bei dieser Erkrankung stark proliferierenden Keratinozyten. Erhöhte IL-8/CXCL8-Spiegel finden sich weiterhin bei akuten Entzündungen der Lunge (Miller et al., 1992), in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis (Rampart et al., 1992) und bei allergischem Asthma (Marini et al., 1992).

4.4. Chemokinrezeptoren

Chemokine binden an Rezeptoren auf der Oberfläche der Zielzellen, die zur Familie der heptahelikalen (7fach membrandurchspannenden), an G-Proteine gekoppelten Rezeptoren gehören (Rhodopsin-Superfamilie). Die CXC-Chemokine bindenden Rezeptoren werden als CXCRs, entsprechend die CC-Chemokine bindenden als CCRs bezeichnet. Es wurden bisher 6 CXC-Rezeptoren und 11 CC-Rezeptoren identifiziert. Auf Leukozyten wird generell mehr als ein Rezeptortyp exprimiert. Fast alle Chemokinrezeptoren besitzen eine überlappende Ligandenspezifität.

4.4.1. CXC-Chemokinrezeptoren

CXCR1 wird hauptsächlich auf neutrophilen Granulozyten exprimiert, aber auch auf Monozyten, eosinophilen und basophilen Granulozyten und auf bis zu 25%

der Lymphozyten (CD8+ T-Zellen und NK-Zellen) (Chuntharapai et al., 1994). Dieser Rezeptor bindet spezifisch nur IL-8/CXCL8 (IL8RA).

CXCR2 zeigt ein ähnliches Expressionsmuster wie CXCR1, kann aber neben IL-8/CXCL8 (IL8RB) auch GRO-α/CXCL1, GRO-β/CXCL2, GRO-γ/CXCL3, NAP-2/CXCL7 und ENA-78/CXCL5 binden (CXC-Chemokine mit ERL-Muster).

CXCR3 wird nur auf aktivierten T-Helferzellen und zytotoxischen T-Zellen exprimiert, IP-10/CXCL10 und MIG/CXCL9 binden an diesem Rezeptor.

CXCR4 wird neben der Expression auf Leukozyten auch auf anderen Geweben gefunden, beispielsweise auf Organen wie Herz, Gehirn, Leber und Darm. Außerdem konnte seine Funktion als Co-Rezeptor für die HIV-Infektion nachgewiesen werden (Feng et al., 1996). Ligand ist SDF-1/CXCL12.

CXCR5 wurde zunächst auf B-Zellen beschrieben als Rezeptor für BCA-1 (B-cell-attracting chemokine 1) /CXCL13, findet sich aber auch auf CD4 positiven T-Zellen. Neueste Erkenntnis ist die Funktion des CXCR5 als Co-Rezeptor für HIV-2.

CXCR6 findet man auf Subtypen der Th1- und Tc1-Zellen, Ligand ist CXCL16.

4.4.2. CC-Chemokinrezeptoren

CCR1 bindet hochaffin MIP-1α/CCL3 und RANTES/CCL5, auch MCP-1/CCL2.

CCR2 liegt in zwei Splicing-Formen vor, wobei sich die Signaltransduktion unterscheidet, nicht die Bindung der Liganden. Hier bindet MCP-1/CCL2, -2/CCL8, -3/CCL7, und MCP-4/CCL.

CCR3 (Eotaxin-Rezeptor) wird vornehmlich auf Eosinophilen exprimiert und bindet Eotaxin, MCP-1/CCL8, -3/CCL7 und -4/CCL13 sowie RANTES/CCL5. Diesem Rezeptor wird eine wichtige Rolle bei Immunreaktionen auf Allergene zugeschrieben.

CCR4 bindet MIP-1α/CCL3 und MCP-1/CCL2 und ist ein weiterer Rezeptor für RANTES/CCL5. Hier bindet auch TARC/CCL17 und MDC/CCL22.

CCR5 bindet ebenfalls RANTES/CCL5, darüber hinaus MIP-1α/CCL3 und MIP-1β/CCL4. Auch diesem Rezeptor kommt eine Rolle als Co-Rezeptor in der HIV-Infektion zu.

CCR6 bindet MIP-3α/CCL20. Exprimiert wird dieser Rezeptor auf T-Lymphozyten und auf dendritischen Zellen.
CCR7 bindet SLC/CCL21 und MIP-3β/CCL19. Er wird auf B- und T-Lymphozyten sowie auf dendritischen Zellen exprimiert und ist an der Interaktion zwischen diesen und Endothelzellen (HEV) beteiligt.
CCR8 bindet MIP-1β/CCL4 und TARC/CCL17, seine Expression ist auf lymphatisches Gewebe beschränkt und scheint eine Rolle in der T-Zell-Aktivierung zu spielen.
CCR9 bindet MCP-1/CCL2,-2/CCL8, und -4/CCL13, MIP-1α/CCL3 und –1β/CCL4, RANTES/CCL5 und Eotaxin.
CCR10 ist ein weiterer Rezeptor für MCP-1/CCL2 und -3/CCL7.
CCR11 bindet ebenfalls MCP-1/CCL2, -2/CCL8 und –4/CCL13, wurde allerdings noch nicht auf Leukozyten nachgewiesen. Eine Expression wurde in der Lunge, im Herz und im Darm gefunden.

Weiterhin wurde ein Rezeptor kloniert (CX_3CR1), der das CX_3C-Chemokin Fractalkine bindet, sowie der Rezeptor für Lymphotaktin (XCR1).

Alle Chemokinrezeptoren sind durch das G-Protein g_i an Phospholipase β_2 gekoppelt und somit kann das "second messenger system" über Inositoltriphoshat und Diacylglycerol aktiviert werden.

5. Zytokine

Als Zytokine bezeichnet man eine Gruppe von Polypeptiden, die ähnlich Hormonen regulatorische Signale zwischen Zellen vermitteln. Sie entfalten ihre Wirkung durch Bindung an einen spezifischen Rezeptor auf den Zielzellen. Die nachfolgende Proteinsynthese nimmt sowohl Einfluss auf die Zellproliferation und -differenzierung als auch immunregulatorisch auf die Effektorphase der natürlichen und der spezifischen Immunität. Man unterscheidet zwischen Monokinen, die von Makrophagen und Monozyten produziert werden, und Lymphokinen, die lymphozytären Ursprungs sind.

Obwohl die Familie der Zytokine eine hohe Diversität aufweist, teilen sie folgende Gemeinsamkeiten (Abbas, 1994):

1) Zytokine werden in der Effektorphase der unspezifischen und der spezifischen Immunität produziert und regulieren die Immunantwort
2) Die Sekretion der Zytokine ist selbstlimitierend
3) Zytokine wirken auf viele verschiedene Zellen (Pleiotropismus)
4) Die Effekte der Zytokine sind häufig redundant
5) Zytokine beeinflussen die Synthese anderer Zytokine (Zytokinkaskade)
6) Zytokine entfalten ihre Wirkung durch die Bindung an einen spezifischen Rezeptor auf den Zielzellen (autokriner, parakriner oder endokriner Mechanismus)
7) Die Bindung der Zytokine an ihren Rezeptor induziert die Neusynthese von mRNA und Proteinen

Im folgenden werden drei Zytokine beispielhaft dargestellt, die in dieser Arbeit untersucht wurden.

5.1. TNF-α

TNF-α (Tumor-Nekrose-Faktor) wurde ursprünglich als Faktor beschrieben, der zu hämorrhagischen Nekrosen in Tumoren führte (Carswell et al.,1975). Er wird überwiegend von Monozyten und Makrophagen gebildet. LPS ist der stärkste Stimulus, aber auch andere bakterielle Produkte und Viren wirken induzierend. Die Bindung von TNF-α an seine Rezeptoren führt über die Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren, wie z.B. NF-κB oder AP-1, zu einer gesteigerten Transkriptionsrate der induzierbaren Gene. Das Spektrum der biologischen Effekte ist abhängig von der Konzentration des induzierten TNFs. Die Auswirkungen reichen von einer lokalen Entzündungsreaktion über systemische Effekte (wie z.B. Fieber, Akute-Phase-Proteine) bis hin zum septischen Schock. Sie äußern sich unter anderem in einer Steigerung der antimikrobiellen Aktivitäten, Induktion von Zytokinen (IL-1, IL-6, Chemokine), der Induktion eines IFN-ähnlichen, virusprotektiven Effekts, der Expression von

Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen, Aktivierung von Hepatozyten (Produktion von Akute-Phase-Proteinen) und Veränderungen im Gerinnungssystem.

5.2. IL-6

IL-6 wird von vielen verschiedenen Zellen produziert, vor allem von Monozyten, Makrophagen, Fibroblasten und Endothelzellen. Als Stimuli wirken dabei vor allem TNF-α, IL-1 und LPS. IL-6 ist ein Zytokin mit pleiotropen Funktionen, es wirkt vor allem als B-Zell-stimulierender Faktor auf die Ausdifferenzierung und Ig-Sekretion bereits aktivierter B-Zellen und induziert in Hepatozyten die Freisetzung von Akute-Phase-Proteinen, womit es die Entzündungsreaktion unterstützt. Zusammen mit IL-1 wirkt es mitogen auf T-Zellen (Gemsa et al., 1997).

5.3. IL-10

Interleukin 10 wird von CD 4^+ T-Zellen, aktivierten B-Zellen, aktivierten Makrophagen und einigen nicht-lymphatischen Zellen (z.B. Keratinozyten) produziert. Die wesentlichen regulatorischen Effekte sind die Suppression der Zytokinproduktion (z.B. TNF-α, IL-1, Chemokine, IL-12) durch Makrophagen, sowie die Inhibition der T-Zellaktivierung durch Makrophagen (Reduktion der MHC II-Expression und weiterer kostimulatorischer Moleküle). Resultat ist eine Inhibition der T-Zell-vermittelten Immunantwort. IL-10 zeigt darüberhinaus aber auch stimulatorische Aktivitäten, so induziert es z.B. in humanen aktivierten B-Zellen ein Umschalten auf die Produktion von IgG4.

6. Proteasom und Immunproteasom

6.1. Struktur und Funktion des 20S Proteasoms

Peptide, die über MHC I- Moleküle zytotoxischen T-Zellen als Antigene präsentiert werden, entstehen durch den Abbau intrazellulärer Proteine. Die selektive Degradation findet in sogenannten 20S-Proteasomen statt, die sich im Zytoplasma und Zellkern aller eukaryontischen Zellen befinden. Proteasomen sind große multikatalytische Proteasekomplexe in Form eines Fasses: vier Ringe aus je sieben verschiedenen Untereinheiten umschließen zylinderförmig einen Hohlraum. Die beiden äußeren Ringe setzen sich aus den nichtkatalytischen α-Einheiten zusammen, die den Zugang zum Inneren des Proteasoms kontrollieren und an der Steuerung der Proteolyse beteiligt sind. An sie bindet ein Aktivatorkomplex (PA700), der die Proteine zunächst entfaltet, die sonst nicht durch die enge Öffnung gelangen könnten. Von den sieben β-Untereinheiten der beiden inneren Ringe haben drei katalytisch aktive Zentren, an denen die Spaltung der Peptidbindungen erfolgt: β1 (alternative Benennung Y), β2 (Z) und β5 (X) (Morel et al., 2000).

Die Aufgabe der Proteasomen besteht im Abbau intrazellulärer Proteine, der essentiell für das Überleben der Zelle ist. Woher aber "weiss" das Proteasom-System, welche Proteine abgebaut werden sollen und welche nicht? Die Auswahl erfolgt über eine Markierung mit Ubiquitin, das von verschiedenen Enzymen an das jeweilige Substrat-Protein gebunden wird. Die ubiquitinylierten Konjugate werden von Komponenten des Proteasoms erkannt und proteolytisch abgebaut, wobei das Ubiquitin selbst recycled wird. Es entstehen Peptidfragmente mit Längen von 3-25 Aminosäuren, von denen etwa 15% die für die Antigenpräsentation über MHC I erforderliche Länge von 8-9 AS aufweisen (Groettrup et a., 2001). Für eine optimale Einfügung in die Bindungstasche (und damit eine optimale Präsentation) werden außerdem bestimmte "Ankerreste" am C-Terminus und einer Position innerhalb der Peptidsequenz benötigt, im humanen System sind diese entweder basisch oder hydrophob. Die oben genannten katalytischen Einheiten des Proteasoms generieren solche C-Termini

von MHC I -Liganden durch die Spaltung der Proteine hinter hydrophoben, basischen und sauren AS-Resten, letztere sind allerdings ungeeignet für eine Bindung an das MHC I–Molekül. Außerdem stimmen die Bindungstaschen für AS-Reste im Proteasom nicht genau mit den C-terminalen Ankerresten von optimalen MHC I – Liganden überein, das heisst, vom konstitutiven Proteasom produzierte Peptide sind für die Präsentation an zytotoxische T-Zellen teilweise unzureichend (Groettrup et al., 2001).

6.2. Immunproteasomen

Während einer akuten Immunantwort kann die Antigenpräsentation entscheidend verbessert werden, d.h. beim Abbau von Proteinen entstehen Peptidfragmente, die effektivere Liganden für das MHC I -Molekül sind. Diese werden jedoch nicht durch das konstitutive Proteasom generiert. Vielmehr werden die drei katalytischen β-Untereinheiten ausgetauscht gegen die homologen Komponenten β1i (LMP 2, low-molecular protein 2), β2i (MECL-1, multicatalytic endopeptidase complex-like-1) und β5i (LMP 7), die dann zusammen mit den anderen Einheiten das sogenannte "Immunproteasom" bilden (Griffin et al., 1998). Der Name deutet darauf hin, dass ein solcher Wechsel durch Zytokine wie z.B. IFN-γ und TNF-α induziert werden kann. Durch den Austausch der proteolytischen Einheiten verändern sich die bevorzugten Schnittstellen, so dass das Spektrum der antigenen Peptide variiert wird. In vielen Fällen führt diese Veränderung zu einer effektiveren Präsentation über MHC I, jedoch zeigt sich heute, nach 10 Jahren intensiver Studien, ein relativiertes Bild. So gibt es durchaus Epitope, die nach dem Abbau durch das konstitutive Proteasom erfolgreich präsentiert werden, durch das Immunproteasom dagegen nicht (Groettrup et al., 2001).

Nach einer Induktion der drei βi-Komponenten werden diese in hoher Konzentration synthetisiert und bei einem Überschuss gegenüber den konstitutiv exprimierten während der Zusammensetzung neuer Proteasomen an deren Stelle eingebaut. Hierbei wird ein kooperatives Modell (Griffin et al., 1998) postuliert: gelangen die Einheiten LMP 2 und MECL-1 in das frühe Proteasom, wobei für beide die Anwesenheit der anderen Komponente Voraussetzung ist, wird der

Einbau von LMP 7 gegenüber seinem Homolog X begünstigt. LMP 2 und MECL-1 benötigen für ihre Reifung, durch die das aktive Zentrum freigelegt wird, als dritte Untereinheit LMP 7. Die Komponente X an dieser Stelle würde eine effektive Ausbildung zum reifen Proteasom verhindern. Für das konstitutive Proteasom gilt ebenso die kooperative Inkorporation. Der Einbau von Z in das frühe Proteasom führt zu einer bevorzugten Ergänzung durch die Komponenten X und Y. So liegen insgesamt überwiegend Proteasomen vor, die einheitlich aus konstitutiven oder induzierbaren β-Einheiten bestehen. In wenigen Fällen bilden sich Mischformen, da LMP 7 auch in Abwesenheit von LMP 2 und MECL-1 in ein konstitutives Proteasom integriert werden kann (Griffin et al., 1998). Diese haben jedoch unter Umständen ungünstige Auswirkungen, indem sie Peptide produzieren, die zu Autoimmunität führen könnten. Hier wird der Vorteil des Kooperationsmodells deutlich, das die Bildung homogener Proteasomen begünstigt.

6.3. Induktoren der Komponenten LMP 2, LMP 7 und MECL-1

Am effektivsten werden die drei Komponenten des Immunproteasoms durch das Zytokin IFN-γ induziert. Aber auch andere Mediatoren gelten als Ursache für ihre Expression, wenngleich in geringerem Maße. IFN-α und IFN-β können in bestimmten Zelllinien die Transkription von LMP 2 hervorrufen, jedoch nicht von MECL-1. Durch TNF-α wird z.B. in Endothelzellen LMP 7 induziert, für LMP 2 und MECL-1 besteht der Nachweis auch in nichtprofessionellen antigenpräsentierenden Zellen (Hallermalm et al., 2001). Diese Aufzählung zeigt bereits, dass die Untersuchungen zu dieser Fragestellung noch kein einheitliches Bild aufweisen, möglicherweise auch aufgrund der Unvollständigkeit der bisher analysierten Zellen und Gewebe. Die Induktion von einzelnen βi-Einheiten durch bestimmte Stimuli würde jedoch nur wenig Sinn machen, da nur homogene Proteasomen die volle Funktion erfüllen (s.o.).
Versuche mit LPS zeigten, dass auch durch diesen bakteriellen Stimulus in bestimmten Zellen die Komponenten LMP 2 und 7 induziert werden (McAry et al., 2001). Außerdem steigert es die Expression von PA700, das an das Proteasom bindet und die Proteine vor ihrem Eintritt entfaltet.

Eine erste in vivo-Studie an Mäusen konnte nachweisen, wofür die in vitro-Untersuchungen Anhaltspunkte gaben: den tatsächlichen, quantitativ analysierten Austausch von konstitutiven Proteasomen gegen Immunproteasomen während einer akuten Infektion. Sowohl bei einer Immunantwort gegen Bakterien (Listeria monocytogenes) als auch gegen Viren (Choriomeningitisvirus) findet innerhalb von sieben Tagen ein nahezu vollständiger Ersatz der konstitutiven Proteasomen in der Leber statt (Khan et al., 2001).
In bestimmten Geweben und Zellen findet man Immunproteasomen nicht nur nach einer Induktion während einer akuten Immunantwort: in den lymphoiden Organen wie Milz, Thymus und Lymphknoten werden sie konstitutiv exprimiert. Die dafür verantwortlichen Zellen sind noch nicht genauer definiert, es könnte sich aber um dendritische Zellen handeln. Diese weisen im unreifen Stadium noch beide Proteasomen in gleichen Anteilen auf, nach der Reifung jedoch ausschließlich Immunproteasomen (Macagno et al., 1999). Diese Erkenntnis führte bereits dazu, dass in der Entwicklung von Vakzinen umgedacht wurde, bei denen dendritische Zellen ganz bestimmte Epitope präsentieren sollen (van den Eynde et al., 2001).

6.4. Proteasomen und Virusantigene

Zu den Antigenen, die durch das IFN-γ induzierte Immunproteasom effektiver an zytotoxische T-Zellen präsentiert werden, gehört eine Vielzahl von viralen Epitopen. Dieselben Peptide werden durch die konstitutiven Proteasomen nur unzureichend oder überhaupt nicht prozessiert. Heute kennt man zwei Mechanismen, aufgrund derer die Steigerung der Präsentations-Effektivität erreicht wird. Die Beobachtung von Epitopen des lymphozytischen Choriomeningitisvirus-Nucleoproteins, des Adenovirus E1B und des Hepatitis B-Virus core-Proteins erwiesen ein effizienteres Schneiden am C-Terminus der Peptide durch die Komponenten des Immunproteasoms und damit eine spezifischere Bindung an das MHC I-Molekül (Schwarz et al., 2000; Sijts et al., 2000). Der zweite Mechanismus ist indirekter Natur und konnte für das Influenza-Matrixprotein (M1) und das HIV reverse Transkriptase-Peptid gezeigt werden. Demnach wird das Epitop beim Prozessieren im Standardproteasom zerstört, indem mitten in der entscheidenden Sequenz geschnitten wird. Es bleibt jedoch

erhalten und kann effizient präsentiert werden, wenn die Proteolyse von den Komponenten des Immunproteasoms durchgeführt wird (Gileadi et al., 1999).
Die Funktion der Immunproteasomen beschränkt sich offensichtlich nicht auf eine verbesserte Prozessierung bestimmter Antigene, sie haben auch einen Einfluss auf die Immunantwort, indem sie das Repertoire der beteiligten zytotoxischen T-Zellen modifizieren. So ist beispielsweise in LMP 2-knockout-Mäusen die Anzahl der für ein Influenza-Antigen spezifischen T-Zellklone stark reduziert, obwohl die Antigenprozessierung in gewöhnlichem Ausmaß stattfindet (Chen et al., 2001). Wie diese Modifizierung der T-Zell-Antwort von den Komponenten des Immunproteasoms abhängig ist, muss allerdings noch untersucht werden.

7. Hitzeschock-Proteine (hsp)

Die Familie der Hitzeschock-Proteine ist physiologisch dadurch charakterisiert, dass ein Hitzeschock oder andere Stressfaktoren (z.B. auch verschiedene Viren) als Induktor wirken. Auf molekularer Ebene findet man ein funktionelles Hitzeschock-Element im Promotor der hsp-Gene. Hitzeschock-Proteine werden in allen Pflanzen-, Hefe-, Bakterien- und Säugerzellen z.T. mit großen Homologien untereinander exprimiert. Sie dienen als Chaperone, kontrollieren also die korrekte Faltung von Proteinen während und nach der Biosynthese. Aus dieser Funktion leitet sich ihre zytoprotektive Fähigkeit ab, die zum Schutz der Zelle vor z.B. Sauerstoffradikalen, Endotoxinen, Infektionen, Hypoxie und Fieber beiträgt. Durch Hitzeschock-Proteine können denaturierte oder ungefaltete Proteine erkannt und gebunden werden, was entweder zur korrekten Faltung oder zur proteolytischen Degradation führt. Weiterhin vermitteln sie die Protein-Translokation durch Organellenmembranen, regulieren die Expression von Rezeptoren und die Aktivität verschiedener Enzyme (Sharp et al., 1999). Die Aktivierung der Hitzeschock-Antwort stellt evolutionär eine sehr frühe, primitive Antwort dar. Vermutlich dienen denaturierte Proteine als Stimulus für die Induktion der hsp-Expression. Die Hitzeschockproteine liegen im Zytosol normalerweise an Hitzeschock-Faktoren (HSFs) gebunden vor, dissoziieren aber bei Anwesenheit denaturierter Proteine und binden diese unter ATP-Verbrauch.

Die Phosphorylierung und Trimerisierung von HSFs führt zu deren Translokation in den Zellkern, wo sie an Hitzeschock-Elemente im Promotor der Hitzeschockproteine binden, die daraufhin verstärkt transkribiert werden. Die HSFs migrieren zurück ins Zytosol, binden dort inaktive Hitzeschock-Proteine und inhibieren auf diese Weise die weitere hsp-Synthese (Bruemmer-Smith et al., 2001).

Die Hitzeschock-Proteine erhalten ihre Bezeichnung aufgrund ihrer Molekulargewichte: hsp 100 (ca. 100 kDA), 90, 70, 60, 40 und kleinere, aber auch Ubiquitin gehört zur hsp-Familie. Für einige Faktoren existieren mehrere Gene im menschlichen Genom, die untereinander hohe Homologien aufweisen, so sind z.B. 11 Sequenzen für hsp 70 bekannt.

Die im folgenden näher beschriebenen Hitzeschockproteine wurden im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

7.1. hsp 40

Als molekulares Chaperon ist hsp 40 bei der Biosynthese bestimmter Polypeptide beteiligt, es reguliert deren korrekte Faltung beim Austritt aus den Ribosomen. Weiterhin scheint es im Zusammenhang mit dem Steroidrezeptor eine Rolle zu spielen, indem es zusammen mit hsp 70 und 90 die Zusammensetzung und Erhaltung des Aporezeptors beim Fehlen eines Liganden unterstützt bzw. nach der Ligandenbindung bei der Faltung des aktivierten Rezeptors hilft. Hsp 40 spielt bei der Replikation von Influenza-Viren eine Rolle, indem es als Inhibitor von zellulären Faktoren wirkt, die zur Reduktion der Virusprotein-Synthese führen (Melville et al., 1997).

7.2. hsp 60

Hsp 60 findet sich in den Mitochondrien und anderen Zellkompartimenten. Als Antwort auf Stressfaktoren wird die Expression gesteigert und die intrazelluläre Lokalisation verändert. Bei verschiedenen entzündlichen Krankheitsbildern wie rheumatoider Arthritis und Artheriosklerose beobachtet man ebenfalls eine

gesteigerte hsp 60-Expression. Das Molekül gilt als wichtiges Zielantigen während einer Immunantwort gegen chronische Entzündungen, es wird angenommen, dass es im Zusammenhang mit Autoimmunreaktionen eine Rolle spielt (Habich et al., 2002). Hsp 60 induziert in Makrophagen eine proinflammatorische Antwort mit der Freisetzung von z.B. IL-6 und TNF-α, außerdem steigert es die Genexpression der T_H1-induzierenden Zytokine IL-12 und IL-15. Es stellt sich damit als "Gefahrensignal" in der angeborenen Immunität dar. Als Rezeptoren für die Signaltransduktion wurden TLR 2 und TLR 4 identifiziert, mit denen hsp 60 allerdings keine Bindung eingeht. Ein noch nicht näher beschriebener Rezeptor mit hoher Spezifität für hsp 60 bindet das Protein mit hoher Affinität und vermittelt dessen Endozytose (Habich et al., 2002).

7.3. hsp 70

Obwohl einige der hsp 70-Gene für identische Proteine kodieren, unterscheiden sich diese durch ihre konstitutive (hsp 70-1, hsp-HOM) oder induzierbare Expression (hsp 70-2 und 70-1). Während erstere eine wichtige Stellung während der Zellproliferation und -differenzierung einnehmen, werden die induzierbaren Proteine nach dem Einwirken verschiedener Stressfaktoren synthetisiert, um die zelluläre Homeostase aufrecht zu erhalten. Neben der Chaperonfunktion erzielt dabei das Eingreifen in stressinduzierte Apoptoseprogramme die zellprotektive Wirkung (Bruemmer-Smith et al., 2001). Ein Rezeptor für hsp 70 wie auch für hsp 90 ist der α-Makroglobulin-Rezeptor auf Makrophagen, allerdings wird mindestens ein weiterer mit grösserer Spezifität für hsp 70 postuliert. Die Komplexierung von hsp 70 mit Virusproteinen spricht für eine entscheidende Rolle bei der Replikation verschiedener Viren (Jindal et al., 1992).

7.4. hsp 90

Hsp 90 wird in Eukaryonten- und Bakterienzellen konstitutiv exprimiert, kann aber durch den Einfluss verschiedener Faktoren verstärkt induziert werden. Die

Bindung an die Zielproteine findet in einem nahezu vollendeten Stadium der Faltung statt und unterstützt die Interaktion mit anderen Faktoren oder die Aktivierung durch Ligandenbindung. Als Substratproteine für hsp 90 fungieren überwiegend Faktoren der Signaltransduktion, des Zellzyklus und der Transkriptionsregulation, außerdem einige Virusproteine. Eine ATP-Bindungsstelle am N-Terminus gewährleistet die für die Chaperonfunktion des hsp 90 notwendige ATP-Hydrolyse (Hung et al., 2002).

8. LPS

Lipopolysaccharide sind ein integraler Bestandteil der äußeren Membran der Zellhülle vieler gramnegativer Bakterien. Im chemischen Aufbau lassen sich drei makromolekulare Anteile voneinander unterscheiden, die man, von außen nach innen, als O-Antigen, Kernpolysaccharid und Lipid A bezeichnet (Hahn et al., 1991). Die O-Antigene bestehen meist aus Einheiten von 3 bis max. 20 Hexosemolekülen. Sie liegen der Oberfläche der äußeren Membran als Knäuel auf und bedingen die Oberflächenhydrophilie der Bakterienzelle. Sie sind für die Bildung hochspezifischer Antikörper verantwortlich. Das Kernpolysaccharid ist im Gegensatz zu den O-Antigenseitenketten bei vielen gramnegativen Bakterien weitgehend gleichartig aufgebaut. Es besteht aus zwei Untereinheiten, dem inneren und dem äußeren Kernpolysaccharid. Für die biologische Aktivität des Lipid A-Anteil scheint das Keto-desoxy-oktonat der inneren Einheit von entscheidender Bedeutung zu sein (Cavaillon et al., 1990). Das Lipid A ist für die meisten pathophysiologischen Wirkungen des LPS verantwortlich. Es bildet den "Membrananker" und trägt zu der Funktion der äußeren Membran als Permeationsbarriere entscheidend bei. Lipid A ist ein amphiphiles Molekül mit einer hydrophilen Kopfgruppe und einem hydrophoben Anteil aus Hydroxy-Fettsäureketten. Die Lipid A-Moleküle verschiedener Bakterien unterscheiden sich hinsichtlich der Zuckerreste, der verwendeten Fettsäuren, der Anzahl und Lokalisation der Acylreste, dem Grad der Phosphorylierung und den Substituenten an den Phosphatgruppen. LPS wird zunächst im Serum von LBP (LPS-bindendes Protein) gebunden und interagiert daraufhin mit dem CD 14-

Molekül (Tobias et al., 1986). Dieses vermittelt die Bindung an TLR 4, der intrazelluläre Signale vermittelt und so eine Zellaktivierung induziert (Underhill et al., 2002).

9. Polymyxin B

Polymyxine sind Antibiotika, die aus verschiedenen Stämmen von Bacillus polymyxa isoliert werden. Das Molekül Polymyxin B ist ein pentakationisches zyklisches amphiphatisches Lipopeptid, das sich aus einem Decapeptid und einer Fettsäure zusammensetzt. Es verhält sich stark bakterizid gegenüber gramnegativen Bakterien, wird aber aufgrund seiner schwerwiegenden toxischen Nebenwirkungen nur eingeschränkt therapeutisch eingesetzt (Wiese et al., 1998).

Im Prinzip wirkt Polymyxin B ähnlich wie ein Detergens, das sich in Zellmembranen einlagert. Die zytoplasmatische Membran aller lebenden Zellen stellt eine Barriere dar, die selektiv permeabel ist, aktive Transportfunktion hat und so das Gleichgewicht des Zellinneren kontrolliert. Wird diese funktionelle Integrität zerstört, hat dies den Tod der Zelle oder zumindest schwere Beschädigungen zur Folge. Aufgrund ihres speziellen Aufbaus ist die Hülle der gramnegativen Bakterien besonders anfällig für die zerstörerische Wirkung von Polymyxin B. Anders als eukaryotische Zellen wird sie zusätzlich zur inneren Zytoplasmamembran von einer darüberliegenden Mureinschicht und einer äußeren Membran umgeben. Letztere setzt sich nach außen hin aus eng aneinanderliegenden Lipopolysaccharid (LPS) -Komplexen zusammen, die wiederum aus einer Polysaccharid-Kette (O-Antigen) und Lipid A besteht, das das Molekül in der Membran verankert.

Wie das Antibiotikum diese äußere Lipopolysaccharidschicht durchdringt, um ihr eigentliches Ziel, die zytoplasmatische Membran, zu erreichen, ist auch heute erst in Ansätzen geklärt. Es wird ein Modell postuliert, das sich aus mehreren Schritten zusammensetzt. Aufgrund der negativen Ladung des LPS und der fünffach positiven des Polymyxin B kommt es zu einer elektrostatischen

UNIVERSITÄTSBIBLIOTHEK MARBURG

Interaktion zwischen den beiden Molekülen. Der amphiphile Charakter und die passende Grösse des Ringsystems erlauben dann eine komplette Einlagerung des Polymyxin-Moleküls (London-Kräfte zwischen hydrophoben Teilen), was die Neutralisierung der Ladung und eine Abnahme des Ordnungsgrades der Membran zur Folge hat (Koch et al., 1999). Das Antibiotikum kann daraufhin allein oder zusammen mit Lipidmolekülen transiente, wassergefüllte Läsionen bilden. Im Fall von asymmetrischen Membranen, wie sie bei gramnegativen Bakterien vorliegen, sind diese Poren groß genug, um die Polymyxin-Moleküle durch die Doppelschicht diffundieren zu lassen (self-promoted transport) (Wiese et al., 1998).

10. Zielsetzung

Die Wechselwirkungen zwischen humanen Monozyten und Influenza A-Viren wurden in der Vergangenheit in einer Vielzahl von Studien untersucht. Bevor die infizierten Monozyten durch Apoptose sterben, leisten sie einen essentiellen Anteil an der Ausbildung der spezifischen Abwehrreaktion: Durch die Freisetzung von CC-Chemokinen infiltrieren weitere mononukleäre Phagozyten das infizierte Gewebe, Zytokine aktivieren verschiedene Immunzellen. Die Präsentation von Virusantigenen an T-Zellen induziert die spezifische zelluläre Immunantwort.

Ziel dieser Arbeit war es, die Interaktion zwischen Influenza A-Viren und Monozyten näher zu analysieren, sowie die Voraussetzungen für eine effiziente Immunantwort zu charakterisieren. Zunächst sollte die Transkriptionsaktivität in A/PR/8-infizierten Monozyten anhand der cDNA-Subtraktionsmethode und von cDNA-Microarrays untersucht werden. Mithilfe dieser beiden Methoden sollten sowohl durch Influenza A-Virus induzierte als auch nach Infektion supprimierte Gene kloniert und identifiziert werden.

In weiterführenden Untersuchungen sollte untersucht werden, ob eine Influenza-Infektion in Monozyten neben Zytokinen und Chemokinen auch Hitzeschockproteine (hsp) induziert. Diese wirken zellprotektiv beim Einfluss

verschiedenster Stressfaktoren und können als endogene Liganden von TLR 4 eine Immunantwort induzieren.

Über welche Rezeptoren virusinduzierte Signale ins Zytoplasma vermittelt werden, die zur Induktion der Immunantwort führen, war bislang unbekannt. In dieser Arbeit sollte daher untersucht werden, ob pattern recognition receptors wie TLR und CD 14 für die Signalweiterleitung nach Influenza-Infektion verantwortlich sind. Hierfür wurden Versuche mit blockierenden Antikörpern und knockout-Mäusen durchgeführt. Außerdem sollte die Regulation dieser Moleküle nach A/PR/8-Infektion auf transkriptioneller und translationeller Ebene analysiert werden, um mögliche Konsequenzen für die Induktion einer Immunantwort nach Sekundärinfektionen wie z.B. gramnegative Bakterien oder Mycoplasmen ableiten zu können.

Eine effektive Immunantwort ist abhängig von der optimalen Präsentation über MHC I-Moleküle. Da bestimmte Antigenfragmente ausschließlich über das sogenannte Immunproteasom generiert werden können, sollte als ein weiterer Schwerpunkt in dieser Arbeit untersucht werden, ob eine Influenza-Infektion Veränderungen in der Zusammensetzung des Proteasomkomplexes bewirkt.

II. Material und Methoden

1. Medien, Zellkulturen und Virusstamm

1.1. Medien

Soweit nicht besonders vermerkt, wurde in allen Versuchen das Zellkulturmedium RPMI 1640 verwendet, welches mit den nachfolgend aufgeführten Lösungen Glutamin (Endkonzentration 2 mM), HEPES (Endkonzentration 50 mM), nichtessentielle Aminosäuren (Endkonzentration 1 %), Penicillin/Streptomycin (Endkonzentration 50 U/ml bzw. 50 mg/ml) und Pyruvat (Endkonzentration 2 mM) zu RPMI 1640^{sup} vervollständigt wurde. Je nach Bedarf wurden unterschiedliche Mengen humanen AB-Serums hinzugefügt.

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

Weitere Lösungen:

PBS-Dulbecco:

PBS $^{def.}$: ohne Mg^{2+}/Ca^{2+}-Ionen	Biochrom, Berlin
PBS ^{plus}: mit Mg^{2+}/Ca^{2+}-Ionen	Biochrom, Berlin

1.2. Zellen

1.2.1. Primäre Zellen

Die Präparation und Isolation humaner Monozyten erfolgte aus frischem Venenblut gesunder Blutspender, das freundlicherweise von Prof. Dr. V. Kretschmer, Zentrum für Transfusionsmedizin der Universitätsblutbank Marburg, zur Verfügung gestellt wurde.

1.2.2. MDCK II

MDCK II-Zellen (Madin and Darby Canine Kidney) sind Nierenepithelien, die 1958 aus einem Cockerspaniel isoliert wurden (Fuller et al., 1984). Die Linie diente zur Bestimmung von Influenza A-Virustitern. Sie ist nur wenig trypsinempfindlich, so dass diese Protease für bestimmte Untersuchungen den Zellkulturüberständen zugesetzt werden kann, ohne den Zellen z.B. in einem Plaquetest zu schaden.

Als Grundmedium für die Kultivierung der MDCK II Zellen diente MEM (Minimum Essential Medium)-EARLE mit 2,2 g/l $NaHCO_3$ ohne L-Glutamin (Biochrom, Berlin). Dieses wurde mit 10% FCS (Biochrom, Berlin) und den unter 1.1. aufgeführten fünf Supplementen ergänzt.

Die Zellkulturen wurden als offenes System in einem Auto-Zero-Brutschrank (Heraeus, Hanau) bei 37°C, ca. 95% relativer Luftfeuchte und Begasung mit 5% CO_2 inkubiert.

Die Zellkultur- und sonstigen sterilen Arbeiten wurden in einer Laminar-Flow-Box (HLB 2448; Heraeus) durchgeführt.

Alle Zellzählungen wurden in einer Neubauer-Zählkammer durchgeführt.

Alle in der Zellkultur verwendeten Substanzen wurden auf Mycoplasmen- und Endotoxinkontaminationen überprüft (siehe 1.3.). Ungeeignete Reagenzien wurden verworfen.

Sämtliche Zentrifugationsschritte wurden, wenn nicht anders angegeben, in einer Tisch-Zentrifuge (Hettich Rotanta/RP Rotor max. 4000 rpm; Hettich, Tuttlingen) durchgeführt.

1.3. Testsysteme in der Zellkultivierung

1.3.1. Überprüfung der Zellkulturen auf Mycoplasmen

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

Zum Nachweis wurde der Mycoplasma Detection Kit (Boehringer Mannheim) verwendet. Die Auswertung erfolgte über ein Plattenphotometer (MR 7000; Dynatech, Denkendorf).

1.3.2. LAL-Test (Limulus amoebocyte lysate- test) zum Nachweis von Endotoxin

Um eine unspezifische Aktivierung von Zellen auszuschließen, wurden die für die Zellkulturen verwendeten Medien, Seren, Virussuspensionen und Reagenzien mit Hilfe des Limulus-Tests (Whittaker, Walkersville) auf ihren Endotoxingehalt hin überprüft. Die Werte lagen stets unter der Nachweisgrenze von 0,1 EU/ml.

1.4. Knockout-Mäuse

Die knockout-Mäuse CD $14^{-/-}$, $Tlr2^{-/-}$ und C3H/HeJ ($Tlr4^{-/-}$) sowie die Kontrollmäuse balb/c und C3H/HeN wurden freundlicherweise von Mitarbeitern der Laborgruppe Molekulare Infektiologie des Forschungszentrums Borstel zur Verfügung gestellt.

1.5. Virusstamm

Das verwendete Influenza A-Virus Puerto Rico aus der achten Isolierung wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. H.-D. Klenk, Institut für Virologie in Marburg, zur Verfügung gestellt. Das ursprünglich 1934 isolierte Virus kann aufgrund der vielen Passagen als adaptiert angesehen werden.

2. Methoden

2.1. Isolierung und Anreicherung humaner Blutmonozyten

Als Ausgangsmaterial für die Isolierung von Blutmonozyten wurden frische "buffy coat" Präparationen aus peripherem Venenblut gesunder Blutspender aus der Abt. f. Transfusionsmedizin im Klinikum der Philipps-Universität Marburg verwendet. "Buffy coats" entstehen bei der Separation bestimmter Blutzellen (Herstellen von Erythrozyten- oder Thrombozytenkonzentraten) und enthalten neben den Granulozyten auch hochangereichert periphere, mononukleare Blutzellen (PBMC "peripheral blood mononuclear cells"). Die Präparation der PBMC-Fraktion erfolgte nach der Ficoll-Hypaque-Methode, durch die aufgrund von Dichteunterschieden mononukleare Zellen von anderen Blutzellen getrennt werden (Boyum, 1968). Die PBMC-Fraktion enthält neben Monozyten auch B- und

T-Lymphozyten sowie NK-Zellen. Die weitere Aufreinigung der Monozyten erfolgte unter Verwendung der Counter flow-Zentrifugation (Elutriation).

Die Aufarbeitung erfolgte in 50 ml Zentrifugationsröhrchen (Greiner, Nürtingen). 12 ml vorgelegtes, 25°C warmes Ficoll (Ficoll-Trennlösung, Dichte 1,077 g/ml, Biochrom, Berlin) wurden vorsichtig mit "buffy"-Vollblut überschichtet (Endvolumen ca. 50 ml) und mit 400 x g bei Raumtemperatur für 30 Minuten zentrifugiert. Danach waren die Erythrozyten und Granulozyten als Sediment abgesetzt, die mononuklearen Zellen in einer Interphase oberhalb des Ficolls angereichert und die Thrombozyten in dem darüber liegenden Serum ankonzentriert. Um die Ficoll-Lösung sowie restliche Erythrozyten und Thrombozyten zu entfernen, wurde nach Abnahme der oberen Phase die Interphase sorgfältig abpipettiert, mit 4°C kaltem PBS^{def} verdünnt und gewaschen. Zur Durchführung dieser Waschschritte wurden zwei Zentrifugationen bei 4°C mit 350 x g für 7 Minuten durchgeführt. Das Sediment wurde jeweils mit kaltem PBS^{def} vorsichtig, um eine Voraktivierung zu vermeiden, resuspendiert und auf 50 ml mit kaltem PBS^{def} aufgefüllt. Für die anschließende Aufreinigung der Monozyten durch die Elutriationsmethode wurde die PBMC-Fraktion nach der letzten Zentrifugation in insgesamt 40 ml $RPMI^{sup}$ aufgenommen und direkt im Anschluss elutriiert.

2.1.1. Elutriation ("Counter flow-Zentrifugation")

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

Jede Zelle in der Separationskammer wird in eine Zone wandern, in der ein Gleichgewicht zwischen ihrer Sedimentationsrate und der durch die Fließgeschwindigkeit des Elutriationsmediums erzeugten Zentripetalkraft herrscht.

Innerhalb der Separationskammer wird durch ihre spezielle Geometrie ein Fließgeschwindigkeitsgradient erzeugt. Hierdurch wird es möglich, Zellen mit verschiedenen Sedimentationsraten in Suspension zu halten. Durch die schrittweise Erhöhung der Flüssigkeitsrate und der dadurch hervorgerufenen Erhöhung der Fließgeschwindigkeit des Elutriationsmediums oder durch die Verringerung der Rotordrehzahl können nach und nach relativ homogene Zellseparationen aus der Kammer ausgespült werden. Jede folgende Separation besteht aus größeren Zellen als die vorhergehende Fraktion (Kung et al, 1981; Grabske et al, 1978; Figdor et al, 1983).

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

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

F = Flüssigkeitsrate in ml/min
X = Kammerfaktor: 0,0511
D = Zelldurchmesser in mm
RPM = Rotorumdrehungen pro min

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

Für die Elutriationsversuche wurde das JE-6B Elutriationssystem mit dazugehörigem Rotor und der Standardseparationskammer verwendet (Beckman, Palo Alto). Die Standardkammer besitzt ein Volumen von 4,2 ml.

Die Durchführung der Elutriation erfolgte bei der konstanten Rotorgeschwindigkeit von 3000 Umdrehungen pro Minute und bei 4°C. Zum Separieren der Zellen wurde die Fließgeschwindigkeit des Elutriationsmediums schrittweise erhöht. Als Elutriationsmedium wurde PBS^{def} + 0,1 % BSA + 0,01 % EDTA verwendet. Pro Elutriationsschritt wurden 300-500 x 10^6 PBMCs eingesetzt.

Für die Aufreinigung der Monozyten wurde die aus "buffy coats" durch Dichtegradientenzentrifugation gewonnene PBMC-Fraktion in 40 ml $RPMI^{sup}$ aufgenommen und mit einer Pumpleistung von 7 ml/min in die Separationskammer eingezogen. Im Anschluss wurde bei 15 ml/min 5 Minuten gespült, um Thrombozyten und Erythrozyten zu entfernen. Durch die weitere schrittweise Erhöhung der Fließgeschwindigkeit bis zu einer Pumpleistung von 28,5 ml/min wurden die in der PBMC-Fraktion enthaltenen Lymphozyten und NK-Zellen fast vollständig ausgewaschen. Mit der Erhöhung der Pumpleistung auf 36 ml/min wurde die Monozytenfraktion in 100 ml Elutriationsmedium separiert.
Die elutriierten Zellfraktionen wurden bei 350 x g für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert, das Sediment resuspendiert und ein Aliquot zur Bestimmung der Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer 1:10 mit Türck's-Lösung verdünnt und ausgezählt.
Für die Kultivierung in 24-Loch-Platten (Falcon® Primaria; Becton Dickinson, USA) wurde die Zellsuspension auf $1{,}5 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt und jeweils 500 µl (0,75 x 10^6 Monozyten) in eine Vertiefung pipettiert. Nach Zugabe von 5% AB-Serum pro Vertiefung wurden die Zellen 1-2 h unter Standardbedingungen inkubiert. In dieser Zeit konnten die Monozyten adhärieren, anschließend wurden sie durch einmaliges Waschen mit 37°C warmem PBS^{++} von nichtadhärenten Zellen befreit. Die verbliebenen Zellen wurden mit 1 ml $RPMI^{sup}$ überschichtet und nach einer Ruhephase von 20-24 h in verschiedenen Versuchen eingesetzt.
Sollte aus den Zellen RNA isoliert werden, wurden 10 x 10^6 Monozyten in 5 ml $RPMI^{sup}$ in Petrischalen (Falcon® Primaria; Becton Dickinson, USA) mit einem Durchmesser von 6 cm ausplattiert und nach einer Ruhephase von 1-2 h einmalig mit PBS^{++} gewaschen. Nach 20-24 h unter Standardbedingungen wurden die Monozyten stimuliert bzw. infiziert wie unter 2.4. beschrieben.
Für die Durchführung von FACS-Analysen ist es entscheidend, dass die Monozyten nicht adhärent sind und als Einzelzellsuspension vorliegen. Dafür wurden 1 x 10^6 Monozyten in 2 ml $RPMI^{sup}$ mit 2% AB-Serum in Teflongefäßen unter Standardbedingungen kultiviert.

2.2. Reinheit der isolierten Monozyten

Die aufgereinigten Monozyten wurden mittels FACS-Analyse auf verunreinigende Zellen untersucht. Diese ergab, dass die Zellpräparationen durchschnittlich über 92% Monozyten enthielten.

2.3. Überprüfung der Zellvitalität

Die Trypanblau-Färbung erlaubt eine Differenzierung zwischen toten und lebenden Zellen. Während sich der Farbstoff in toten Zellen anreichert (Blaufärbung), sind vitale Zellen (ungefärbt) in der Lage, den eingedrungenen Farbstoff aktiv aus dem Zytoplasma zu entfernen (Trypanblau-Ausschluss).
Die präparierten Monozyten wurden auf ihre Vitalität überprüft, indem ein Aliquot der Zellpräparation 1:2 mit 0,25 % Trypanblau-Lösung (Serva, Heidelberg) verdünnt wurde. Nach einer Inkubationszeit von 2 Minuten wurde der Anteil gefärbter und damit toter Zellen in einer Neubauer-Zählkammer mikroskopisch bestimmt.

2.4. Stimulation und Infektion der Monozyten mit LPS und Zymosan bzw. Influenza A/PR/8

Für die Stimulations- bzw. Infektionsversuche wurden die über Elutriation aufgereinigten Monozyten eingesetzt, parallel wurde immer eine unbehandelte Negativkontrolle mitgeführt.
Die Überstände der isolierten Zellen wurden nach der Ruhephase abgesaugt, die Zellen dreimal mit PBS^{++} gewaschen und wieder mit Medium aufgefüllt.
Die Infektion wurde mit 2 MOI infektiösem bzw. inaktiviertem Influenza A/PR/8 durchgeführt. Die Virusadsorption erfolgte über einen Zeitraum von 45 Minuten bei 37°C unter Standardbedingungen, anschließend wurden 2% AB-Serum zugegeben und die Zellen für die angegebenen Zeiten weiter inkubiert.

Die Stimulation der Zellen erfolgte mit LPS in einer Endkonzentration 10 ng/ml. Das LPS (von E. coli 0127, B8W, Difco, Detroit, MI, USA) wurde zuvor mittels Ultraschall (Elma; Transsonic Digital, T 480/H-2) 3 Minuten bei Stufe 9 und 4°C suspendiert.
Für die Stimulation mit Zymosan (Sigma, München) wurden die Monozyten mit einer Konzentration von 15 Partikeln pro Zelle inkubiert.
Nach der Inkubation wurden die Überstände der Zellen, die in 24-Loch-Platten kultiviert worden waren, abgenommen, zellfrei zentrifugiert (1200 x g, 10 Minuten, 4°C), portioniert und die Aliquots bei -70°C aufbewahrt.
Sollte aus den Monozyten die RNA isoliert werden, wurde nach der Inkubation der Überstand abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS^{++} gewaschen. Nach Zugabe von 1 ml Trizol (Gibco BRL, Karlsruhe) wurde weiterverfahren wie unter 2.12. beschrieben.

2.5. Stimulation und Infektion von Makrophagen aus knockout-Mäusen

Die Versuche mit Mausmakrophagen wurden in Zusammenarbeit mit dem Forschungszentrum Borstel durchgeführt.
Aus TLR 2- bzw. TLR 4- knockout-Mäusen und Kontrollmäusen wurden Monozyten aus dem Knochenmark isoliert und zu Makrophagen ausdifferenziert. Die Stimulation erfolgte mit LPS in Dosen von 1, 10 und 100 ng/ml oder MALP (1, 10, 100 und 1000 pg/ml). Eine Infektion der Zellen wurde mit 0,5, 3 oder 20 MOI Influenza A/PR/8 durchgeführt. Nach 18 h wurden die Überstände gewonnen und in ELISAs analysiert.
Versuche mit Makrophagen aus CD 14 knockout-Mäusen wurden analog durchgeführt, die Inkubationszeit betrug hier 24 h.

2.6. FACS-Analyse, Durchflusszytometrie

Mithilfe der FACS-Analyse (fluorescence activated cell sorting) ist es möglich, Zellen bezüglich ihrer Oberflächenantigene, Größe und Granularität zu erfassen.

Die Zellen werden dabei mit spezifischen, fluoreszenzmarkierten Antikörpern inkubiert und danach die markierten Zellen von den unmarkierten in einem elektronischen fluoreszenzaktivierten Zellsortierer abgetrennt. Die Einzelzellen, die in einem feinen Flüssigkeitsfaden hintereinander wandern, werden auf ihre Fluoreszenz hin geprüft, wenn sie einen Laserstrahl passieren. Zellgröße und Granularität werden anhand der Lichtstreuung einer vorderen und seitlichen, um 90° versetzten Lichtquelle gemessen. Durch Markierung mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen können bis zu drei Oberflächenantigene parallel erfasst werden. Die Darstellung der Daten kann als Histogramm erfolgen, in dem Zellzahl gegen Intensität der Fluoreszenz aufgetragen ist, oder als zweidimensionaler Dot Blot, in dem jeder Punkt eine Zelle entsprechend ihrer Fluoreszenz und Größe bzw. Granularität repräsentiert.

Von den in Teflongefäßen kultivierten Monozyten wurden je 100.000 Zellen in Polystyren-Rundbodenröhrchen überführt (12 x 75 mm, Falcon, Becton Dickinson, San Jose) und einmal mit FACS-Puffer (PBS^{def}/1% FCS) gewaschen (Zugabe von 750 µl, Zentrifugation 3 min bei 300 x g, 4°C). Der Überstand wurde dekantiert und die Monozyten resuspendiert. 8 µl der fluoreszenzmarkierten Antikörper wurden dazupipettiert und 30 min bei 4°C im Dunkeln mit den Zellen inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschritten mit FACS-Puffer wurden die Monozyten mit 50 µl 3%igem Formaldehyd (Merck, Darmstadt) auf Eis für 5 min fixiert und anschließend in 100 µl Trägerflüssigkeit (FACSFlow; Becton Dickinson, San Jose) aufgenommen. Die Auswertung erfolgte in einem FACScan (Becton Dickinson, San Jose) unter Berücksichtigung der Signale von je 4000 Zellen.

Verwendete Antikörperlösungen:

anti-CD 14-PE	Pharmingen, Hamburg
anti-HLA-A,B,C-PE	Pharmingen, Hamburg
anti-HLA-DR-PE	Pharmingen, Hamburg
Isotyp-Kontrolle IgG1-PE	Pharmingen, Hamburg
Isotyp-Kontrolle IgG2A-PE	Pharmingen, Hamburg

2.7. Vermehrung und Reinigung von Influenza-Viren

Orthomyxoviren replizieren gut in entodermalem Gewebe, deshalb können sie in 11 Tage alten Hühnerembryonen vermehrt werden, wobei ein Virustiter von 10^9-10^{10} PFU/ml erreicht werden kann (Burnett, 1936; Barrett, 1985). Man injiziert das Virusinokulum in die Allantoishöhle, von der aus sich eine systemische Infektion entwickelt. Die Gewinnung der Viren erfolgt 2 Tage nach Infektion aus der Allantoisflüssigkeit, die durch mehrere Zentrifugationsschritte einschließlich einer Saccharose-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation aufgereinigt wird.

2.7.1. Vorbereitung der Eier und Beimpfung

Befruchtete Hühnereier wurden 11 Tage bei 37°C und einer relativen Luftfeuchte von 40-60% im Inkubator bebrütet und dabei alle 6 Stunden automatisch gewendet. Mit Hilfe einer Schierlampe (Blohm Apparatebau, Hamburg) wurden die Embryonen auf Vitalität (Eigenbeweglichkeit, Gefäßzeichnung) hin überprüft und zur Beimpfung ausgewählt. Nach Markierung der Luftkammergrenze am stumpfen Eipol wurde dort die Kalkschale mit Jodlösung (0,05 Mol J_2/l, Titrisol, Merck, Darmstadt) desinfiziert. Innerhalb der Kennzeichnung wurde die Schale an einer gefäßarmen Stelle angebohrt und 0,2 ml Virussuspension mit einer feinen Kanüle (24G x 1"; 0,55 x 25 mm) vertikal injiziert. Als Virusinokulum diente native virushaltige Allantoisflüssigkeit 1:1000 in PBS^{def} verdünnt. Die Injektionsstelle wurde zum Schutz vor Infektion mit Holzleim verschlossen und die Eier für 2 Tage bei 37°C und 80% Luftfeuchte inkubiert. Vor Ernte der Allantoisflüssigkeiten wurden bereits abgestorbene Embryonen mit Hilfe der Schierlampe aussortiert.

2.7.2. Ernte der Allantoisflüssigkeit

Alle nachfolgenden Schritte erfolgten bei 4°C unter sterilen Bedingungen.

Die Lagerung der verwendeten Eier bei 4°C über Nacht führte zur Gefäßkonstriktion und somit zum Absterben der Embryonen. Nach Desinfektion des Eipols wurde die Kalkschale oberhalb der Luftkammergrenze entfernt und die Allantoisflüssigkeit mit einer Kanüle (20G x 1,5";0,9 x 40 mm) und einer 10 ml - Spritze abgesaugt. Nur klare Flüssigkeit wurde in einem sterilen Glasgefäß auf Eis gesammelt, jede hämorrhargische, dottergelbe oder weisslich trübe Verunreinigung verworfen. Aus jedem Ei konnten 7-12 ml Allantoisflüssigkeit geerntet werden.

2.7.3. Reinigung der Influenza A-Viren

Der erste Zentrifugationsschritt erfolgte 30 min bei 6000 rpm ohne Bremse (Rotor JA-10 Beckman Zentrifuge J21) und diente zur Sedimentation von Zellen und Zelltrümmern.

Das Virus im Überstand wurde durch Zentrifugation für 1 h bei 18000 rpm in Ultra-Clear™-Tubes (Rotor SW 28, Beckman Zentrifuge L7-55) pelletiert, der Überstand verworfen und das Viruspellet mit 500 µl PBS^{def} zur Quellung 1 h auf Eis inkubiert. Das Pellet wurde sorgfältig mittels einer 1 ml-Tuberkulinspritze mit feiner Kanüle resuspendiert. Ein vorher angefertigter, kontinuierlicher 30-55% (w/w) Saccharosegradient (in Ultra-Clear™-Tubes) wurde nun mit der Virussuspension vorsichtig überschichtet und bei 4°C 16 h mit 24000 rpm ohne Bremse (Rotor SW 28) zentrifugiert. Das Virus befand sich danach in einer weisslich trüben Bande im Gradienten (bei ca. 45% Saccharose), die abpipettiert und in kaltem PBS^{def} aufgenommen wurde.

Nach einem letzten Zentrifugationsschritt (1 h bei 24000 rpm, ohne Bremse, Rotor SW 28) ließ man das Pellet erneut in PBS^{def} quellen und resuspendierte wie oben beschrieben. Verbliebene Virusaggregate konnten durch 5 minütiges Zentrifugieren bei 3000 rpm entfernt werden.

2.7.4. Dialyse und Lagerung

Der verwendete Dialyseschlauch (Visking, 1,5-3 nm Porenweite; Roth) wurde in EDTA-Lösung (100 mmol Na_2-EDTA-Lösung; Serva) aufgekocht, um unerwünschte Substanzen wie Glycerin, Spuren von Schwefelverbindungen und Schwermetallen zu entfernen. Die Virussuspension wurde in den Schlauch eingefüllt und 21 h bei 4°C gegen das 500-fache Volumen PBS^{def} dialysiert.

Im parallel durchgeführten Hämagglutinations (HA)-Test (siehe unter 2.8.) wurde der Virustiter in Hämagglutinationseinheiten HAU /ml ermittelt. Das Dialysat wurde auf einen Titer von 10^5 HAU/ml eingestellt und in Aliquots von 250-500 µl bei -170°C gelagert.

Zur Überprüfung der Keimfreiheit wurde die Virussuspension auf verschiedenen Kulturmedien (Thioglykolat-Bouillon, Endo-Agar, Blut-Agar) ausgetestet, zur Feststellung der Endotoxinfreiheit wurde der LAL-Test (siehe 1.3.2.: Limulus Amebocyte Lysate-Test; QCL-1000; Fa. Bio Whittaker) durchgeführt.

2.8. Hämagglutinationstest (HA-Test)

Der HA-Test dient zur quantitativen Bestimmung von Viren, welche die Fähigkeit besitzen, Erythrozyten zu agglutinieren. Man erfasst damit nicht nur die infektiösen, sondern auch die defekten Viruspartikel. Der Test wurde in Mikrotiterplatten (Fa. Greiner) durchgeführt. Nach Herstellung einer Verdünnungsreihe (1:2, 1:4, 1:8,...) in einem Volumen von 50 µl PBS^{++} wurden zu jeder Verdünnung 50 µl einer 0,5% Hühnererythrozytensuspension gegeben. Der Test konnte nach 30 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur abgelesen werden. Erythrozyten, die nicht agglutiniert wurden, sedimentierten unter Knopfbildung. Der HA-Titer wird in hämagglutinierenden Einheiten (HAU/ml) angegeben und stellt den reziproken Wert der höchsten Verdünnungsstufe dar, die noch eine vollständige Agglutination bewirkt.

2.9. Plaque-Test

Der Plaque-Test dient zur quantitativen Bestimmung von infektiösen Viruspartikeln. Nach Herstellung einer geometrischen Verdünnungsreihe aus der zu bestimmenden Virussuspension (10^{-1}-10^{-9}) wurde ein Zellrasen aus permissiven MDCK II-Zellen mit je 333 µl aus den verschiedenen Virusverdünnungen infiziert. Nach einer Adsorptionszeit von 1 h wurden die Zellen mit 0,5% Agar in RPMI 1640 überschichtet, um eine unerwünschte Ausbreitung der Viren per Diffusion durch das Medium zu verhindern. Ein infektiöses Virus führte zur Ausbildung eines "Plaques" (Tobita et al., 1975). Nach einer Inkubation von 3 Tagen wurden die Plaques durch Anfärbung mit Kristallviolett sichtbar gemacht. Der Farbstoff wurde nur von intakten Zellen aufgenommen, die Plaques erschienen als helle Läsionen und konnten ausgezählt werden. Der Virustiter wurde als Anzahl der Plaque-bildenden Einheiten (PFU) /ml angegeben.

Reagenzien und Medien:

2,5 % Trypsin wurde 1:10 verdünnt, davon je 4µl /100µl Probe eingesetzt.

0,5% Agarose-Medium : 0,5 g Agarose L (Behringwerke, Marburg) wurden in 100 ml A.dest. aufgekocht. Parallel wurde zweifach konzentriertes $RPMI^{sup}$ angesetzt:

10 ml $RPMI^{sup}$ (10 x)

je 0,5 ml Glutamin, Pyruvat, HEPES-Puffer, Penicillin/Streptomycin

5,5 ml Bicarbonat (Biochrom, 7.5%)

ad 50 ml A. dest.

Beide Lösungen wurden im Wasserbad auf 41°C gehalten und kurz vor Gebrauch gemischt.

Kristallviolett-Stammlösung

2% (w/v) Kristallviolett (Serva) in:

0,2 Vol 96% -igem Ethanol

0,1 Vol Formalin

0,7 Vol A.dest

Färbelösung

0,1 Vol Stammlösung

0,1 Vol Formalin

0,8 Vol A.dest

2.10. Inaktivierung von Influenza A-Viren

2.10.1. Inaktivierung von A/PR/8 bei 56°C

Eine Hitzeinaktivierung der Influenza A-Viren, bei der das Hüllprotein Neuraminidase zerstört wird, erfolgte über 30 min im 56°C-Wasserbad. Die Zellen wurden mit der Menge des inaktivierten Virus inkubiert, die 2 MOI des infektiösen A/PR/8 entsprach.

2.10.2. Inaktivierung von A/PR/8 durch UV-Bestrahlung

Durch eine Bestrahlung mit UV-Licht wird die RNA im Inneren des Virus zerstört, so dass eine Replikation nicht mehr möglich ist. Die Virussuspension wurde auf Eis für 45 min der UV-Strahlung (Wellenlänge 254 nm) ausgesetzt. Die Inkubation der Monozyten erfolgte mit der Menge, die 2 MOI des infektiösen Virus entsprach.

2.11. ELISA-Technik (Enzyme linked Immunosorbent Assay)

Die durchgeführten ELISAs beruhen auf dem Prinzip der Sandwich-Technik. Hierzu wird ein Antikörper, der gegen die zu testende Substanz gerichtet ist, an eine feste Phase (Kunststoffoberfläche) gekoppelt. An diesen Antikörper bindet das zu quantifizierende Molekül aus der Probe. Ein zweiter biotinylierter Antikörper bindet an andere spezifische Determinanten des Analyten und komplementiert somit das Sandwich. Die MCP-1, MIP-1α, MIP-1β, IL-8, IL-6, IL-10 und TNF-α-ELISAs funktionierten mit einem biotinylierten 2. Antikörper und Zugabe eines Streptavidin-POD-Komplexes. Im Gegensatz dazu wurden bei den GRO-α und RANTES -ELISAs POD-gekoppelte 3. Antikörper eingesetzt, die eine antigene Determinante des zweiten Antikörpers erkennen. Die durch das Enzym Peroxidase umgesetzte Substratmenge ist direkt proportional der Konzentration des gesuchten Analyten.

Die Beschichtung der 96-Loch Mikrotiterplatten (Maxisorp, Nunc; Wiesbaden) erfolgte mit 100 µl der Verdünnung des ersten Antikörpers über Nacht bei 4°C. Zwischen den folgenden Schritten wurde die Platte jeweils dreimal mit Waschpuffer gewaschen (Waschgerät der Firma Dynatech, Denkendorf). Die Inkubationen mit den einzelnen Antikörpern, Proben, Standards und Reagenzien fanden für 1 h bei RT statt. Die Volumina pro Vertiefung betrugen:

250 µl	Blockpuffer
100 µl	Standardverdünnung bzw. Probe (gegebenenfalls verdünnt)
100 µl	2. Antikörper
100 µl	3. Antikörper oder Streptavidin-POD-Konjugat
100 µl	Substrat

Als Substrat für die Peroxidase wurde 1,2-o-Phenyldiamin (OPD, Sigma) eingesetzt.

Die Farbrektion wurde nach 5-10 Minuten mit 25 µl 2,5 M H_2SO_4 (Merck) gestoppt; die Messung erfolgte bei 490 nm im Mikroplattenphotometer (MR 7000;

Dynatech, Denkendorf). Die aktuellen Konzentrationen wurden durch eine Standardreihe mit Hilfe eines geräteinternen Auswertungsprogramms (Advanced Program, Version 3.1) des Photometers berechnet.

Für die Durchführung der ELISAs wurden folgende Lösungen benutzt:

1) Beschichtungspuffer: PBS^{def}

2) Waschpuffer: PBS^{def} + 0,05% Tween 20

3) Block- und Probenverdünnungspuffer: PBS^{def} + 0,05% Tween 20 + 2% BSA

2.11.1. IL-8-ELISA

1. Antikörper:	Maus anti-Human IL-8 (0,5 mg/ml; R&D, Wiesbaden)
	Verdünnung 1:1000 in Beschichtungspuffer
2. Antikörper:	Kaninchen anti-Human IL-8 (1 mg/ml; R&D)
	Verdünnung 1:1000 in Probenverdünnungspuffer
POD-Konjugat:	Streptavidin-Peroxidase-Konjugat (500 U/ml; Boehringer Mannheim)
	Verdünnung 1:10000 in Probenverdünnungspuffer
Standard:	rekombinantes humanes IL-8 (IC Chemikalien, Ismaning)
	Konzentrationsbereich: 50 pg/ml bis 3,125 ng/ml)

2.11.2. GRO-α-ELISA

1. Antikörper:	Maus anti-Human GRO–α (0,5 mg/ml; Sigma, München)
	Verdünnung 1:250 in Beschichtungspuffer
2. Antikörper:	Ziege anti-Human (1 mg/ml; R&D)
	Verdünnung 1:500 in Probenverdünnungspuffer

3. Antikörper:	Esel anti-Ziege IgG Peroxidasekonjugat (1 mg/ml, Dianova, Hamburg)
	Verdünnung 1: 5000 in Probenverdünnungspuffer
Standard:	rekombinantes humanes GRO-α (R&D)
	Konzentrationsbereich: 100 pg/ml bis 6,25 ng/ml

2.11.3. MCP-1 ELISA

1. Antikörper:	Maus anti-Human MCP-1 (0,5 mg/ml; PharMingen, Hamburg)
	Verdünnung 1:500 in Beschichtungspuffer
2. Antikörper:	Kaninchen anti-Human MCP-1 (0,5 mg/ml; PharMingen)
	Verdünnung 1:1000 in Probenverdünnungspuffer
POD-Konjugat:	Streptavidin-Peroxidase-Konjugat (500 U/ml; Boehringer Mannheim)
	Verdünnung 1:10000 in Probenverdünnungspuffer
Standard:	rekombinantes humanes MCP-1 (IC Chemikalien)
	Konzentrationsbereich 200 pg/ml bis 12,5 ng/ml

2.11.4. MIP-1α-ELISA

1. Antikörper:	Maus anti-Human MIP-1α (R&D)
	Verdünnung 1:500 in Beschichtungspuffer
2. Antikörper:	Ziege anti-Human MIP-1α, Biotin-konjugiert (50 mg/ml;R&D)
	Verdünnung 1:625 in Probenverdünnungspuffer
POD-Konjugat:	Streptavidin-Peroxidase-Konjugat (500 U/ml; Boehringer Mannheim)

Verdünnung 1:10000 in Probenverdünnungspuffer

Standard: rekombinantes humanes MIP-1α (IC Chemikalien)

Konzentrationsbereich 200 pg/ml bis 12,5 ng/ml

2.11.5. MIP-1β-ELISA

1. Antikörper: Maus anti Human MIP-1β (0,5 mg/ml; R&D)

Verdünnung 1:250 in Beschichtungspuffer

2. Antikörper: Ziege anti Human MIP-1β Biotin-konjugiert (50 mg/ml; R&D)

Verdünnung 1:2000 in Probenverdünnungspuffer

POD-Konjugat: Streptavidin-Peroxidase-Konjugat (500 U/ml; Boehringer-Mannheim)

Verdünnung 1:10000 in Probenverdünnungspuffer

Standard: rekombinantes humanes MIP-1β (R&D)

eingesetzter Konzentrationsbereich: 50 pg/ml bis 3,125 ng/ml

2.11.6. RANTES-ELISA

1. Antikörper: Maus anti-Human RANTES (1 mg/ml; R&D)

Verdünnung 1:1000 in Beschichtungspuffer

2. Antikörper: Ziege anti-Human RANTES (1 mg/ml;R&D)

Verdünnung 1:500 in Probenverdünnungspuffer

3. Antikörper: Esel-anti-Ziege IgG Peroxidasekonjugat (1 mg/ml; Dianova)

Verdünnung 1: 5000 in Probenverdünnungspuffer

Standard: rekombinantes humanes RANTES (IC Chemikalien)

Konzentrationsbereich: 100 pg/ml bis 6,25 ng/ml

2.11.7. IL-6-ELISA

1. Antikörper: Ratte anti-Human IL-6 (0,5 mg/ml; PharMingen)

Verdünnung 1:1000 in Beschichtungspuffer

2. Antikörper: Ratte anti-Human IL-6, Biotin-konjugiert (0,5 mg/ml; PharMingen)

POD-Konjugat: Streptavidin-Peroxidase-Konjugat (500 U/ml; Boehringer Mannheim)

Verdünnung 1:10000 in Probenverdünnungspuffer

Standard: rekombinantes humanes IL-6 (PBH, Hannover)

Konzentrationsbereich 150 pg/ml bis 10 ng/ml

2.11.8. IL-10-ELISA

1. Antikörper: Ratte anti-Human IL-10 (0,5 mg/ml; PharMingen)

2. Antikörper: Ratte anti-Human IL-10, Biotin-konjugiert (0,5 mg/ml; PharMingen)

Verdünnung 1:10000 in Probenverdünnungspuffer

POD-Konjugat: Streptavidin-Peroxidase-Konjugat (500 U/ml; Boehringer Mannheim)

Verdünnung 1:10000 in Probenverdünnungspuffer

Standard: rekombinantes humanes IL-10 (PharMingen)

Konzentrationsbereich 15 pg/ml bis 1 ng/ml

2.11.9. TNF-α-ELISA

1.Antikörper:	Maus anti-Human TNF-α (1mg/ml; PharMingen)
	Verdünnung 1:400 in Beschichtungspuffer
2. Antikörper:	Maus anti-Human (0,5 mg/ml; PharMingen), Biotin-konjugiert
POD-Konjugat:	Streptavidin-Peroxidase-Konjugat (500 U/ml; Boehringer Mannheim)
	Verdünnung 1:10000 in Probenverdünnungspuffer
Standard:	rekombinantes humanes TNF-α (PharMingen)
	Konzentrationsbereich 300 pg/ml bis 20 ng/ml

2.11.10. ELISAs für den Nachweis muriner Chemokine

Die Überstände, die aus der Kultivierung von murinen Makrophagen gewonnen wurden, wurden in spezifischen ELISAs auf die Freisetzung von JE (murines MCP-1) und MIP-1α untersucht. Hierzu wurde das jeweilige DuoSet® ELISA development system von R&D (Wiesbaden) benutzt und gemäß den Angaben des Herstellers angewendet.

2.12. RNA-Isolierung

Die RNA wurde mit der Trizol-Methode (Gibco BRL über Life Technologies, Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers isoliert und bei -80°C gelagert.

Für die RNA-Präparation wurden die Zellen in 6 cm Gewebekulturschalen (Falcon®-Primaria) mit einer Zellzahl von $10x10^6$ Zellen pro Ansatz kultiviert. Die

Stimulation bzw. Infektion der Zellen erfolgte wie unter 2.4. beschrieben. Danach wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Monozyten einmal mit PBS^{++} gewaschen. Die Zellen jeder Petrischale wurden mit 1 ml Trizol-Reagenz versetzt und bis zur weiteren Bearbeitung bei -80°C gelagert. Das Zelllysat wurde mit Hilfe von sterilen Gummischabern aus den Gewebekulturschalen abgelöst und zum Scheren der DNA mehrfach durch eine Kanüle (24 g) aufgezogen und in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt.

Die isolierte RNA wurde in 30 µl RNAse-freiem Wasser aufgenommen und vermessen. Dazu wurden die Proben (je 1 µl) mit 750 µl A.dest. verdünnt und die optische Dichte bei 260 nm bestimmt (Gilford Response II™ UV-Vis Spectrophotometer). Die Konzentration (C) der in der Probe enthaltenen RNA läßt sich durch folgende Formel errechnen:

$C\ (mg/ml) = OD_{260} \times U \times V$

U = Umrechnungsfaktor (40 für RNA, 50 für DNA)

V = Verdünnungsfaktor (750)

2.13. Northern Blot

2.13.1. Präparation von RNA

Die RNA wurde mit der Trizol-Methode (Gibco BRL über Life Technologies, Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers isoliert und bei -80°C gelagert (s. 2.12.).

2.13.2. Herstellung DIG-markierter RNA-Sonden

Im Northern Blot wurde mRNA mit DIG-markierten antisense-RNA-Sonden detektiert. Diese wurden hergestellt, indem zunächst RNA in cDNA

umgeschrieben, diese dann in einen Vektor kloniert und abschließend als DIG-markierte RNA transkribiert wurde.

Frisch synthetisiertes PCR-Produkt des gewünschten Gens wurde nach den Angaben des Herstellers mit dem Dual Promotor TOPO TA Cloning® Kit (Invitrogen, Karlsruhe) in den pCR® II-Vektor einkloniert. Nachdem durch eine Richtungsanalyse die Orientierung des Fragments ermittelt worden war, folgte eine Linearisierung des Vektors durch Xho I oder BamHI in folgendem Ansatz:

2 µg	Plasmid	
1 µl	Xho I / BamHI	(Gibco, Karlsruhe)
1 µl	10x React 3-Puffer	(Gibco, Karlsruhe)
A.dest ad 10 µl		

Der Verdau erfolgte über 2 h bei 37°C.

Der geschnittene Vektor wurde gefällt und auf einem 1% Agarosegel die Vollständigkeit der Linearisierung überprüft. Zum Umschreiben der cDNA in markierte RNA wurde der DIG RNA Labeling Kit (Sp6/T7) (Roche, Mannheim) verwendet. War der Vektor mit Xho I verdaut worden, wurde die Sonde mit der Sp6-Polymerase geschrieben, im Fall von BamHI mit der T7-Polymerase. Die synthetisierte RNA wurde mit EtOH gefällt und pelletiert, in A.dest aufgenommen und nach der Zugabe von 50% Formamid bei -80°C gelagert.

Zur Verminderung von unspezifischer Hintergrundfärbung wurde eine Präabsorption der Sonde an eine leere Nylonmembran über Nacht bei 68°C durchgeführt.

2.13.3. Agarose-Gelelektrophorese für RNA

Es wurden denaturierende Formaldeyd-haltige Agarosegele benutzt, um bei geringem Probenvolumen einen maximalen RNA-Gehalt zu erhalten. Diese Methode geht auf Lehrbach et al. (1977), Goldberg (1980) und Seed (1992) zurück.

Die drei nach Detektion mit Ethidiumbromid sichtbaren Banden repräsentieren die 28S-, 18S- und 5S-rRNA. Sie geben Aufschluss über die Integrität der RNA und sind Kontrolle über die Einstellung der RNA-Konzentration.

Für die elektrophoretische Auftrennung wurden folgende Lösungen benötigt:

1. MOPS-Puffer (10x):	200 mM 4-Morpholino-propansulfonsäure,	ICN, Meckenheim
	50 mM Natriumacetat	Merck, Darmstadt
	10 mM EDTA (Na_2-Salz)	Merck, Darmstadt
2. Probenpuffer (5x)	750 µl Formamid (deionisiert)	ICN, Meckenheim
	150 µl 10x MOPS-Puffer	
	240 µl Formaldehyd, 37%ig	Merck, Darmstadt
	100 µl Glycerin	Serva, Heidelberg
	80 µl 1% Bromphenolblau	Sigma, München
	180 µl H_2O	
1. Laufpuffer:	1x MOPS-Puffer	
2. Färbelösung:	0,2% Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
	in 0,1 M Ammoniumacetat	Merck, Darmstadt

Vor Benutzung wurden die Elektrophoresekammer, Schlitten und Kämme für 1 Stunde in 3% igem H_2O_2 sterilisiert und anschließend mit sterilem Wasser gewaschen. Für die Herstellung von 100 ml Gelvolumen wurde 1 g Agarose (Gibco BRL über Life Technologies, Karlsruhe) eingewogen und in 95 ml 1x MOPS-Puffer durch Aufkochen gelöst. Nach Abkühlung der Lösung auf 60°C wurden 5 ml 37%iges Formaldehyd (Merck, Darmstadt) unter Schütteln zugegeben und das Gel gegossen.

Der RNA-Ansatz pro Spur setzte sich folgendermaßen zusammen:

2,5 µl Probenpuffer (5x)

10 µl RNA (2-5 µg Gesamt-RNA, in H_2O verdünnt)

Zur Denaturierung basengepaarter Nukleotidabschnitte wurden die RNA-Proben 10 min bei 65°C erhitzt und dann sofort auf Eis gestellt. Der Laufpuffer wurde zunächst nur so hoch eingefüllt, dass er das Gel nicht überspülte. Jeweils 10 µl wurden pro Spur beladen. Damit die Proben ins Gel einlaufen konnten, wurde die Elektrophorese mit 100 mA gestartet, dann die Kammer mit Laufpuffer aufgefüllt und die Elektrophorese mit 4V/cm Elektrodenabstand fortgesetzt.

Nach der Elektrophorese wurde das Gel je nach beabsichtigtem Verwendungszweck wie folgt weiterbehandelt:

Sollte das Gel zur Kontrolle der RNA-Präparation dienen, so wurde es 30 min im Dunkeln in der Färbelösung geschüttelt und danach für 1 Stunde in 0,1 M Ammoniumacetat entfärbt. Die Detektion der RNA erfolgte mit einem UV-Transilluminator (UV-Kontaktlampe Chroma 41; Vetter, Wiesloch) bei kurzwelligem UV-Licht (254 nm).

Sollte das Gel im Northern Blot weiterverwendet werden, wurde es nach der Elektrophorese dreimal für je 20 min unter Schütteln gewässert, um das Formaldehyd auszuspülen.

2.13.4. Blotting

Der Northern Blot ist eine Methode zur vertikalen Übertragung von RNA aus einem Gel auf eine Membran, wo sie schließlich mit komplementären Nukleinsäure-Sonden hybridisieren kann. Bei der Kapillar-Transfer-Methode wandert die RNA aufgrund von Kapillarkräften mit dem Flüssigkeitsstrom aus dem Gel heraus und lagert sich auf der Membran ab (Thomas, 1980; Wahl et al., 1987). Die relativen Positionen der RNA-Banden werden während des Transfers auf die Matrix beibehalten. Somit läßt sich die RNA quantitativ, qualitativ und in ihrer Länge analysieren.

Folgender Transferpuffer wurde verwendet:

20x SSC, pH 7:	3 M NaCl	Roth, Karlsruhe
	300 mM Natriumcitrat	Roth, Karlsruhe

Das gewässerte Gel equilibrierte 15 min in 20x SSC. Die positiv geladene Nylonmembran (Boehringer Mannheim) wurde nach 5-minütiger Wässerung für 10 min in 20x SSC geschüttelt. Als Blotsystem wurde der TurboBlotter™ (Schleicher & Schüll, Dassel) verwendet, bei dem die RNA der Schwerkraft folgend von oben nach unten auf die Membran übertragen wird. Zwischen saugfähigem, zum Teil in 20x SSC getränktem Whatmanpapier lag die equilibrierte Nylonmembran und darüber das Gel (Rückseite nach unten). Um einen Kurzschluss-Kontakt zwischen den ober- und unterhalb des Geles befindlichen Filterpapieren zu vermeiden, wurden die Gelränder mit breiten Parafilm-Streifen ausgelegt. Der Aufbau wurde oben durch eine Brücke abgeschlossen, deren Enden in das Pufferreservoir hineinreichten. Der Transfer erfolgte für 3-4 h bei RT. Um die nach dem Blot immobilisierte RNA kovalent mit der Nylonmembran zu verknüpfen, wurde sie zunächst luftgetrocknet, dann mit der RNA-tragenden Seite einer UV-Strahlung (254 nm) von 1,23 J/cm^2 ausgesetzt (Fluo-Link; Biometra, Göttingen). Die Lagerung der Membran erfolgte kurzfristig bei 4°C oder langfristig bei -20°C.

2.13.5. Nicht radioaktive Hybridisierung

Hybridisierung bezeichnet allgemein die Bildung doppelsträngiger Nukleinsäuren durch Basenpaarung aus zwei vollständig getrennt vorliegenden Einzelsträngen. Stringente Bedingungen gewährleisten eine fehlerlose Basenpaarung zwischen den hybridisierenden Einzelsträngen (McGinnis et al., 1984; Wahl et al., 1987). In der vorliegenden Arbeit wurden zur Hybridisierung der Northern Blot-Membranen Antisense RNA-Sonden benutzt, da RNA/RNA-Hybride stabiler als RNA/DNA-Hybride sind (Bodkin und Knudson, 1985), so dass eine höhere Stringenz und damit höhere Spezifität erreicht werden kann.

Für die Hybridisierungreaktion wurden folgende Lösungen benutzt:

1) 20x SSC, pH 7		s. o.
2) Maleinsäurepuffer	100 mM Maleinsäure	Merck-Schuchardt,
	pH7,5	Hohenbrunn
	150 mM NaCl	Roth, Karlsruhe
3) Blockierungspuffer	10% Blockierungsreagenz	Boehringer,
(10x)	in Maleinsäurepuffer	Mannheim
4) Hybridisierungslösung		
5x SSC mit	2% (w/v) Blockierungsreagenz	Boehringer,
		Mannheim
	50% (v/v) Formamid	ICN, Meckenheim
	0,1% (w/v) N-Laurylsarkosin	Sigma,
		Deisenhofen
	0,02% (w/v) SDS	Serva, Heidelberg
	100 µg/µl denaturierte Salm-DNA	Sigma,
		Deisenhofen
5) Waschlösung 1:	2x SSC mit 0,1% SDS	Serva, Heidelberg
6) Waschlösung 2:	0,1x SSC mit 0,1% SDS	Serva, Heidelberg

Die Nylonmembran mit der kovalent gebundenen RNA wurde 5 min in 2x SSC equilibriert und in Hybridisierungsflaschen (Biometra, Göttingen) eingerollt. Die Prähybridisierung und die Hybridisierung erfolgten in diesen Flaschen im Hybridisierungsofen (Hybaid; Biometra, Göttingen) unter ständiger Rotation. Zur Prähybridisierung inkubierte die Membran zwei Stunden bei 68°C in der Hybridisierungslösung. Diese wurde dann verworfen und durch in Vorversuchen präabsorbierte DIG-markierte RNA-Sonde (50 ng/ml) in Hybridisierungslösung ersetzt. Diese Lösung war mehrfach verwendbar und konnte bei -20°C gelagert

werden. Die Hybridisierungsreaktion erfolgte über Nacht unter hoch-stringenten Bedingungen bei 68°C. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal 10 min in Waschpuffer 1 und zweimal 15 min in Waschpuffer 2 bei je 68°C gewaschen. Sie konnte danach bei -20°C gelagert werden.

2.13.6. Detektion der hybridisierten RNA

Nach dem Blockieren unspezifischer Bindungsstellen wird ein an alkalische Phosphatase gekoppelter anti-DIG-Antikörper an die DIG-markierte RNA-Sonde auf der Nylonmembran gebunden. Die Sichtbarmachung der Komplexe wird durch Zugabe eines Chemolumineszenz-Substrates (CPD-Star, Tropix; Boehringer Ingelheim, Heidelberg) ermöglicht, welches durch die Antikörper-gekoppelte Phosphatase umgesetzt wird. Das Substrat wird nach enzymatischer Dephosphorylierung instabil und zerfällt unter Lichtemission, die auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht werden kann (Holtke et al., 1992; Dubitsky et al., 1992; Vaillancourt et al.,1992). Die Intensität der Lichtemission ist direkt proportional zur Konzentration des vorhandenen Enzyms und somit zur auf der Membran gebundenen spezifischen RNA-Menge.

Folgende Reagenzien wurden benötigt:

1) Waschpuffer, pH 7,5	100 mM Maleinsäure	Merck-Schuchardt,
		Hohenbrunn
	150 mM NaCl	Roth, Karlsruhe
	0,3% Tween 20	Serva, Heidelberg
2) Reaktionspuffer, pH 9,5	100 mM NaCl	Roth, Karlsruhe
	100 mM Tris-HCl	Serva, Heidelberg
	50 mM $MgCl_2$	Merck, Darmstadt
3) Blockierungspuffer	siehe unter 2.13.5.	

4) anti-DIG-AP-Konjugat	polyklonale Schaf-anti-DIG-Fab-Fragmente, konjugiert an alkalische Phosphatase (750 U/ml)	Boehringer Mannheim

Die hybridisierte Membran wurde 5 min im Waschpuffer equilibriert und für 45 min in 1%igem Blockierungspuffer geschüttelt. Das anti-DIG-AP-Konjugat wurde 1:1500 in 1% Blockierungspuffer verdünnt und die Membran 45 min in dieser Antikörperlösung inkubiert. Es folgten drei Waschschritte von je 10 min in Waschpuffer. Die Membran wurde für 5 min in Reaktionspuffer equilibriert, dann für 5 min mit dem Substrat CPD-Star bedeckt (Substrat mehrfach verwendbar; Lagerung dunkel bei 4°C) und feucht in einer Kunststoff-Folie eingeschweißt. Um ein möglichst hintergrundarmes Ergebnis zu erzielen, wurde die Membran für 10 min bei 37°C inkubiert; dabei stellt sich ein Gleichgewicht bei der Chemoluminiszenz-Reaktion ein. Die Membran wurde einem Röntgenfilm exponiert, wobei die Expositionszeiten sehr variieren konnten (wenige Mintuten bis Stunden). Die Filmentwicklung erfolgte mit Chemikalien der Agfa-Gefaert AG, Leverkusen (Entwickler G 152; Fixierer G 354).

2.14. cDNA-Synthese

Das Enzym *Reverse Transkriptase* schreibt RNA in DNA um, Oligo-dT wurde als Primer benutzt.

Zur cDNA-Synthese wurden 2 µg RNA in 12 µl Aqua dest. aufgenommen und mit 1 µl Oligo-dT19-24 (Amersham, Freiburg) für 10 min bei 70°C erhitzt. Sekundär- und Tertiärstrukturen der RNA werden dabei gelöst und die Oligo-dT-Primer an die Poly-A-Region der mRNA angelagert. Die Proben wurden sofort auf Eis gelagert, mit 4 µl Reaktionspuffer (5x; Gibco BRL über Life Technologies, Karlsruhe), 2 µl 0,1M DTT (Gibco) 1 µl 10mM dNTP-Mix (Promega, Mannheim) und 1 µl SuperScript™ (Gibco) gemischt und 1 h bei 42°C inkubiert. Das Enzym wurde anschließend durch Inkubation der Proben bei 94°C 10 min denaturiert.

2.15. Amplifizierung von DNA durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Dieses in-vitro-Verfahren wird zur selektiven Amplifizierung spezifischer DNA-Sequenzen aus einem Gemisch von Nukleinsäuren verwendet. Man nutzt die Fähigkeit von DNA-Polymerasen, einen Einzelstrang zum Doppelstrang ergänzen zu können, wenn ihnen ein kurzer, doppelsträngiger Bereich zur Verfügung steht. Dazu wird die denaturierte DNA, die eine zu amplifizierende Sequenz erhält, mit einem Überschuss von zwei flankierenden, chemisch synthetisierten Oligonukleotiden (Primern) inkubiert. Durch diese Hybridisierung entstehen kurze doppelsträngige DNA-Abschnitte, die als Startpunkte für die DNA-Polymerase dienen, die nun die zwischen den Primern liegenden DNA-Abschnitte zum Doppelstrang ergänzt. Bei Wiederholung der Reaktionsfolge aus DNA-Denaturierung, Hybridisierung der Primer und Polymerisation kommt es nach jedem Zyklus zu einer Verdopplung der vorliegenden DNA-Fragmente. Diese Kettenreaktion führt zu einer exponentiell ansteigenden, selektiven Vermehrung der durch die Primer flankierten DNA-Sequenz. Die Primer-Anlagerung kann spezifisch nur bei hohen Temperaturen erfolgen, so dass eine thermostabile DNA-Polymerase aus dem Bakterium *Thermophilus aquaticus* eingesetzt wird. Diese Taq-Polymerase besitzt ein Temperaturoptimum von 70°C und ist auch für kurze Zeit bei 95°C stabil.

2.15.1. Primerauswahl

Die DNA-Sequenzen der jeweiligen Gene wurden von der Datenbank der „European Molecular Biology Organization" (EMBO; Heidelberg) erhalten.

Gen	Sequenz	Fragment-länge	annealing-Temp.
GAPDH	5'-CGTCTTCACCACCATGGAGA-3' 5'-GCTATACCAGGAAATGAGCTT-3'	300 bp	62°C
CBP	5'-GGTTAGGACTTCCTCCAAA - 3' 5'- AATGCAGTCCACTCTGCTT - 3'	200 bp	56°C
cig 5	5'- TGTGTTCAGGCAACCTCTGA - 3' 5'- CTACTTTGCAGAACCTCACC - 3'	400 bp	58°C
cig 33	5'- AATATGTGTGTGTCTCATCC - 3' 5'- TGCCATGAGGATTAGTAAAG - 3'	200 bp	56°C
hsp 40	5'- CATCAAGAACCGTACTTGAGCA - 3' 5'- CTGCAGGTTGACATTATCTACC - 3'	400 bp	58°C
hsp 60	5'- CGATTAATTCACGAACCGTC - 3' 5'- CAAATCTTGCTCTGGACAC - 3'	400 bp	58°C
hsp 70	5'- ATCTGGAACTATCAATAGAGGC - 3' 5'- AAACTGAGCTATAGCAGGATCT - 3	500 bp	58°C
hsp 90	5'- TATGATTGGCCAGTTCGGTGTT - 3' 5'- GAATTCTCCGTACTCCTCATTAG - 3'	500 bp	56°C

alpha 2	5'- TGTGTACCAAGAACCCATTACC - 3' 5'- GGCAGCCAAGTAATCCTTAAC - 3'	400 bp	60°C
subunit X	5'- TGATCTGTGGCTGGGATAAGAG - 3' 5'- AATAGGATGGAGGATGGGTCAC - 3'	400 bp	60°C
subunit Y	5'- TGCTGATACCCAGGCAGTAGC - 3' 5'- TGACTCTGCAATGGCTGCCAG - 3'	400 bp	60°C
subunit Z	5'- TATGTCACCATGGGTTCTGGC - 3' 5'- TGTCTTACTGGGCCTCAATGC - 3'	400 bp	60°C
LMP 2	5'- TCTCTGGTTCAGCTGCTGATG - 3' 5'- CACCGGCAGCTGTAATAGTGA - 3'	400 bp	60°C
LMP 7	5'- ACTATCTGCGAAATGGAGAACG - 3' 5'- GTACTGGTGCAGCAGGTCACT - 3'	400 bp	60°C
MECL 1	5'- CAGACGCTCTTCAGGTACCAG - 3' 5'- AGGGTTAGTGGCTTCACTGTC - 3'	400 bp	60°C
CD 14	5'- ACTTATCGACCATGGAGC - 3' 5'- AGGCATGGTGCCGGTTA - 3'	400 bp	52°C
TLR 2	5'- GCCAAAGTCTTGATTGATTGG - 3' 5'- TTGAAGTTCTCCAGCTCCTG - 3'	350 bp	52°C
TLR 4	5'- TGGATACGTTTCCTTATAAG - 3' 5'- GAAATGGAGGCACCCCTTC - 3'	550 bp	52°C

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

2.15.2. Amplifizierungsreaktion

Die PCR wurde in 500 µl Eppendorfgefäßen durchgeführt. Zu 1 µl der cDNA wurden je 5 µl 10x Taq-Reaktionspuffer (Perkin Elmer), 0,2 µl Taq-Polymerase (Perkin Elmer) und 1 µl dNTP-Mix (je 10 mM), sense- und antisense Primer (50 pM) zugesetzt und auf ein Endvolumen von 50 µl mit Aqua dest. aufgefüllt. Die Reaktion wurde in einem Touch down Hybaid Theromcycler unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Denaturierung:	5 min	95°C
Amplifizierung:	1 min	95°C (Denaturierung der DNA)
	1 min	s. primer-spezifische annealing-Temperatur
	1 min	72°C (Polymerisation)

Zum Ergänzen von unvollständigen DNA-Doppelsträngen wurde abschließend ein Polymerisationsschritt (5 min bei 72°C) angefügt. Die Anzahl der Amplifizierungszyklen wurde je nach der zu erwartenden PCR-Produktmenge variiert.

2.15.3. Elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte

Die PCR-Fragmente wurden in 1%-Agarose-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt (horizontal system for submerged electrophoresis, BRL, USA). Als Laufpuffer wurde TAE-Puffer eingesetzt.

10 µl des jeweiligen PCR-Produkts wurden mit 2 µl 6x DNA-Ladepuffer versetzt, 2 µl 100 bp-Marker (Pharmacia) auf 10 µl mit Aqua dest. aufgefüllt. Jeweils 10 µl der Probe wurde in die Geltasche aufgetragen und bei 110 Volt aufgetrennt.
Das Gel wurde anschließend für 20 min in Ethidiumbromid gefärbt und die Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht. Das Photographieren der Gele erfolgte mit einem computergestützten Aufnahmesystem (Vilber Lourmat; Fröbel Labortechnik, Wasserburg).

TAE-Puffer:	0,04 M Tris-Acetat 0,001 M EDTA 1,1 ml Eisessig ad 1000 ml A. dest.
Ethidiumbromid:	50 µl Ethidiumbromid ad 100 ml A. dest.
DNA-Probenpuffer:	0,25% (w/v) Bromphenolblau 0,25% (w/v) Xylencyarol gelöst in 30% Glycerin

2.16. cDNA-Subtraktion

Die Methode der cDNA-Subtraktion erlaubt es, unterschiedlich exprimierte mRNA in zwei unterschiedlich stimulierten bzw. aktivierten Zellpopulationen zu untersuchen. In dieser Arbeit wurden dabei unbehandelte Kontroll-Monozyten mit durch Influenza-Virus A infizierten Monozyten verglichen.
Durch Hybridisierung der beiden Proben werden mRNAs, die etwa gleichwertig exprimiert sind, unzugänglich gemacht für eine Vervielfältigung durch PCR, so dass nur Gene dargestellt werden, die in der zu testenden Probe deutlich stärker exprimiert sind. Diese werden nachfolgend sequenziert und mit einer Genbank verglichen.

Ein geeigneter Spender für die cDNA-Subtraktion wurde anhand von Daten ausgewählt, die in verschiedenen Chemokin-ELISAs aus Monozyten-Überständen ermittelt wurden. Parallel zu den Zellen, aus denen die mRNA für die Subraktionsreaktion isoliert werden sollte, wurden Monozyten für 6 h mit LPS (10 ng/ml) stimuliert oder mit A/PR/8 (2 MOI) infiziert. Die Überstände wurden anschließend in verschiedenen Chemokin- und Zytokin-ELISAs analysiert. Entscheidend war dabei, dass die unbehandelten Kontrollzellen nicht unspezifisch vorstimuliert waren, und dass die Chemokinfreisetzung dem für eine Influenza-Infektion bzw. LPS-Stimulation charakteristischen Muster entsprach.
Es wurden zwei kommerzielle Kits verwendet, zunächst der SMART PCR cDNA Synthesis Kit (Clontech, Heidelberg) zum Umschreiben der mRNA in cDNA, dann der Clontech PCR-Select cDNA Subtraction Kit zur Durchführung der Subtraktion. Der Versuchsablauf richtete sich nach den Protokollen des Herstellers. Grundsätzlich wurden Reaktionen dabei *nicht* durch die Zugabe von EDTA gestoppt.

2.16.1. Umschreiben der RNA in cDNA mittels SMART PCR cDNA Synthesis Kit

Verwendet man zum Umschreiben in cDNA nicht mRNA, sondern Gesamt-RNA, haben konventionelle Methoden den Nachteil, dass auch ribosomale RNA transkribiert wird. Dies würde aufgrund ihrer größeren Menge zu einer uneffektiven Subtraktion im nachfolgenden Schritt führen. Statt dessen wurde der SMART PCR cDNA Synthesis Kit benutzt, die daraus erhaltene cDNA konnte direkt im PCR-Select cDNA Subtraction Kit eingesetzt werden.

1 µg Gesamt-RNA wurde zunächst in ss cDNA umgeschrieben. Die Durchführung richtete sich nach den Herstellerangaben, es wurde lediglich statt der reversen Transkriptase aus dem Kit 1 µl SuperScript™ (Gibco BRL über Life Technologies, Karlsruhe) verwendet. Eine abschließende Aufreinigung wurde mithilfe des PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.16.2. Clontech PCR-Select cDNA Subtraction Kit

Die vorbereitete cDNA konnte nun auf Unterschiede in der Genexpression untersucht werden. Dabei wurde die Probe, in der man nach stärker exprimierten Transkripten suchte, als "tester", die Referenz-Probe dagegen als "driver" bezeichnet. Da in dieser Arbeit gleichermaßen von Interesse war, welche Gene durch Influenza-Infektionen supprimiert und welche induziert werden, wurden beide Proben in parallelen Versuchen als tester eingesetzt. Im ersten Fall wurde also die mRNA der infizierten Zellen (driver) von der der Kontrollzellen (tester) subtrahiert, so dass Sequenzen dargestellt werden konnten, die durch die Infektion herunterreguliert wurden und daher in den Kontrollzellen in höherer Konzentration vorlagen. Im zweiten Fall war die mRNA der infizierten Zellen der "tester", so dass Gene nachgewiesen werden konnten, die durch eine Influenza-Infektion induziert oder verstärkt wurden.

Eine Kontroll-Probe für den gesamten Versuch wurde vorbereitet wie folgt:
300 ng einer beliebigen cDNA, in diesem Fall aus den infizierten Zellen gewonnen, wurden mit 750 pg control DNA aus dem Kit (Hae III-verdaute ϕX174 DNA) versetzt und im weiteren Versuch als "tester" geführt. Als "driver" fungierte dieselbe cDNA, allerdings ohne zugesetzte control DNA. Nach einer erfolgreichen Subtraktion sollte ausschließlich die zugesetzte DNA dargestellt werden, da alle anderen Transkripte identisch in beiden Proben vorlagen.

In Abb. 2 ist der Versuchsablauf schematisch dargestellt.

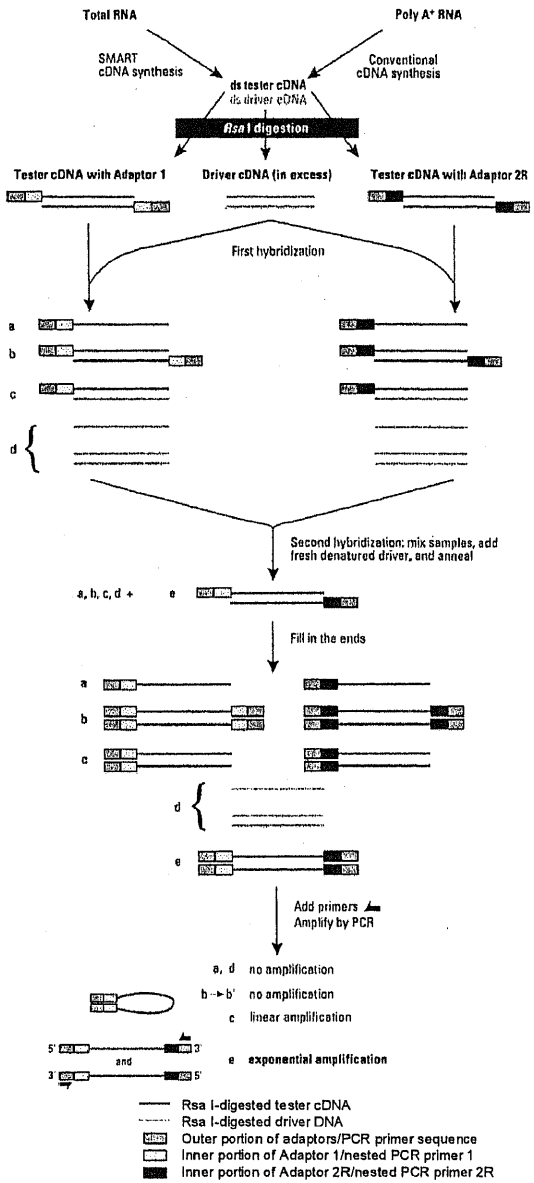


Abb. 2: schematische Darstellung der cDNA-Subtraktion.

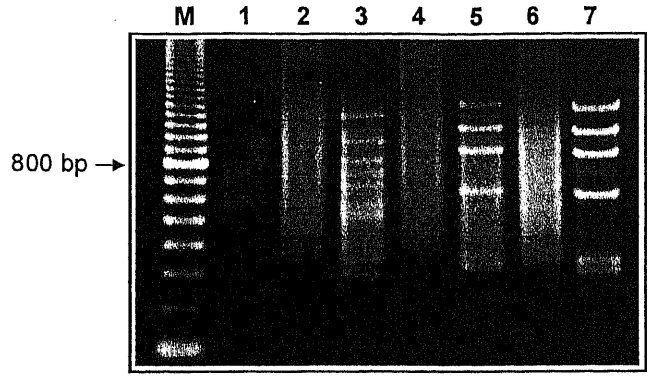
Die Probe, die als tester fungierte, wurde in zwei Hälften aufgeteilt. Diese wurden mit jeweils verschiedenen ds cDNA-Adaptoren ligiert, die driver-Probe blieb unbehandelt. In einer ersten Hybridisierung wurde zu beiden tester-Hälften ein 30facher Überschuss an driver-cDNA gegeben. Nach einer Denaturierung konnten gleiche Sequenzen hybridisieren, was zu den Produkten a-d im 2. Schritt auf Abb. 2 führte. Es fand dabei eine Anreicherung von unterschiedlich exprimierten Sequenzen in Form der Moleküle des Typs a statt, da gleichwertig vorliegende cDNAs vorwiegend Moleküle vom Typ c mit den driver-Fragmenten bilden. Vor der zweiten Hybridisierung wurden die beiden Hälften des testers zusammengeführt und mit frischem driver versetzt. Außer den Produkten der 1. Hybridisierung entstanden nun auch Doppelstränge aus cDNAs mit zwei verschiedenen Adaptoren (e). Diese wurden überwiegend von unterschiedlich exprimierten Sequenzen gebildet.

Im letzten Schritt wurden die Fragmente mittels PCR amplifiziert, um vor allem die regulierten Gensequenzen zu vervielfachen. In einem ersten Zyklus wurden dabei die Enden der cDNAs komplementär zu den jeweiligen Adaptoren komplettiert, die als Ansatzstelle für die Primer der PCR dienten. Es konnten daher keine Moleküle amplifiziert werden, die als Einzelstrang vorlagen (a, d). Moleküle, die an beiden Enden mit demselben Adaptor versehen waren (b), formten aufgrund deren spezieller Sequenz schlingenförmige Strukturen, wodurch eine Vervielfältigung nicht möglich war. Moleküle des Typs c wurden zwar amplifiziert, jedoch nur linear. Lediglich cDNAs, die mit beiden verschiedenen Adaptoren als Doppelstrang vorlagen, wurden exponentiell angereichert und konnten nach einem zweiten PCR-Zyklus (unter Verwendung von nested primers zur Verminderung des Hintergrundes) auf einem Agarosegel dargestellt werden.

2.16.3. Darstellung der cDNA-Fragmente nach der Subtraktion

Im letzten Schritt der cDNA-Subtraktion wurden Genfragmente, die differentiell exprimert waren, durch PCR amplifiziert und damit angereichert. In der anschließenden Gelelektrophorese zeigte sich im Vergleich zu den Ausgangsproben ein verändertes Bild: statt eines Gemisches unterschiedlich langer cDNAs, die sich als "Schmier" darstellten, war nun ein Muster von

definierten Banden zu sehen. In Abb. 3 sind jeweils subtrahierte und nicht subtrahierte Proben nebeneinander aufgetragen. Spur 7 zeigt eine Kontrolle aus dem Kit, in der bereits subtrahierte cDNA (Hae III-verdaute ϕX174 DNA) enthalten war. Im Ansatz der Spur 5 waren, wie in 2.16.2. beschrieben, einer Hälfte zweier identischer cDNA-Proben dieselben Phagen-DNA-Fragmente zugesetzt worden, die in Spur 7 aufgetragen waren. Diese sollten sich nach erfolgreich verlaufener Subtraktion als distinkte Banden im Gel darstellen. Wie Abb. 3 zeigt, ist dies der Fall: neben einem geringen Hintergrunds-"Schmier" sind deutlich die Banden zu erkennen, die auch die Kontrolle der Spur 7 zeigt. Es war daher davon auszugehen, dass die Subtraktion der beiden cDNA-Populationen nahezu komplett stattgefunden hat. Die Spur 1 zeigt den Ansatz, in dem die cDNA der Kontrollzellen als "tester", die der infizierten Monozyten als "driver" diente (s. 2.16.2.). Auf dem Gel erschienen also Sequenzen, die in der Kontrollpopulation stärker exprimiert waren. Es zeigten sich hierbei nur sehr wenige, schwach angefärbte Banden. Wesentlich mehr Genfragmente wies der Ansatz in Spur 3 auf, in dem die Probe der infizierten Monozyten als "tester", die der Kontrollzellen als "driver" diente. Hier fand also eine Anreicherung von mRNA-Sequenzen statt, die durch eine Influenza-Infektion verstärkt induziert wurden.



M: 100 bp- Marker
1 : Kontrolle als tester, subtrahiert
2 : Kontrolle nicht subtrahiert
3 : infizierte Zellen als tester, subtrahiert
4 : infizierte Zellen nicht subtrahiert
5 : Kontroll-Probe, subtrahiert
6 : Kontroll-Probe, nicht subtrahiert
7 : Subtraktionskontrolle (aus dem Kit)

Abb. 3: Darstellung der subtrahierten und nicht subtrahierten Proben sowie Kontrollen im Agarosegel nach Durchführung der cDNA-Subtraktion.
10 µl der amplifizierten Proben wurden auf ein 1% Agarosegel aufgetragen und enthaltene DNA durch eine Ethidiumbromid-Färbung dargestellt.

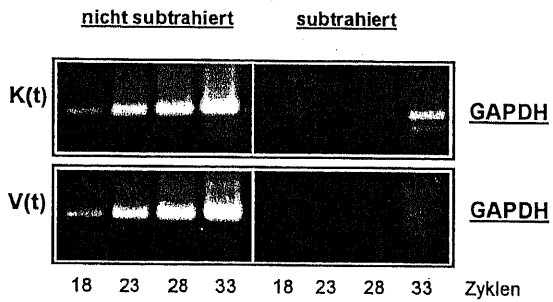
2.16.4. Kontrolle der Subtraktions-Effizienz

Es ist möglich, durch PCRs die Vollständigkeit der cDNA-Subtraktion zu überprüfen. Das Houskeeping-Gen GAPDH zum Beispiel sollte in Kontroll- und infizierten Zellen konstitutiv und gleichwertig exprimiert sein, so dass nach einer erfolgreichen Subtraktion keine cDNA dieser Sequenz mehr in der Probe enthalten wäre und entsprechend keine PCR-Produkte entstehen sollten.

Die Proben aus dem letzten Schritt der cDNA-Subtraktion wurden 1:10 verdünnt und im folgenden PCR-Ansatz eingesetzt:

1 µl	verdünnte Probe	
1 µl	sense Primer (50 pM)	
1 µl	antisense Primer (50 pM)	
3 µl	10x Taq-Reaktionspuffer	(Perkin Elmer)
0,6 µl	dNTP-Mix (je 10 mM)	(Promega, Mannheim)
0,6 µl	Taq-Polymerase	(Perkin Elmer)
22,8 µl	H_2O	

Abb. 4 zeigt die PCR-Analyse der subtrahierten und nicht subtrahierten Proben, in der spezifisch cDNA des housekeeping-Gens GAPDH vervielfältigt wurden. Es wurde sowohl die Subtraktion analysiert, in der die unbehandelten Kontrollzellen als "tester" dienten (K(t)), als auch die Probe, in der von der cDNA der infizierten Zellen die cDNA der Kontrollzellen subtrahiert worden war (V(t)). Um die PCR quantitativ aussagekräftiger zu machen, wurde in 18, 23, 28 und 33 Zyklen amplifiziert. Die Abbildung zeigt, dass in den Ausgangsproben (K(t) und V(t) nicht subtrahiert) bereits ab 18 Zyklen das genspezifische Fragment deutlich nachweisbar ist. Im Gegensatz dazu wurde in den subtrahierten Proben K(t) und V(t) wenig oder kein GAPDH-Produkt synthetisiert, lediglich nach 33 Zyklen zeigt sich eine sehr dünne Bande.



K(t): Kontrollzellen als tester (Subtraktion: Kontrollzellen minus infizierte Zellen)
V(t): infizierte Zellen als tester (Subtraktion: infizierte Zellen minus Kontrollzellen)

Abb. 4: Nachweis von GAPDH-cDNA in subtrahierten und nicht subtrahierten Proben als Kontrolle für die Subtraktionseffizienz.
Die aus dem letzten Schritt der cDNA-Subtraktion erhaltenen subtrahierten und unsubtrahierten Proben (s. 2.16.2., jeweils Kontroll- und infizierte Monozyten als "tester") wurden 1:10 verdünnt als template in einer PCR-Reaktion eingesetzt. Mittels eines GAPDH-spezifischen Primerpaars wurden die entsprechenden Genfragmente in 18, 23, 28 und 33 Zyklen amplifiziert und im Agarosegel aufgetrennt und durch eine Ethidiumbromidfärbung dargestellt.

2.16.5. Klonierung der cDNA-Fragmente

Die im letzten Amplifizierungsschritt der cDNA-Subtraktion gewonnenen cDNA-Fragmente wurden mithilfe des TOPO-TA-Cloning Kit (Invitrogen, Karlsruhe) in kompetente Zellen einkloniert, um sie anschließend zu sequenzieren und mit einer Genbank zu vergleichen.

1 µl frisches PCR-Produkt aus 2.16.2. wurde zusammen mit 3 µl A.dest zu 1 µl pCR2.1-TOPO®-Vektor (Invitrogen, Karlsruhe) gegeben und 5 min bei RT inkubiert. Die bei der PCR angehängten Adenosine binden dabei an einen Tyrosinüberhang im linearisierten Vektor und das PCR-Produkt wird durch eine Topoisomerase eingefügt.
2 µl der Cloning-Reaktion wurden zu einem batch kompetenter Zellen (TOP10F One Shot®, Invitrogen, Karlsruhe) gegeben, vorsichtig vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen ohne Schütteln für exakt 30 sec einem Hitzeschock von 42°C ausgesetzt und für 2 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 250 µl S.O.C.-Medium (Gibco BRL, Karlsruhe) wurde der Ansatz 1 h bei 37°C geschüttelt (225 rpm) und anschließend auf Agarplatten, die mit 50 µg/ml Ampicillin (Boehringer Mannheim, Mannheim) und 1mg X-Gal (Gibco BRL, Karlsruhe) versetzt waren, ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Bakterien, die den Vektor mit einem Insert enthielten, erschienen als weisse Kolonien, Bakterien ohne PCR-Fragment als blaue, da das zur Umsetzung des X-Gal-Farbstoffes benötigte lacZ-Gen nicht vom Insert unterbrochen war.
Weisse Bakterienkolonien wurden gepickt und über Nacht in LB-Medium vermehrt. Zur Überprüfung der Klone wurden die Plasmide mithilfe des QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) isoliert, das Insert wurde durch einen Restriktionsverdau mit EcoRI aus dem Vektor ausgeschnitten. Der Ansatz dafür setzte sich folgendermaßen zusammen:

1 µl	Plasmid	
7 µl	H_2O	
1 µl	10x React 3 -Puffer	(Gibco BRL, Karlsruhe)
1 µl	EcoRI	(Gibco BRL, Karlsruhe)

Die Plasmide wurden 1 h bei 37°C verdaut und anschließend in einem 1% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Inserts wurden dadurch als Fragmente verschiedener Größen sichtbar.

2.16.6. Sequenzierung der einklonierten Fragmente

Die Inserts positiver Klone wurden sequenziert, um sie anschließend mit einer Genbank vergleichen zu können. Dazu wurde der ABI Prism® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit von Perkin Elmer gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. 1 µg Plasmid wurde mit 4 µl Terminator-Mix, 1 µl Sp6-Primer (10 pM, 5´- GCTATTTAGGTGACACTATAG -3´, MWG Biotech, Ebersberg) und 14 µl H_2O gemischt und eine PCR von 25 Zyklen unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

96°C 30 sec
50°C 15 sec
60°C 4 min

Das PCR-Produkt wurde mit H_2O auf ein Volumen von 100 µl gebracht und aufgereinigt, indem die DNA zunächst durch Zugabe von 10 µl 3M Natriumacetat pH 4,8 und 250 µl 100% EtOH gefällt und pelletiert (25 min, 12000 g, RT) und einmal mit 300 µl 70 % EtOH gewaschen wurde. Das Pellet wurde in 2 µl Probenpuffer aufgenommen und vor dem Auftrag auf das Sequenziergel 5 min bei 95°C denaturiert. Die Vorbereitung des 5% Polyacrylamid-Gels sowie der Gellauf wurde freundlicherweise von Mitarbeitern des Instituts für Virologie übernommen. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit denen einer Datenbank (Husar, Heidelberg) verglichen. Die Expression interessanter Gene wurde daraufhin mittels PCR (s. 2.15.) und Northern-Blot (s. 2.13.) in Influenza-nfizierten Monozyten weiter untersucht.

2.17. cDNA-Expressions Array Atlas™

Neben der cDNA-Subtraktion (s. 2.16.) bieten cDNA-Microarrays die Möglichkeit, zwei Zellpopulationen bezüglich unterschiedlicher Genexpression zu untersuchen. Der Vorteil dieser Arrays besteht darin, dass in einem Arbeitsschritt mehrere hundert Sequenzen genau definierter Gene gleichzeitig betrachtet werden. In dieser Arbeit wurde der Atlas™ cDNA Expression Array Human 1.2 (Clontech, Heidelberg) verwendet, mit dem 1176 Gene auf Expressionsunterschiede in verschiedenen Proben analysiert werden können. Die Durchführung richtete sich nach den Angaben im Handbuch.

Humane Monozyten wurden wie unter 2.4. beschrieben in Zellkulturschalen (Primaria, Becton Dickinson, USA) mit einem Durchmesser von 10 cm kultiviert und mit 2 MOI A/PR/8 oder 10 ng/ml LPS infiziert bzw. stimuliert. Zusätzlich wurde eine Kostimulation durchgeführt. Nach Inkubationszeiten von 30 min, 1 h, 3 h und 6 h wurde die Gesamt-RNA nach der Trizol-Methode (s. 2.12.) präpariert und bis zur Weiterverwendung bei -80°C gelagert. Parallele Ansätze wurden auf einer 24-Loch-Platte mit einer Inkubationszeit von 20 h mitgeführt, deren Überstände in verschiedenen ELISAs analysiert wurden. Aufgrund dieser Daten wurden geeignete Spender für den Microarray ausgewählt.
Die cDNAs der 1176 ausgewählten Gene waren auf einer positiv geladenen Nylonmembran fixiert. Die isolierte RNA der zu vergleichenden Zellpopulationen wurde mithilfe des Atlas™ Pure Total RNA Labeling System (Clontech, Heidelberg) in cDNA umgeschrieben und dabei durch ^{32}P radioaktiv markiert. Es folgte eine Hybridisierung, während der in der Probe enthaltene Sequenzen an die auf der Membran fixierten cDNAs binden konnten. Der Kit enthielt vier identische Membranen, so dass parallel vier Proben untersucht werden konnten. Die gebundene Radioaktivität wurde durch einen Phosphorimager (BAS-1000, Fuji, Tokio, Japan) erfasst und unter Verwendung der Software Bio1D (Vilber Lourmat, Frankreich) densitometrisch ausgewertet. Mehrere "housekeeping"-Gene dienten zum Angleichen der Werte verschiedener Membranen.

. Ergebnisse

Differenzielle Genexpression in Monozyten nach Influenza A-Infektion

. Untersuchung regulierter Gene in humanen Monozyten nach A/PR/8-Infektion durch cDNA-Subtraktion

e Methode der cDNA-Subtraktion bietet die Möglichkeit, die differenzielle nexpression in unterschiedlich stimulierten Zellen zu untersuchen. Hierbei wird nächst die mRNA von zwei verschieden behandelten Zellpopulationen in cDNA geschrieben und diese anschließend miteinander hybridisiert. Gleichwertig primierte Sequenzen werden dadurch unzugänglich gemacht für nachfolgende vielfältigungsschritte, so dass nach beendetem Versuchsablauf nur Fragmente gereichert vorliegen, die in der zu analysierenden Probe eine deutlich höhere nskriptionsrate hatten. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, welche Gene närer Monozyten nach einer Infektion mit dem Influenza A-Virus eine gulation erfahren, d.h. stärker exprimiert oder inhibiert werden als in gleichbaren nicht infizierten Kontrollzellen. Induzierte Sequenzen stellten sich , nachdem die cDNA der Kontrollzellen von der der infizierten Monozyten trahiert worden war, also letztere als "tester" (s. II.2.16.2.) eingesetzt wurden. pprimierte (e wurden nachgewiesen, wenn die Kontrollzellen als "tester" nten, von d cDNA die der infizierten Zellen subtrahiert wurde.

1. I n Genen in infizierten Monozyten

di n Genen, die durch eine Influenza-Virus A/PR/8-Infektion uzi mussten die mRNA-Transkripte der unbehandelten tr en der infizierten Monozyten subtrahiert werden. Nach s ktion blieben nur solche Genabschnitte übrig, die durch exprimiert wurden. Diese konnten nach einer Klonierung in d sequenziert werden. Es wurden insgesamt 50 Gene ich mit einer Datenbank ergab, dass 17 davon Sequenzen

entsprachen, denen bisher noch keine definierte Funktion zugeordnet werden kann. Die meisten Sequenzen (23) gehörten erwartungsgemäß zum Genom des Influenza-Virus, mit dem die Infektion der Zellen durchgeführt worden war. Es fanden sich Transkripte für das Nucleoprotein, das Matrix-Protein, Hämagglutinin und die Neuraminidase, einige kamen mehrfach vor. Weiterhin konnten anhand der Datenbank 7 verschiedene funktionelle Gene identifiziert werden, die in Tab. 2 aufgelistet sind.

Tab. 2: Gene mit verstärkter Expression nach Infektion mit Influenza A-Virus (Virus-infizierte Monozyten als tester)

cig 5 (Cytomegalovirus induced gene 5)
cig 33
OMG / Neurofibromatosis Gen
SURF 4-Homolog / hsp 90 ähnlich
MLN 51
Elastin / LIM-Kinase
Cytochrom c-Oxidase / transcription initiation factor II b

1.1.2. Suppression von Genen in infizierten Monozyten

Die Identifikation von Genen, deren Transkription in Monozyten durch eine Influenza A-Infektion reduziert wurde, war möglich, indem die mRNA der Kontrollzellen als "tester" eingesetzt wurde, von der die der infizierten Zellen subtrahiert wurde. So konnten Genabschnitte isoliert werden, deren Transkription durch das Virus supprimiert wurde. Insgesamt wurden 34 Sequenzen kloniert und mit Genbankdaten verglichen. 23 Transkripte waren Sequenzen, deren Translationsprodukt bisher noch keine definierte Funktion zugeordnet werden kann. 11 Gene, die Proteine mit bereits beschriebenen Funktionen kodieren, sind in Tab. 3 zusammengefasst.

III. Ergebnisse

1. Differenzielle Genexpression in Monozyten nach Influenza A-Infektion

1.1. Untersuchung regulierter Gene in humanen Monozyten nach A/PR/8-Infektion durch cDNA-Subtraktion

Die Methode der cDNA-Subtraktion bietet die Möglichkeit, die differenzielle Genexpression in unterschiedlich stimulierten Zellen zu untersuchen. Hierbei wird zunächst die mRNA von zwei verschieden behandelten Zellpopulationen in cDNA umgeschrieben und diese anschließend miteinander hybridisiert. Gleichwertig exprimierte Sequenzen werden dadurch unzugänglich gemacht für nachfolgende Vervielfältigungsschritte, so dass nach beendetem Versuchsablauf nur Fragmente angereichert vorliegen, die in der zu analysierenden Probe eine deutlich höhere Transkriptionsrate hatten. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, welche Gene primärer Monozyten nach einer Infektion mit dem Influenza A-Virus eine Regulation erfahren, d.h. stärker exprimiert oder inhibiert werden als in vergleichbaren nicht infizierten Kontrollzellen. Induzierte Sequenzen stellten sich dar, nachdem die cDNA der Kontrollzellen von der der infizierten Monozyten subtrahiert worden war, also letztere als "tester" (s. II.2.16.2.) eingesetzt wurden. Supprimierte Gene wurden nachgewiesen, wenn die Kontrollzellen als "tester" dienten, von deren cDNA die der infizierten Zellen subtrahiert wurde.

1.1.1. Induktion von Genen in infizierten Monozyten

Für die Isolation von Genen, die durch eine Influenza-Virus A/PR/8-Infektion induziert werden, mussten die mRNA-Transkripte der unbehandelten Kontrollzellen von denen der infizierten Monozyten subtrahiert werden. Nach abgeschlossener Subtraktion blieben nur solche Genabschnitte übrig, die durch eine Infektion verstärkt exprimiert wurden. Diese konnten nach einer Klonierung in E.coli aufgereinigt und sequenziert werden. Es wurden insgesamt 50 Gene analysiert. Der Vergleich mit einer Datenbank ergab, dass 17 davon Sequenzen

entsprachen, denen bisher noch keine definierte Funktion zugeordnet werden kann. Die meisten Sequenzen (23) gehörten erwartungsgemäß zum Genom des Influenza-Virus, mit dem die Infektion der Zellen durchgeführt worden war. Es fanden sich Transkripte für das Nucleoprotein, das Matrix-Protein, Hämagglutinin und die Neuraminidase, einige kamen mehrfach vor. Weiterhin konnten anhand der Datenbank 7 verschiedene funktionelle Gene identifiziert werden, die in Tab. 2 aufgelistet sind.

Tab. 2: Gene mit verstärkter Expression nach Infektion mit Influenza A-Virus (Virus-infizierte Monozyten als tester)

cig 5 (Cytomegalovirus induced gene 5)
cig 33
OMG / Neurofibromatosis Gen
SURF 4-Homolog / hsp 90 ähnlich
MLN 51
Elastin / LIM-Kinase
Cytochrom c-Oxidase / transcription initiation factor II b

1.1.2. Suppression von Genen in infizierten Monozyten

Die Identifikation von Genen, deren Transkription in Monozyten durch eine Influenza A-Infektion reduziert wurde, war möglich, indem die mRNA der Kontrollzellen als "tester" eingesetzt wurde, von der die der infizierten Zellen subtrahiert wurde. So konnten Genabschnitte isoliert werden, deren Transkription durch das Virus supprimiert wurde. Insgesamt wurden 34 Sequenzen kloniert und mit Genbankdaten verglichen. 23 Transkripte waren Sequenzen, deren Translationsprodukt bisher noch keine definierte Funktion zugeordnet werden kann. 11 Gene, die Proteine mit bereits beschriebenen Funktionen kodieren, sind in Tab. 3 zusammengefasst.

Tab. 3: Gene mit supprimierter Expression nach Influenza A-Infektion (Kontrollzellen als tester). Diese Sequenzen waren in Kontrollzellen stärker exprimiert als in infizierten Monozyten.

ST7-Protein
Lipoprotein Lipase
Calmodulin 1 (CALM1)
cap binding protein (CBP / eIF4e)
X-CGD-Gen (chronic granulomatous disease, X-linked)
Cyclophilin-related protein / NK-Tumor recognition protein
mitochondriale DNA (tRNA, Cytochromoxidase, URFs)
Proteasom subunit HC2 (C2)
Fructosebisphosphat Aldolase
Cystatin B (Cystein-Protease Inhibitor)
Protein-Disulfid-Isomerase related protein 5

1.1.3. Induktion von cig 5 und cig 33 in humanen Monozyten durch Infektion mit dem Influenza-Virus A/PR/8

Die genaue Funktion der Gene cig 5 und 33 ist noch nicht bekannt. Sie wurden innerhalb einer Untersuchung kloniert, deren Fragestellung der dieser Arbeit entsprach. Aufgrund ihrer Induzierbarkeit nach einer Infektion von Zellen mit dem Cytomegalovirus erhielten sie ihren Namen: cytomegalovirus induced gene (cig). Die Tatsache, dass das Influenza A-Virus ebenso in der Lage ist, die Transkription dieser Gene in Monozyten zu induzieren, machte sie interessant für weiterführende Untersuchungen. Darin wurde mittels PCR und Northernblot überprüft, ob sich das Ergebnis aus der cDNA-Subtraktion in weiteren Spendern bestätigen ließ.

1.1.3.1 Nachweis von cig 5 und cig 33 in Monozyten nach Infektion mit A/PR/8 mittels PCR

In Abb. 5 ist eine PCR gezeigt, in der die subtrahierten Proben als Ausgangsmaterial für die Amplifiziertung eingesetzt wurden. Es konnte bestätigt werden, dass die Transkripte für cig 5 und cig 33 lediglich in den subtrahierten Proben vorlagen, bei denen die infizierten Monozyten als "tester" eingesetzt worden waren. Dagegen konnte auch bei der Verwendung hoher Zyklenzahlen kein PCR-Produkt in der Probe dargestellt werden, in der die Kontrollzellen als "tester" fungiert hatten. Die mRNAs für cig 5 und cig 33 lagen also in infizierten Zellen in deutlich höherer Konzentration vor als in den unbehandelten Monozyten, so wie es das Ergebnis der cDNA-Subtraktion erwarten ließ (s.Tab. 2). Für den in Abb. 6 gezeigten Versuch wurden humane Monozyten mit 2 MOI Influenza-Virus A/PR/8 für 6 h infiziert. Anschließend wurde die RNA isoliert, davon 2 µg in cDNA umgeschrieben und in spezifischen PCRs amplifiziert. Die Proben wurden über das konstant exprimierte housekeeping-Gen GAPDH angeglichen. Die Frage, ob diese Gene generell nach einer Infektion mit A/PR/8 in Monozyten verstärkt transkribiert werden, konnte positiv beantwortet werden. Die untersuchten Spender wiesen sämtlich PCR-Produkte auf, wenn die Zellen infiziert waren, jedoch keine oder nur äusserst geringe Mengen in den Kontrollzellen.

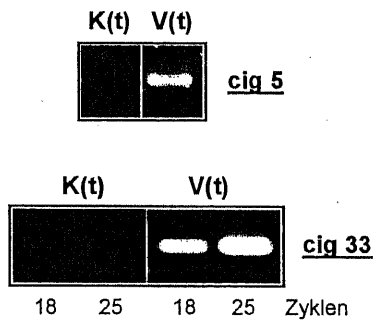


Abb. 5: Darstellung von cig 5 und cig 33 nach cDNA-Subtraktion.
Die im letzten Schritt der cDNA-Subtraktion erhaltenen Proben K(t) und V(t) wurden 1:10 verdünnt und in spezifischen PCRs amplifiziert (cig 5 in 35 Zyklen, cig 33 in 18 und 25 Zyklen). Mit K(t) ist dabei die Probe bezeichnet, in der die mRNA der infizierten Monozyten von der der Kontrollzellen subtrahiert wurde, V(t) benennt den umgekehrten Vorgang, in dem die infizierten Zellen als "tester" fungierten.

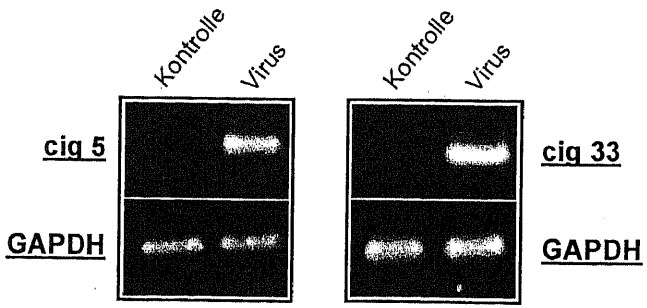


Abb. 6: Induktion von cig 5 und cig 33 in humanen Monozyten nach Infektion mit A/PR/8.
Humane Monozyten wurden über 6 h mit 2 MOI A/PR/8 infiziert oder blieben unbehandelt. Die RNA wurde isoliert, in cDNA umgeschrieben und in spezifischen PCRs vervielfältigt. Das cig 5-Fragment wurde in 32 Zyklen, das cig 33-Fragment in 30 Zyklen amplifiziert und im Agarosegel dargestellt. Zur Angleichung der Proben wurde parallel das housekeeping-Gen GAPDH, das konstant exprimiert wird, in 25 Zyklen angereichert. Die Abbildung zeigt jeweils einen repräsentativen Spender.

1.1.3.2 Untersuchung der cig 5 und cig 33-Expression in Monozyten nach A/PR/8-Infektion im Northernblot

Da eine RT-PCR nur bedingt quantitative Ergebnisse liefert, wurde die Expression der Gene cig 33 und 5 zusätzlich im Northernblot mit spezifischen Sonden untersucht. Die Monozyten wurden behandelt wie oben beschrieben (1.1.3.1.) und 2 µg (cig 5) bzw. 10 µg (cig 33) der Gesamt-RNA im Formaldehydgel aufgetrennt. Der Nachweis der cig-Fragmente erfolgte mittels DIG-markierter antisense-RNA-Sonden. Zur Kontrolle wurde auch das konstitutiv exprimierte housekeeping-Gen GAPDH dargestellt.

Wie schon in den PCR-Analysen deutlich wurde, zeigten sich auch im Northernblot deutliche Banden, die cig 5 bzw. 33 repräsentieren, nur in den Proben der infizierten Monozyten, nicht dagegen in den Kontrollen (Abb. 7). Es bestätigte sich also, dass die Transkription dieser Gene nur nach einer Infektion mit dem A/PR/8-Virus induziert wurde, es konnte keine konstitutive Expression in den nicht infizierten Kontrollzellen nachgewiesen werden.

Abb. 7: Darstellung der mRNA von cig 5 und cig 33 in humanen Monozyten nach Infektion mit A/PR/8 im Northernblot.
2 µg (cig 5) bzw. 10 µg (cig 33) Gesamt-RNA aus humanen Monozyten, die über 6 h mit 2 MOI A/PR/8 infiziert worden waren oder als Kontrolle unbehandelt blieben, wurden im Northernblot eingesetzt und mittels DIG-markierter Sonden spezifisch das cig 5- bzw. cig 33-Fragment nachgewiesen. Zum Vergleich ist das konstitutiv exprimierte GAPDH-Gen dargestellt. Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Spender.

1.1.4. Expression von CBP in Monozyten nach Infektion mit A/PR/8

CBP (cap binding protein/eIF4e) spielt eine entscheidende funktionale Rolle als Initiationsfaktor der Translation. Sollte es tatsächlich, worauf die cDNA-Subtraktion hindeutet, durch eine Infektion mit Influenza A-Viren in Monozyten herabreguliert werden, wäre dies von großem Interesse. Die Expression des CBP-Gens nach einer Influenza A-Infektion wurde mittels PCR an verschiedenen Spendern untersucht. Nach der Infektion der Monozyten mit 2 MOI A/PR/8 wurde die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben (2 µg). Das CBP-Fragment wurde mit einem spezifischen Primerpaar amplifiziert und im Agarosegel dargestellt. Parallel dazu wurden die subtrahierten Proben (jeweils Kontrolle und infizierte Zellen als tester) in der PCR eingesetzt (Abb. 8).
Abb. 8A zeigt wie erwartet eine deutliche Anreicherung des CBP-Fragments in der Probe, in der die Kontrollzellen als tester fungierten. Dagegen war es nach der Subtraktion, in der die infizierten Zellen den tester darstellten, nur in geringen Mengen und erst nach einer höheren Zyklenzahl (35) nachweisbar. Dies weist darauf hin, dass eine Infektion mit A/PR/8 die Transkription von CBP supprimiert. Um eine generellere Aussage treffen zu können, wurden weitere, nicht

subtrahierte Proben verschiedener Spender verglichen. Hier zeigte sich in der Tat die Reduktion der Transkription durch eine Infektion, wie in Abb. 8B dargestellt ist.

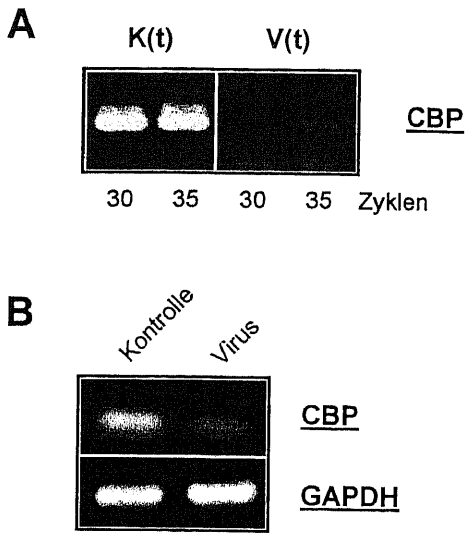


Abb. 8: Inhibition der CBP-Expression in humanen Monozyten nach Infektion mit A/PR/8.
A) Die im letzten Schritt der cDNA-Subtraktion erhaltenen Proben K(t) und V(t) wurden 1:10 verdünnt und in einer spezfischen PCR amplifziert (30 und 35 Zyklen). Mit K(t) ist dabei die Probe bezeichnet, in der die mRNA der infizierten Monozyten von der der Kontrollzellen subtrahiert wurde, V(t) benennt den umgekehrten Vorgang, in dem die infizierten Zellen als "tester" fungierten.
B) Humane Monozyten wurden über 6 h mit 2 MOI A/PR/8 infiziert oder blieben unbehandelt. Die RNA wurde isoliert, in cDNA umgeschrieben und das CBP-Fragment in einer spezifischen RT-PCR amplifiziet (25 Zyklen). Zur Angleichung der Proben wurde parallel das housekeeping-Gen GAPDH, das konstant exprimiert wird, in 25 Zyklen angereichert. Die Auftrennung und Darstellung erfolgte im Agarosegel. Die Abbildung zeigt jeweils einen Spender.

1.1.4.1. CBP-Northernblot

Um eine genauere quantitative Aussage zu treffen, wurde die Expression von CBP im Northernblot untersucht. Dabei ergab sich, dass die normalerweise eingesetzte RNA-Menge von 2-5 µg nicht für ein deutliches Signal ausreichte. Beim Einsatz von 25 µg zeigten sich zwar Banden, diese waren jedoch so ungenau, dass eine objektive Auswertung nicht möglich war, so dass auf eine Darstellung verzichtet wurde.

1.2. cDNA-Expressions-Array Atlas™

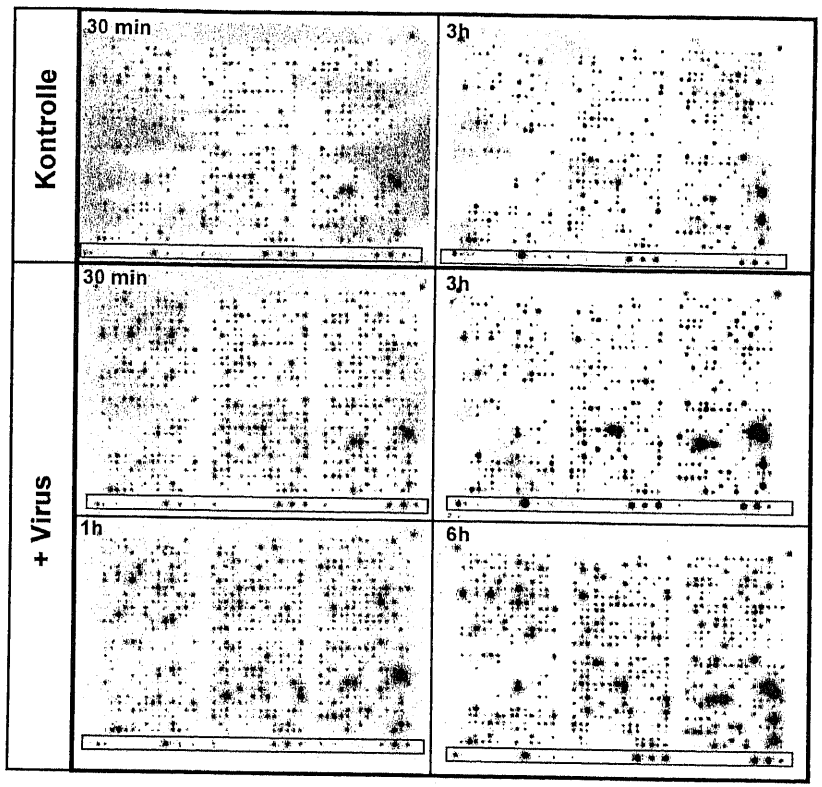
Neben der cDNA-Subtraktion bot der cDNA-Microarray die Möglichkeit, unterschiedlich exprimierte Gene in verschiedenen Zellpopulationen zu identifizieren. Mit Hilfe des verwendeten Arraysystems können in einem Arbeitsgang 1167 definierte Gene analysiert werden.
Humane Monozyten wurden mit 2 MOI A/PR/8 infiziert und für 30 min, 1 h, 3 h oder 6 h inkubiert. Unstimulierte Zellen wurden parallel über 30 min und 3 h als Kontrolle mitgeführt. Anschließend wurde die Gesamt-RNA aus den Zellen isoliert und nach der radioaktiven Markierung im Atlas-Array eingesetzt.
Geeignete Spender wurden ausgewählt, indem Überstände von Monozyten, die mit Influenza A-Virus infiziert und 10 ng/ml LPS stimuliert worden waren, in Chemokin- und Zytokin- ELISAs analysiert wurden. Zeigten sich die für Monozyten typischen Expressionsmuster, wurde die RNA dieses Spenders im cDNA-Expressions-Array analysiert.

Gensequenzen, die spezifisch an die Membran des Atlas-Array gebunden waren, konnten aufgrund ihrer radioaktiven Markierung im Phosphorimager erfasst und sichtbar gemacht werden. Die erhaltenen Daten wurden densitometrisch ausgewertet. Die Angleichung der Werte verschiedener Membranen erfolgte über mehrere sogenannte housekeeping-Gene, die in allen Zellpopulationen gleichwertig exprimiert sein sollten. Unterschieden sich zwei verglichene Werte um mindestens das Doppelte, konnte man von einer Regulation der entsprechenden Gene mit großer Sicherheit ausgehen. Dennoch wurden auch Unterschiede berücksichtigt, die geringer als das Zweifache ausfielen, um eventuelle Tendenzen ebenfalls aufzeigen zu können.

1.2.1. Darstellung von regulierten Genen nach Infektion mit A/PR/8 an einem Spender

Abbildung 9 zeigt die Membranen der einzelnen Zeitpunkte, wie sie durch den Phosphorimager erfasst wurden. Jeder sichtbare Punkt repräsentiert dabei radioaktiv markierte mRNA, die an eine spezifische cDNA-Sonde gebunden ist. Ein stärkeres Signal zeigt einen höheren Gehalt des jeweiligen mRNA-Transkripts in der Probe an. In der untersten Reihe jeder Membran sind verschiedene

housekeeping-Gene aufgetragen, anhand derer eine Angleichung der Proben möglich war. Die Abbildungen geben bereits einen optischen Eindruck, der durch die densitometrische Auswertung bestätigt wurde. Die beiden Kontrollmembranen stimmen sehr genau überein, so dass man davon ausgehen kann, dass in den Kontrollzellen keine nennenswerte Genregulation stattgefunden hat. Somit sollte ein Vergleich des 1- und 6-Stundenwertes mit der 30 min bzw. 3 h –Kontrolle statthaft sein. Weiterhin wird eine Zunahme der sichtbaren dots und deren Intensität über die Zeit deutlich, was darauf hinweist, dass die Transkriptionsrate in Influenza A-infizierten Monozyten stark zunimmt.



▭ : housekeeping-Gene zum Standardisieren der Membranen

Abb. 9: Darstellung regulierter Gene in unbehandelten und A/PR/8-infizierten humanen Monozyten mittels cDNA-Mikroarray.
Humane Monozyten eines Spenders wurden mit 2 MOI A/PR/8 infiziert bzw. als unbehandelte Kontrollzellen kultiviert. Nach 30 min, 1h, 3h und 6h wurde die RNA isoliert, mit ^{32}P radioaktiv markiert und mit spezifischen, auf einer Membran fixierten cDNA-Sonden hybridisiert. Gebundene Transkripte wurden mit Hilfe eines Phosphorimagers dargestellt.

Die densitometrische Auswertung der Membranen ergab, dass eine Infektion von Monozyten mit dem Influenza-Virus A/PR/8 generell eine starke Erhöhung der Transkriptionsrate in der Zelle induzierte. Eine graphische Auswertung der Resultate (Abb. 10) stellt die Anzahl der Gene dar, die gegenüber der Kontrolle eine erhöhte (grün) bzw. reduzierte (rot) Expression aufwiesen. Eine geringe Regulation zeigte sich nach 30 minütiger Infektion, hier wurde lediglich eine vermehrte Transkription bei knapp 20 der insgesamt 1167 analysierten Genen induziert. Eine drastische Erhöhung der abgelesenen Gene fand sich bereits nach einer Stunde, hier lag, wie auch nach 3 h, mit über 200 regulierten Sequenzen das Maximum. Auffallend war, dass nur etwa 40 Gene eine der Kontrolle gegenüber verminderte Transkription aufwiesen, der Rest wurde verstärkt abgelesen oder sogar neu induziert. Die über 3 h infizierten Monozyten zeigten dagegen ausschließlich hochregulierte Gene. Nach 6 h verringerte sich die Anzahl der verstärkt induzierten Sequenzen auf etwa die Hälfte, jedoch fanden sich auch hier wieder einige (ca. 10) Gene mit verringerter Transkriptionsrate. Während der Infektion (0-6h) wurden insgesamt 386 der 1167 untersuchten Gene zu einem oder mehreren Zeitpunkten gegenüber der Kontrolle reguliert, d.h. entweder verstärkt oder vermindert exprimiert.

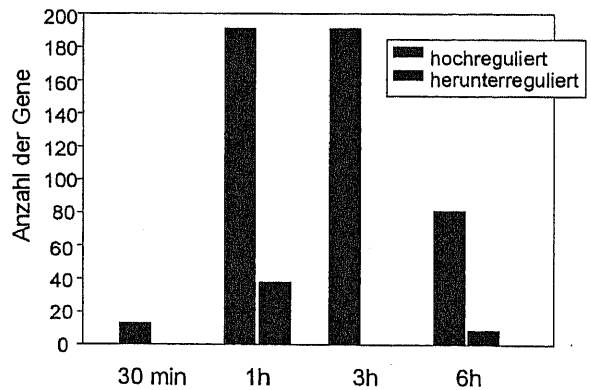


Abb. 10: Anzahl der Gensequenzen, die in humanen Monozyten nach einer Infektion mit A/PR/8 über 30 min, 1h, 3h oder 6h gegenüber der Kontrolle verstärkt (grün) oder vermindert (rot) exprimiert waren.
Humane Monozyten wurden mit 2 MOI A/PR/8 infiziert oder blieben unstimuliert. Nach 30 min, 1h, 3h und 6h wurde die Transkriptionsaktivität im cDNA-Microarray ermittelt. Die im Phosphorimager erfassten Daten wurden densitometrisch ausgewertet. Die Anzahl der Gene, die gegenüber der Kontrolle herauf- oder herunterreguliert war, ist für jeden Zeitpunkt dargestellt. Insgesamt wurden im Array 1167 Sequenzen verglichen.

Abbildung 11 zeigt eine differenziertere Darstellung der in Abb. 10 zusammengefassten Daten. Die regulierten Gene wurden funktionellen Gruppen zugeordnet, wobei nur Sequenzen berücksichtigt wurden, die im Kontext einer Influenza-Infektion als relevant zu erachten sind.

Grundsätzlich zeigt sich, ähnlich wie in der Gesamtdarstellung, dass nach 30 minütiger Infektion nur ein geringfügig erhöhtes Transkriptionslevel erreicht wird. Eine deutliche Zunahme der Genregulation beginnt erst nach einer Stunde. Zu diesem Zeitpunkt ist im Bereich Transkriptionsfaktoren / Signaltransduktions-moleküle die maximale Anzahl der hochregulierten Gene zu finden, die danach wieder abnimmt. In den übrigen Gruppen steigt die Transkriptionsrate bis zu 3 h an und vermindert sich zum 6 h-Wert hin, z.T. drastisch (Onkogene, Zell-Zyklus, Zellwachstum). Eine Ausnahme bilden dabei die Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren, die die größte Anzahl hochregulierter Gene erst nach 6 h aufweist. Die Verteilung der Sequenzen, die gegenüber der Kontrolle durch eine Infektion vermindert transkribiert werden, ähnelt ebenfalls der Gesamtdarstellung. Nach einer Stunde findet man in den infizierten Zellen nur wenige herunterregulierte Gene, die sich etwa gleichmäßig auf alle funktionellen Gebiete verteilen, im Bereich der Onkogene, Zell-Zyklus- und Zellwachstums-Faktoren liegt die höchste Anzahl vor. Nach 6 h konnten nur noch in drei der untersuchten Bereiche Gene mit verminderter Transkriptionsrate nachgewiesen werden.

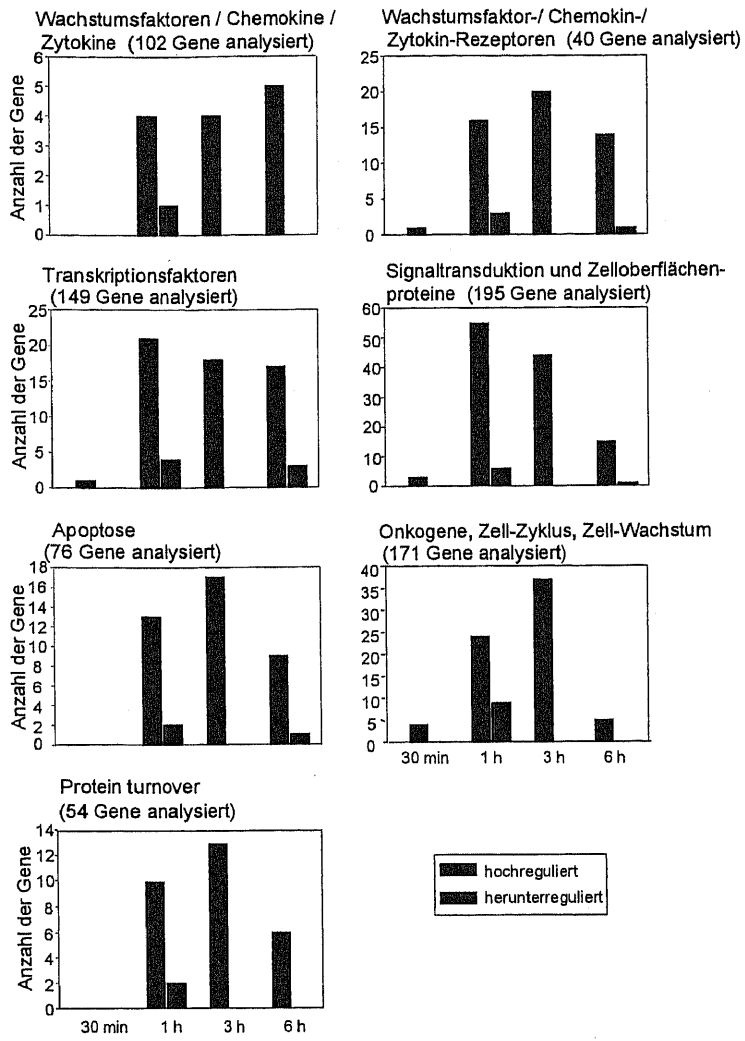


Abb. 11: Anzahl regulierter Gene in humanen Monozyten nach Infektion mit A/PR/8 über 30 min, 1h, 3h und 6h.
Humane Monozyten blieben unbehandelt oder wurden mit 2 MOI A/PR/8 infiziert. Nach 30 min, 1h, 3h und 6h wurden die Transkriptionsaktivität im cDNA-Microarray Atlas™ ermittelt. Gene, die in der densitometrischen Auswertung gegenüber der Kontrolle mindestens um das Doppelte stärker (grün) oder schwächer (rot) exprimiert waren, sind im Diagramm dargestellt.

Nachdem die Abbildungen 10 und 11 einen Überblick über die Daten aus dem cDNA-Microarray gegeben haben, sind in Tab. 4 im einzelnen diejenigen Gene aufgelistet, für die nach einer Infektion mit A/PR/8 eine Regulation der

Transkriptionsrate gefunden wurde. Dabei sind für jeden Zeitpunkt die verstärkt exprimierten Sequenzen mit +, die reduzierten mit – und die neu induzierten mit n markiert. Das einfache Symbol zeigt eine Veränderung gegenüber der Kontrolle um weniger als das Doppelte an, um auch auf Tendenzen hinzuweisen, das zweifache steht für eine veränderte Transkription um mehr als das Doppelte, das dreifache bezeichnet alle Gene, die dreimal stärker bzw. weniger exprimiert wurden oder sogar um noch höhere Faktoren. Auch hier wurden die Sequenzen ihrer Funktion entsprechend bestimmten Gruppen zugeordnet.

Tab. 4: Regulierte Gene in humanen Monozyten nach Influenza A-Infektion zu verschiedenen Zeitpunkten.
Erklärung der Symbole:
+ / n / -: Hochregulation / Neuinduktion / Herunterregulation um weniger als das Zweifache
++ / nn / --: Regulation um mehr als das Zweifache
+++ / nnn / ---: Regulation um mehr als das Dreifache.

	0,5 h	1h	3h	6h
Tumorsuppression und verwandte Proteine				
mothers against dpp homolog 4 (SMAD4); MADR4; DPC4		nnn	+++	
adenomatous polyposis coli protein (APC protein); DP2.5			+++	
breast cancer type 2 susceptibility protein (BRCA2)		+++		
p53-associated mdm2 protein			nnn	
retinoblastoma-like protein 2 (RBL2; RB2);			nnn	
retinoblastoma-associated protein (RB1); PP110; P105-RB			+++	+++
putative protein-tyrosine phosphatase PTEN;		+++	+++	+++
EB1 protein		+++	+++	
ezrin; cytovillin 2; villin 2 (VIL2)	+			+
prohibitin (PHB)			nn	
c-myc purine-binding transcription factor puf; NDP kinase B; NDKB			+	+
nucleoside diphosphate kinase A (NDKA); NDP kinase A;NM23		++	+	+
LUCA2; lysosomal hyaluronidase 2 (HYAL2) ; PH-20 homolog			+++	
LUCA15 putative tumor suppressor			++	
p78 putative serine/threonine-protein kinase		+++	++	
Transkriptionsfaktor-related Onkogene				
c-jun proto-oncogene; transcription factor AP-1				+++
c-myc oncogene		---		
c-rel proto-oncogene protein			nnn	
Serin/Threonin Kinasen				
c-raf proto-oncogene		+++	++	
A-raf proto-oncogene serine/threonine-protein kinase; PKS2		++		
Tyrosinkinase-Rezeptoren				
macrophage colony stimulating factor I receptor precursor (CSF-1-R);		+++	+	
ERBB2 receptor protein-tyrosine kinase; neu proto-oncogene; c-erbB2		+++	++	+
ERBB-3 receptor protein-tyrosine kinase precursor;			++	
c-ros-1 tyrosine-protein kinase proto-oncogene	+	++	++	

Non-Rezeptor Tyrosinkinasen				
tyrosine-protein kinase ABL2; tyrosine kinase ARG (ABLL)	+			
C-src proto-oncogene (SRC1)		+++		
C-yes proto-oncogene (YES1)				+
C-fgr proto-oncogene (p55-FGR); SRC2		---		-
snoN oncogene			++	
CBL-B		---	++	+
intrazelluläre Signaltransduktions-verwandte Onkogene				
transforming protein rhoA H12 (RHO12; ARH12; ARHA)		--	+	
N-ras; transforming p21 protein		++	++	+
Growth factor-related Onkogen				
INT-2 proto-oncogene protein precursor; FGF-3; HBGF-3		++	+	
Cycline				
cyclin K		+++	++	+
fte-1; yeast mitochondrial protein import homolog; RPS3A		+++	+	
Zellzyklus-regulierende Kinasen				
cell division protein kinase 4; cyclin-dependent kinase 4; PSK-J3		+	+	
cell division protein kinase 5 (CDK5); TPKII catalytic subunit			+	
extracellular signal-regulated kinase 2; MAP kinase 2; p42-MAPK		+	+	
extracellular signal-regulated kinase 3; MAPK3; p97-MAPK; PRKM5		+	+	
extracellular signal-regulated kinase 5 (ERK5); BMK1 kinase		+		
cell division protein kinase 9 (CDK9); serine/threonine protein kinase			+	
cyclin G-associated kinase (GAK)		+	+	
cyclin-dependent kinase regulatory subunit 1 (CKS1)			+	
CDK Inhibitoren				
cyclin-dependent kinase 4 inhibitor D (CDKN2D); p19-INK4D			+	+
cyclin-dependent kinase inhibitor 1 (CDKN1A); MDA6; CIP1; WAF1		+	+	++
andere Zellzyklus-Regulatoren				
diaphanous 1 (HDIA1)		+	+	
sprouty 2 (SPRY2)		n		
CDC25B; CDC25HU2; M-phase inducer phosphatase 2			+++	
prothymosin alpha (ProT-alpha; PTMA)		+	+	+
DNA-binding protein inhibitor ID-1; Id-1H		---		
transcription factor DP2 (Humdp2); E2F dimerization partner 2		---		
40S ribosomal protein S19 (RPS19)	+	+	++	+
proliferating cell nucleolar antigen P120; NOL1			++	
myeloid cell nuclear differentiation antigen (MNDA)		---	+	+
transducer of erbB2 (TOB)		---		
p55CDC		---		
RCL growth-related c-myc-responsive gene		---	+	+
transmembrane 4 superfamily protein; SAS			+++	
C-1		nnn	nnn	
cyclin-D binding Myb-like protein (hDMP1)			nnn	
facilitated diffusion proteins				
water channel aquaporin 3 (AQP3)			nn	
erythrocyte glucose transporter 1 (GLUT1)			+++	+
brain glucose transporter 3 (GTR3)			+++	++
aquaporin 4; WCH4; mercurial-insensitive water channel (MIWC)		+		
aquaporin 9		+	+	(-)

Ionenkanäle				
chloride conductance regulatory protein ICLN;		+	+	
kidney glomeruli chloride channel; ClC-5			++	
Transporter				
neutral amino acid transporter A (SATT); ASCT1		+++	++	
sodium/potassium-transporting ATPase beta 3 subunit (ATPB3)		+	++	
sodium/potassium-transporting ATPase alpha 1 subunit	+	+	+++	
adrenoleukodystrophy protein (ALDP); X-linked ALD			+	+
Golgi 4-transmembrane spanning transporter; MTP		+	+	+
Signaltransduktions-Rezeptoren und Zelloberflächen Proteine				
T-lymphocyte activation CD86 antigen precursor; activation B7-2 antigen		+	+	
CC chemokine receptor type 1 (CC CKR1; CCR 1); MIP1alpha R			+	+
IFN-gamma receptor beta subunit precursor; AF1;IFNGT1		+	+++	+
ephrin type-A receptor 1 precursor; tyrosine-protein kinase receptor eph		+	++	+
U-PAR; monocyte activation antigen MO3; CD87 antigen		+	+++	+
transferrin receptor (TFRC); CD71 antigen		+	+	
ephrin A receptor 4 precursor; tyrosine-protein kinase receptor sek; hek8			+++	++
serine/threonine-protein kinase rec. R4 precursor; TGF-beta I receptor			++	
related to receptor tyrosine kinase (RYK)			++	
tyrosine kinase receptor tie-1 precursor			++	
G-protein-coupled receptor HM74			nn	nnn
Rezeptor-assozilierte Proteine und Adaptoren				
guanine nucleotide release/exchange factor (GNRP); ras-GRF; sos			n	nn
c-src kinase (CSK); protein-tyrosine kinase cyl		+++	+	-
growth factor receptor-bound protein 2 (GRB2) isoform; GRB3-3;		+	++	
tyrosine-protein kinase lyn		++	+	+
integrin-linked kinase (ILK)		+++	+++	+
epidermal growth factor receptor substrate 15 (EPS15); AF-1P protein			++	
Ink adaptor protein		+++		
putative src-like adapter protein (SLAP)		nnn		
intrazelluläres Kinase-Netzwerk				
T-lymphocyte maturation-associated protein MAL				+++
cAMP-dependent protein kinase I alpha regulatory subunit; TSE1	+	++		-
tyk2 non-receptor protein tyrosine kinase		+++		
LIM domain kinase 1 (LIMK-1)		+++		
MAP kinase-activated protein kinase 2 (MAPKAPK-2)		+		
MAP kinase kinase 1; MAPKK 1; MKK1; ERK activator kinase 1		---		
MAP kinase kinase 2; MAPKK 2; ERK activator kinase 2; MEK2		+++		
MAP kinase kinase 3; MAPKK 3; MKK3; ERK activator kinase 3; MEK3		+++		
c-jun N-terminal kinase kinase 1; JNKK1; MAP kinase kinase 4		nnn		
MAPK/ERK kinase kinase 3 (MEK kinase 3; MEKK3)		nnn	n	
protein kinase C alpha polypeptide (PKC-alpha; PKCA)			n	
protein kinase C beta I (PKC-beta-1)		+++	+	
protein kinase C delta (NPKC-delta)			+	+
casein kinase II alpha subunit (CK II); CSNK2A1		nnn		
cAMP-dependent protein kinase alpha-catalytic subunit (PKA C-alpha)		+++		
Janus kinase 1 (JAK1)		+++	++	
janus kinase 3 (JAK3); leukocyte janus kinase (L-JAK)		+++		
c-jun N-terminal kinase 2 (JNK2); JNK55		+++	++	
phosphatidylinositol 3-kinase regulatory alpha subunit		nnn	++	
p21-activated kinase alpha (PAK-alpha; PAK1)		+++	++	
Bruton's tyrosine kinase (BTK); agammaglobulinaemia tyrosine kinase		nnn		
Janus kinase 2 (JAK2); receptor-associated tyrosine kinase		+++		+

lipid-activated protein kinase PRK1			++	+
serum- & glucocorticoid-regulated serine/threonine protein kinase (SGK)		+++	+	+
serine/threonine-protein kinase NRK2; serine/threonine kinase 2 (STK2)				---
protein kinase MLK-3; sprk		++		
tyrosine kinase tnk1		++		
serine kinase		---		
calcium/calmodulin-dependent protein kinase I (CAMKI)		+++	++	-
casein kinase I gamma 2 (CKI-gamma 2)		+++	+++	+
cAMP-dependent protein kinase type I beta regulatory subunit		++		
ribosomal protein S6 kinase II alpha 1 (S6KII-alpha 1); RSK1		--		
ribosomal protein S6 kinase II alpha 2 (S6KII-alpha 2); RSK3		+++		
ribosomal protein S6 kinase II alpha 3 (S6KII-alpha 3); RSK2; ISPK1		+++		
Phospholipasen und Phosphoinositolkinasen				
phosphatidylinositol 4-kinase alpha (PI4-kinase; PTDINS-4-kinase)		nnn		
phospholipase C beta 2 (PLC-beta 2; PLCB2)		nnn		
G-Proteine				
Ral A; GTP-binding protein		+++	+++	++
transforming protein rhoB; ARHB; ARH6			++	
ras-related protein RAB-7		--	+	
guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) beta subunit 1 (GNB1)		++	+	+++
vav oncogene		+++		
ADP-ribosylation factor 1		+++		
ras-related protein RAP-1B; GTP-binding protein SMG p21B		+++		
ras-related protein RAB2		++	+	
ras-related protein RAB4A		+++	+	
ras-related protein RAB5A		--		
ras-related protein RAB6		+++		
guanine nucleotide-binding protein G-i/G-s/G-t beta subunit 2		+++	++	
RalB GTP-binding protein		+++		
Tyrosinphosphatasen				
leukocyte common antigen precursor (L-CA); CD45 antigen; PTPRC			++	+
protein-tyrosine phosphatase 1B (PTP-1B)		+++	+++	+
protein-tyrosine phosphatase 2C (PTP-2C); SH-PTP2		+++	++	
serine/threonine protein phosphatase PP2A-alpha catalytic subunit		+++	++	
protein phosphatase PP2A 55-kDa regulatory subunit neuronal isoform	+	+++	+	
protein phosphatase PP2A 55-kDa regulatory subunit alpha isoform		+++	++	+
protein phosphatase 2B regulatory subunit; calcineurin B subunit isoform 1			++	
serine/threonine protein phosphatase 2B catalytic subunit alpha isoform			++	
protein phosphatase 2C alpha isoform (PP2C-alpha)			++	
serine/threonine protein phosphatase PP1-alpha 1 catalytic subunit	+	+++	++	
PTPCAAX1 nuclear tyrosine phosphatase (PRL-1)		+++	+	+++
Adenylyl/Ganylylcyclasen und Diesterasen				
calcium/calmodulin-dependent 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase1B				n
Calcium bindende Proteine				
neurogranin (NRGN); RC3		---		
recoverin; cancer-associated retinopathy protein (CAR protein)		+++		
Transkriptionsfaktoren				
interferon regulatory factor 1 (IRF1)		+++	+	+
NF-kappaB transcription factor p65 subunit; RELA; NFKB3				n
STAT1; transcription factor ISGF-3 components p91/p84		nnn		n

cAMP-response element binding protein (CREB)		++	+	+
GDP/GTP exchangers und GTPase Stimulatoren/Inhibitoren				
ran GTPase activating protein 1 (RANGAP1)			++	
rap1 GTPase activating protein 1 (RAP1GAP)		+++	+	
rap1 GTPase-GDP dissociation stimulator 1; SMG GDS protein		nnn		
rho GDP dissociation inihibitor 1 (RHO-GDI 1); RHO-GDI alpha; ARHGDIA		--		
GTPase-activating protein (GAP); ras p21 protein activator; p120GAP; RASA		+++	+	
Kinase-Substrate und Inhibitoren				
14-3-3n protein eta; protein AS1; YWHAH; YWHA1		+++	++	+
14-3-3 protein beta/alpha; protein kinase C inhibitor protein-1 (KCIP-1)		+++	+	
protein kinase C substrate 80-kDa protein heavy chain; 80K-H protein		+++	+	
hint protein; protein kinase C inhibitor 1 (PKCI1)		+++	+	
andere intrazelluläre Signaltransduktionsmodulatoren und Effektoren				
GAP-associated protein			+++	
zyxin + zyxin-2		-	++	
junction plakoglobin (JUP); desmoplakin III (DP3)			++	++
FRAP-related protein; protein kinase ATR		+++		
Death ligands/Rezeptoren				
tumor necrosis factor precursor (TNF-alpha; TNFA); cachectin			+	+
TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL); APO-2 ligand (APO2L)			n	n
CD27L antigen receptor precursor; T-cell activation CD27 antigen		--		
fasL receptor; fas; APO-1 antigen; CD95 antigen			(+)?	
tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1);TBP1; CD120A antigen		---	++	
tumor necrosis factor receptor (TNFR) + TNFR2; TBP2			++	
adenosine A1 receptor (ADORA1)		+	+	
Death receptor-associated proteins and adaptors				
receptor interacting protein; cell death protein RIP			nnn	
tumor necrosis factor receptor 1-associated death domain protein (TRADD)			nnn	n
FAN protein		+	+	
caspase-3; apopain precursor; cysteine protease CPP32; YAMA protein;			++	
caspase-4 precursor ; ICH-2 protease; ICE(REL)-II + caspase-5 precursor		+	+++	++
cysteine protease ICE-LAP3			++	
caspase-10 precursor; ICE-LAP4; FLICE2		+		
interleukin-1 beta convertase precursor (IL-1BC); ICE; p45; caspase-1			+++	++
Calpaine				
calpain 1 large subunit; mu-type calcium-activated neutral proteinase			++	
calpain 2 large (catalytic) subunit; M-type calcium-activated neutral proteinase		+	+++	++
calcium-dependent protease small (regulatory) subunit; calpain; CANP		+	+	
BCL-Familie				
BCL-2 binding athanogene-1; glucocorticoid receptor-associated protein 46		+	++	++
apoptosis regulator bclw; KIAA0271; BCL2L2		n		
apoptosis regulator bcl-x		+	++	(-)
induced myeloid leukemia cell differentiation protein MCL-1		+	++	++
BCL-2-related protein A1 (BCL2A1); BFL1 protein; GRS protein		+		
Apoptose-assoziierte Kinasen / Proteine				
interferon-inducible RNA-dependent protein kinase (P68 kinase)			+	+
IEX-1L anti-death protein; PRG-1; DIF-2			nn	
SL cytokine precursor; FLT3 ligand (FLT3LG)		+++		
GADD153; DNA-damage-inducible transcript 3; C/EBP homologous protein			++	

defender against cell death 1 (DAD1)		+	+	
cytoplasmic dynein light chain 1 (HDLC1); PIN		+		
cytochrome P450 reductase				--
cytoplasmic antiproteinase 3 (CAP3); protease inhibitor 19 (PI9)			nn	n
inhibitor of apoptosis protein 2 ; TNFR2-TRAF signalling complex protein 2;			+	+
ALG-2 calcium-binding protein			++	
DNA-Polymerasen, Replikationsfaktoren und Rekombinationsproteine				
DNA polymerase alpha catalytic subunit (POLA)			++	
DNA polymerase delta catalytic subunit		+	+	
DNA topoisomerase I (TOP1)				+
replication protein A 14-kDa subunit (RP-A); replication factor A protein 3		+	++	
activator 1 40-kDa subunit; replication factor C 40-kDa subunit; RFC2		+	++	
replication factor C 36-kDa subunit (RFC36); activator 1 36-kDa subunit		+	++	
activator 1 37-kDa subunit; replication factor C 37-kDa subunit; RFC4			++	
MCM5 DNA replication licensing factor; CDC46 homolog		+++	+	+
DNA-damage repair proteins, DNA-Synthese, Rekombinationsproteine				
nibrin (NBS1)		+	+++	+++
DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase; AP endonuclease 1; REF-1 protein		+++		+
Ku 70-kDa subunit; ATP-dependent DNA helicase II 70-kDa subunit; CTC75		+++	++	+
Ku (p70/p80) subunit; ATP-dependent DNA helicase II 86-kDa subunit;		nnn		
DNA ligase I; polydeoxyribonucleotide synthase (ATP) (DNL1) (LIG1)		---		
DNA ligase IV (LIG4); polydeoxyribonucleotide synthase			+++	++
DNA-repair protein complementing XP-C cells;		+++		
DNA-repair protein XRCC1	+		+++	
DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) + DNA-PK catalytic subunit			+++	
HHR23A; UV excision repair protein protein RAD23A			++	+
ubiquitin-conjugating enzyme E2 17-kDa; ubiquitin-protein ligase			++	+
translin; recombination hotspot binding protein			++	
deoxyribonuclease II (DNase II); acid DNase; lysosomal DNase II		-	++	
G-Protein gekoppelte Rezeptoren				
mu-type opioid receptor (MOR-1)	+			
prostaglandin E2 (PGE) receptor EP4 subtype (PTGER4; PTGER2)			+	
P2X purinoceptor 6 (P2X6); P2XM Ionenkanalrezeptor		-		+
flavin-containing amine oxidase A; monoamine oxidase (MAO-A)		+++		
neuroendocrine protein 7B2 precursor; secretory granule endocrine protein I evtl. Chaperon		nnn		
synapse-associated protein 97 (SAP97);		nnn	+++	
myelin-oligodendrocyte glycoprotein precursor (MOG)		-		
Alzheimer's disease amyloid A4 protein precursor; protease nexin-II		+++		
Nervensystem-verwandte Transkriptionsfaktoren				
TIS11B protein; EGF response factor 1 (ERF1)		-		-
hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF1 alpha); ARNT-interacting protein;MOP1		+++		--
jun activation domain binding protein		+++		---
histone acetyltransferase B subunit 2; retinoblastoma-binding protein p46		+++		
BRCA1-associated ring domain protein				+++
YL-1 protein			+	
metal-regulatory transcription factor			+	+
transcription repressor protein PRDI-BF1; BLIMP1			+	+
PCAF-associated factor 65 beta		+++		

Cyclic-AMP-dependent transcription factor ATF-3 (activating factor 3)		+++		+
interferon regulatory factor 7 (IRF-7)			+	+
interferon regulatory factor 2 (IRF2)			+	+
nuclear factor NF-kappa-B p100 subunit+p52 subunit; H2TF1;oncogene lyt-10			+	+
pre-B-cell leukemia transcription factor-1; homeobox protein pbx1; prl		+++		
interferon consensus sequence-binding protein (ICSBP)			+	
CACCC-box DNA-binding protein			+	
cellular nucleic acid binding protein (CNBP);		+++	+	
basic transcription factor 2 44-kDa subunit (BTF2p44)		+++		-
estrogen receptor hSNF2b; SNF2L4; mitotic growth and transcription activator		+++	++	-
transcriptional repressor NF-X1		++	++	
GA-binding protein beta-2 subunit; transcription factor E4TF1-60		---		
transcription factor ZFM1		+++		
RNA polymerase II elongation factor SIII p15 subunit		+	+	
transcription factor E2-alpha ; immunoglobulin enhancer binding factor E12;		+		
transcription factor ETR101				++
transcription factor TFIIB; GTF2B			+	++
transcription factor HTF4; transcription factor 12; E-box-binding protein HEB			+	
nuclease-sensitive element DNA-binding protein (NSEP)			+	
transcriptional regulator interferon-stimulated gene factor 3 (ISGF3G)			+	++
paired box protein PAX-5; B-cell specific transcription factor; BSAP		+		
special AT-rich sequence binding protein 1 (SATB1)		-		
nuclear respiratory factor 1 (NRF1); alpha palindromic binding protein				++
transcription factor Sp1 (TSFP1)		+++		
TRAF-interacting protein (I-TRAF) + TANK			+	+
transcription initiation factor TFIID 31-kDa subunit; TAFII31; TAF2G			+	
DNA-binding protein HIP116; ATPase; SNF2/SWI2-related protein	+			
Sp3 protein		n		
cAMP-dependent transcription factor ATF-4; CREB2		++	+	+
heat shock factor protein 1 (HSF1); heat shock transcription factor 1; TCF5		+	+	
putative transcription activator DB1		---	+	
DNA-binding protein TAXREB302; albumin D box-binding protein (DBP)		+++		
zinc finger protein 91 (ZNF92); HPF7; HTF10		++	+	++
tristetraproline (TTP); TIS11; growth factor-inducible nuclear protein 475			+++	++
transcription factor LSF				-
DNA-binding and chromatin proteins				
polyadenylate binding protein-interacting protein 1 (PAIP1)		+++		
RPD3 protein; histone deacetylase 1 (HD1)		+++		
high mobility group protein (HMG-I)			+	
Zelloberflächenantigene und Adhäsionsmoleküle				
cadherin 5 (CDH5); vascular endothelial cadherin precursor; CD144 antigen		--		
integrin alpha E precursor; mucosal lymphocyte-1 antigen; CD103 antigen		+++		
alpha1 catenin (CTNNA1); cadherin-associated protein; alpha E-catenin		++		
intercellular adhesion molecule-1 precursor (ICAM1); CD54 antigen			+	+
leukosialin precursor; leukocyte sialoglycoprotein; sialophorin; CD43 antigen		+++	++	
NADH-ubiquinone oxidoreductase B18 subunit; cell adhesion protein SQM1		+	++	+
CD44 antigen hematopoietic form precursor (CD44H)		+++		
cell surface glycoprotein mac-1 alpha subunit precursor; CD11B antigen; integrin alpha M (ITGAM); neutrophil adherence receptor alpha M subunit		+++	+	
LFA-1/CR3/p150,95 beta-subunit precursor; integrin beta 2; CD18 antigen; complement receptor C3 beta subunit		+++	+	
leukocyte adhesion glycoprotein p150, 95; CD11C antigen	+	+++		
fibronectin receptor alpha subunit; integrin alpha 5; VLA5; CD49E antigen		+++		
LFA-1 alpha subunit precursor; CD11A antigen; integrin alpha L (ITGAL)		+++		
B-lymphocyte CD19 antigen precursor; B-lymphocyte surface antigen B4		---		

myeloid cell surface CD33 antigen precursor		+++	++	
growth factor and chemokine receptors				
tumor necrosis factor-inducible protein TSG-6; hyaluronate-binding protein			nn	n
granulocyte colony stimulating factor receptor precursor; CD114 antigen		---		
granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor alpha;		+++		
CDW40 antigen; CD40L receptor precursor			+	+++
corticotropin releasing factor receptor 1 precursor (CRF-R; CRF1)			+	+++
CC chemokine receptor type 2 (CC CKR2; CCR2); MCP1R		n		
Interleukin- und Interferon-Rezeptoren				
interleukin-7 receptor alpha subunit precursor (IL-7R-alpha; IL7R);				+++
interferon-alpha/beta receptor alpha subunit precursor (IFN-alpha receptor)		+		
interleukin-5 receptor alpha subunit precursor (IL-5R-alpha;); CD125 ag				++
interferon-gamma receptor (IFNR-gamma; IFNGR1); CDW119 antigen		+		-
Homöostase und Detoxifikation				
selenium-binding protein		+		
microsomal stress 70 protein ATPase core precursor			+	
growth arrest & DNA-damage-inducible protein 45 beta (GADD45 beta)			nn	nn
14.5-kDa translational inhibitor protein (p14.5); UK114 antigen homolog			nn	
microsomal glutathione S-transferase 12 (GST12; MGST1)		+		
heme oxygenase 1 (HO1); HSOXYGR		+	++	-
heat shock-related 70-kDa protein 2		+++		
glutathione peroxidase (GSHPX1; GPX1)		---		--
thioredoxin peroxidase 2 (TDPX2); natural killer cell enhancing factor A				++
heat-shock protein 40 (HSP40)		++		
heat shock protein 60 (HSP-60); mitochondrial matrix protein P1 precursor		++		
heat shock 90-kDa protein A (HSP90A; HSPCA); HSP86		+		
70-kDa heat shock protein 1 (HSP70.1; HSPA1)		(-)		++
cytosolic superoxide dismutase 1 (SOD1)		+	++	
glutaredoxin		+	++	+
thioredoxin reductase		++	+	
25-hydroxy vitamin D3 1-alpha hydroxylase mitochondrial precursor				++
glutathione synthetase (GSH synthetase; GSH-S); glutathione synthase			+++	
glutathione S-transferase mu1 (GSTM1; GST1); HB subunit 4; GTH4			+++	++
glutathione S-transferase A1 (GTH1; GSTA1); HA subunit 1; GST-epsilon			+++	+
MPV17 protein		+++	+	
B94 protein primary response gene		+++	+	
growth-factors, Cytokine, Chemokine				
osteoclast stimulating factor		+++	+	
bone morphogenetic protein 1 (BMP1) + procollagen C-proteinase (pCP-2)			nn	
bone morphogenetic protein 2A (BMP2A)		---		+
bone morphogenetic protein 4 (BMP4) + 2B (BMP2B)		+++	-	
platelet-derived growth factor B subunit precursor (PDGFB; PDGF2); c-sis		+++	++	
granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF); CSF2			++	
transforming growth factor-beta (TGF-beta; TGFB)		+		
cytokine humig; interferon-gamma-induced monokine (MIG)			nn	n
FMLP-related receptor I (FMLPRII); RMLP-related receptor I (RMLPRI)		++	++	
macrophage-specific colony-stimulating factor (CSF-1; MCSF)		+	+	
neuroleukin (NLK); glucose-6-phosphate isomerase (GPI); PGI; PHI		++		
rantes pro-inflammatory cytokine; sis delta; small inducible cytokine A5		++	+	+
macrophage inflammatory protein 1 alpha precursor (MIP1-alpha); SCYA3		+	nnn	n
monocyte chemotactic protein 1 precursor (MCP1); MCAF; SCYA2		(-)	+++	+
insulin-like growth factor binding protein 1 (IGFBP1); placental protein 12		+	++	+

endothelin 2 (ET2)		-		+
thymosin beta-10 (TMSB10; THYB10); PTMB10		+++		
endothelial-monocyte activating polypeptide II (EMAP II)		+	+	
interferon gamma-induced protein precursor (gamma-IP10)			nnn	n
MIP2-alpha; growth-regulated protein beta (GRO-beta)			+++	
placenta growth factors 1 + 2 (PLGF1 + PLGF2)		+		
granulocyte chemotactic protein 2; neutrophil-activating peptide ENA-78		+		
interleukin-8 precursor (IL-8); MDNCF; T-cell chemotactic factor; NAP1		+	+++	
MIP1-beta; T-cell activation protein 2 (AT2); LAG 1; HC21; SCYA4			+	+
Hormone				
ribonuclease/angiogenin inhibitor (RAI); placental ribonuclease inhibitor; RNH		+		-
inhibin alpha subunit precursor (INHA)	+	+	+	
estrogen sulfotransferase (STE; EST1)			+	
cellular retinoic acid-binding protein II (CRABP2)			+	
Interleukine				
interleukin-1 beta precursor (IL-1 ; IL1B); catabolin		+	+	+
interleukin-6 precursor (IL-6); B-cell stimulatory factor 2; interferon beta-2		-	+	++
interferon-beta (IFN-beta; IFNB); fibroblast interferon			n	nnn
interferon-alpha2 precursor (IFN-alpha); roferon + IFN-alpha10 precursor			n	nnn
interleukin-10 precursor (IL-10); cytokine synthesis inhibitory factor (CSIF)		+	+	+
interleukin-15 (IL-15)				nnn
parathymosin				nn
protein turnover				
alpha-1-antitrypsin precursor; alpha-1 protease inhibitor; α-1-antiproteinase		+	++	
dipeptidyl-peptidase I precursor (DPP-I); cathepsin C; cathepsin J		+	++	+
cathepsin H precursor		+	++	+
methionine aminopeptidase 2; initiation factor 2-associated 67-kDa glycoprot.			nnn	
proteasome activator HPA28 subunit beta			++	++
proteasome inhibitor HPI31 subunit		---		++
proteasome component C2; macropain subunit C2; proteasome nu subunit		+	+	
proteasome component C3; macropain subunit C3		+	+	+
proteasome component C5; macropain subunit C5;proteasome g subunit		+	+	-
proteasome component C8; macropain subunit C8		+	+++	+
proteasome component C9; macropain subunit C9		n	+++	++
leukocyte elastase inhibitor (LEI); monocyte/neutrophil elastase inhibitor) (EI)		+	++	
inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2 precursor (ITI heavy chain H2)				++
matrix metalloproteinase 7 (MMP7); matrilysin		nnn	nn	
matrix metalloproteinase 9; gelatinase B; type IV collagenase precursor			++	
matrix metalloproteinase 14 precursor (MMP14); MT-MMP1; MMP-X1			+++	++
cathepsin D precursor (CTSD)		+	+	+
metalloprotease/disintegrin/cysteine-rich protein precursor (MDC9)		+++	+	
endothelial plasminogen activator inhibitor-1 precursor (PAI1; PLANH1)			++	
tissue inhibitor of metalloproteinases 2 (TIMP2); CSC-21K		-		
tripeptidyl-peptidase I precursor; tripeptidyl aminopeptidase			++	+
cathepsin L precursor; major excreted protein (MEP)		+++	+	++
activator of RNA decay (ARD-1)		+++		

1.2.2. Untersuchung regulierter Gene nach Influenza A-Infektion in weiteren Spendern

Die Analyse von Proben, die analog zum oben dargestellten Spender gewonnen wurden, wies erneut auf das Problem hin, das sich bei der Untersuchung von primären Monozyten (im Gegensatz zu Zelllinien) stellt. Zeigte der in 1.2.1. untersuchte Spender nach der Influenza-Infektion eine drastische Zunahme der Transkriptionsaktivität, konnte bei zwei weiteren keine deutliche Regulation der Expression nach ein- bzw. zweistündiger Influenza-Infektion nachgewiesen werden, obwohl sie nach den gleichen Kriterien ausgewählt worden waren. Ein Problem dabei war allerdings auch die unterschiedliche Intensität der Siganale auf den zu vergleichenden Membranen, die eine Angleichung und damit exakte Auswertung erschwerte.

1.2.3. Regulation von Genen in humanen Monozyten nach LPS-Stimulation

Analog zur Untersuchung der Genregulation in Monozyten nach einer Infektion mit Influenza A wurde die Transkriptionsaktivität der Zellen nach einer LPS-Stimulation analysiert. Humane Monozyten wurden über 2 Stunden unbehandelt kultiviert oder mit 10 ng/ml LPS stimuliert, anschließend die RNA isoliert und im cDNA-Microarray eingesetzt wie unter II.2.17. beschrieben. Der Versuch wurde mit zwei Spendern durchgeführt, die ein typisches Zytokin- und Chemokin-Freisetzungsmuster aufwiesen.

Eine Gesamtübersicht über die Anzahl der regulierten Gene zeigt Abbildung 12. Es fällt sofort auf, dass die Regulation nach einer LPS-Stimulation wesentlich geringer ausfällt als nach der gezeigten Infektion mit Influenza A. Allerdings handelte es sich hier um Spender, die auf eine Infektion ebenfalls eine nicht so starke Erhöhung der Transkriptionsaktivität aufwiesen (s. 1.2.2.). Nur ca. 40 bzw. 30 Sequenzen waren in den beiden Spendern gegenüber der Kontrolle verändert exprimiert, wobei es sich größtenteils um dieselben Gene handelte. Während bei Spender 1 zwei Gene herunterreguliert wurden, konnte bei Spender 2 keine verminderte Transkription durch LPS festgestellt werden.

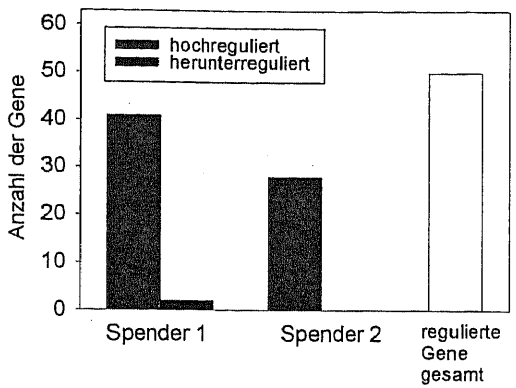


Abb. 12: Anzahl der regulierten Gene in humanen Monozyten nach LPS-Stimulation über 2 h. Humane Monozyten zweier Spender blieben unbehandelt oder wurden mit 10 ng/ml LPS stimuliert. Nach 2 h wurde die Gesamt-RNA isoliert und im Atlas cDNA-Microarray auf Transkriptionsunterschiede untersucht. Dargestellt sind solche Gene, bei denen die densitometrische Auswertung einen mindestens zweifachen Intensitätsunterschied zwischen Kontrolle und stimulierten Zellen ergab.

In Abbildung 13 wurden die nach LPS-Stimulation ermittelten regulierten Gene nach ihren Funktionen bestimmten Gruppen zugeordnet. Wie in der Gesamtübersicht bereits deutlich wurde, zeigen auch die Einzeldarstellungen, dass Spender 2 eine geringere Anzahl regulierter Sequenzen aufweist als Spender 1, was auf alle untersuchten Gruppen zutrifft. Lediglich Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren wurden gleichwertig hochreguliert, wobei es sich auch bei beiden Spendern um dieselben Faktoren handelte. Unterschiedliche Gene wurden bei beiden im Bereich Transkriptionsfaktoren, Signaltransduktion / Zelloberflächenproteine und Protein-turnover induziert, wie der Vergleich mit der jeweiligen Gesamtanzahl zeigt.

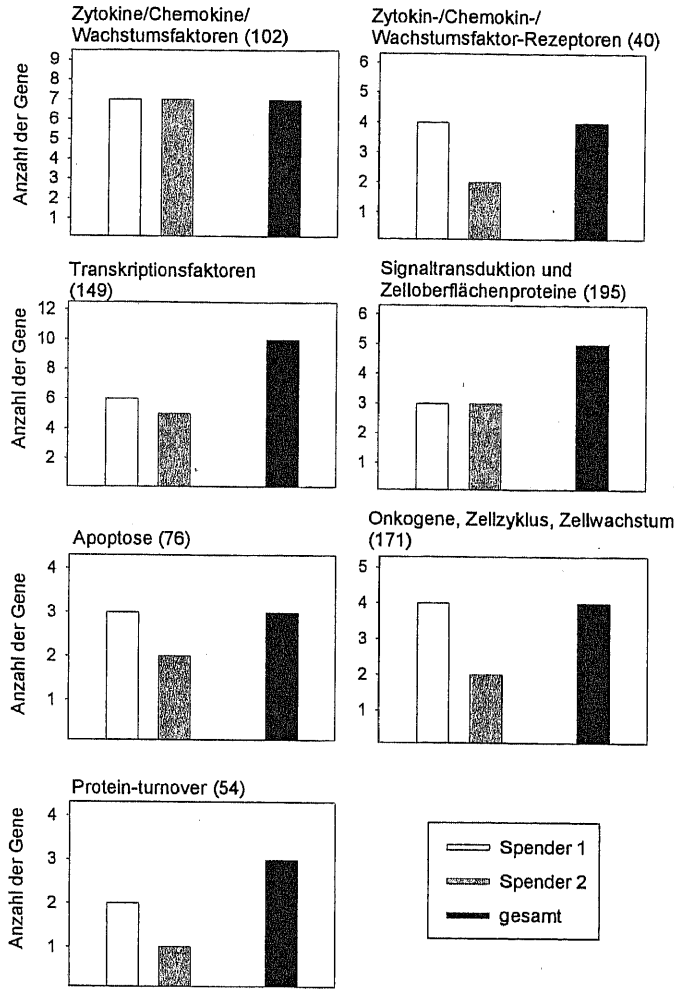


Abb. 13: Anzahl regulierter Gene in humanen Monozyten nach zweistündiger LPS-Stimulation, dargestellt nach funktionell zusammengehörigen Gruppen.
Humane Monozyten wurden nach zweistündiger Stimulation mit 10 ng/ml im Atlas cDNA-Microarray mit unbehandelten Kontrollzellen verglichen. Unterschiedlich exprimierte Gene wurden ihrer Funktion entsprechend Gruppen zugeordnet und graphisch dargestellt. Außerdem wird die Zahl der insgesamt in beiden Versuchen regulierten Gene gezeigt. Die in Klammern angezeigten Zahlen geben die Gesamtanzahl der analysierten Sequenzen im jeweiligen Bereich an.

Die in der Übersicht zusammengefassten, durch LPS regulierten Gene sind im einzelnen in Tab. 5 aufgelistet. Die Daten der beiden untersuchten Spender sind nebeneinandergestellt.

Tab. 5: Darstellung von regulierten Genen in humanen Monozyten nach zweistündiger LPS-Stimulation.
Erklärung der Symbole:
+ / n / -: Hochregulation / Neuinduktion / Herunterregulation um weniger als das Zweifache
++ / nn / --: Regulation um mehr als das Zweifache
+++ / nnn / ---: Regulation um mehr als das Dreifache, in einigen Fällen wird der genaue Faktor angegeben.

	Spender 1	Spender 2
ezrin; cytovillin 2; villin 2 (VIL2)		+
c-myc oncogene		+
ERBB-3 receptor protein-tyrosine kinase precursor	+++	++
cyclin-dependent kinase 4 inhibitor D (CDKN2D); p19-INK4D		+
plasma membrane calcium-transporting ATPase isoform 2 (PMCA2)		-
thyroxine-binding globulin precursor; T4-binding globulin	++	
Ink adaptor protein		--
dual-specificity mitogen-activated protein kinase kinase 6 (MAPKK 6)	++	
MAPK/ERK kinase kinase 3 (MEK kinase 3; MEKK3)	++	
guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) beta subunit 1 (GNB1)	+++ 5x	+++
3'5'-cAMP phosphodiesterase HPDE4A6		++
interferon regulatory factor 1 (IRF1)	++	
tumor necrosis factor precursor (TNF-alpha; TNFA); cachectin	+++ 10x	+++ 7x
BCL-2-related protein A1 (BCL2A1); BFL1 protein;GRS protein	+	++
IEX-1L anti-death protein; PRG-1; DIF-2	+++ 4x	++
cytoplasmic antiproteinase 3 (CAP3); protease inhibitor 19 (PI9)		+
nibrin (NBS1)		+++ 4x
6-O-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT)		+
DNA-repair protein XRCC1		+
growth arrest & DNA-damage-inducible protein (GADD45); DDIT1	+	+++ 6x
mu-type opioid receptor (MOR-1)	+	+
galanin receptor type 1 (GALNR1; GALR1)		++
P2X purinoceptor 6 (P2X6); P2XM		+++
histidine decarboxylase (HDC)		+
transcription repressor protein PRDI-BF1; BLIMP1	++	
glucocorticoid receptor repression factor 1		+
nuclear factor NF-kappa-B p100 subunit; nuclear factor NF-κ-B p52 subunit	++	+
PAX3/forkhead transcription factor fusion		++
transcription factor NF-ATc		++
R kappa B DNA-binding protein	++	
transcription factor Sp1 (TSFP1)	++	
cAMP-dependent transcription factor ATF-4; CREB2		+
putative transcription activator DB1		++
tristetraproline (TTP); TIS11; ZFP36; growth factor-inducible nuclear prot.475	+++ 4x	
integrin beta 8 precursor (ITGB8)		++
intercellular adhesion molecule-1 precursor (ICAM1)	+++	++
NADH-ubiquinone oxidoreductase B18 subunit; complex I-B18; SQM1		+
tumor necrosis factor-inducible protein TSG-6; hyaluronate-binding protein	+++	+++
neuromedin B receptor (NMBR); neuromedin-B-preferring bombesin receptor		+
corticotropin releasing factor receptor 1 precursor (CRF-R; CRF1)	++	+++
N-sam; fibroblast growth factor receptor1 precursor (FGFR1)		+
polymorphic arylamine N-acetyltransferase (PNAT) + monomorphic (MNAT)		+++
B94 protein	++	++
macrophage inflammatory protein 1 alpha precursor (MIP1-alpha)	+++	+++ 6x
monocyte chemotactic protein 1 precursor (MCP1);MCAF	+	+
macrophage inflammatory protein 2 alpha (MIP2-alpha); GRO-beta	+++ >10x	+++ 6x
interleukin-8 precursor (IL-8)	+++ >10x	+++
macrophage inflammatory protein 1 beta precursor (MIP1-beta)	+++ >10x	+++ 14x

interleukin-1 beta precursor (IL-1 ; IL1B); catabolin	+++ 8x	+++ 5x
proteasome inhibitor HPI31 subunit	++	
inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3 precursor (ITI heavy chain H3)		++
placental plasminogen activator inhibitor 2 (PAI-2; PLANH2)	+++	++

2. Expression von Hitzeschock-Proteinen nach Influenza A-Infektion

Hitzeschockproteine (hsp) sind Chaperone, denen bei der Faltung von Proteinen sowie deren Transport durch Membranen eine entscheidende Funktion zukommt. Sie wirken z.B. zellprotektiv beim Einfluss verschiedener Stressfaktoren wie Hitze, Hypoxie, Endotoxinen und Infektionen. Ob diese Faktoren durch eine Influenza-Infektion eine veränderte Expression aufweisen, war bisher nicht bekannt. Da bei der cDNA-Subtraktion eine Sequenz identifiziert wurde, die hsp 90 ähnelt (SURF 4), ergab sich ein erster Hinweis, dass eine Regulation durch das Virus möglich ist. In dieser Arbeit wurde der Einfluss einer Influenza A-Infektion auf die Transkription von hsp 40, 60, 70 und 90 untersucht, die mittels RT-PCR analysiert wurde. Humane Monozyten wurden über 6 h mit 2 MOI A/PR/8 infiziert oder blieben unbehandelt. Die RNA wurde in cDNA umgeschrieben und in spezifischen PCRs amplifiziert. Zur Kontrolle wurde das konstitutiv exprimierte Gen GAPDH mitgeführt.

Abb. 14 zeigt, dass sowohl das Hitzeschockprotein 90 als auch hsp 60 durch die Infektion mit Influenza-Virus verstärkt transkribiert wird. Der Faktor hsp 40 zeigte eine noch drastischere Aufregulation. Während in den Kontrollen nur eine kaum nachweisbare Expression vorlag, konnte die Transkriptionsrate durch das Virus um ein Vielfaches erhöht werden. Die Untersuchungen an hsp 70 ergaben kein eindeutiges Ergebnis, in einigen Spendern (40%) fand eine Hochregulation des Gens statt, in anderen (60%) dagegen wurde es der Kontrolle gleichwertig exprimiert, so dass sich kein einheitliches Bild ergab.

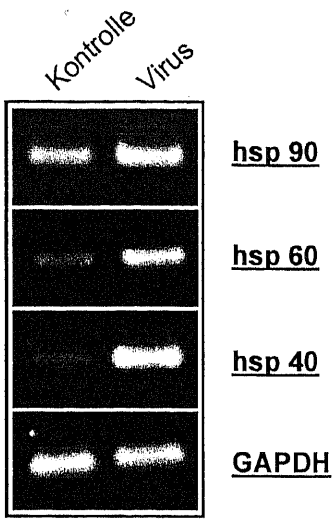


Abb. 14: Expression der Hitzeschockproteine 90, 60 und 40 in humanen Monozyten nach Influenza A-Infektion.
Humane Monozyten wurden mit 2 MOI A/PR/8 infiziert oder blieben als Kontrollzellen unbehandelt. Nach 6 h wurde die RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels spezifischer PCR in 25 (hsp 90) bzw. 30 Zyklen (hsp 60 und 40) amplifiziert. Zum Vergleich wurde das housekeeping-Gen GAPDH in 25 Zyklen vervielfältigt. Es ist ein repräsentativer Spender dargestellt.

3. Proteasom und Immunproteasom

3.1. Austausch der Komponenten X, Y und Z gegen LMP 7, LMP 2 und MECL-1 durch A/PR/8

Die drei Untereinheiten X, Y und Z eines Standard-Proteasoms werden durch verschiedene Auslöser gegen die Einheiten LMP 7, LMP 2 und MECL-1, respektive, ausgetauscht. Dies führt in der Folge zu einer veränderten Antigenprozessierung, die generierten Antigene unterscheiden sich auffallend von denen des Standardproteasoms. Es stellte sich die Frage, ob eine Infektion mit dem Influenza-Virus A/PR/8 zu einer solchen Umwandlung des Standardproteasoms in ein Immunproteasom führt. Dazu wurden humane Monozyten 8 h und 24 h lang mit 2 MOI A/PR/8 infiziert, die Gesamt-RNA

gewonnen und in cDNA umgeschrieben. Mittels semiquantitativer RT-PCR wurden die mRNAs der relevanten Gene auf eine virusinduzierte Regulation untersucht. Die Komponente $\alpha 2$ des Proteasoms wird während der Umwandlung in ein Immunproteasom konstant exprimiert. Eine PCR für dieses Gen konnte daher zur Standardisierung der mRNA genutzt werden. In Abb. 15 werden PCR-Daten für jeweils einen repräsentativen Spender dargestellt.

Es zeigte sich, dass die mRNA für die Komponenten X und Y nach 8 h Infektion deutlich herunterreguliert waren. Im Gegensatz dazu waren die Gene für LMP 7 und LMP 2 unter den gleichen Bedingungen verstärkt induziert (Abb. 15A+B). Die Regulation der Komponenten Z und MECL-1 war dagegen nicht eindeutig zu zeigen: die mRNA für Z wurde zwar wie erwartet herunterreguliert, dies war jedoch auch in 50% der Spender hinsichtlich der MECL-1 mRNA zu beobachten (Abb. 15C). Wenige Spender (35%) zeigten eine unveränderte oder erhöhte (15%) Expression dieses Gens (Abb. 15D).
Es ist zu bemerken, dass auch in unbehandelten Kontrollzellen neben den mRNAs für die Komponenten der "gewöhnlichen" Proteasomen die der Immunproteasomen-Komponenten exprimiert wurden. Es scheint also auch hierfür eine konstitutive Transkription vorzuliegen oder die Spender waren bereits in irgendeiner Weise vorstimuliert.
Nach einer Infektion von 24 h näherte sich die Expression der untersuchten Gene wieder der der Kontrollzellen an, es wurde also der Zustand vor der Infektion erreicht. Nur bei wenigen Spendern wurde die mRNA für X auch nach 24 h weiter herunterreguliert. LMP 2 wurde zu diesem Zeitpunkt noch genauso stark exprimiert wie nach der 8-stündigen Infektion.

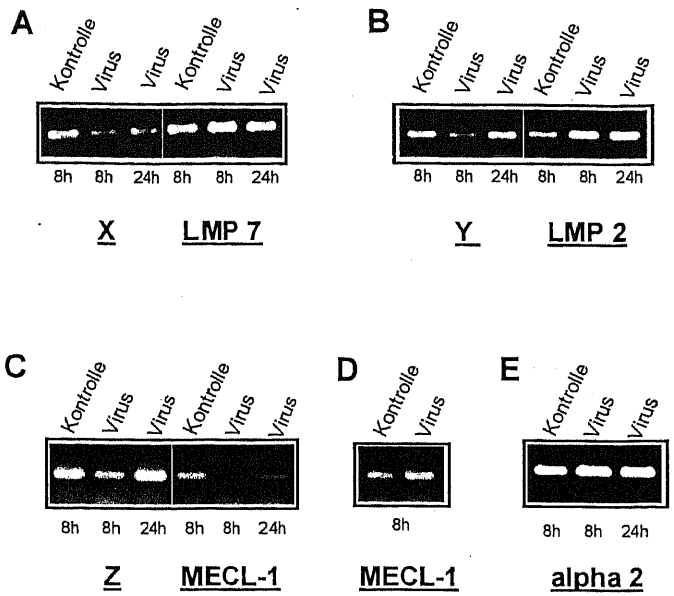


Abb. 15: Nachweis der Regulation verschiedener Proteasom-Komponenten (X, Y, Z) und Immunproteasom-Komponenten (LMP 7, LMP 2, MECL-1) mittels spezifischer PCR (A-D). Humane Monozyten wurden mit 2 MOI A/PR/8 infiziert und 8 bzw. 24 h inkubiert. Unbehandelte Zellen wurden als Kontrolle mitgeführt. Die Gesamt-RNA dieser Zellen wurde in cDNA umgeschrieben und jeweils 1 µl davon in der spezifischen PCR amplifiziert (25 Zyklen). Zur Kontrolle der eingesetzten RNA-Menge wurde eine PCR für das Gen α2 mitgeführt (E). Dargestellt sind die Ergebnisse eines repräsentativen Spenders.

3.2. Einfluss von LPS und inaktivierten Influenza A-Viren auf die Expression der Proteasomen-Komponenten

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Expression der einzelnen Komponenten des Proteasoms durch eine Infektion mit Influenza-Virus reguliert wird, wurde untersucht, ob dies mit Hitze- bzw. UV-inaktiviertem Virus in ähnlicher Weise stattfindet. Durch eine halbstündige Inkubation bei 56°C wird das Hüllprotein Neuraminidase sowie die Polymerase zerstört. Die Aufnahme des Virus in die Zelle findet zwar statt, jedoch kann dieses nicht repliziert werden. Nach einer Bestrahlung mit UV-Licht bleiben zwar die Proteine intakt, aber aufgrund der Zerstörung des Genoms (crosslinking, Strangbrüche) wird auch hier eine Replikation unmöglich. Weiterhin wurde die Frage gestellt, ob auch ein bakterieller Stimulus, in diesem Fall LPS, zu einer veränderten mRNA-Expression

der Proteasom-Komponenten führt. Humane Monozyten wurden mit 2 MOI A/PR/8, entsprechenden Mengen 56°C- bzw. UV-inaktiviertem A/PR/8 behandelt oder mit 10 ng/ml LPS stimuliert. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Eine Kostimulation erfolgte außerdem mit 2 MOI infektiösem A/PR/8 und 10 ng/ml LPS. Nach 8 h wurde die Gesamt-RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und in spezifischen PCRs analysiert. In Abb. 16 ist die Expression der Gene X, Y, LMP 7 und LMP 2 jeweils eines repräsentativen Spenders dargestellt. Als Kontrolle wurde das konstitutiv exprimierte Gen alpha 2 mitgeführt.

Die Stimulation mit LPS verursachte bei keinem der untersuchten Gene eine eindeutige Expressionsveränderung. Zwar fand sich in einigen Spendern eine Hoch- oder Herunterregulation einzelner Sequenzen, andere Individuen verhielten sich jedoch gegensätzlich oder es war überhaupt keine Veränderung im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten. Hitzeinaktiviertes Virus bewirkte eine Genregulation, die der des infektiösen A/PR/8 entsprach: die Komponenten des konstitutiven Proteasoms X und Y waren nach 8 h deutlich vermindert exprimiert, wohingegen die Komponenten des Immunproteasoms LMP 7 und LMP 2 gegenüber der Kontrolle verstärkt transkribiert wurden (letzteres beim gezeigten Spender nicht so deutlich wie sonst). Eine Infektion mit UV-inaktivierten Viren führte im Gegensatz zu infektiösem Virus zu keiner Regulation der untersuchten Gene, die Expression war der der Kontrollzellen vergleichbar. Die Ergebnisse der Kostimulation geben ein widersprüchliches Bild ab: die Komponenten des Standard-Proteasoms werden vermindert abgelesen, die Reduktion ist teilweise sogar stärker als bei der alleinigen Infektion mit A/PR/8. Im Gegenzug ist hier allerdings keine Induktion der Bestandteile des Immunproteasoms zu beobachten, die Transkriptionsrate dieser Gene entspricht der von Kontroll-Monozyten.

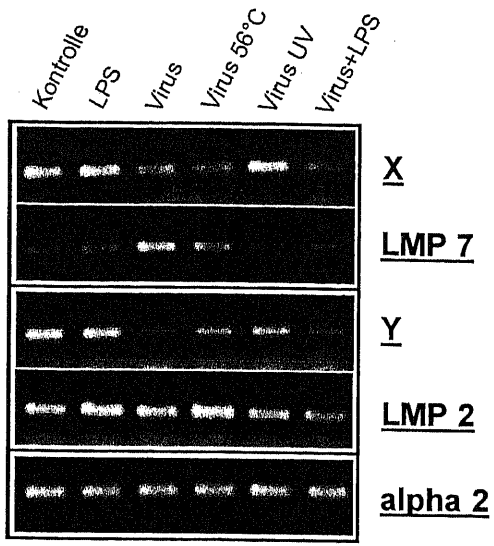


Abb. 16: Regulation der mRNA-Expression der Komponenten X, Y, LMP 7 und LMP 2 nach Infektion mit aktivem und 56°C- bzw. UV-inaktiviertem A/PR/8, Stimulation mit LPS oder Kostimulation.
Humane Monozyten wurden über 8 h mit 2 MOI infektiösem, 56°C- oder UV-inaktiviertem A/PR/8 infiziert bzw. mit 10 ng/ml LPS stimuliert, außerdem wurde mit Virus und LPS kostimuliert. Unbehandelte Zellen wurden als Kontrolle mitgeführt. Die Gesamt-RNA der Zellen wurde in cDNA umgeschrieben und in der RT-PCR mit spezifischen Primern in 25 Zyklen amplifiziert. Das konstitutiv exprimierte Gen für α2 diente als Kontrolle. Dargestellt sind die Daten eines repräsentativen Spenders.

4. Signalvermittlung von Influenza A-Viren über pattern recognition receptors

Werden Monozyten mit Influenza A-Viren infiziert, löst dies in der Zelle vielfältige Reaktionen aus. Dies konnte z.B. in der Induktion oder Suppression von bestimmten Zytokinen und Chemokinen gezeigt werden. Wie die virusvermittelten Signale, die solche Regulationen hervorrufen, ins Zellinnere geleitet werden, ist bislang noch weitgehend unklar. Eine Möglichkeit stellen sogenannte pattern recognition receptors dar, die z.B. durch CD 14 oder die toll-like receptors (TLR) repräsentiert werden. Solche Rezeptoren erkennen mit geringer Spezifität eine Vielzahl von Molekülen auf verschiedenen Pathogenen und aktivieren die Abwehrmechanismen der angeborenen Immunität. Es konnte bereits gezeigt werden, dass RSV (respiratory syncytial virus) Signale über die Kombination CD 14/TLR 4 vermittelt (Kurt-Jones et al., 2000). Daher sollte der Frage nachgegangen werden, ob dies auch für das Influenza A-Virus, das ebenfalls zur Familie der Negativstrang-RNA-Viren gehört, zutrifft.

4.1. CD 14

4.1.1. Blockierung von CD 14 durch monoklonale Antikörper

Eine wirkungsvolle Methode zur Untersuchung der Fragestellung, ob bestimmte Rezeptoren eine Rolle in der Signalvermittlung spielen, ist deren funktionelle Blockierung durch spezifische Antikörper. Im Fall von CD 14 lag ein monoklonaler Antikörper vor, von dem bekannt war, dass die Bindung an das Rezeptormolekül die Übertragung von LPS-induzierten Signalen verhindert. Als Nachweissystem dafür dienten ELISAs, mit denen die Freisetzung bestimmter Zytokine und Chemokine ermittelt wurde.
Humane Monozyten wurden vor der LPS-Stimulation bzw. Influenza A-Infektion für 30 min mit verschiedenen Konzentrationen des monoklonalen anti-CD 14-Antikörpers inkubiert. Als Isotyp-Kontrolle diente ein unspezifischer Antikörper vom gleichen Isotyp (IgG2A). Nach 20 h wurden die Überstände der Zellen gewonnen

und in spezifischen ELISAs hinsichtlich der Freisetzung verschiedener Zytokine und Chemokine analysiert.

Es zeigte sich, dass der gewählte Antikörper das CD 14-Molekül tatsächlich sehr wirkungsvoll blockiert: alle untersuchten Zytokine und Chemokine wurden nach LPS-Stimulation nur noch in kleinen Mengen bzw. nicht mehr detektierbar freigesetzt.
Die mit A/PR/8 infizierten Monozyten verhielten sich ganz ähnlich: Zytokine und Chemokine, die durch eine Influenza-Infektion induziert werden, wurden nach einer Blockierung des CD 14-Moleküls nur noch stark vermindert von den Zellen freigesetzt. Die Inhibition der LPS- bzw. virusinduzierten Freisetzung der untersuchten Chemokine und Zytokine, die durch die antikörpervermittelte Blockierung des CD 14-Rezeptormoleküls hervorgerufen wird, ist in den Abbildungen 17 bis 20 graphisch dargestellt. Es ist jeweils ein repräsentativer Spender gezeigt.

4.1.1.1. Freisetzung von CXC-Chemokinen aus Monozyten nach CD 14-Blockierung

Einige CXC-Chemokine werden durch das Influenza-Virus induziert, so z.B. IP-10, jedoch nicht IL-8. Die Untersuchung dieses Chemokins diente lediglich zur Kontrolle, dass die verschiedenen Spender das charakteristische Muster bei der Zytokin- und Chemokinfreisetzung aufwiesen. Der Antikörper gegen CD 14 blockierte die Freisetzung von IL-8 nach einer Stimulation mit LPS vollständig, bei einer Konzentration ab 2 µg/ml wurde das Kontrollniveau erreicht. Im Gegensatz dazu konnte bei den untersuchten Zellen keine IP-10-Freisetzung nach LPS-Stimulation beobachtet werden, sondern nur nach der Infektion mit A/PR/8. Die synthetisierte Menge wurde durch die CD 14-Blockierung deutlich supprimiert, bei einer Antikörperkonzentration von 1 µg/ml um etwa 50%.

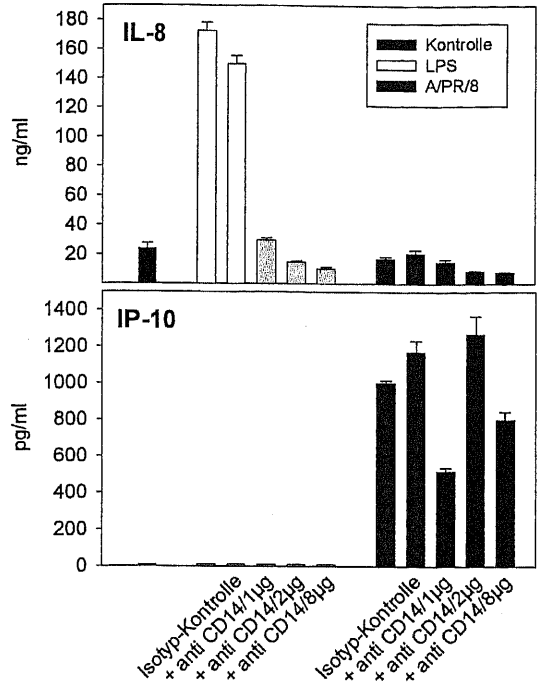


Abb. 17: LPS- und virusinduzierte Freisetzung der CXC-Chemokine IL-8 und IP-10 aus Monozyten nach Vorinkubation mit anti-CD 14-Antikörper.
Humane Monozyten wurden mit 1 µg, 2 µg oder 8 µg/ml eines monoklonalen Antikörpers gegen CD 14 oder einem unspezifischen Antikörper vom gleichen Isotyp (IgG2A, 5 µg/ml) für 30 min vorinkubiert und anschließend mit 10 ng/ml LPS stimuliert oder mit 2 MOI A/PR/8 infiziert. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Nach 20 h wurden die Überstände gewonnen und in spezifischen ELISAs die Freisetzung von IL-8 und IP-10 analysiert. Dargestellt sind jeweils die MW ± SD eines repräsentativen Spenders.

4.1.1.2. Freisetzung von CC-Chemokinen aus Monozyten nach CD 14-Blockierung

Aus der Gruppe der CC-Chemokine wurde die Freisetzung von MIP-1α, MIP-1β, RANTES und MCP-1 untersucht. Wie bei IL-8 wurde eine durch die Blockierung von CD 14 verursachte Inhibition der MIP-1α, -1β und RANTES -Freisetzung nach LPS-Stimulation beobachtet. Der Antikörper reduzierte die Menge der nach Influenza-Infektion synthetisierten Chemokine um bis zu 75%. Die optimale Antikörperkonzentration lag für MIP-1α und -1β bei 2 µg/ml, in Bezug auf RANTES dagegen rief eine Dosis von 8 µg/ml die stärkste Suppression hervor.

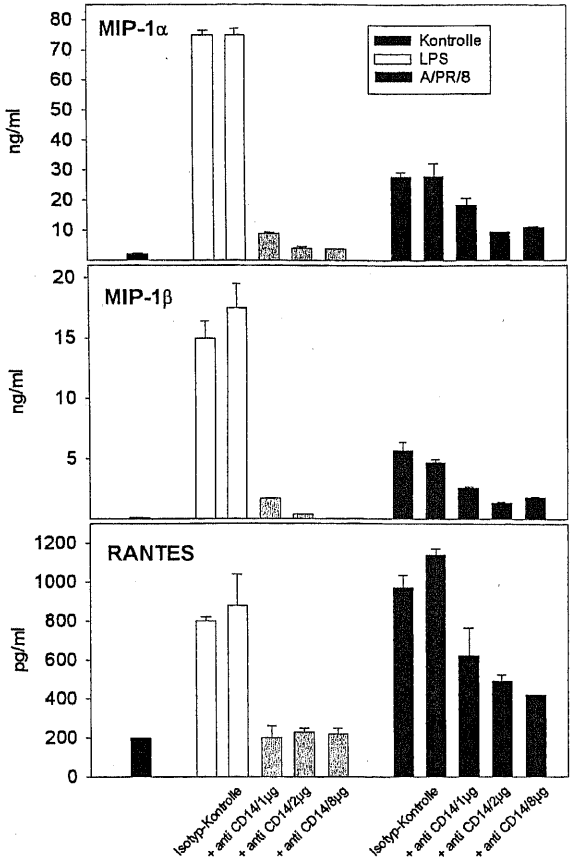


Abb. 18: LPS- und virusinduzierte Freisetzung der CC-Chemokine MIP-1α, MIP-1β und RANTES aus Monozyten nach Vorinkubation mit einem anti-CD 14-Antikörper.
Humane Monozyten wurden mit 1 µg, 2 µg oder 8 µg/ml eines monoklonalen Antikörpers gegen CD 14 oder einem unspezifischen Antikörper vom gleichen Isotyp (IgG2A, 5 µg/ml) für 30 min vorinkubiert und anschließend mit 10 ng/ml LPS stimuliert oder mit 2 MOI A/PR/8 infiziert. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Nach 20 h wurden die Überstände gewonnen und in spezifischen ELISAs die Freisetzung von MIP-1α, MIP-1β und RANTES analysiert. Dargestellt sind jeweils die MW ± SD eines repräsentativen Spenders.

MCP-1 nahm unter den CC-Chemokinen eine Sonderstellung ein: die Spender ließen sich hinsichtlich des Reaktionsverhaltens in der hier untersuchten Fragestellung in zwei Gruppen einteilen. Eine Gruppe (ca. 50%), repräsentiert durch Spender A, zeigte eine deutliche Suppression der MCP-Freisetzung nach Stimulation und Infektion bei Blockierung des CD 14-Moleküls und entsprach damit dem Reaktionsmuster, das auch für die anderen untersuchten CC-

Chemokine beobachtet worden war. Spender B repräsentiert die zweite Gruppe. Auch hier war eine Reduktion der der LPS-induzierten Chemokinesynthese durch den CD 14-blockierenden Antikörper zu beobachten. Im Gegensatz zu Spender A zeigte die Blockierung von CD 14 allerdings keinerlei Einfluss auf die durch das Influenza-Virus induzierte Freisetzung von MCP-1.

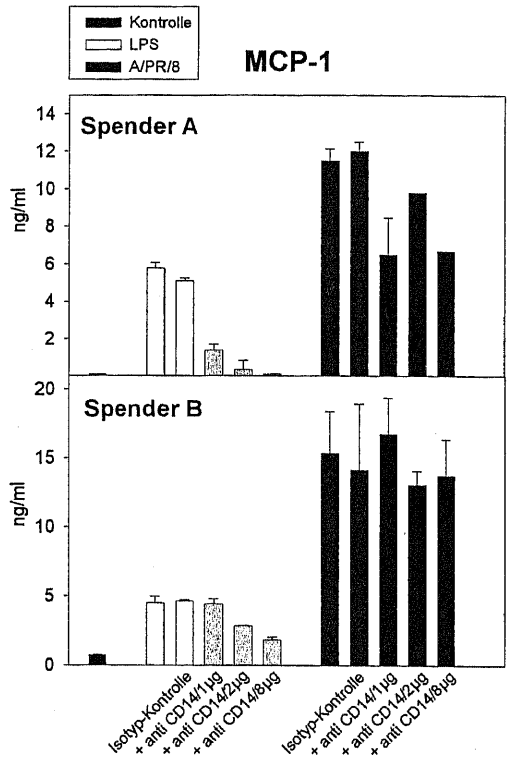


Abb. 19: LPS- und virusinduzierte Freisetzung des CC-Chemokins MCP-1 aus Monozyten nach Vorinkubation mit einem anti-CD 14-Antikörper.
Humane Monozyten wurden mit 1 µg, 2 µg oder 8 µg/ml eines monoklonalen Antikörpers gegen CD 14 oder einem unspezifischen Antikörper vom gleichen Isotyp (IgG2A, 5 µg/ml) für 30 min vorinkubiert und anschließend mit 10 ng/ml LPS stimuliert oder mit 2 MOI A/PR/8 infiziert. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Nach 20 h wurden die Überstände gewonnen und im spezifischen ELISA die Freisetzung von MCP-1 analysiert. Dargestellt sind jeweils die MW ± SD eines Spenders der Gruppen A und B, die das unterschiedliche Verhalten entsprechend dem beobachteten MCP-1-Freisetzungsmuster repräsentieren.

4.1.1.3. Freisetzung von Zytokinen aus Monozyten nach CD 14-Blockierung

Stellvertretend für die Induktion proinflammatorisch bzw. antiinflammatorisch wirkender Zytokine wurde in diesem Versuchsmodell die Freisetzung der Mediatoren TNF-α und IL-10 untersucht. Für beide Zytokine konnte bereits in früheren Arbeiten gezeigt werden, dass sie in humanen Monozyten durch eine Infektion mit A/PR/8 induziert werden können. Für TNF-α konnte nach Blockierung des CD 14-Moleküls durch einen monoklonalen Antikörper eine komplette Hemmung der LPS- und Virus- induzierten Freisetzung beobachtet werden, die IL-10-Synthese wurde nur um jeweils 50% reduziert.

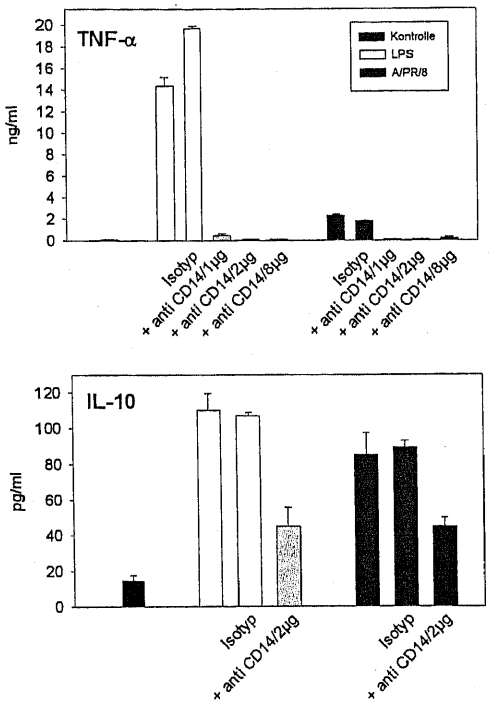


Abb. 20: LPS- und virusinduzierte Freisetzung der CC-Chemokine TNF-α und IL-10 aus Monozyten nach Vorinkubation mit einem anti-CD 14-Antikörper.
Humane Monozyten wurden mit 1 µg, 2 µg oder 8 µg/ml eines monoklonalen Antikörpers gegen CD 14 oder einem unspezifischen Antikörper vom gleichen Isotyp (IgG2A, 5 µg/ml) für 30 min vorinkubiert und anschließend mit 10 ng/ml LPS stimuliert oder mit 2 MOI A/PR/8 infiziert. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Nach 20 h wurden die Überstände gewonnen und in spezifischen ELISAs die Freisetzung von TNF-α und IL-10 analysiert. Dargestellt sind jeweils die MW ± SD eines repräsentativen Spenders.

4.1.2. Funktion des CD 14-Rezeptormoleküls bei der Infektion mit inaktiviertem A/PR/8

Die Feststellung, dass CD 14 eine entscheidende Rolle bei der Vermittlung von Signalen ins Zellinnere nach einer Influenza A-Infektion spielen, führte zu der Fragestellung, ob das Virus als Auslöser einer Immunantwort über diesen Rezeptor infektiös sein muss, oder ob auch inaktiviertes A/PR/8 zu einer Signaltransduktion über CD 14 führt. Das Influenza-Virus wurde dazu entweder durch eine Hitzeinaktivierung über 30 min bei 56°C oder durch eine UV-Bestrahlung über 45 min inaktiviert. Die Inkubation der humanen Monozyten erfolgte mit einer Konzentration, die 2 MOI des infektiösen A/PR/8 entsprach. Davor wurden die Zellen für 30 min mit dem CD 14-blockierenden Antikörper oder einer Isotypkontrolle (nicht dargestellt) inkubiert. Nach 20 h wurden die Überstände im spezifischen ELISA auf den Gehalt von TNF-α, MIP-1β oder MCP-1 untersucht.

Die Freisetzung von TNF-α und MIP-1β ist in Abb. 21 dargestellt. Nach einer Infektion der Monozyten mit aktivem Influenza A-Virus konnten beide im Überstand der Zellen nachgewiesen werden. Eine Inkubation mit 56°C-inaktiviertem A/PR/8 führte zur Freisetzung geringerer Konzentrationen von TNF-α, MIP-1β dagegen wurde verstärkt induziert. Das UV-bestrahlte Virus bewirkte lediglich eine sehr geringe Ausschüttung von TNF-α, MIP-1β wurde im Bereich der von den Kontrollzellen produzierten Mengen gemessen. Nach der Antikörper-vermittelten Blockierung des CD 14-Moleküls wurde die Freisetzung von TNF-α sowie MIP-1β auf Kontrollniveau reduziert, unabhängig davon, ob mit infektiösem oder inaktiviertem A/PR/8 behandelt worden war.

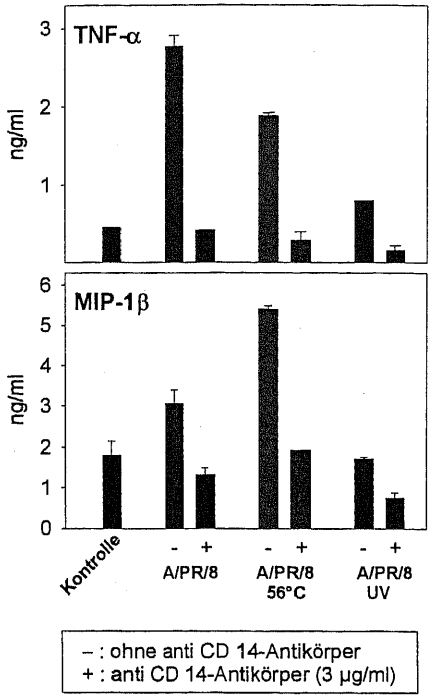


Abb. 21: Freisetzung von TNF-α und MIP-1β aus humanen Monozyten nach Infektion mit aktivem, 56°C- und UV-inaktiviertem A/PR/8 bei blockiertem CD 14-Rezeptor.
Humane Monozyten wurden 30 min mit 3 µg/ml eines monoklonalen Antikörpers gegen CD 14 inkubiert oder blieben unbehandelt. Anschließend wurde mit 2 MOI A/PR/8 bzw. äquivalenten Dosen 56°C- oder UV-inaktivierter Viren infiziert. Die Überstände wurden nach 20 h gewonnen und in spezifischen ELISAs für TNF-α und MIP-1β analysiert. Es sind jeweils die MW ± SD eines repräsentativen Spenders dargestellt.

Dem CC-Chemokin MCP-1 kam auch hier wieder eine Sonderrolle zu. Die Beobachtung, die bei den Untersuchungen in 4.1.1.2. gemacht wurden, konnte beim Einsatz von inaktivierten Influenza A-Viren bestätigt werden (Abb. 22). So gab es eine Gruppe von Spendern (A, ca. 50%), die bei einer Blockade von CD 14 nur noch verringerte Mengen MCP-1 nach der Infektion mit aktivem oder inaktiviertem A/PR/8 freisetzten, der blockierte Rezeptor behinderte also eine optimale Signaltransduktion. In einer zweiten Gruppe (Spender B) zeigte der monoklonale anti CD 14-Antikörper jedoch fast keinen Effekt. Hier wurden unabhängig von der Blockierung des CD 14-Moleküls die gleichen oder nur leicht reduzierte Konzentrationen MCP-1 gemessen, sowohl bei Infektion der Zellen mit aktivem Virus als auch bei der Stimulation mit inaktivierten Viruspartikeln.

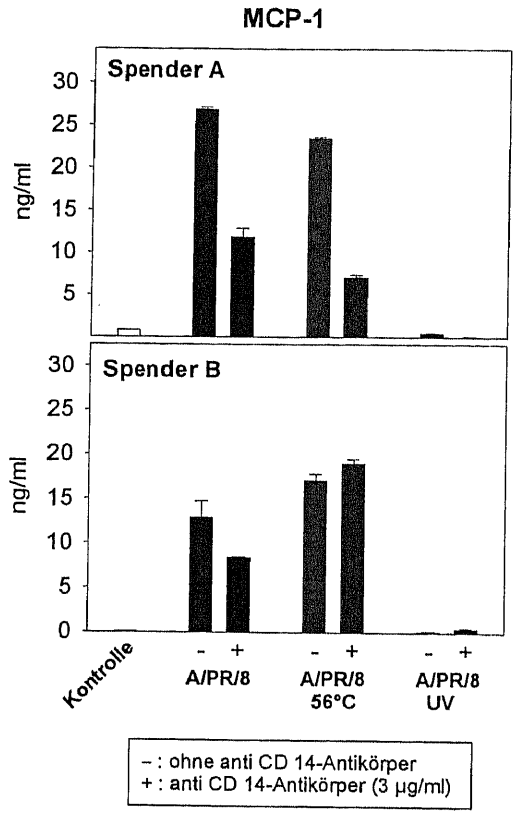


Abb. 22: Freisetzung von MCP-1 aus humanen Monozyten nach Infektion mit aktivem, 56°C- und UV-inaktiviertem A/PR/8 bei blockiertem CD 14-Rezeptor.
Humane Monozyten wurden 30 min mit 3 µg/ml eines monoklonalen Antikörpers gegen CD 14 inkubiert oder blieben unbehandelt. Anschließend wurde mit 2 MOI A/PR/8 bzw. äquivalenten Dosen 56°C- oder UV-inaktivierter Viren infiziert und die Überstände nach 20 h im ELISA analysiert. Dargestellt sind jeweils die MW ± SD eines Spenders, der das unterschiedliche Verhalten entsprechend dem beobachteten MCP-1-Freisetzungsmuster repräsentiert.

4.1.3. CD 14- knockout Maus

Die funktionelle Blockierung des CD 14-Moleküls durch einen monoklonalen Antikörper lieferte Hinweise darauf, dass dieser Rezeptor eine entscheidende Rolle bei der Influenza-induzierten Signalübermittlung spielt und somit direkt an der Induktion und Freisetzung verschiedener Immunmediatoren beteiligt ist. Um den funktionellen Zusammenhang zwischen CD 14 und dem Virus A/PR/8 näher zu charakterisieren, wurden weiterführende Analysen mit Makrophagen aus einer

CD 14 knockout-Maus durchgeführt. Diese kann aufgrund einer Genmanipulation kein funktionelles CD 14-Molekül auf der Zelloberfläche exprimieren.

Aus der CD 14 knockout-Maus isolierte Knochenmarks-Makrophagen wurden mit 10 ng/ml LPS stimuliert oder mit verschiedenen Konzentrationen (0,5, 3 und 20 MOI) A/PR/8 infiziert. Unstimulierte Zellen wurden als Kontrolle mitgeführt. Nach der Inkubation über 24 h wurden die Überstände gewonnen und in spezifischen ELISAs der Gehalt von murinem MIP-1α und JE, dem Homolog zum humanen MCP-1, analysiert. Parallele Ansätze wurden mit Makrophagen durchgeführt, die aus einer balb/c-Maus isoliert wurden. Diese exprimiert intaktes CD 14 und konnte als Vergleich zu den knockout-Mausn eingesetzt werden.

Die Abbildungen 23 und 24 zeigen die Freisetzung der CC-Chemokine JE (MCP-1) und MIP-1α aus Makrophagen, die aus einem Kontrolltieren des Stamms balb/c (A) oder einer CD 14 knockout-Maus (B) isoliert worden waren. Wie im humanen System ließen sich beide Chemokine in den Zellen der Kontrollmaus durch die Infektion mit dem Influenza A-Virus A/PR/8 induzieren, wobei sich eine Dosisabhängigkeit bei der Synthese von JE zeigt. Hier lag die maximale Ausschüttung des Chemokins bei der niedrigsten Infektionsdosis (0,5 MOI), sie reduzierte sich durch die Behandlung der Makrophagen mit höheren Viruskonzentrationen. Dagegen konnten ungefähr gleiche Mengen MIP-1α durch eine Infektion mit 0,5, 3 und 20 MOI induziert werden.
Als Kontrolle für das fehlende CD 14-Gen in der knockout-Maus diente die Synthese der beiden Chemokine nach LPS-Stimulation. Dieses bakterielle Modulin vermittelt über CD 14 und TLR 4, von dem später die Rede sein wird, Signale in die Zelle, die zur Transkription verschiedenster Gene führen, so auch MCP-1 (bzw. JE) und MIP-1α. Beim Fehlen von CD 14 sollte diese Signaltransduktion nicht stattfinden und somit beide Chemokine im Zellüberstand der LPS-stimulierten Makrophagen nicht nachweisbar sein. Die Abbildungen 23 und 24 zeigen, dass dies der Fall ist: während die Makrophagen der Kontrollmaus deutliche Mengen von JE und MIP-1α freisetzen, finden sich bei der CD 14 knockout-Maus nur Konzentrationen, die denen der unbehandelten Zellen entsprechen. Es kann also als sicher gelten, dass die knockout-Maus kein funktionelles CD 14 exprimiert.

Die mit A/PR/8 infizierten Zellen zeigten in der knockout-Maus ein dosisabhängiges Verhalten. Die Freisetzung von JE und MIP-1α, die in der Kontrollmaus mit einer Konzentration von 0,5 MOI induziert wurde, wurde durch das Fehlen von CD 14 vollständig verhindert. Dagegen zeigten sich nach einer Infektion mit 3 bzw. 20 MOI in den knockout-Zellen noch deutliche Mengen beider Chemokine im Überstand, wobei die höhere Infektionsdosis auch eine vermehrte Freisetzung hervorrief. Bezüglich der niedrigsten Infektionsdosis lässt sich aber feststellen, dass die Ergebnisse, die beim Einsatz des CD 14-blockierenden Antikörpers erzielt wurden, in der CD 14 knockout-Maus bestätigt werden konnten.

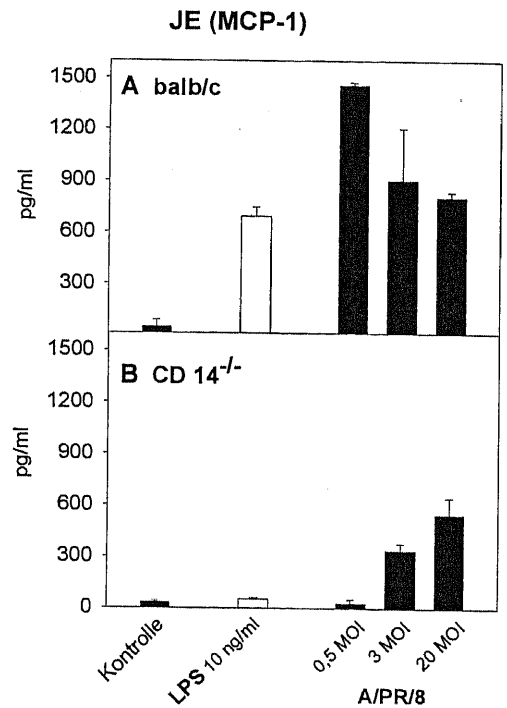


Abb. 23: Vergleich der Freisetzung von murinem JE (Homolog zu MCP-1) aus Makrophagen nach Infektion mit Influenza A-Virus oder Stimulation mit LPS in Kontroll- und CD 14 knockout-Mäusen. Aus einer Kontrollmaus (balb/c, A) und CD 14 knockout-Maus ($CD14^{-/-}$, B) gewonnene Makrophagen wurden mit 10 ng/ml LPS stimuliert oder mit A/PR/8 infiziert (0,5, 3 und 20 MOI). Kontrollzellen blieben unbehandelt. Nach 24 h wurden die Überstände gewonnen und im spezifischen ELISA die enthaltene Menge JE bestimmt. Die Abbildung zeigt die MW ± SD je eines Tieres.

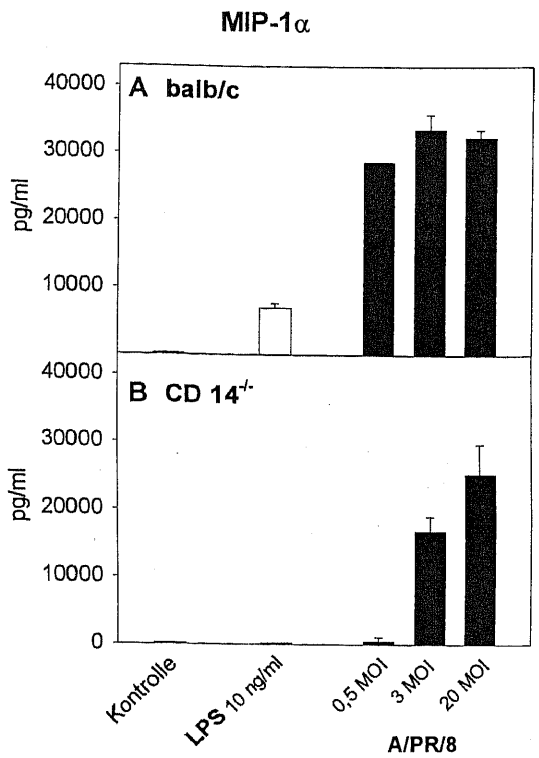


Abb. 24: Vergleich der Freisetzung von murinem MIP-1α aus Makrophagen nach Infektion mit Influenza A-Virus oder Stimulation mit LPS in Kontroll- und CD 14 knockout-Mäusen.
Aus einer Kontrollmaus (balb/c, A) und CD 14 knockout-Maus ($CD14^{-/-}$, B) gewonnene Makrophagen wurden mit 10 ng/ml LPS stimuliert oder mit A/PR/8 infiziert (0,5, 3 und 20 MOI). Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Nach 24 h wurden die Überstände gewonnen und im spezifischen ELISA die enthaltene Menge MIP-1α bestimmt. Die Abbildung zeigt die MW ± SD je eines Tieres.

4.2. Influenza A-Infektion und Toll-like receptors (TLR)

Nachdem gezeigt werden konnte, dass ein funktioneller Zusammenhang zwischen CD 14 und der Induktion verschiedener Chemokine und Zytokine nach einer Influenza A-Infektion besteht, sollte der Frage nachgegangen werden, welche Rolle die Toll-like receptors (TLRs) bei der virusinduzierten Signaltransduktion spielen. Diese Rezeptoren vermitteln nach der Interaktion mit verschiedenen Liganden Signale, die zur Induktion der schnellen, angeborenen Immunantwort

führen. TLR 4 hat zusammen mit CD 14 eine entscheidende Funktion bei der Transduktion LPS-vermittelter Signale, TLR 2 wird u.a. durch das Mycoplasmen-Molekül MALP-2 aktiviert, TLR 9 erkennt unmethylierte CpG-Motive. TLR 4 war in dieser Arbeit von besonderem Interesse, da seine Funktion als Vermittler in einer RSV-Infektion bereits beschrieben wurde. Ausserdem wurde TLR 2 als weiterer Vertreter dieser Rezeptorfamilie untersucht.

4.2.1. TLR 2 und TLR 4 knockout-Mäuse

Es wurde eine TLR 2-knockout-Maus verwendet, die aufgrund einer Genmanipulation keine TLR 2-Rezeptoren auf der Zelloberfläche trägt ($TLR2^{-/-}$). Weiterhin standen Mäuse zur Verfügung, die durch eine Punktmutation in den entsprechenden Genabschnitten keinen funktionellen TLR 4 exprimieren (C3H/HeJ). Als Kontrollgruppe dienten jeweils Mäuse vom Stamm C3H/HeN. Nach Gewinnung der Makrophagen wurde mit verschiedenen Konzentrationen LPS, MALP-2 und A/PR/8 stimuliert bzw. infiziert. Die Zellüberstände wurden nach 18 h abgenommen und in spezifischen ELISAs auf die Freisetzung der CC-Chemokine MIP-1α und JE, dem Homolog zum humanen MCP-1, untersucht.

4.2.1.1. Freisetzung von Chemokinen aus Makrophagen einer TLR 2 knockout-Maus

In den Abb. 25 und 26 ist die Freisetzung von JE bzw. MIP-1α jeweils aus Kontrollzellen (A) und Makrophagen einer TLR 2 knockout-Maus (B) dargestellt. Wie erwartet wurden durch alle drei Stimuli in den Makrophagen der Kontrolltiere (C3H/HeN) die Chemokine JE und MIP-1α induziert. Deutlich war dabei eine dosisabhängige Steigerung der Freisetzung erkennbar. Die aus der TLR 2-knockout-Maus gewonnenen Zellen sollten dagegen auf einen MALP-Stimulus hin, der den TLR 2-Rezeptor zur Übermittlung von Signalen in das Zellinnere benötigt, weder JE noch MIP-1α synthetisieren. Tatsächlich ließen sich beide in den Überständen dieser Makrophagen nicht nachweisen. LPS, das für die Signaltransduktion TLR 4 benötigt und unabhängig von einer TLR 2-Expression ist, führte demzufolge auch hier zu einer Freisetzung von JE und MIP-1α. Eine Infektion mit dem Influenza-Virus A/PR/8 zeigte dasselbe Ergebnis: beide

Chemokine konnten wie in den Zellen der Kontrolltiere durch die Virusinfektion induziert werden.

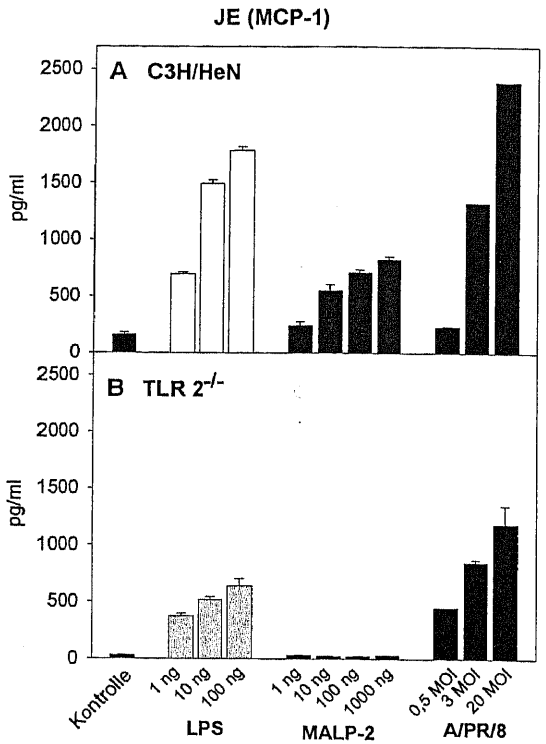


Abb. 25: Freisetzung von JE aus murinen Makrophagen nach Stimulation mit LPS, MALP-2 und A/PR/8.
Aus einer Kontroll-Maus C3H/HeN (A) bzw. einer TLR 2 knockout-Maus TLR2$^{-/-}$ (B) wurden die Makrophagen isoliert und unter Standardbedingungen kultiviert. Die Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen LPS (1 ng, 10 ng und 100 ng/ml), MALP-2 (1 ng, 10 ng, 100 ng, 1000 ng/ml) oder A/PR/8 (0,5 MOI, 2 MOI und 20 MOI) stimuliert bzw. infiziert. Nach 18 h wurden die Überstände gewonnen und in einem spezifischen ELISA die Freisetzung von JE ermittelt. Dargestellt sind die MW ± SD eines Tieres.

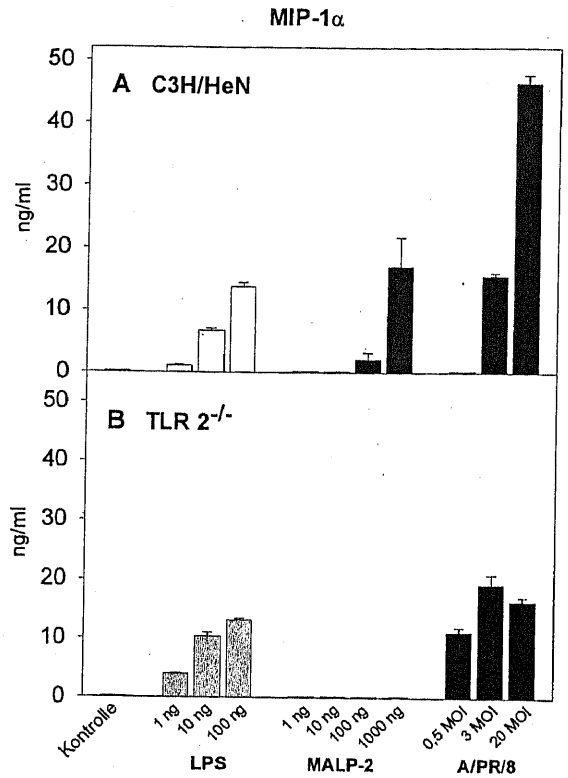


Abb. 26: Freisetzung von MIP-1α aus murinen Makrophagen nach Stimulation mit LPS, MALP-2 und A/PR/8.
Aus einer Kontroll-Maus C3H/HeN (A) bzw. einer TLR 2 knockout-Maus TLR2$^{-/-}$ (B) wurden die Makrophagen isoliert und unter Standardbedingungen kultiviert. Die Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen LPS (1 ng, 10 ng und 100 ng/ml), MALP-2 (1 ng, 10 ng, 100 ng, 1000 ng/ml) oder A/PR/8 (0,5 MOI, 2 MOI und 20 MOI) stimuliert bzw. infiziert. Nach 18 h wurden die Überstände gewonnen und in einem spezifischen ELISA die Freisetzung von MIP-1α ermittelt. Dargestellt sind die MW ±.SD eines Tieres.

4.2.1.2. Freisetzung von Chemokinen aus Makrophagen einer TLR 4-defizienten Maus (C3H/HeJ)

Analog zu den Untersuchungen der Makrophagen aus einer TLR 2 knockout-Maus wurde die Freisetzung von JE und MIP-1α aus Zellen einer TLR 4-defizienten Maus vom Stamm C3H/HeJ analysiert. LPS-responder-Zellen vom Stamm C3H/HeJ, die einen funktionellen TLR 4 exprimieren, dienten als Kontrollen. Die

Stimulation erfolgte hierbei mit 10 ng/ml LPS oder drei Konzentrationen A/PR/8 (0,5 MOI, 3 MOI und 20 MOI). In Abb. 27 ist die Freisetzung von JE in beiden Makrophagenpopulationen gegenübergestellt. Die Kontrollzellen C3H/HeN reagieren auf die beiden Stimuli erwartungsgemäß mit der Ausschüttung dieses Chemokins, wobei im Fall der Influenza-Infektion mindestens eine Dosis von 3 MOI Voraussetzung ist. C3H/HeJ-Makrophagen besitzen keinen TLR 4, der für die Signalweiterleitung nach einer LPS-Stimulation essentiell ist. Dementsprechend ließ sich keine JE-Freisetzung aus diesen Zellen durch den Stimulus nachweisen. Dagegen wurden nach einer Infektion mit A/PR/8 vergleichbare Konzentrationen dieses Chemokins synthetisiert wie in den Kontrollzellen.

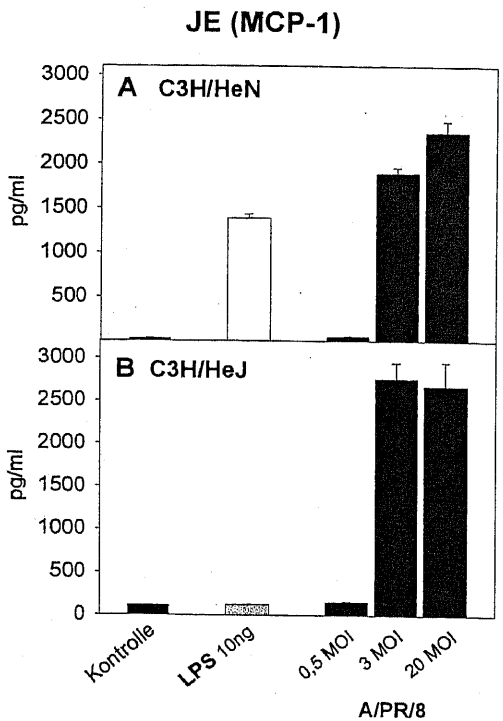


Abb. 27: Freisetzung von JE aus Makrophagen nach Stimulation mit LPS und A/PR/8.
Aus einer Kontroll-Maus C3H/HeN (A) bzw. TLR 4-defizienten Maus C3H/HeJ (B) wurden die Makrophagen isoliert und unter Standardbedingungen kultiviert. Die Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen LPS (1 ng, 10 ng und 100 ng/ml) oder A/PR/8 (0,5 MOI, 2 MOI und 20 MOI) stimuliert bzw. infiziert. Nach 18 h wurden die Überstände gewonnen und in einem spezifischen ELISA die Freisetzung von JE ermittelt. Dargestellt sind jeweils die MW ± SD eines Tieres.

Wie in Abb. 28 gezeigt wird, verhält sich die Ausschüttung von MIP-1α genauso, allerdings liegt hier die freigesetzte Menge nach einer LPS-Stimulation bei sehr geringen Werten. Dennoch wird deutlich, dass in den Zellen C3H/HeJ die Freisetzung des Chemokins völlig unterbleibt. Auf die Synthese von MIP-1α nach einer Virusinfektion hat das Fehlen des Rezeptors keinen Einfluss, wie es für JE bereits ebenfalls gezeigt werden konnte: Die freigesetzten Konzentrationen entsprechen denen der Kontrollzellen. Die Signale nach einer solchen Infektion werden offensichtlich über einen anderen Rezeptor als TLR 4 ins Zellinnere vermittelt.

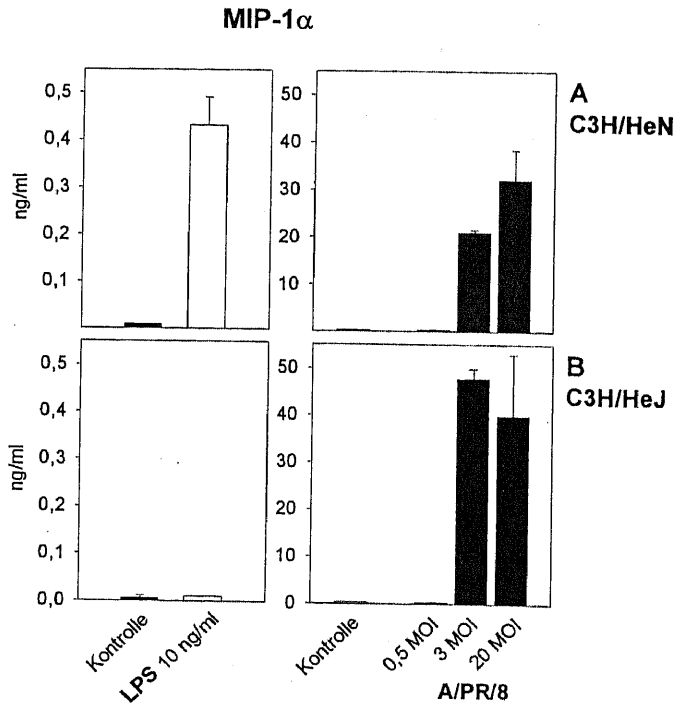


Abb. 28: Freisetzung von MIP-1α aus murinen Makrophagen nach Stimulation mit LPS und A/PR/8.
Aus einer Kontroll-Maus C3H/HeN (A) bzw. TLR 4-defizienten Maus C3H/HeJ (B) wurden die Makrophagen isoliert und unter Standardbedingungen kultiviert. Die Zellen wurden mit 10 ng/ml LPS oder verschiedenen Konzentrationen A/PR/8 (0,5 MOI, 2 MOI und 20 MOI) stimuliert bzw. infiziert. Nach 18 h wurden die Überstände gewonnen und in einem spezifischen ELISA die Freisetzung von MIP-1α ermittelt. Dargestellt sind jeweils die MW ± SD eines Tieres.

5. Einfluss von Influenza A-Viren auf die Expression von pattern-recognition receptors

5.1. Regulation der CD 14-Expression

5.1.1. Regulation der CD 14-Transkription durch A/PR/8

Die Daten aus 4.1. lassen darauf schliessen, dass der pattern-recognition receptor CD 14 eine entscheidende Funktion bei der Vermittlung der zellulären Immunantwort auf eine Infektion mit dem Influenza A-Virus hat. Es war daher von Interesse, ob das Virus auch die Regulation dieses Moleküls auf mRNA-Ebene beeinflusst. Dazu wurden Monozyten mit 2 MOI A/PR/8 infiziert oder als Kontrollzellen ohne Stimulation inkubiert. Nach 6 Stunden wurde die RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und in spezifischen RT-PCRs semiquantitativ analysiert. Zur Kontrolle wurde eine PCR für das housekeeping-Gen GAPDH mitgeführt. In Abb. 29 ist das Ergebnis für einen repräsentativen Spender dargestellt.

Es zeigte sich, dass die Transkriptionsrate für CD 14 durch eine Infektion mit Influenza A-Viren verändert wurde. In Abb. 29 ist eine deutliche Abnahme der mRNA-Expression in den infizierten Monozyten im Vergleich zu den Kontrollzellen erkennbar.

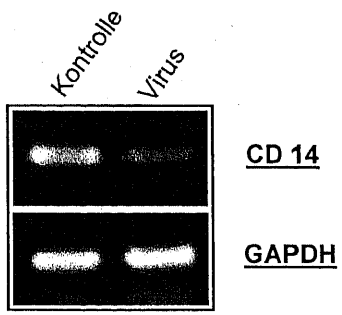


Abb. 29: Regulation der CD 14-Expression in A/PR/8-infizierten Monozyten.
Humane Monozyten wurden mit 2 MOI A/PR/8 infiziert oder wurden als Kontrollzellen unter Standardbedingungen kultiviert. Die Gesamt-RNA wurde nach 6 h isoliert, in cDNA umgeschrieben und in spezifischen RT-PCRs amplifiziert (CD 14: 30 Zyklen; GAPDH: 27 Zyklen). Die Genfragmente wurden im Agarosegel aufgetrennt und nach einer Ethidiumbromidfärbung sichtbar gemacht.

5.1.2. Regulation der CD 14-Oberflächenexpression durch A/PR/8

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Transkriptionsrate der CD 14-mRNA in Monozyten durch eine Infektion mit dem Influenza-Virus A/PR/8 stark reduziert wird, stellte sich die Frage, ob die Oberflächenexpression dieses Rezeptors ebenfalls verändert wird. Die Untersuchung erfolgte mittels FACS-Analysen, in denen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbte Zellen sichtbar gemacht werden können. Humane Monozyten wurden in Teflongefäßen kultiviert und über 6, 8 und 12 Stunden mit 2 MOI A/PR/8 infiziert. Unstimulierte Zellen wurden als Kontrolle mitgeführt. Für die Färbung wurden je 100.000 Zellen mit PE-markierten Antikörpern gegen CD 14 (Isotyp IgG2A), MHC I (IgG1), MHC II (IgG2A) oder irrelevante Antigene (Isotypkontrollen IgG1 und IgG2A) über 30 min inkubiert. Nach der Fixierung mit Formaldehyd konnten die Monozyten im FACScan erfasst und analysiert werden. Die Untersuchung der MHC I- und II- Expression diente dabei als Kontrolle dafür, dass keine generelle Abnahme der Oberflächenmoleküle infolge der Infektion oder durch das Absterben von Zellen stattfindet.

Nach sechsstündiger Infektion mit dem Virus A/PR/8 zeigten die Monozyten keine veränderte Oberflächenexpression des CD 14-Rezeptors sowie von MHC I und II gegenüber den Kontrollzellen (nicht dargestellt). Alle drei Moleküle konnten im FACScan deutlich auf den Zellen nachgewiesen werden. Nach 8 h (Abb. 30) fand bereits eine Veränderung statt: während MHC I und II nach wie vor genauso stark auf den infizierten Zellen exprimiert waren wie auf den Kontrollzellen, zeigte die Darstellung von CD 14 nun zwei Zellpopulationen. Auf einem Teil der infizierten Monozyten war der Rezeptor weiterhin in vergleichbaren Mengen wie auf den Kontrollzellen nachweisbar. Andere Zellen zeigten jedoch nach der Inkubation mit dem anti-CD 14-Antikörper eine wesentlich geringere Färbung, die im Bereich der Isotyp-Kontrolle lag. In dieser Population war die Expression des CD 14-Moleküls also durch das Virus stark vermindert worden. Nach 12 h (Abb. 31) verstärkte sich der Effekt noch. Zu diesem Zeitpunkt liess sich auf allen infizierten Monozyten kein CD 14 mehr nachweisen, die Expression wurde durch das Influenza-Virus vollständig herabreguliert. Dagegen hatte sich die MHC I- und II- Expression weiterhin nicht vermindert, die Intensität der Färbung entsprach derjenigen der Kontrollzellen.

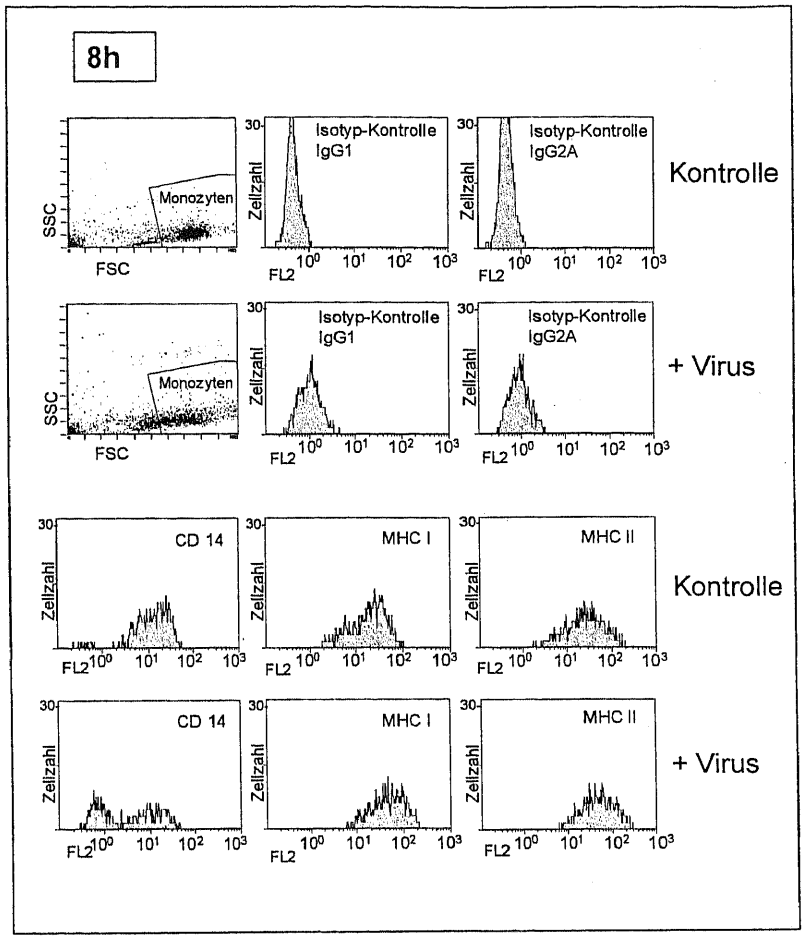


Abb. 30: Reduktion der CD 14-Expression auf humanen Monozyten durch das Influenza-Virus A/PR/8 nach 8 h.
Humane Monozyten wurden in Teflongefäßen kultiviert. Ein Teil der Zellen wurde als Kontrolle verwendet, der andere Teil mit 2 MOI A/PR/8 infiziert. Nach 8 h wurden je 100.000 Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen CD 14, MHC I und MHC II gefärbt, zur Darstellung unspezifischer Bindungen ausserdem mit Isotypkontrollen (IgG1 und IgG2A). Die Monozyten wurden im FACScan durchflusszytometrisch analysiert. Im Dot-Blot erfolgt die Darstellung nach Grösse (FSC, Vorwärtsstreulicht) und Granularität (SSC, 90°-Streulicht), im Histogramm die Intensität der Fluoreszenz (FL2) auf den angefärbten Zellen. Es wurden ausschliesslich die Zellen analysiert, die im mit "Monozyten" bezeichneten gate lagen. Die Abbildung zeigt die Daten eines repräsentativen Spenders.

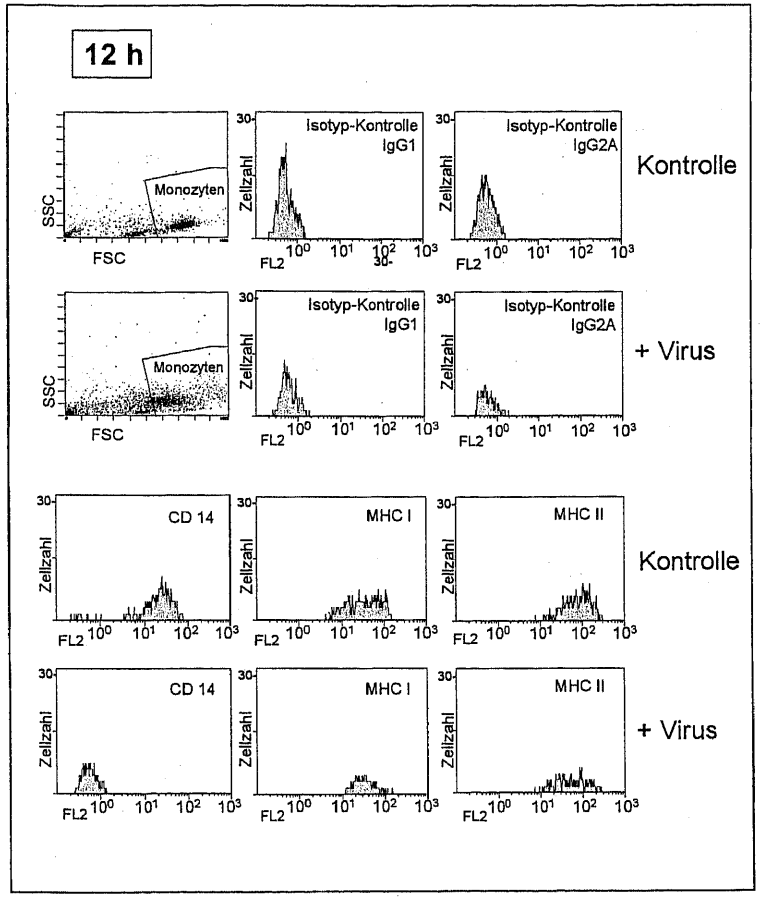


Abb. 31: Reduktion der CD 14-Expression auf humanen Monozyten durch das Influenza-Virus A/PR/8 nach 12 h.
Humane Monozyten wurden in Teflongefäßen kultiviert. Ein Teil der Zellen wurde als Kontrolle verwendet, der andere Teil mit 2 MOI A/PR/8 infiziert. Nach 12 h wurden je 100.000 Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen CD 14, MHC I und MHC II gefärbt, zur Darstellung unspezifischer Bindungen ausserdem mit Isotypkontrollen (IgG1 und IgG2A). Die Monozyten wurden im FACScan durchflusszytometrisch analysiert. Im Dot-Blot erfolgt die Darstellung nach Grösse (FSC, Vorwärtsstreulicht) und Granularität (SSC, 90°-Streulicht), im Histogramm die Intensität der Fluoreszenz (FL2) auf den angefärbten Zellen. Es wurden ausschliesslich die Zellen analysiert, die im mit "Monozyten" bezeichneten gate lagen. Die Abbildung zeigt die Daten eines repräsentativen Spenders.

5.2. Regulation der TLR 2- und TLR 4- Expression

5.2.1. Einfluss von LPS und A/PR/8 auf die Transkription von TLR 2 und TLR 4

Die Expression von Toll-like receptors (TLR) auf der Zelloberfläche wird durch verschiedene Mediatoren verändert, so z.B. durch LPS. Ob eine Infektion mit dem Influenza-Virus A/PR/8 ebenfalls einen Einfluss auf die Regulation dieser Rezeptoren hat, wurde im folgenden untersucht.

Anhand spezifischer RT-PCRs wurde die Expression der mRNAs für TLR 2 und TLR 4 analysiert. Humane Monozyten wurden mit 10 ng/ml LPS stimuliert bzw. mit 2 MOI A/PR/8 infiziert und über 2 h, 4 h und 8 h inkubiert. Unstimulierte Zellen dienten als Kontrolle. Nach der Präparation der Gesamt-RNA (s. II.2.12.) und der Umschreibung in cDNA wurde unter Verwendung spezifischer Primer für TLR 2 und TLR 4 eine PCR durchgeführt wie unter II.2.15. beschrieben. Anhand des housekeeping-Gens GAPDH konnten die Proben standardisiert werden. Die mRNA für TLR 2 und TLR 4 wurde in 28 Zyklen amplifiziert, die für GAPDH in 27 Zyklen. In Abb. 32 sind die Ergebnisse der PCRs eines repräsentativen Spenders dargestellt.

Es zeigte sich, dass sowohl die Expression der mRNA für TLR 2 als auch die für TLR 4 durch beide Stimuli reguliert wurde. Es war bereits bekannt, dass LPS zu einer erhöhten Transkription der beiden Gene in Monozyten führt. Dies konnte hier bestätigt werden, schon nach 2 h ist eine Zunahme der TLR 2- und TLR 4-mRNA zu beobachten, die sich nach 4 h und 8 h noch verstärkt.
Überraschend dagegen war die Feststellung, dass auch eine Influenza-Infektion die Expression der TLR-Gene beeinflusst. Im Gegensatz zu LPS wurde dabei allerdings eine Herunterregulation der mRNA-Transkription gefunden, die für TLR 2 nach 4-8 h, für TLR 4 in einigen Spendern auch schon nach 2 h sichtbar war.

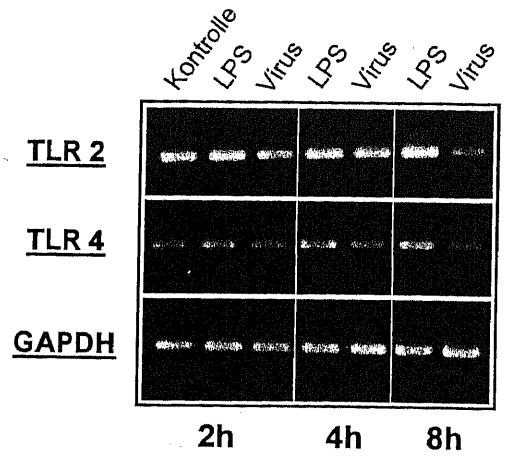


Abb 32: Darstellung der Transkription von TLR 2 und TLR 4 in humanen Monozyten nach Infektion mit A/PR/8 oder Stimulation mit LPS anhand spezifischer PCRs.
Über einen Zeitraum von 2h, 4h und 8h wurden humane Monozyten mit 2 MOI A/PR/8 infiziert, mit 10 ng/ml LPS stimuliert oder blieben unbehandelt. Nach Isolation der RNA und Umschreiben in cDNA erfolgte die Amplifikation der Transkripte für TLR 2 und TLR 4 in 28 Zyklen mittels spezifischer Primer. Als Standard wurde eine PCR für das konstant exprimierte GAPDH-Gen (27 Zyklen) mitgeführt. Die Fragmente wurden im Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid dargestellt.

5.2.2. Regulation der Expression von TLR 2 und TLR 4 nach Inkubation mit infektiösem und inaktiviertem A/PR/8

Nachdem gezeigt werden konnte, dass eine Infektion mit dem Influenza A-Virus die Transkription der Gene für TLR 2 sowie TLR 4 supprimiert, wurde untersucht, ob inaktiviertes A/PR/8 ebenfalls eine reduzierte Expression hervorruft. Durch eine Hitzeinaktivierung bei 56°C wurde das Hüllprotein Neuraminidase sowie die Polymerase zerstört, durch die Bestrahlung mit UV-Licht verlor das Virus die Fähigkeit zur Replikation aufgrund von Schäden im Genom. Zusätzlich wurde eine Kostimulation der Monozyten mit LPS und aktivem A/PR/8 durchgeführt.

Die Infektion bzw. Stimulation der Monozyten erfolgte mit 2 MOI aktivem oder einer äquivalenten Dosis inaktiviertem A/PR/8 bzw. 10 ng/ml LPS. Die Inaktivierung des Virus wurde durch eine 30 minütige Inkubation bei 56°C oder durch UV-Bestrahlung über 45 min bewirkt. Nach 6 stündiger Inkubation wurde die

RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und in spezifischen RT-PCRs analysiert. In 28 Zyklen wurden die TLR-Fragmente amplifiziert, ausserdem das konstant exprimierte GAPDH-Gen, das als Kontrolle zum Angleichen der cDNAs mitgeführt wurde. Wie in Abb 33 gezeigt, fand sich wiederholt eine deutliche Suppression der Transkription von TLR 2 und TLR 4 nach Infektion mit A/PR/8. Vergleicht man dagegen die Expression von TLR 2 nach einer Inkubation mit den inaktivierten Viren mit der in den Kontrollzellen, ist so gut wie kein Unterschied erkennbar. Eine Regulation dieses Rezeptors kann offensichtlich nur durch strukturell intakte und replikationsfähige Viruspartikel bewirkt werden. Die Transkription des TLR 4-Gens wurde durch das 56°C-inaktivierte A/PR/8 zwar supprimiert, jedoch nicht so stark wie durch das aktive Virus. Die UV-inaktivierten Influenza-Viren hatten, wie auch für TLR 2 zu beobachten war, keinen regulativen Einfluss auf die Transkriptionsrate von TLR 4. Auffallend war die Wirkung einer Kostimulation der Monozyten mit aktivem A/PR/8 und LPS: hier konnten keine spezifische DNA-Fragmente nachgewiesen werden, weder TLR 2 noch TLR 4 wurden in diesen Zellen transkribiert. Durch die Kombination der Stimuli wird also sogar die in den Kontrollzellen beobachtete konstitutive Expression vollständig inhibiert.

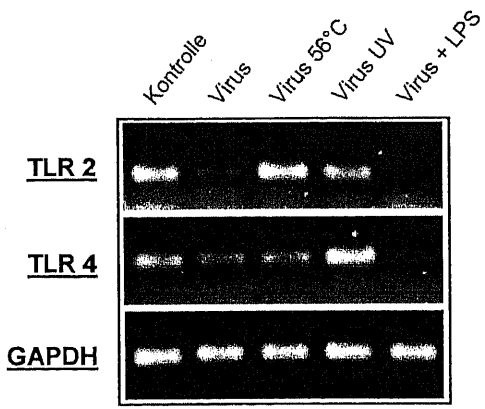


Abb. 33: Regulation der mRNA-Expression von TLR 2 und TLR 4 in humanen Monozyten nach Infektion mit infektiösem und inaktiviertem Influenza-Virus A/PR/8 durch Nachweis spezifischer Genfragmente in der RT-PCR.
Humane Monozyten blieben unbehandelt, wurden mit 2 MOI infektiösem A/PR/8 infiziert oder mit einer entsprechenden Menge von inaktiviertem Virus (30 min 56°C oder 45 min UV-bestrahlt) inkubiert. Zusätzlich wurde eine Kostimulation von 2 MOI A/PR/8 und 10 ng/ml LPS durchgeführt. Nach 6 h wurde die RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und in der PCR analysiert. Mithilfe spezifischer Primer für TLR 2 und TLR 4 wurden in 28 Zyklen die spezifischen Genfragmente amplifiziert und anschliessend im Agarosegel dargestellt. Zum Angleichen der cDNA-Mengen wurde parallel eine PCR für das konstitutiv exprimierte GAPDH-Gen mitgeführt. Es wird das Ergebnis eines repräsentativen Spenders gezeigt.

6. Hemmung der Zytokin- und Chemokinsynthese durch Polymyxin B nach A/PR/8- Infektion

Polymyxin B ist ein polykationisches Antibiotikum, das hochwirksam LPS neutralisieren kann. Seine bakterizide Wirkung beruht auf der Eigenschaft, dass nach der Bindung an LPS eine Einlagerung der Polymyxin-Moleküle in die Membran folgt, wodurch deren Integrität gestört wird. Eine Inkubation mit Polymyxin B und LPS bewirkt, dass Monozyten nicht mehr die Zytokine und Chemokine freisetzen, die nach einer LPS-Stimulation sonst nachgewiesen werden können. In diesem Teil der Arbeit wurde untersucht, ob Polymyxin B einen ähnlich hemmenden Einfluss auf Influenza A-Viren haben. Dieses Virus ist ebenfalls von einer Membran umgeben, so dass eine Einlagerung des Antibiotikums auch zu einer Inhibition der Infektion bzw. der Antwort auf die Infektion führen könnte.
Humane Monozyten wurden unter Standardbedingungen kultiviert. Gleichzeitig mit der Stimulation mit 10 ng/ml LPS bzw. der Infektion mit 2 MOI A/PR/8 wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen Polymyxin B für 30 min inkubiert. Nach 20 Stunden wurden die Überstände gewonnen und in spezifischen ELISAs die Freisetzung von verschiedenen Zytokinen und Chemokinen analysiert.

Die Stimulation mit LPS diente hierbei primär als Kontrolle für die Wirkung von Polymyxin B: die auf diesen Stimulus hin typischerweise freigesetzten Zytokine und Chemokine sollten nur noch in geringeren Konzentrationen oder gar nicht mehr nachweisbar sein. Die Abbildungen 34-36 zeigen, dass die untersuchten Zytokine und Chemokine nach einer Inkubation mit Polymyxin B praktisch nicht mehr freigesetzt wurden. Bereits die niedrigste eingesetzte Dosis (0,05 µg/ml) hatte diesen komplett hemmenden Effekt.
Völlig unerwartet war dagegen die Beobachtung, dass das Antibiotikum auch die Synthese von Zytokinen und Chemokinen hemmt, die gewöhnlich nach einer Infektion der Monozyten mit Influenza-Viren freigesetzt werden. Die Hemmung war zwar hier z.T. nicht so vollständig wie nach der LPS-Stimulation, jedoch war die Freisetzung auch in der niedrigsten Dosis um mindestens 50% vermindert.

6.1. Freisetzung von CXC-Chemokinen aus Monozyten nach Inkubation mit Polymyxin B

Das CXC-Chemokin IL-8 wird zwar nicht durch Influenza A induziert, dient jedoch als Kontrolle dafür, dass der jeweilige Spender das typische Freisetzungsmuster aufweist. Die vollständige Hemmung der IL-8-Synthese nach LPS-Stimulation durch Polymyxin B konnte hier in allen eingesetzten Konzentrationen gezeigt werden.

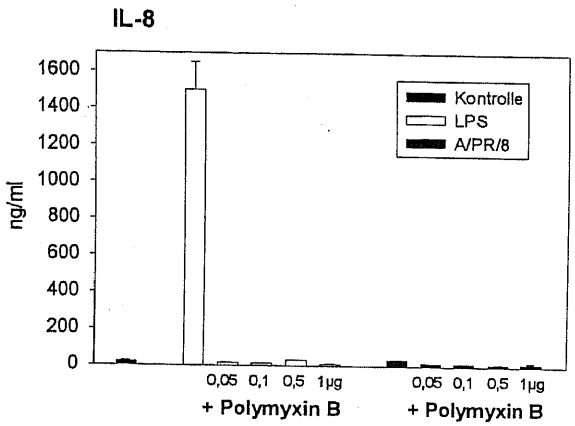


Abb. 34: Freisetzung des CXC-Chemokins IL-8 aus Monozyten nach Inkubation mit Polymyxin B. Humane Monozyten wurden 30 min mit Polymyxin B in verschiedenen Konzentrationen (0,05, 0,1, 0,5 und 1 µg/ml) inkubiert und entweder mit 10 ng/ml LPS stimuliert oder mit 2 MOI A/PR/8 infiziert. Unbehandelte Monozyten dienten als Kontrolle. Nach 20 h wurden die Überstände gewonnen und im spezifischen ELISA die Freisetzung von IL-8 analysiert. Die Darstellung zeigt die MW ± SD eines repräsentativen Spenders.

6.2. Freisetzung von CC-Chemokinen aus Monozyten nach Inkubation mit Polymyxin B

Auch bei den untersuchten CC-Chemokinen zeigte sich wie erwartet eine komplette Hemmung der LPS-induzierten Freisetzung nach einer Polymyxin B-Behandlung der Zellen. Das Antibiotikum wirkte sich jedoch auch auf die Synthese der Chemokine nach einer Influenza-Infektion aus. Es wurden stark verminderte oder sogar auf Kontroll-Niveau reduzierte Konzentrationen von MIP-1α, MIP-1β und RANTES im Zellüberstand nachgewiesen. Allerdings konnte die Freisetzung von RANTES nicht so vollständig inhibiert werden wie die von MIP-1α

und MIP-1β. Hier war eine deutliche Dosisabhängigkeit erkennbar, wonach 0, µg/ml Polymyxin B lediglich eine Reduktion um etwa 60% bewirkte und 0,5 µg/ die maximale Hemmung von ca. 80%. Eine Sonderstellung nahm MCP-1 ein: d Freisetzung dieses Chemokins konnte durch Polymyxin B in keiner d eingesetzten Dosen so stark vermindert werden wie die anderen CC-Chemoki (beim gezeigten Spender max. 50%).

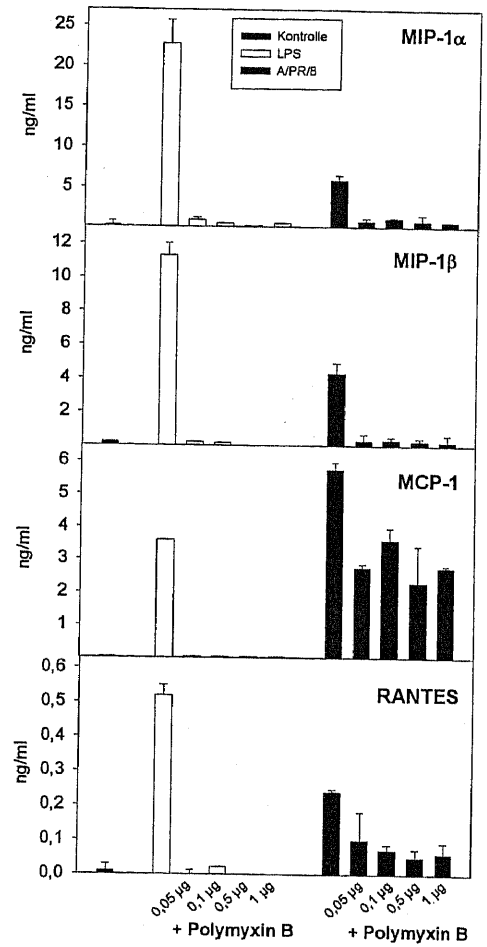


Abb. 35: Freisetzung der CC-Chemokine MIP-1α, MIP-1β, MCP-1 und RANTES aus Monozyte nach Vorinkubation mit Polymyxin B.
Humane Monozyten wurden 30 min mit Polymyxin B in verschiedenen Konzentrationen (0,05, 0,1 0,5 und 1 µg/ml) inkubiert und entweder mit 10 ng/ml LPS stimuliert oder mit 2 MOI A/PR/8 infiziert Kontrollzellen blieben unbehandelt. Nach 20 h wurden die Überstände gewonnen und im spezifischen ELISA die Freisetzung der CC-Chemokine analysiert. Dargestellt sind die MW ± SD eines repräsentativen Spenders.

6.3. Freisetzung des Zytokins TNF-α aus Monozyten nach Inkubation mit Polymyxin B

Als Vertreter proinflammatorischer Mediatoren wurde die Freisetzung von TNF-α untersucht. Es wurde bereits in früheren Arbeiten gezeigt, dass dieses Zytokin durch eine Influenza-Infektion in Monozyten induziert wird. Wie in Abb. 36 gezeigt, wurde durch das Antibiotikum sowohl die LPS- als auch die A/PR/8-induzierte TNF-α- Freisetzung komplett oder nahezu vollständig inhibiert.

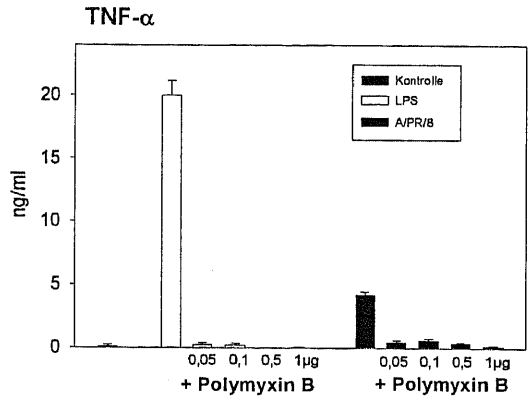


Abb. 36: Freisetzung des Zytokins TNF-α aus Monozyten nach Vorinkubation mit Polymyxin B. Humane Monozyten blieben unbehandelt oder wurden 30 min mit Polymyxin B in verschiedenen Konzentrationen (0,05, 0,1, 0,5 und 1 µg/ml) inkubiert und entweder mit 10 ng/ml LPS stimuliert oder mit 2 MOI A/PR/8 infiziert. Nach 20 h wurden die Überstände gewonnen und im spezifischen ELISA die Freisetzung von TNF-α analysiert. Die Graphik zeigt die die MW ± SD eines repräsentativen Spenders.

6.4. Hemmung der Zytokin- und Chemokinsynthese durch Polymyxin B nach Infektion mit inaktiviertem A/PR/8

Nachdem beobachtet wurde, dass das Antibiotikum Polymyxin B die Zytokin- und Chemokinfreisetzung aus Monozyten nach einer Infektion mit dem Influenza-Virus A/PR/8 unterbinden kann, stellte sich die Frage, ob es einen vergleichbaren Einfluss auf die Stimulation mit inaktivierten Viren hat. Nach einer 30 minütigen Inkubation bei 56°C ist das Protein Neuraminidase auf der Virushülle sowie die Polymerase nicht mehr intakt. Dagegen zerstört eine 45 minütige Bestrahlung mit UV-Licht die RNA und macht eine Replikation in der Zelle unmöglich. Die so

inaktivierten Viren wurden analog zum infektiösen A/PR/8 zu den Zellen gegeben, die zuvor mit 1 µg/ml Polymyxin B inkubiert worden waren. In allen Fällen wurde dabei von 2 MOI der ursprünglichen Virussuspension ausgegangen. Nach 20 Stunden wurden die Zellüberstände gewonnen und die freigesetzten Chemokine und Zytokine in spezifischen ELISAs bestimmt.

6.4.1. Hemmung der CC-Chemokinfreisetzung aus Monozyten durch Polymyxin B nach Infektion mit inaktiviertem Influenza A-Virus

Als repräsentative Vertreter der CC-Chemokine wurden MIP-1β und MCP-1 untersucht. Beide konnten nach einer Stimulation der Monozyten mit 56°C-inaktiviertem A/PR/8 in vergleichbaren Mengen im Überständ nachgewiesen werden wie nach einer Infektion mit aktivem Virus. Polymyxin B konnte diese ebenso wie in 6.2. gezeigt stark reduzieren, im Fall von MCP-1 sogar effektiver als nach der Inkubation mit infektiösem Virus. Dagegen wurden die beiden untersuchten CC-Chemokine durch das UV-inaktivierte A/PR/8 nicht in den Monozyten induziert. Die konstitutive Freisetzung wurde durch die Behandlung mit Polymyxin B jedoch weiter reduziert.

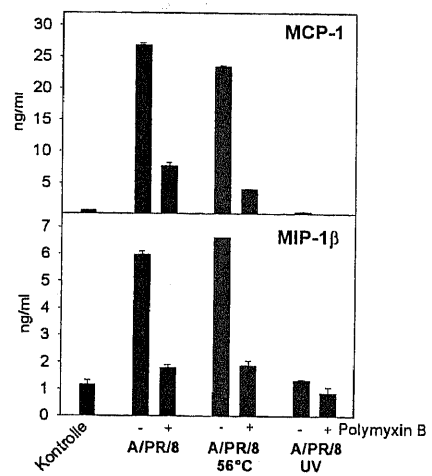


Abb. 37: MCP-1- und MIP-1β-Freisetzung aus mit Polymyxin B vorbehandelten humanen Monozyten nach Infektion mit infektiösem und inaktiviertem A/PR/8.
Neben einer Behandlung der Zellen mit 1µg/ml Polymyxin B wurde mit 2 MOI infektiösem, 56°C- oder UV-inaktiviertem Influenza A/PR/8 infiziert. Nach 20 h wurden die Überstände gewonnen und in spezifischen ELISAs die Freisetzung von MCP-1 bzw. MIP-α analysiert. Die Darstellung zeigt die MW ± SD eines repräsentativen Spenders.

6.4.2. Hemmung der Freisetzung von TNF-α aus Monozyten durch Polymyxin B nach Inkubation mit inaktiviertem A/PR/8

Das Zytokin TNF-α wurde sowohl durch infektiöses wie auch durch inaktiviertes A/PR/8 in Monozyten induziert. Dabei bewirkte das 56°C-inaktivierte Virus eine leicht verminderte, das UV-inaktivierte eine sehr stark reduzierte Freisetzung im Vergleich zum replikationsfähigen A/PR/8. Die durch alle drei Virussuspensionen hervorgerufene Induktion von TNF-α wurde auch hier durch Polymyxin B komplett inhibiert. Wie bei den CC-Chemokinen wurde nach der Behandlung mit dem Antibiotikum die konstitutiv freigesetzte TNF-α-Konzentration leicht verringert.

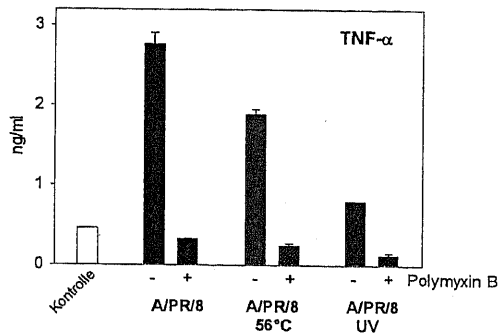


Abb. 38: TNF-α-Freisetzung aus mit Polymyxin B vorbehandelten humanen Monozyten nach Infektion mit infektiösem und inaktiviertem A/PR/8.
Neben einer Behandlung der Zellen mit 1µg/ml Polymyxin B wurde mit 2 MOI infektiösem, 56°C- oder UV-inaktiviertem Influenza Virus A/PR/8 infiziert. Nach 20 h wurden die Überstände gewonnen und im spezifischen ELISA die Freisetzung von TNF-α analysiert. Dargestellt sind die MW ± SD eines repräsentativen Spenders.

6.5. Fehlende Inhibition der Freisetzung von TNF-α und MIP-1β durch Polymyxin B nach Stimulation mit Zymosan

Die Beobachtung, dass Polymyxin B die Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen aus Monozyten supprimiert, die mit LPS oder dem Influenza-Virus A/PR/8 stimuliert worden waren, warf die Frage auf, ob diese Inhibition spezifisch ist. Es wurde daher mit Zymosan ein weiteres Stimulans eingesetzt, das von den Monozyten durch Phagozytose internalisiert wird und die Freisetzung bestimmter Zytokine und Chemokine induziert. Die Expression von TNF-α und MIP-1β diente

zur Untersuchung des Einflusses von Polymyxin B auf die Zymosan-vermittelte Stimulation. Humane Monozyten wurden mit Zymosan in einer Konzentration von 15 Partikeln pro Zelle stimuliert oder zusätzlich mit Polymyxin B in verschiedenen Konzentrationen behandelt. Nach 20 h wurden die Zellüberstände im ELISA bezüglich der Freisetzung von TNF-α und MIP-1β analysiert.

In Abb. 39 sind jeweils die Daten eines repräsentativen Spenders dargestellt. Nach einer Stimulation mit Zymosan wurde sowohl TNF-α wie auch MIP-1β aus den Monozyten freigesetzt. Die Synthese von MIP-1β wurde durch das Antibiotikum Polymyxin B leicht reduziert, allerdings war keine Dosisabhängigkeit erkennbar. Dagegen wurde TNF-α in unveränderten Konzentrationen aus den Zellen freigesetzt, Polymyxin B hatte keinen supprimierenden Einfluss. Demnach scheint das Antibiotikum keinen generell inhibierenden Effekt zu vermitteln, die Hemmung der LPS- und A/PR/8-induzierten Zytokin- und Chemokinfreisetzung ist also spezifisch.

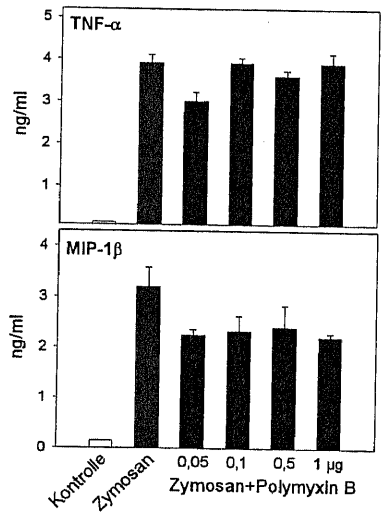


Abb. 39: Freisetzung von TNF-α und MIP-1β aus Monozyten nach Stimulation mit Zymosan und Behandlung mit Polymyxin B.
Humane Monozyten wurden mit 15 Zymosan-Partikeln pro Zelle inkubiert oder parallel mit verschiedenen Konzentrationen (0,05 µg, 0,1 µg, 0,5 µg oder 1 µg/ml) Polymyxin B versetzt. Kontrollzellen blieben unbehandelt. Die Überstände wurden nach 20 h in spezifischen ELISAs auf den Gehalt von TNF-α und MIP-1β hin untersucht. Dargestellt sind die MW ± SD eines repräsentativen Spenders.

IV. Diskussion

1. Transkriptionsregulation in Monozyten nach Infektion mit dem Influenza-Virus A/PR/8

Monozyten spielen eine entscheidende Rolle bei der Abwehr von Pathogenen. So beobachtet man zum Beispiel nach einer Infektion mit dem in dieser Arbeit verwendeten Influenza-Virus A/PR/8 die selektive Freisetzung verschiedener proinflammatorischer Zytokine und CC-Chemokine. Auf molekularer Ebene zeigt sich bereits nach 2 Stunden eine deutliche Erhöhung der Transkriptionsrate der zugehörigen Gene sowie eine Aktivierung bestimmter Transkriptionsfaktoren. Nach der Adsorption und Internalisierung des Influenza-Virus beginnt die de novo-Synthese viraler Proteine, die jedoch noch vor Vollendung des ersten Replikationszyklus abgebrochen wird, so dass so gut wie keine Freisetzung infektiöser Viruspartikel erfolgt (Kaufmann et al., 2001). Die Monozyten sterben daher nicht durch eine Zerstörung der Zellmembran wie z.B. Bronchialepithelzellen, in denen eine produktive Replikation stattfindet, jedoch wird 24-48 Stunden nach der Infektion der Untergang der meisten Monozyten durch Apoptose beobachtet. Diese Zeitspanne reicht allerdings zur Induktion einer antiviralen, zellspezifischen Antwort aus (Kaufmann et al., 2001).

Die Prozesse, die auf genregulatorischer Ebene in den Influenza-infizierten Monozyten vor dem Absterben ablaufen, sind erst in Ansätzen geklärt. Um die zellinterne Transkriptionsregulation in humanen Monozyten nach einer A/PR/8-Infektion genauer zu charakterisieren, wurden in der vorliegenden Arbeit zwei Methoden angewendet: die cDNA-Subtraktion und die cDNA-Microarray-Technologie (Atlas™).

1.1. Analyse der Genexpression in Influenza-infizierten Monozyten mithilfe der cDNA-Subtraktion

Mit der cDNA-Subtraktions-Methode wurde einerseits untersucht, welche Gene durch die Infektion mit A/PR/8 in den Monozyten induziert worden waren und damit vermehrt als Transkripte in den infizierten Zellen vorlagen, andererseits welche Sequenzen supprimiert wurden und damit in größerer Menge in den Kontrollzellen nachweisbar waren. Die Darstellung der amplifizierten zellulären Transkripte nach vollendeter Subtraktion zeigte, dass die Anzahl der vorliegenden mRNAs in den infizierten Monozyten deutlich höher lag als in den Kontrollzellen (Abb. 3). Dies war ein erster Hinweis darauf, dass die Infektion mehr Gene in der Zelle induziert als supprimiert, was sich bei den späteren Versuchen im cDNA-Microarray bestätigen sollte. Die Sequenzierung der klonierten Transkripte ergab, dass etwa die Hälfte der in den infizierten Zellen vermehrt vorliegenden mRNAs dem Virusgenom zuzuordnen waren. Dies entsprach den Erwartungen, da bereits 8 h nach der Infektion die maximale Translation der Virusproteine erreicht ist (Nain et al., 1990; Bender et al., 1993), so dass eine hohe Transkriptionsaktivität der entsprechenden Gene vorausgesetzt werden kann. Weiterhin wurden 7 zelleigene durch das Virus A/PR/8 induzierte Sequenzen gefunden, die bereits beschrieben waren oder deren genaue Funktion bekannt ist (Tab. 2). Vier davon ließen sich jedoch nicht in einen direkten Zusammenhang mit einer Influenza-Infektion stellen, wie z.B. das Neurofibromatose-Gen, so dass sie nicht ausführlicher untersucht wurden.

Weiterführende Versuche wurden in bezug auf die Expression von cig 5 und cig 33 durchgeführt. Diese Gene wurden erstmals innerhalb einer Studie identifiziert, die im Aufbau der hier vorliegenden ähnelte (Zhu et al., 1997). Mithilfe eines differential display wurden Sequenzen ermittelt, die durch die Infektion mit Cytomegalovirus in Fibroblasten induziert werden (cig: cytomegalovirus induced gene). Die Untersuchungen in meiner Arbeit zeigten anhand von RT-PCRs und Northernblots, dass cig 5 und cig 33 in allen analysierten Spendern nach der Infektion mit A/PR/8 in den Monozyten verstärkt transkribiert wurden (Abb. 6 und Abb. 7). Es wäre von großem Interesse, die Funktion der translatierten Proteine zu kennen, da sie offensichtlich bei verschiedenen Virusinfektionen eine Rolle spielen.

Die Identifizierung einer induzierten Gensequenz, die Homologien zu hsp 90 und SURF 4 (ein Membranprotein mit unbekannter Funktion) aufwies, veranlasste die Untersuchung der Expression von Hitzeschockproteinen nach einer Influenza-Infektion in Monozyten. Die Ergebnisse werden in 2. diskutiert. 17 Sequenzen wiesen im Vergleich mit einer Genbank keine Homologien auf, wurden also offensichtlich noch nicht kloniert. In Analogie zu den Versuchen mit Cytomegalovirus könnte man solche Gene als "Influenza-induced genes" bezeichnen.

Von den klonierten Transkripten, die in den infizierten Monozyten supprimiert waren, also in den Kontrollzellen in grösserer Menge vorlagen, konnten nur 11 bekannten Sequenzen zugeordnet werden (Tab. 3). Lediglich eine davon ist in einem direkten Zusammenhang mit einer Influenza-Infektion von Bedeutung: das cap binding protein (CBP, auch eukaryontischer Initiationsfaktor 4e (eIF4e)). Dieses Molekül ist essentiell an der Translation von mRNAs im Zytoplasma beteiligt, indem es an das 5´-cap bindet und somit wichtige Schritte der beginnenden Proteinsynthese initiiert. Neuere Studien zeigten außerdem eine Beteiligung dieses Faktors am nucleozytoplasmatischen Transport bestimmter mRNAs, an der Translationsregulation im Kern und möglicherweise bei oncogenen Prozessen (Strudwick et al., 2002). Bekannt ist, dass CBP nach verschiedenen Virusinfektionen, darunter auch Influenza A, durch eine Dephosphorylierung inaktiviert wird, so dass die Translation zelleigener Proteine verhindert wird. Die virusspezifischen mRNAs sind unabhängig von CBP, Resultat ist dadurch letztendlich die mehrheitliche Synthese von Virusproteinen in der Zelle (Feigenblum et al., 1993). Die Analyse der CBP-Transkriptionsregulation mittels RT-PCR ergab nun, dass sich die „Taktik" des Virus nicht auf diesen einen Mechanismus beschränkt. Zusätzlich zur Inaktivierung des fertigen Proteins bewirkt die Influenza-Infektion eine Inhibition der CBP-Gentranskription und führt damit zu einer Erniedrigung der intrazellulär verfügbaren Menge an CBP (s. Abb 8). Dies müsste noch anhand von Westernblots genauer untersucht werden.

Insgesamt ergab sich, dass die Methode der cDNA-Subtraktion nicht sehr effektiv ist. Die Suche nach induzierten oder supprimierten Genen liefert zwar unter Umständen interessante und unerwartete Ergebnisse, jedoch ist sie durch den Schritt des Klonierens und das nachfolgende Auswählen der Klone sehr

ungerichtet und zufällig. Lediglich zum Auffinden von Sequenzen, die bisher noch nicht kloniert und beschrieben wurden, bietet sich die Methode an.

1.2. Analyse der Genexpression in Monozyten nach Influenza-Infektion mithilfe der cDNA-Microarray-Technologie (Atlas)

Wesentlich gezieltere Untersuchungen im Vergleich zur cDNA-Subtraktion waren durch den Einsatz eines cDNA-Microarrays möglich, mit dem 1167 genau definierte Gene in einem Arbeitsgang untersucht werden konnten. Mithilfe radioaktiver Markierung kann die in einer Zellpopulation exprimierte mRNA eines Gens quantifiziert und mit der Expression in einer anderen Zellpopulation verglichen werden.

Zunächst wurde die mRNA eines ausgewählten Spenders zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion mit 2 MOI A/PR/8 analysiert. Nach 30 min war die Transkriptionsrate weniger Gene im Vergleich zu den Kontrollzellen erhöht, nach 1 Stunde mit knapp 200 regulierten Genen das Maximum erreicht und nach 6 Stunden eine Abnahme der Transkriptionsaktivität zu beobachten (Abb. 10). Dies passt zu Daten über die Stoffwechselaktivität in Monozyten, die unmittelbar nach der Infektion mit A/PR/8 eine Aktivierung zeigen, ab 6 Stunden p.i. aber zunehmend einem Vitalitätsverlust unterliegen (Fesq, 1997). Überraschend war dabei zunächst die unerwartet hohe Anzahl der regulierten Gene, die mit insgesamt 386 etwa ein Drittel der untersuchten Sequenzen darstellt. Weiterhin fiel das ungleiche Verhältnis von durch die Infektion induzierten (ca. 340) gegenüber den äußerst wenigen supprimierten (ca. 50) Genen auf. Allerdings hatte bereits die cDNA-Subtraktion einen Hinweis auf diese Tatsache geliefert, die eine deutlich größere Menge von Transkripten in den infizierten Monozyten als in den Kontrollzellen aufwies (Abb. 3). Diese starke Geninduktion war dabei keineswegs auf bestimmte funktionelle Bereiche beschränkt. Vielmehr konnte eine ähnliche Transkriptionsaktivität in allen untersuchten Gruppen beobachtet werden (Abb. 11 und Tab. 4). Unterschiede fielen lediglich im zeitlichen Verlauf auf: während in den meisten Bereichen das Maximum der induzierten Gene nach 1-3 Stunden erreicht war, steigerte sich die Anzahl der Gene mit erhöhter Transkriptionsaktivität in der Gruppe der Wachstumsfaktoren, Chemokine und Zytokine bis 6 Stunden nach der Infektion. Dies korreliert mit Daten über die

Freisetzung der zugehörigen Proteine, die bis über 24 Stunden p.i. im Überstand der Monozyten nachweisbar sind (Kaufmann et al., 2001).

Insgesamt ergab sich ein Bild, das darauf schließen lässt, dass die Monozyten nach einer Influenza-Infektion nicht mit einer sehr beschränkten, differenzierten Antwort reagieren. Sie zeigen im Gegenteil eine Art „Notbeleuchtung aller Lampen"/Panikreaktion, indem eine enorme, in ihrem Ausmaß beinahe unkontrolliert erscheinende Aktivierung der Transkriptionsrate induziert wird. Monozyten sind offensichtlich nicht die einzigen Zellen, die in dieser Weise auf eine Infektion mit Influenza A reagieren. Eine Studie mit dendritischen Zellen zeigte, dass auch diese Zellen, die sich aus Monozyten differenzieren, mit einer starken Induktion von Genen antworten, während nur ein geringer Teil supprimiert wird (Huang et al., 2001). Auch hier erstreckte sich die Regulation auf verschiedenste Funktionsgruppen, die nicht unbedingt in unmittelbarem Zusammenhang mit der Antwort gegen das Influenza-Virus stehen. Dass nur so wenige supprimierte Gene gefunden wurde, könnte eine Bestätigung dieses Effekts sein. Allerdings wäre auch denkbar, dass durch die getroffene Auswahl der auf dem Microassay repräsentierten Gene die inhibierten Sequenzen nur in geringer Anzahl untersucht wurden. Durch die Infektion wird mit Sicherheit auch ein deutlicher Anteil von Genen vermindert transkribiert, wie es verschiedene Versuche dieser Arbeit verdeutlichen (s. 5. und 6.). Weiterhin muss darauf hingewiesen werden, dass die Daten aus dem Microarray nicht im Einzelnen bestätigt wurden. Zur Absicherung müsste die Expression jedes einzelnen Genes mittels RT-PCR oder Northernblot analysiert werden, was aufgrund der großen Anzahl hier nicht möglich war. Eine Bestätigung, dass der Versuch realistische Daten liefert, wird durch die Analyse von Genen erbracht, deren Regulation bekannt ist. So wurden beispielsweise die Chemokine MCP-1, MIP-1α, und MIP-1β sowie das Zytokin TNF-α durch die A/PR/8-Infektion induziert, wie es in früheren Arbeiten beschrieben wurde (s. Tab. 4; Kaufmann et al., 2001; Hofmann et al., 1997).

Erschwert wird eine Auswertung der Daten durch die Wiederholung des Versuchs mit zwei weiteren Spendern. Zum gewählten Zeitpunkt von einer Stunde p.i. zeigten die Proben des einen Spenders keine Transkriptionsunterschiede zwischen Kontrolle und infizierten Monozyten. Möglicherweise reagieren die Immunzellen verschiedener Personen unterschiedlich schnell auf das Influenza-Virus und der untersuchte Zeitpunkt war in diesem Fall zu früh angesetzt. Der

Versuch mit einem dritten Spender, dessen Monozyten zwei Stunden p.i. analysiert wurden, konnte aufgrund großer Unterschiede der Signalintensität und des Hintergrundes auf den Membranen nicht ausgewertet werden. So bleibt es hier offen, ob der oben dargestellte Spender einen Repräsentanten darstellt, dessen Transkriptionsaktivität nach der Influenza-Infektion sich in einer breiten Allgemeinheit wiederfindet, oder ob es ein weites Spektrum von individuellen Reaktionsmustern gibt.

1.2.1. Erhöhung der Transkriptionsaktivität in Monozyten nach Stimulation mit LPS

Die Variabilität zwischen verschiedenen Spendern wird auch durch die Analyse der Genexpression nach LPS-Stimulation deutlich. Analog zu der Virusinfektion wurden Monozyten über 2 Stunden einem bakteriellen Stimulus, wie ihn das Endotoxin LPS repräsentiert, ausgesetzt und die Transkriptionsaktivität im Microarray Atlas analysiert (Abb. 12). Von den 1167 untersuchten Genen war hier nur eine relativ geringe Anzahl im Vergleich zu den Kontrollzellen verändert exprimiert: etwa 40 bei Spender 1 und 30 bei Spender 2. Diese geringe Induktion widersprach den Erwartungen, nach denen eine stärkere Transkriptionsaktivität nach LPS-Stimulation angenommen werden kann. Eine Suppression wurde nach der LPS-Stimulationen nur für 2 Gene bei Spender 1 gefunden, Spender 2 zeigte ausschließlich eine Erhöhung der Transkriptionsaktivität.

Wie unterschiedlich sich die beiden analysierten Spender bezüglich der Genexpression nach einer Stimulation mit LPS verhielten, zeigen die Einzeldarstellungen, in denen die Anzahl der induzierten Gene nach ihrer Funktion verschiedenen Gruppen zugeordnet wurden (Abb. 13). In fast allen Bereichen wurden in beiden Spendern nur teilweise dieselben Gene verstärkt transkribiert, der Rest variierte. Lediglich in der Gruppe der Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren stimmten die bei beiden Spendern induzierten 7 Gene exakt überein.

Die relativ geringe Anzahl von regulierten Genen in beiden Spendern muss auch in dem Zusammenhang gesehen werden, dass es sich um dieselben Proben handelte, die nach der Influenza-Infektion überhaupt keine veränderte Transkriptionsaktivität zeigten (bzw. eine Membran war nicht auszuwerten). Der Spender, der etwa bei einem Drittel der untersuchten cDNAs eine Regulation

nach der Infektion aufwies, wurde nicht analog nach einer LPS-Stimulation analysiert. Die Ergebnisse aus III.1.2.1. und III.1.2.3. sind also nicht direkt vergleichbar.

2. Induktion von Hitzeschockprotein (hsp)-Genen in Monozyten nach Infektion mit A/PR/8

Hitzeschockproteine sind Chaperone, die während der Biosynthese die korrekte Faltung der Proteine gewährleisten und denaturierte oder ungefaltete Moleküle im Zytoplasma erkennen und korrigieren. Sie können damit zellprotektiv beim Einfluss von verschiedenen Stressfaktoren wirken, so wurde die Induktion durch Hitzeschock, Hypoxie, Endotoxine und Infektionen beschrieben (Fink, 1999). Aber auch Viren können die Expression bestimmter hsp in unterschiedlichen Zellen verändern. So wird z.B. hsp 40 durch Adenovirus induziert (Glotzer et al., 2000), hsp 70 durch Hantaan-Virus, Vaccinia-Virus und HIV (Ye et al, 2001; Jindal et al., 1992; Brenner et al., 1999) und hsp 60 durch Influenza A-Virus (Ponniah et al., 1996). Die Hitzeschockproteine scheinen eine entscheidende Rolle bei der Virusreplikation zu spielen, was sich aus ihrer Funktion als Chaperone erklärt. In vielen Fällen wird eine Kolokalisierung von hsp mit Virusproteinen gefunden, die für die korrekte Faltung und das Virus-assembly essentiell ist (Hung et al., 2002; Brenner et al., 1999). Die Wechselwirkungen zwischen Viren und hsp sind aber noch komplexer: so kann z.B. hsp 70 die Replikation von Sendai-Virus inhibieren (Amici et al., 1991) und Influenza-Viren inhibieren die hsp 70-Proteinsynthese, indem das Schneiden an der Polyadenylierungsstelle der pre-mRNA verhindert wird (Shimizu et al., 1999). Insgesamt lässt sich feststellen, dass eine Regulation von verschiedenen Mitgliedern der hsp-Familie während Virusinfektionen häufig zu finden ist, die Auswirkungen aber genauso gut pro- wie antiviral sein können.

Nur wenig war bisher über den Einfluss von Influenza A-Viren auf die Regulation von hsp-Genen bekannt, bezogen auf Monozyten gab es gar keine Daten. Die Ausführung oben zeigt, wie entscheidend diese Moleküle auf den Verlauf einer Infektion einwirken können, eine genauere Untersuchung über die hsp-

Transkriptionsregulation nach einer A/PR/8-Infektion lag also nahe. Hinzu kam der Befund aus der cDNA-Subtraktion, demzufolge ein hsp 90-ähnliches Transkript durch das Virus induziert wurde (Tab. 2). Die Expression der Gene für hsp 40, hsp 60, hsp 70 und hsp 90 wurde in Monozyten analysiert, die 6 h mit 2 MOI des Influenza-Virus A/PR/8 infiziert waren.

Für die Transkriptionsaktivität von hsp 70 ließ sich keine einheitliche Regulation durch die Infektion erkennen. Einige Spender (40%) zeigten eine Induktion des Gens, andere (60%) ließen keinen deutlichen Unterschied zur Kontrolle erkennen (Daten nicht gezeigt). Dies ist erstaunlich, da gerade für hsp 70 eine gezielte Regulation durch verschiedene Viren und essentielle Wechselwirkungen während der Virusreplikation bekannt waren. Möglicherweise ist eine Induktion dieses Gens in der Zelle nicht unbedingt notwendig. Das Protein wird konstitutiv exprimiert und könnte damit in ausreichendem Maße für die Replikation des Virus vorliegen. Weiterhin ist folgender Mechanismus denkbar: es wurde nachgewiesen, dass im Influenza-Virion hsp 70 integriert ist (Sagara et al., 1992), wenn auch nur in geringen Mengen (<1%). Falls das Protein den Abbau in den Lysosomen umgehen kann, würde das Virus einfach das benötigte hsp 70 selbst "im Gepäck" mit in die Zelle bringen und eine Induktion des Gens wäre unnötig.

Eine deutliche Regulation fand sich in allen untersuchten Spendern für hsp 40 (Abb. 14). Während in Kontrollzellen nur geringe Mengen der mRNA nachweisbar waren, zeigte sich nach der Infektion eine Erhöhung der Transkriptionsrate um ein Vielfaches. Neben der Hilfe beim Virus-Zusammenbau könnte die verstärkte hsp 40-Expression eine weitere, allerdings anivirale, Funktion haben. Hsp 40 greift in die Infektion von Influenza-Viren ein, indem es als Inhibitor von P58 fungiert, das wiederum PKR (Serin-Threonin-Proteinkinase) inhibiert, den Vermittler der Interferon-Typ I-Antwort (Melville et al., 1996). Das Virus bewirkt zwar eine Dissoziation des hsp 40 vom PKR-Inhibitor, so dass dessen antiviralen Effekte verhindert würden, aber möglicherweise kann dies durch eine Erhöhung der hsp 40-Konzentration kompensiert werden.

Das Gen für hsp 60 wurde durch die Infektion mit A/PR/8 in Monozyten induziert und bestätigte damit den früheren Befund aus Untersuchungen in T-Zellen (Ponniah et al., 1996). Auch die Transkriptionsaktivität des hsp 90-Gens wurde durch das Virus erhöht. Diese Induktion fiel jedoch, genau wie bei hsp 60, nicht ganz so drastisch aus wie für hsp 40 (Abb. 14). Eine Hilfe dieser Chaperone bei

der Synthese von Virusproteinen ist wahrscheinlich, insofern wäre die erhöhte Expression der zugehörigen Gene mit einem Vorteil für das Virus zu verbinden. Kürzlich wurde beschrieben, dass hsp 60 und hsp 70 endogene Liganden der toll-like receptors (TLR) 2 und 4 sind (Ohashi et al., 2000; Dybdahl et al., 2002). Sie vermitteln über diese Rezeptoren der angeborenen Immunität eine inflammatorische Antwort. Eine erhöhte Synthese von hsp 60 in Monozyten nach der Infektion mit Influenza könnte somit nicht nur für das Virus vorteilhaft sein, sondern auch der Zelle bei einer schnellen Abwehrreaktion helfen.

3. A/PR/8-induzierte Veränderungen der Proteasomenspezifität in Monozyten

Eine effektive, spezifische Immunantwort ist nur dann gewährleistet, wenn die Antigene des Pathogens über MHC-Moleküle an T-Zellen präsentiert werden. Intrazelluläre Proteine werden im sogenannten 20S-Proteasom, einem Proteasekomplex aus 28 Untereinheiten, abgebaut und als Peptidfragmente von 8-9 AS an MHC I gebunden. Dieses wandert daraufhin zur Zelloberfläche, wo die Präsentation an zytotoxische T-Zellen erfolgt (Rock et al., 1999). Neben dem konstitutiven Standardproteasom findet man auch so genannte Immunproteasomen, die z.B. durch den Einfluss von IFN-γ und TNF-α während einer akuten Immunantwort induziert werden. Dabei beobachtet man einen Austausch der drei katalytischen Untereinheiten des konstitutiven Proteasoms X, Y und Z gegen die Komponenten LMP 7 (low molecular protein 7), LMP 2 und MECL-1 (multicatalytic endopeptidase complex-like 1), respektive. Die Folge ist eine veränderte Antigenprozessierung, die zu einer verbesserten oder verringerten Effektivität der Präsentation führt (Tanaka et al., 1998). Es wurden Antigene beschrieben, die ausschließlich vom Immunproteasom generiert werden, so z.B. verschiedene Virusepitope wie das Influenza Matrix-Protein (Gileadi et al., 1999). Genauso gibt es Epitope, die effektiver nach der Prozessierung im Standardproteasom präsentiert werden können.

Es stellte sich die Frage, ob eine Infektion mit dem Influenza-Virus A/PR/8 zur Induktion des Immunproteasoms führt und damit das Spektrum der präsentierten Antigene verändert. Mittels RT-PCR wurde mRNA von Monozyten untersucht, die 8 h mit 2 MOI des Virus infiziert worden waren oder unstimuliert blieben. Die Auswertung zeigte eindeutig einen Austausch von zwei der drei Komponenten auf transkriptioneller Ebene. Dies hätte bereits zu einer veränderten Spezifität der Antigenprozessierung zur Folge (Gileadi et al., 1999). Die konstitutiven Untereinheiten X und Y waren durch die Infektion stark reduziert, während die mRNA für LMP 7 und LMP 2 gegenüber der Kontrolle deutlich erhöht waren (Abb. 15A,B). Der Austausch der dritten konstitutiven Komponente Z durch die Immunproteasom-Einheit MECL-1 konnte dagegen nicht sicher nachgewiesen werden. Zwar verursachte die Infektion eine Reduktion der Expression von Z (Abb. 15C), jedoch variierte die MECL-1-Transkriptionsaktivität bei verschiedenen Spendern. Ein Teil (15%) wies die erwartete Zunahme der MECL-1-mRNA durch A/PR/8 auf (Abb. 15D), was zusammen mit den ebenfalls induzierten Komponenten LMP 2 und LMP 7 die Umwandlung in ein vollständiges Immunproteasom ermöglichen würde. Andere Spender (50%) dagegen zeigten eine verringerte Transkription des MECL-1-Gens (Abb. 15C), was zusammen mit der Abnahme von Z dazu führen könnte, dass zu wenig Komponenten für das Gesamtproteasom translatiert werden. 35% der Spender zeigten keine Veränderung der Transkriptionsaktivität nach der Infektion mit A/PR/8. Auch in anderen Untersuchungen nimmt MECL-1 eine Sonderstellung ein. So wurde in verschiedenen Zellen keine Induktion dieser Komponente durch IFN-γ und TNF-α erreicht, wohl aber der beiden LMPs (van den Eynde et al., 2001). Weiterhin beobachteten Groettrup et al. (2001), dass in humanen Zelllinien nach dreitägiger IFN-γ-Behandlung zwar ein kompletter Austausch der Standardkomponenten X und Y gegen LMP 7 und LMP 2 erfolgte, jedoch der Ersatz von Z durch MECL-1 nur zu 50% stattfand.

Der Wechsel vom Standard- zum Immunproteasom ist auf Transkriptionsebene bereits nach 8 h deutlich erkennbar, was auf eine Induktion direkt durch die Infektion schließen lässt. Zwar wird im Verlauf einer Immunantwort auf das Influenzavirus TNF-α, das ebenfalls als Induktor wirkt (Hallermalm et al., 2001), aus den Monozyten freigesetzt, jedoch nur in geringen Mengen und frühestens nach 16 h (Nain et al., 1990).

Nach 24 h kehrte sich der beobachtete Vorgang offensichtlich wieder um: die Komponenten X, Y, und Z wurden stärker exprimiert als nach 8 h und im Gegenzug reduzierte sich die Transkriptionsaktivität von LMP 7. LMP 2 zeigte zu diesem Zeitpunkt allerdings noch vergleichbare mRNA-Mengen wie nach 8 h. Insgesamt deutet sich darin ein erneuter Austausch an, der aber keine Auswirkung mehr haben dürfte, da die meisten Zellen 24 h bis 48 h p.i. in Apoptose gehen (Fesq, 1997).

Auffallend war, dass alle Komponenten, also die des konstitutiven und die des Immunproteasoms, auch in den Kontrollzellen als mRNA vorlagen. Eine Erklärung dafür wäre, dass die Monozyten beide Formen des Proteasoms nebeneinander exprimieren. Sie würden damit den unreifen dendritischen Zellen ähneln, die sich aus ihnen differenzieren, und in denen Immunproteasomen und Standardproteasomen in gleichen Anteilen konstitutiv vorliegen (Macagno et al., 1999). Eine andere Möglichkeit wäre, dass die Spender nicht allzu lange vor der Blutentnahme auf eine Infektion oder eine unspezifische Stimulation mit der Induktion der Immunproteasom-Komponenten reagiert hat, die noch nicht wieder völlig abgeklungen ist.

3.1. Einfluss von inaktivierten Viren und LPS auf die Induktion von Immunproteasomen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass das Influenza-Virus A/PR/8 in Monozyten die Komponenten des Immunproteasoms induziert, wurde untersucht, ob auch inaktivierte Viren diese Fähigkeit besitzen. Zum Vergleich mit der viralen Infektion wurde weiterhin LPS als bakterieller Stimulus eingesetzt. Ergänzend wurde der Einfluss einer Kostimulation aus A/PR/8 und LPS analysiert. In Abb. 16 sind die Daten einer RT-PCR gezeigt, die mit der mRNA eines Spenders nach 8-stündiger Inkubation durchgeführt wurde. Die Regulation der Komponenten Z und MECL-1 ist dabei nicht dargestellt, da sie, wie oben erläutert, nicht in allen Spendern einheitlich war.

Eine Hitzeinaktivierung der Influenza-Viren bei 56°C verursacht die Zerstörung des Hüllproteins Neuraminidase sowie der Polymerase. Dies hat zur Folge, dass das Virus zwar noch in die Zelle eindringen kann, dort aber nicht repliziert wird.

Abb. 16 zeigt, dass eine Inkubation der Monozyten mit dem 56°C-inaktivierten A/PR/8 nahezu die gleichen Auswirkungen hatte wie die Infektion mit dem aktiven Virus. Die Transkription der konstitutiven Komponenten X und Y nahm im Vergleich zur Kontrolle deutlich ab, während LMP 7 und LMP 2 aufreguliert wurden. Das inaktivierte Virus war dabei nicht ganz so effektiv wie das infektiöse (LMP 7, Y), aber der Wandel in der Transkription hin zum Immunproteasom war eindeutig. Der dargestellte Spender zeigte sogar eine stärkere Induktion von LMP 2 durch das 56°C-behandelte Virus als durch das native. Das Ergebnis lässt darauf schließen, dass weder die Neuraminidase noch die Replikationsfähigkeit des Virus notwendig für die Induktion der Immunproteasom-Komponenten sind. Im Gegensatz dazu stand die Inkubation mit UV-inaktiviertem A/PR/8. Durch die UV-Bestrahlung wird das virale Genom zerstört, die Proteine bleiben jedoch intakt. Die Monozyten zeigten nach der Stimulation mit diesem inaktivierten Virus keine transkriptionellen Unterschiede aller untersuchten Gene im Vergleich mit der Kontrolle. Offensichtlich gibt es UV-sensitive Faktoren im Virus, die essentiell für die Regulation der Proteasom-Komponenten sind.

Wenig war bisher über den Einfluss von LPS auf die Induktion von Immunproteasomen bekannt. Lediglich McAry et al. (2001) beschrieben erhöhte Konzentrationen von LMP 2 und LMP 7 in Langerhanszellen nach 12-stündiger LPS-Stimulation. Ein in vivo-Modell in Mäusen bestätigte den Austausch von konstitutiven gegen Immunproteasomen nach der Infektion mit Listeria monocytogenes nach 7 Tagen (Khan et al., 2001). Die Untersuchung innerhalb dieser Arbeit lieferte keinen deutlichen Hinweis darauf, dass LPS in Monozyten die Induktion von Immunproteasomen auf Transkriptionsebene hervorrufen kann. Im gezeigten Spender (Abb. 16) findet man zwar eine leichte Erhöhung der LMP 7- und LMP 2-mRNA, dies konnte jedoch in weiteren Spendern nicht bestätigt werden. Möglicherweise ist der Zeitpunkt 8 h zu früh gewählt und der Austausch der Komponenten findet erst später statt. Da Monozyten durch die Stimulation mit LPS nicht so schnell zugrunde gehen wie nach der Influenza-Infektion, könnte auch ein späterer Wechsel zum Immunproteasom noch effektiv sein.

Eine Gefahr für den menschlichen Organismus stellen bakterielle Superinfektionen dar, die nach einer Influenza-Erkrankung auftreten und oft zu schweren Komplikationen führen. Diese können teilweise durch eine überschießende Immunreaktion verursacht werden, die sich z.B. in stark erhöhter

Zytokinfreisetzung äußert (Fields, 1991). Die Analyse der Expression von Bestandteilen des Proteasoms nach einer Doppelstimulation von A/PR/8 und LPS zeigte eine drastische Reduktion der konstitutiven Komponenten ohne Induktion der Immunproteasom-Untereinheiten. Dies könnte in der Folge zu einem Mangel an Antigenprozessierung und damit –präsentation aufgrund fehlender Proteasomen führen. Aber selbst wenn die Anzahl ausreicht, handelt es sich ausschließlich um Standardproteasomen, die bestimmte Antigene nicht generieren können. So würde beispielsweise das Influenza-Matrix-Protein, das nur im Immunproteasom prozessiert werden kann, nicht präsentiert werden können und eine entsprechende Immunantwort durch T-Zellen bliebe aus.

4. Übertragung virusinduzierter Signale über pattern recognition receptors (PRR)

Die durch Influenza-Viren induzierte, spezifische Immunantwort durch Monozyten wurde in der Vergangenheit bereits sehr genau untersucht und charakterisiert. Sie zeichnet sich durch die selektive Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen der CC-Familie aus, wodurch es zur Monozyteninfiltration ins infizierte Gewebe kommt. Die Transkriptionsaktivität verschiedener Gene wird gesteigert und es wird die Aktivierung und nukleäre Translokation von Transkriptionsfaktoren beobachtet (Kaufmann et al., 2001). Völlig unbekannt war jedoch bisher, über welche Rezeptoren die entsprechenden Signale vom Virus ins Zytoplasma übertragen werden. Die Anheftung an die Zelle und anschließende Internalisierung der Influenza-Viren erfolgt über sialinsäurehaltige Proteine und Lipide auf der Zelloberfläche, also eine Vielzahl verschiedenster Moleküle (Fields, 1991). Ein Teil davon verfügt zwar über zytoplasmatische Signaldomänen, jedoch ist es aufgrund der Heterogenität dieser Rezeptoren unwahrscheinlich, dass die gezielte Immunantwort auf diesem Weg induziert wird.
In dieser Arbeit wurde untersucht, ob pattern recognition receptors (PRR) für die Signaltransduktion verantwortlich sind. Diese Rezeptoren der angeborenen Immunität erkennen hochkonservierte molekulare Muster auf verschiedensten Mikroorganismen (Medzhitov et al., 2000). Insbesondere die Entdeckung und

Charakterisierung der toll-like receptors (TLR) bietet neue Erklärungsansätze, wie Signale von verschiedensten Pathogenen übertragen werden können. So wurden als Liganden für verschiedene TLR beispielsweise LPS (TLR 4), verschiedene bakterielle Lipoproteine, Zymosan, Lipoarabinomannan (TLR 2), CpG-DNA (TLR 9) und dsRNA (TLR 3) identifiziert (Underhill et al., 2002). Von besonderem Interesse war der Befund, dass auch eine virale Infektion, nämlich RSV (respiratory syncytial virus), eine Immunantwort über TLR 4 in Verbindung mit CD 14 (ebenfalls ein PRR) auslösen kann (Kurt-Jones et al., 2000). Es lag also nahe zu überprüfen, ob Interaktionen zwischen PRR und dem Influenza-Virus A/PR/8 ebenfalls zur Signalinduktion in Monozyten führen.

4.1. Influenza-Viren induzieren Signale in Monozyten mithilfe von CD 14

Es wurde zunächst untersucht, ob das Molekül CD 14 eine Rolle bei der Vermittlung virusinduzierter Signale ins Zellinnere spielt. CD 14 gehört zu den PRR, kann jedoch selbst keine Signaltransduktion bewirken, da eine entsprechende zytoplasmatische Domäne fehlt. Dennoch ist es essentiell an der Initiierung der Immunantwort durch verschiedene Pathogene wie Bakterien (LPS), Pilze und RSV beteiligt (Kurt-Jones et al., 2000). Durch die Assoziation mit TLR 2 und TLR 4 ermöglicht oder verbessert CD 14 dabei die Interaktion der Liganden mit den signalvermittelnden TLR.

Die Funktion von CD 14 innerhalb einer Influenza-Infektion wurde untersucht, indem der Rezeptor funktional durch einen monoklonalen Antikörper blockiert wurde. Es war bekannt, dass eine Bindung des Liganden LPS auf diese Weise verhindert wird und damit auch die Induktion von Signalen über TLR, die für die Freisetzung bestimmter Zytokine und Chemokine notwendig sind. LPS wurde bereits vor vielen Jahren als Ligand des CD 14-Moleküls identifiziert, die Stimulation von Monozyten mit diesem Endotoxin bot sich daher als Kontrolle des Versuchssystems an. Zytokine und Chemokine, die gewöhnlich durch LPS aus den Zellen freigesetzt werden, konnten im ELISA gemessen werden und sollten nach Blockierung von CD 14 nicht mehr im Überstand nachweisbar sein. Ebenso sollten die Mediatoren einer Influenza-spezifischen Immunantwort nach einer Infektion mit A/PR/8 fehlen, falls dieser Rezeptor für die Signaltransduktion durch

das Virus essentiell ist. Der blockierende Antikörper wurde in verschiedenen Konzentrationen (1, 2, 8 µg) eingesetzt, außerdem eine Isotyp-Kontrolle, die keinen blockierenden Effekt zeigen sollte.

In der Tat zeigten die Monozyten keine inhibierte Zytokin- und Chemokinfreisetzung durch die Vorinkubation mit dem unspezifischen Antikörper. Dagegen konnte die blockierende Wirkung des anti CD 14-Antikörpers bestätigt werden. Alle analysierten Zytokine und Chemokine, die nach einer LPS-Stimulation über 20 h aus den Monozyten freigesetzt wurden, waren aufgrund der CD 14-Blockierung nur noch in stark reduzierten Konzentrationen im Überstand nachweisbar oder sogar komplett inhibiert (Abb. 17-20). Überraschend war dagegen der Befund, dass das CD 14-Molekül auch für die Übertragung virusinduzierter Signale notwendig zu sein scheint, die zur Freisetzung bestimmter Zytokine und Chemokine führen. Eine Blockierung des Rezeptors verminderte nach einer A/PR/8 Infektion über 20 h die Induktion der CC-Chemokine MIP-1α, MIP-1β und RANTES (Abb. 18), des CXC-Chemokins IP-10 (Abb. 17) und der Zytokine TNF-α und IL-10 (Abb. 20). Diese Immunmediatoren werden normalerweise im Verlauf einer Influenza-Infektion aus Monozyten freigesetzt (Kaufmann et al., 2001). Die Inhibition der Signaltransduktion durch den Antikörper erwies sich dabei in allen eingesetzten Konzentrationen als nicht ganz so effektiv wie in Bezug auf die LPS-Stimulation. Lediglich die Ausschüttung von TNF-α wurde nach der Influenza-Infektion genauso stark reduziert wie nach der Inkubation der Monozyten mit dem bakteriellen Stimulus. Mit einer Verminderung von maximal ca. 65% (MIP-1α), 80% (MIP-1β), 60% (RANTES), 50% (IP-10) und 50% (IL-10) beim dargestellten Spender ist jedoch eindeutig gezeigt, dass dem CD 14-Molekül bei der Vermittlung Influenza-induzierter Signale in Monozyten eine entscheidende Rolle zukommt. Interessant ist dabei, dass sowohl proinflammatorische als auch antiinflammatorische Mediatoren über dasselbe Molekül induziert werden.

Eine Besonderheit zeigte die Untersuchung des CC-Chemokins MCP-1. Hier waren zwei Gruppen von Spendern zu beobachten, die bei der CD 14-Blockierung ein unterschiedliches Verhalten in Bezug auf die MCP-1-Freisetzung aufwiesen. Einige Spender (Gruppe A, ca. 50%) zeigten, wie für die anderen CC-Chemokine beschrieben, durch die Vorinkubation mit dem anti CD 14-Antikörper eine verminderte MCP-1-Induktion nach der A/PR/8-Infektion (Abb. 19). Diese Reduktion fiel mit maximal 50% (beim dargestellten Spender) zwar eher gering

aus, ist aber signifikant. Eine zweite Spendergruppe B dagegen reagierte überhaupt nicht auf die Blockierung des CD 14-Moleküls. Es wurden die gleichen MCP-1-Konzentrationen im Zellüberstand gemessen wie in den Monozyten, die nicht mit dem Antikörper inkubiert worden waren. Dieselben Spender zeigten jedoch die erwartete Inhibition der LPS-vermittelten MCP-Freisetzung, d.h. der Rezeptor war tatsächlich blockiert. Offensichtlich existiert neben dem Signalweg über CD 14 eine Alternative, die nach einer Influenza-Infektion in Monozyten zur Induktion von MCP-1 führt. Eine weitere Auffälligkeit war zu beobachten: die Wirksamkeit des blockierenden Antikörpers war nur in bestimmten Konzentrationen optimal. Sowohl zu niedrige als auch zu große Mengen konnten keine effektive Blockierung des CD 14-Moleküls bewirken. Deutlich wird dies z.B. in Abb. 18, die für die virusinfizierten Monozyten nur in der Konzentration von 2 µg/ml die maximale Reduktion der Freisetzung von MIP-1α und MIP-1β darstellt. Teilweise war allerdings auch die mittlere gewählte Antikörperkonzentration unwirksam, wie die Analyse von IP-10 (Abb. 17) und MCP-1 (Abb. 19, Spender A) verdeutlicht. Eine Ursache dafür ist möglicherweise die unspezifische Stimulation der Monozyten durch sich ausbildende Immunkomplexe in bestimmten Konzentrationsverhältnissen.

Die Daten aus den Versuchen mit dem CD 14-blockierenden Antikörper deuteten auf eine entscheidende Rolle als Signalvermittler dieses Moleküls während einer Influenza-Infektion hin. Mit Sicherheit kann diese Funktion aber erst bestätigt werden, wenn die Wirkung des Virus auf Zellen untersucht wird, denen CD 14 fehlt. Es wurden Makrophagen aus einer CD 14-knockout-Maus analysiert, die entweder zur Kontrolle mit LPS stimuliert oder verschiedenen Dosen A/PR/8 infiziert wurden (Abb. 23 und 24). Eine LPS-Stimulation konnte in den Zellen nicht mehr zur Induktion der untersuchten Chemokine führen, da hierfür CD 14 notwendig ist. Dagegen wurde aus Makrophagen der Kontrollmaus, die CD 14 exprimieren, sowohl JE (das Maus-Homolog zu MCP-1) als auch MIP-1α durch LPS freigesetzt. Beide CC-Chemokine wurden in den Überständen der Kontrollzellen ebenfalls nach der Infektion mit A/PR/8 (0,5, 3, 20 MOI) nachgewiesen. Wäre CD 14 tatsächlich für eine Signalübertragung durch das Virus notwendig, sollte sich dies in einer inhibierten Chemokinfreisetzung aus den Makrophagen der knockout-Maus äußern. Abb. 23 und 24 zeigen, dass dies zutrifft, wenn auch mit Einschränkung.

Die Infektion mit der geringsten Virusdosis (0,5 MOI) rief bei Zellen mit fehlendem CD 14 keine Induktion von JE und MIP-1α hervor. 3 MOI des Virus führten zwar zu einer Freisetzung beider Chemokine, jedoch war die Konzentration gegenüber dem Kontrolltier deutlich vermindert. Dabei ist darauf hinzuweisen, dass die absoluten Werte nicht direkt verglichen werden können, da es sich um verschiedene Mausstämme handelt. Die Tendenz spricht aber eindeutig für eine Inhibition der Induktionseffektivität durch den Verlust von CD 14. Dagegen ist die Signalübertragung nach einer Infektion mit sehr hohen Virusdosen (20 MOI) offensichtlich unabhängig von diesem Molekül. Die freigesetzten Chemokinkonzentrationen aus Makrophagen der knockout-Maus entsprach etwa derjenigen des Kontrolltieres. Es wäre denkbar, dass neben CD 14 auch andere Rezeptoren die Signalübertragung vermitteln, die durch Influenza-Viren induziert wird und in der Zelle eine Immunantwort hervorruft. Möglich wäre auch, dass die Interaktion zwischen Virus und signalgebendem Rezeptor bei hohen Konzentration nicht mehr von der Vermittlung durch CD 14 abhängig ist. Das Molekül erleichtert zwar den Kontakt von Liganden wie LPS mit ihrem eigentlichen Rezeptor (z.B. TLR 4), jedoch kann dieser vielleicht auch selbstständig hergestellt werden, wenn die Ligandendichte entsprechend hoch ist. Nicht auszuschließen ist außerdem, dass das Maussystem im untersuchten Zusammenhang nicht völlig dem humanen entspricht.

4.2. Vermittlung von Signalen in Monozyten über CD 14 durch inaktiviertes A/PR/8

Müssen Influenza-Viren strukturell intakt und infektiös sein, um über CD 14 eine Immunantwort hervorzurufen? Es wäre zu erwarten, dass die Replikationsfähigkeit hierbei keine Rolle spielt. Lediglich die Hüllproteine sollten notwendig sein, um mit CD 14 interagieren zu können. Frühere Versuche hatten bereits gezeigt, dass Chemokine und Zytokine, die durch eine Infektion mit aktivem A/PR/8 in Monozyten induziert wurden, genauso nach der Inkubation mit hitze- und teilweise mit UV-inaktivierten Viren aus den Zellen freigesetzt wurden (Kaufmann et al., 2001). Der Verlust der Replikationsfähigkeit kann durch eine Bestrahlung der Viren mit UV-Licht oder durch Hitzeinaktivierung erlangt werden.

Letztere zerstört außerdem das Hüllprotein Neuraminidase. Das 56°C-inaktivierte A/PR/8 induzierte in den Monozyten leicht verminderte bzw. sogar größere Mengen TNF-α und MIP-1β, respektive, wie das infektiöse Virus (Abb. 21). Dies bestätigte die Daten aus früheren Versuchen. Wurde das CD 14-Molekül durch den blockierenden Antikörper unzugänglich gemacht, wurde im Zellüberstand sowohl das Zytokin als auch das CC-Chemokin nur noch in Konzentrationen nachgewiesen, die den unbehandelten Kontrollzellen entsprachen. Die UV-bestrahlten Viren konnten dagegen gegenüber der Kontrolle nur eine geringfügig gesteigerte Freisetzung von TNF-α hervorrufen, auch diese Induktion fehlte nach der CD-14-Blockierung. MIP-1β wurde nach der Inkubation mit UV-inaktiviertem A/PR/8 nicht verstärkt aus den Monozyten freigesetzt. Allerdings war zu beobachten, dass selbst die konstitutive Synthese durch die Inkubation mit dem anti CD 14-Antikörper reduziert wurde.

Die Analyse von MCP-1 wies wiederum zwei Spenderpopulationen auf (Abb. 22). Während UV-bestrahltes Virus kein MCP-1 in den Monozyten induzieren konnte, führte hitzeinaktiviertes A/PR/8 in allen Spendern zur Induktion des Chemokins. Eine Blockierung des CD 14-Moleküls inhibierte bei einer Spendergruppe A (ca. 50% der untersuchten Spender) diese Freisetzung stark. Die zweite Gruppe B setzte jedoch identische MCP-1-Konzentrationen frei wie bei frei zugänglichem CD 14, die Blockierung hatte überhaupt keinen hemmenden Effekt. Dies entsprach der Beobachtung nach Infektion mit aktivem Influenza-Virus. Insgesamt lässt sich feststellen, dass 56°C-inaktiviertes Virus vergleichbar effektiv eine spezifische Immunantwort in Monozyten initiiert wie infektiöses A/PR/8, während UV-bestrahltes Virus nicht dazu in der Lage ist. Dies war bereits bekannt; es konnte hier jedoch ergänzt werden, dass CD 14 ein entscheidendes Signal-vermittelndes Moleküls bei der Induktion darstellt. Für die Interaktion mit dem Oberflächenmolekül ist eine intakte Struktur der Virusproteine mit Ausnahme der Neuraminidase notwendig, während die Replikationsfähigkeit keine Rolle spielt. Es scheint entscheidende UV-sensible Strukturen auf dem Virus zu geben, die für die Interaktion mit CD 14 essentiell sind. Das Ergebnis könnte auch früher durchgeführte Studien mit Virosomen erklären (Pauligk, 1997; Kaufmann, 1998). Diese bestehen aus der kompletten Virushülle, die RNA sowie die Nukleokapsidproteine fehlen jedoch. Allein durch die Anheftung der Hüllproteine an die Zielzelle wird eine Reihe von immunregulatorischen Signalen vermittelt, die

teilweise denen eines infektiösen Virus entsprechen. Als Schlüsselprotein konnte außerdem Hämagglutinin auf der viralen Seite ausgemacht werden (Kaufmann, 1998).

In CD 14 wurde nun ein zellulärer Vermittler der Signaltransduktion gefunden, der bisher noch nicht identifiziert worden war. Das Ergebnis hat aber noch weitere Konsequenzen, wenn man berücksichtigt, dass bei der Virusreplikation zum größten Teil (ca. 90%) sogenannte defective interfering particles (DI) generiert werden (Fields, 1991). Diesen fehlen lediglich einzelne RNA-Segmente, so dass sie nicht weiter replizieren können, die Hülle ist jedoch intakt. Das bedeutet, dass DI über die Interaktion mit CD 14 eine ebenso effektive Immunantwort auslösen können wie infektiöse Influenza-Viren.

4.3. TLR 2 und TLR 4 induzieren keine Influenza A-vermittelte Signaltransduktion in murinen Makrophagen

Das Molekül CD 14 auf der Oberfläche von Monozyten wurde als Vermittler von Signalen identifiziert, die bei einer Influenza A-Infektion zur Ausbildung einer Immunantwort führen. Dieser Rezeptor kommt jedoch als eigentlicher Induktor der Signaltransduktion nicht in Frage, da ihm eine entsprechende zytoplasmatische Domäne fehlt. Als weiterführende Fragestellung wurde untersucht, ob toll-like receptors (TLR) Influenza A-Viren als Liganden erkennen und daraufhin spezifische Signale im Zytoplasma induzieren. TLR wurden in den letzten Jahren als Rezeptoren verschiedenster Pathogene und Vermittler der angeborenen Immunität identifiziert (Underhill et al., 2002). Bisher wurden neun TLR kloniert, die Charakterisierung der jeweiligen Liganden ist jedoch noch unvollständig. Es gibt allerdings verschiedene Hinweise, dass neben Bakterien und Pilzen auch Viren mit TLR interagieren können. So löst RSV eine spezifische Immunantwort über TLR 4 in Monozyten aus (Kurt-Jones et al., 2000) und murine Retroviren aktivieren B-Zellen über denselben Rezeptor (Rassa et al., 2002). Weiterhin führt die Bindung von dsRNA, wie sie bei der Replikation vieler Viren entsteht, an TLR 3 zur NFκB-Aktivierung und Interferonfreisetzung aus dendritischen Zellen (Alexopoulou et al., 2001). Es wäre also durchaus denkbar, dass auch das Influenza Virus A/PR/8 Signale über einen Rezeptor der TLR-Familie in Monozyten induziert. Dabei lag die Untersuchung von TLR 2 und TLR 4 nahe.

Beide Rezeptoren sind mit CD 14 assoziiert (Yoshimura et al., 1999; da Silva Correia et al., 2001) und TLR 4 hat mit RSV mindestens einen viralen Liganden.

Die Untersuchung der Funktion von TLR 2 und TLR 4 innerhalb einer Influenza-Infektion von Monozyten/Makrophagen konnte mithilfe von knockout-Mäusen durchgeführt werden. Zur Kontrolle wurde ein Mausstamm eingesetzt, der beide Rezeptoren exprimiert (C3H/HeN). Die isolierten Knochenmarks-Monozyten wurden nach der Reifung zu Makrophagen jeweils mit verschiedenen Konzentrationen A/PR/8 infiziert und nach 18 h die Freisetzung von JE (Homolog von MCP-1) und MIP-1α im ELISA gemessen. Zur Kontrolle wurden die Zellen mit MALP-2, einem Liganden von TLR 2, und LPS stimuliert, das über TLR 4 Signale induziert. In den jeweiligen knockout-Zellen sollten die Stimuli nicht mehr zur Induktion der Chemokine führen, da der entsprechende Rezeptor fehlt.

In den Abb. 25 bis 28 wird deutlich, dass dies der Fall ist. Während aus den Makrophagen des Kontrolltieres durch MALP-2 sowohl JE als auch MIP-1α freigesetzt wurden, fehlten beide im Überstand der TLR 2-defizienten Zellen. Genauso konnte LPS zwar in den Kontroll- und TLR $2^{-/-}$ -Zellen, nicht aber in den TLR 4-knockout-Zellen die Chemokine induzieren. Eine Infektion der Makrophagen aus dem Kontrolltier mit dem Influenza A-Virus resultierte erwartungsgemäß in einer Ausschüttung von JE und MIP-1α. Diese fand sich jedoch in vergleichbarer Größenordnung auch in den TLR 2- und TLR 4-defizienten Zellen. Die beiden Rezeptoren sind also nicht für die Induktion der Chemokinantwort während einer Influenza A-Infektion verantwortlich. Das schließt natürlich nicht aus, dass ein anderes Mitglied der TLR-Familie die Viren erkennt und eine entsprechende Signaltransduktion vermittelt. Möglicherweise besteht eine Assoziation von CD 14 auch mit anderen TLR, die bisher nicht daraufhin untersucht wurden.

5. Einfluss von A/PR/8 auf die Expression von pattern recognition receptors

5.1. Regulation der CD 14-Expression durch A/PR/8

In 4. wurde dargestellt, dass CD 14 eine entscheidende Funktion bei der Vermittlung von Signalen hat, die durch die Infektion mit dem Influenza-Virus A/PR/8 in Monozyten zur Ausbildung einer Immunantwort führen. Weiterhin ist bekannt, dass das Molekül, zusammen mit verschiedenen TLR, notwendig für die Stimulation der Zellen durch das bakterielle Endotoxin LPS und MALP-2 aus Mycoplasmen ist (Underhill et al., 2002). Dies setzt natürlich voraus, dass CD 14 in ausreichender Anzahl auf der Zelloberfläche vorhanden ist. Es war daher von Interesse zu erfahren, ob eine Infektion mit dem Influenza-Virus A/PR/8 zu einer Regulation der Expression in Monozyten führt. Es wurde bereits beschrieben, dass verschiedene Zytokine wie IL-4, IL13, IL-2, IFN-α und IFN-γ eine Abnahme der CD 14-Moleküle auf der Zelloberfläche bewirken (Antal-Szalmas et al., 2000; Landmann et al., 2001). LPS dagegen verstärkt die Expression kurz nach der Stimulation, reduziert sie im Zeitraum 3-6 h und erhöht sie wiederum nach 1-6 Tagen (Antal-Szalmas et al., 2000).

Der Einfluss der Virusinfektion auf die Regulation von CD 14 wurde untersucht, indem humane Monozyten über 6 h mit 2 MOI A/PR/8 infiziert wurden und anschließend die mRNA in einer spezifischen RT-PCR analysiert wurde. In Abb. 29 wird deutlich, dass die Transkriptionsaktivität des CD 14-Gens durch das Virus stark reduziert wird. Eine de novo-Synthese des Moleküls danach möglicherweise nur noch eingeschränkt möglich. Diese Daten sagen allerdings noch nichts über die Situation auf der Zelloberfläche aus. Um die Expression von CD 14 auf Monozyten quantitativ zu bestimmen, bot sich die FACS-Analyse an. Monozyten, die 6, 8 oder 12 h infiziert waren, wurden mittels fluoreszenzmarkierter spezifischer Antikörper gegen CD 14 gefärbt und im FACScan dargestellt. Während sich nach 6 h keine Veränderung der CD 14-Oberflächenexpression auf infizierten Zellen gegenüber der auf Kontrollzellen feststellen ließ (ohne Abb.), deutete sich nach 8 h bereits eine Reaktion der Monozyten auf das Virus an (Abb. 30). Es zeigte sich eine Aufteilung in zwei Zellpopulationen, von denen eine weiterhin die gleiche Menge CD 14 aufwies wie die Kontrolle. An anderen

Monozyten dagegen war ein kompletter Verlust von CD 14 zu beobachten, es ließen sich keine Moleküle mehr auf der Oberfläche nachweisen. Dieser Effekt verstärkte sich nach 12 h noch: zu diesem Zeitpunkt war auf allen infizierten Monozyten kein CD 14 mehr exprimiert (Abb. 31). Um auszuschließen, dass das Fehlen von CD 14 auf das Absterben der Zellen zurückzuführen ist, wurden zwei weitere Moleküle dargestellt. Sowohl MHC I als auch MHC II wurden zu allen untersuchten Zeitpunkten auf den infizierten Monozyten in gleichem Maße exprimiert wie auf den Kontrollzellen. Somit kann davon ausgegangen werden, dass der Verlust von CD 14-Molekülen auf der Zelloberfläche, genau wie die transkriptionelle Regulation, direkt vom Virus verursacht wird.

Der Befund entspricht früher beschriebenen Untersuchungen mit RSV (respiratory syncytial virus) und Rhinoviren, die ebenfalls nach einer Infektion von THP-1-Zellen bzw. PBMC eine Herabregulation von CD 14 bewirkten (Raza et al., 2000; Papadopoulos et al., 2002). Das Fehlen des Moleküls hatte dabei zur Folge, dass RSV-infizierte Zellen ein deutlich vermindertes Bakterien-killing während einer Sekundärinfektion aufwiesen. Dies macht deutlich, welch ernsthafte Konsequenzen die Reduktion von CD 14 auch nach einer Influenza-Infektion haben kann. Nachfolgende Pathogene wie gramnegative Bakterien oder Mycoplasmen rufen möglicherweise keine schnelle, adäquate Immunantwort mehr hervor, da ein entscheidendes Molekül der Signalweiterleitung fehlt. Die spezifische Induktion von Zytokinen und Chemokinen unterbleibt so, die Abwehr der Superinfektion kann auf diesem Weg nicht stattfinden.

Mit der Reduktion von CD 14 auf der Zelloberfläche durch das Influenza-Virus wird aber noch ein weiterer, für den Verlauf der Infektion entscheidender Prozess in Gang gesetzt: die Apoptose der Monozyten. Den direkten Zusammenhang zwischen dem Verlust von CD 14 und der Induktion des programmierten Zelltods zeigten zunächst Heidenreich et al. 1997. Die Gruppe verminderte die Expression des Moleküls durch IL-4 oder entfernte CD 14 enzymatisch, woraufhin die Monozyten apoptotisch wurden. Genau wie in den Versuchen meiner Arbeit blieb dabei die Expression anderer Oberflächenmoleküle, unter anderem auch MHC I, konstant. Mittlerweile wurde durch eine andere Gruppe beschrieben, dass auch eine Infektion mit Mycobacterium tuberculosis Apoptose durch die Herunterregulation von CD 14 verursacht (Santucci et al., 2000). Ein

Gegenmechanismus ist ebenfalls bekannt: die Aktivierung von Monozyten durch LPS äußert sich in einer verstärkten CD 14-Expression auf der Zelloberfläche, und die Zellen zeigen zeitweilig einen Schutz gegenüber der Apoptose (Heidenreich et al., 1997). Ob eine Vorstimulation mit LPS nach einigen Stunden die Monozyten vor der durch Influenza-Viren induzierten Apoptose bewahrt, wäre eine interessante Fragestellung für weitere Versuche.

5.2. Regulation der TLR 2- und TLR 4-Expression durch A/PR/8

Toll-like receptors (TLR) gehören zu den pattern recognition receptors und nehmen damit eine entscheidende Funktion bei der frühen Abwehr verschiedenster Pathogene ein. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, besteht kein funktioneller Zusammenhang zwischen einer Influenza-Infektion und TLR 2 bzw. TLR 4, d.h. die Immunantwort der Monozyten wird nicht über diese Rezeptoren induziert (s. 4.). Allerdings wäre es möglich, dass das Virus einen Einfluss auf die Regulation der TLR-Expression hat, was Konsequenzen für nachfolgende Infektionen haben könnte. CD 14, das ebenfalls der Familie der pattern recognition receptors angehört, wird durch A/PR/8 komplett von der Zelloberfläche entfernt (s. 5., Abb. 31). Es sollte daher untersucht werden, ob auch zwei Mitglieder der TLR-Familie, die auf der Zelle mit CD 14 assoziiert sind, durch die Infektion reguliert werden. TLR 2 wird z.B. durch den Liganden MALP-2, ein Lipoprotein aus Mycoplasma fermentans, aktiviert (Underhill et al., 2002). TLR 4 erkennt das bakterielle Endotoxin LPS, aber auch RSV (respiratory syncytial virus) (Kurt-Jones et al, 2000).

Eine Regulation der TLR-Expression ist durch verschiedene Faktoren möglich, so wird die Zahl der TLR 2-Moleküle auf Monozyten z.B. durch GM-CSF, IL-1, IL-10 und LPS erhöht, durch IFN-γ, TNF und IL-4 verringert (Flo et al, 2001). TLR 4 wird durch LPS, Lipoarrabinomannan und proinflammatorische Zytokine induziert (Muzio et al., 2000). Auch eine Regulation durch die Infektion mit bestimmten Viren wurde bereits beschrieben. So erhöht sich die mRNA-Expression von TLR 2 in Makrophagen sowohl durch Influenza- als auch durch Sendai-Virus, wobei TLR 4 nicht reguliert wird (Miettinen et al., 2001). Da die Erhöhung von TLR 2 auch durch IFN-α erreicht wird, könnte der eigentliche Induktor dabei die Immunantwort auf das Virus und nicht unbedingt dieses selbst sein.

Die TLR-Expression wurde in Monozyten untersucht, die über 2, 4 und 8 h mit 2 MOI des Influenza-Virus A/PR/8 infiziert oder 10 ng/ml LPS stimuliert worden waren. Anhand semiquantitativer PCR konnte die Menge der jeweiligen Transkripte mit der in Kontrollzellen verglichen werden. Die konstitutive Expression beider Rezeptoren in den Kontrollzellen blieb während der gesamten Inkubationsdauer unverändert (Daten nicht gezeigt). Die Daten in Abb. 32 bestätigen frühere Veröffentlichungen, nach denen die Stimulation mit LPS zu einer Aufregulation von TLR 2 und TLR 4 führt (Flo et al., 2001; Muzio et al., 2000). Bereits nach 2 h wird eine leichte Zunahme der TLR 2- und TLR 4-mRNA sichtbar, die sich bis 8 h nach LPS-Gabe noch deutlich verstärkt.

Aber auch die Infektion der Monozyten mit dem Virus A/PR/8 führte zu einer veränderten Expression. Im Gegensatz zum bakteriellen Stimulus zeigte sich hier allerdings eine Reduktion der Transkriptionsaktivität beider Rezeptoren. Während dieser Effekt bei TLR 4 bereits sehr früh, 2 h p.i., sichtbar wurde, trat er bei TLR 2 erst nach 4-8 h auf (im gezeigten Spender 8 h p.i.). Obwohl die Oberflächenexpression der Moleküle nicht überprüft werden konnte, da ein geeigneter Antikörper nicht vorlag, ist davon auszugehen, dass sich die Daten von der Transkriptionsebene auf die Rezeptoranzahl auf der Zelle übertragen lassen.

Demnach führt eine Influenza-Infektion nicht nur zum völligen Fehlen von CD 14, sondern auch zur Reduktion anderer pattern recognition receptors auf Monozyten. Das hätte Folgen für die Immunantwort bei nachfolgenden Infektionen durch gramnegative Bakterien, Mycobakterien oder RSV. Bei einer verringerten Anzahl von TLR findet eine entsprechend geringere Aktivierung der Zelle statt, so dass diese eventuell nur unzureichend mit der Synthese und Freisetzung spezifischer Zytokine und Chemokine reagiert. Die Abwehr der Pathogene wäre damit nicht mehr gewährleistet, was möglicherweise die schwerwiegenden Komplikationen bei Superinfektionen erklärt, die in der Folge von Influenza-Erkrankungen auftreten können. Auch endogene Faktoren, wie z.B. Hitzeschockproteine, können über TLR eine Zellantwort hervorrufen (Underhill et al., 2002). Werden beim Einwirken bestimmter Stressfaktoren die Hitzeschockproteine hsp 60 und 70 freigesetzt, können diese aufgrund der Herabregulation keine Signale mehr über TLR 4 in der Zelle induzieren und eine entsprechende Antwort wird nicht ausgelöst.

Bei der Untersuchung der TLR-Expression nach einer Influenza-Infektion zeigten die Monozyten deutliche Unterschiede zu den weiter differenzierten Makrophagen. Während in der hier vorliegenden Arbeit durch die Infektion mit A/PR/8 eine Reduktion der TLR 2-Transkriptionsrate gefunden wurde, beschreiben andere Autoren die vermehrte Expression des Rezeptors in primären humanen Makrophagen (Miettinen et al., 2001). Hier zeigt sich einmal mehr, wie deutlich sich die beiden Zellen in den unterschiedlichen Reifestadien funktionell voneinander abgrenzen.

5.3. Regulation der TLR-Expression durch inaktivierte Viren und Kostimulation mit LPS

Es wurde weiterhin untersucht, ob das Virus replikationsfähig und strukturell intakt sein muss, um eine Regulation der TLR-Expression zu verursachen. Dazu wurde A/PR/8 eingesetzt, das entweder bei 56°C oder durch UV-Bestrahlung inaktiviert worden war. Die TLR 2- und TLR 4-Transkription wurde zum Zeitpunkt 6 h p.i. mittels RT-PCR analysiert. Die mRNA für TLR 2 wurde durch das aktive Virus wiederum deutlich im Vergleich zur Kontrolle verringert (Abb. 33). Dagegen zeigte sich keine Veränderung, wenn die Monozyten mit dem hitzeinaktivierten Virus inkubiert wurden. Eine leichte Reduktion der Transkriptionsaktivität zeigte sich bei dem gezeigten Spender nach der Behandlung mit UV-inaktiviertem Virus, die aber in anderen Spendern nicht reproduzierbar war. Die Expression des TLR 4 wurde sowohl durch infektiöses als auch durch 56°C-inaktiviertes Virus deutlich vermindert. Dagegen zeigte UV-bestrahltes A/PR/8 keinen Einfluss auf die Regulation. Beim dargestellten Spender stieg die Transkriptionsaktivität sogar etwas, was aber in anderen Spendern nicht der Fall war. Insgesamt ist festzustellen, dass die Reduktion der TLR 2-Expression ausschließlich mit replikationsfähigem, strukturell intaktem A/PR/8 erreicht wird. Die Transkription von TLR 4 wird jedoch auch durch Virus inhibiert, das durch die Hitzeinaktivierung nach dem Eindringen in die Zelle nicht repliziert wird. Die Replikationsfähigkeit ist also nicht unbedingt notwendig. Die fehlende Regulation durch UV-inaktiviertes A/PR/8 deutet darauf hin, dass bestimmte UV-sensitive Faktoren im Virus entscheidend für die Transkriptionsinhibition sind.

Ergänzend wurden die Monozyten einer Doppelstimulation ausgesetzt, bestehend aus der bakteriellen Komponente LPS und der viralen Infektion mit A/PR/8. Folgt einer Influenza-Infektion eine bakterielle Superinfektion, kann diese zu schweren Komplikationen oder sogar zum Tod führen (Fields, 1991). Die genauen Mechanismen, die dafür verantwortlich sind, sind noch nicht vollständig bekannt. Es sollte hier untersucht werden, welchen Einfluss eine Kostimulation auf die Regulation von toll-like Rezeptoren in Monozyten hat. In der Tat unterschied sich die Reaktion der Zellen deutlich von der auf die Einzelstimulation mit LPS oder Virus (s. Abb. 32). Nach 6 h war überhaupt keine TLR 2- und TLR 4-mRNA mehr in den Monozyten nachweisbar (Abb. 33). Die Kostimulation führte zu einer kompletten Inhibition der Transkription beider Gene, es wurde also auch die Induktion, die nach der Einzelstimulation mit LPS zu beobachten war, supprimiert. Damit wäre eine Reaktion auf verschiedene Pathogene nach einer bakteriellen und viralen Doppelinfektion nicht mehr möglich, falls sich der Verlust der TLR auch auf die Proteinebene überträgt.

Der Verlust von pattern-recognition receptors wie TLR und CD 14 auf Monozyten ist vielleicht von größerer Relevanz, als es auf den ersten Blick scheinen mag. Wie bereits erläutert, induziert die Infektion mit Influenza-Viren Apoptose in den meisten Monozyten, die daraufhin innerhalb von 24-48 h absterben. Der genaue Vorgang ist noch nicht bekannt, möglicherweise stellt aber der Verlust von CD 14 einen Auslöser dar (s. 5.). Infizierte Zellen wären also ohnehin nur noch relativ kurze Zeit für eine Immunantwort auch gegen sekundäre Infektionen verantwortlich, die jedoch fehlt, wenn die entsprechenden pattern recognition receptors herabreguliert werden. Anders sieht es mit Monozyten aus, die nicht durch die Virusinfektion zerstört werden und daher potentiell für nachfolgende Immunantworten zuständig sind. Doch auch solche Zellen können möglicherweise durch unvollständige Influenza-Viren so verändert werden, dass diese nicht mehr stattfinden. Inaktiviertes Virus, das keine Fähigkeit zur Replikation besitzt, ist nicht in der Lage, den Zelltod zu verursachen (Fesq, 1997), demzufolge führt eine ausschließliche Interaktion des Virus mit der Zelloberfläche nicht zur Apoptose. In diesem Zusammenhang muss berücksichtigt werden, dass nur ein äußerst geringer Bestandteil der Viren infektiös ist. Über 90% stellen sogenannte defective interfering particles (DI) dar, deren Hülle zwar intakt ist, denen aber Teile des Genoms fehlen (Fields, 1991). Eine Interaktion mit der Zelle ist somit

möglich, nicht aber eine produktive Infektion mit Replikation. Es ist daher denkbar, dass solche DI zwar durch die Interaktion mit äußeren Rezeptoren, wie z.B. CD 14 und andere, Signale im Zellinneren induzieren, jedoch keine Apoptose verursachen. Durch eine induzierte Verminderung der exprimierten pattern recognition receptors wäre die Zelle in der Folge anfällig für "echte" Infektionen und nicht mehr in der Lage, eine adäquate Immunantwort herzustellen.

6. Interaktion von Polymyxin B mit dem Influenza-Virus A/PR/8

Polymyxin B ist ein Antibiotikum, das hochwirksam das Endotoxin LPS, einen wesentlichen Bestandteil der äußeren Membran gramnegativer Bakterien, neutralisieren kann. Die bakterizide Funktion erklärt sich aus seinem Wirkmechanismus: nach der Bindung an LPS lagert sich Polymyxin B wie ein Detergens in die äußere und zytoplasmatische Membran der Bakterien ein und zerstört dadurch deren funktionelle Integrität (Wiese et al., 1998). Influenza A-Viren umgeben sich beim Ausknospen aus ihren Wirtszellen ebenfalls mit einer Membran. Diese unterscheidet sich lediglich durch die Einlagerung virusspezifischer Proteine wie Hämagglutinin und Neuraminidase von der Zellmembran (Fields, 1991). So stellte sich die Frage, ob das Antibiotikum auch eine Inaktivierung der Viren bewirken könnte.

Humane Monozyten wurden mit 10 ng/ml LPS stimuliert oder mit 2 MOI A/PR/8 infiziert, was jeweils die Freisetzung verschiedener Chemokine und Zytokine induzierte (gemessen nach 20 h, Abb. 34 bis 36). Nach der Neutralisierung von LPS durch verschiedene Konzentrationen Polymyxin B wurde diese Ausschüttung komplett inhibiert, keins der untersuchten Chemokine und Zytokine war mehr im Zellüberstand nachweisbar. Überraschend war dagegen, dass Polymyxin B in allen eingesetzten Konzentrationen auch die Induktion durch Influenza-Viren drastisch reduzierte. Während die Hemmung der MIP-1α-, MIP-1β- und TNF-α -Freisetzung etwa so effektiv war wie nach der LPS-Stimulation, waren die

Konzentrationen von RANTES und MCP-1 im Zellüberstand nicht so stark vermindert. Insbesondere die Synthese von MCP-1 wurde durch Polymyxin B bei den meisten Spendern nur um ca. 50% (max. 70%, bei einem Spender) reduziert, womit dieses CC-Chemokin wiederum eine Sonderrolle gegenüber den übrigen Chemokinen dieser Familie einnimmt (vgl. 4.1.). Offensichtlich wird MCP-1 durch die Influenza-Infektion teilweise über andere Mechanismen in den Monozyten induziert als die, die durch Polymyxin B gestört werden. Insgesamt ließ sich aber feststellen, dass das Antibiotikum zu einer Inaktivierung der Influenza-Viren fähig ist, was sich in einer fehlenden Induktion einer spezifischen Immunantwort äußert. Dieser Effekt ist mit Sicherheit nicht auf eine LPS-Kontamination der Viruspräparation zurückzuführen. Die Analyse durch den LAL-Test (s. II.1.3.2.) zeigte, dass deren Endotoxingehalt unter der Nachweisgrenze von 0,1 EU/ml liegt, d.h. dieser kann für die beobachtete Wirkung nicht verantwortlich sein.

Die Inhibition erstreckt sich auch auf Viren, deren Neuraminidase und/oder Replikationsfähigkeit durch Hitze bzw. UV-Strahlen zerstört wurde (Abb. 37 und 38). Die Induktion von CC-Chemokinen und TNF-α durch 56°C-inaktiviertes A/PR/8 ist derjenigen durch intaktes Virus fast gleichwertig und wird genauso stark durch die Zugabe von Polymyxin vermindert. UV-bestrahltes Virus führt lediglich zur Freisetzung des Zytokins TNF-α, aber auch diese wird komplett durch das Antibiotikum inhibiert.
Um auszuschließen, dass die Inaktivierung der Influenza-Viren durch Polymyxin B unspezifisch ist, wurden die Monozyten mit einem weiteren Stimulans inkubiert. Zymosan-Partikel werden von den Zellen phagozytiert und führen daraufhin zur Aktivierung. Wie nach der Virusinfektion äußert sich diese in der Freisetzung von z.B. TNF-α und MIP-1β. Abb. 39 macht deutlich, dass diese Induktion durch verschiedene Konzentrationen Polymyxin B keine oder nur eine äußerst geringe Hemmung erfährt. Zymosan stimuliert die Monozyten also auf einem Weg, der durch das Antibiotikum nicht gestört wird. Damit ist sicher, dass die Virusinaktivierung durch Polymyxin B spezifisch ist. Auch ein zytotoxischer Effekt wird ausgeschlossen, was sich im mikroskopischen Erscheinungsbild der Monozyten bestätigte.

Die Frage ist nun, warum Polymyxin B als typisches Antibiotikum auch antiviral wirkt. Möglicherweise ist der Wirkmechanismus ein ähnlicher wie gegenüber den Bakterien. Koch und Mitarbeiter (1999) postulieren, dass Polymyxin aufgrund seiner fünffach positiven Ladung zunächst an das negativ geladene LPS bindet und sich daraufhin in die äußere Membran einlagert. Dies führt zur Bildung von Läsionen, die von Polymyxin B-Molekülen durchwandert werden können (self-promoted transport; Wiese et al., 1998). Sie gelangen so zu ihrem eigentlichen Ziel, der zytoplasmatischen Membran. Möglicherweise liegen auch auf der Virusmembran an prominenten Stellen negative Ladungen vor, die eine Bindung von Polymyxin B begünstigen. Die anschließende Einlagerung der Moleküle in die Lipiddoppelschicht könnte dann zur Zerstörung der funktionellen Integrität des Viruspartikels führen, wie auch andere Detergentien. Unter Umständen könnte die Interaktion sogar ausschließlich aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen stattfinden. Es wurde beobachtet, dass ein negativ geladenes Detergens (SDS) sogar mit einer negativen Oberfläche interagieren kann (Wiese et al., 1998). Dieselben Autoren vermuten, dass Polymyxin B in hohen Konzentrationen ebenso an neutrale Oberflächen binden kann. Träfe dies zu, wäre eine Erklärung für die Inaktivierung der Influenza-Viren gefunden. Allerdings würde das bedeuten, dass auch die Zellen durch das Antibiotikum zerstört werden könnten. Dies konnte aber in den durchgeführten Versuchen mit den eingesetzten Polymyxin-Konzentrationen nicht beobachtet werden. Möglicherweise sind sie im Gegensatz zu den Viren in der Lage, das Antibiotikum aktiv aus der Zelle zu entfernen.

Es wäre von großem Interesse, den genauen Wirkmechanismus der Virusinaktivierung zu kennen. Ein therapeutischer Einsatz dieses oder eines optimierten Antibiotikums wäre dann denkbar.

V. Zusammenfassung

Im Verlauf einer Influenza A-Infektion sind Monozyten wesentlich an der Ausbildung einer zellspezifischen Immunabwehr beteiligt. Verschiedene Transkriptionsfaktoren werden aktiviert und in der Folge die Gene von Zytokinen und Chemokinen verstärkt transkribiert. Die Freisetzung von CC-Chemokinen bewirkt die Infiltration des infizierten Gewebes durch weitere mononukleäre Zellen. In dieser Arbeit sollten weitere Wechselwirkungen zwischen Monozyten und dem Influenza-Virus A/PR/8 analysiert werden.

Die Regulation der **Transkriptionsaktivität** in infizierten Monozyten wurde mittels cDNA-Subtraktion und cDNA-Microarrays (Atlas) untersucht. Durch die Influenza-Infektion wurde eine unerwartet hohe Anzahl von Genen aus verschiedensten funktionellen Bereichen verstärkt transkribiert. Eine Suppression der Transkriptionsaktivität fand dagegen kaum statt, im Atlas-Array standen ca. 50 vermindert exprimierte Gene ca. 340 verstärkt induzierten gegenüber.
Die Regulation von drei der in der cDNA-Subtraktion klonierten Sequenzen wurde weiter analysiert. Zwei Gene, die durch das Cytomegalovirus in Monozyten induziert werden (**cig 5 und cig 33**), werden auch nach einer Influenza-Infektion verstärkt transkribiert. Die Funktion der zugehörigen Proteine ist jedoch noch unbekannt. Die Transkription von **CBP** (cap binding protein), das als Translationsinitiator eine wichtige Rolle spielt, wird durch das Virus inhibiert. Dies trägt in der Folge vermutlich dazu bei, dass zwar noch virale Proteine, jedoch kaum zelluläre im Zytoplasma synthetisiert werden, da die virale Proteinsynthese unabhängig von CBP verläuft.

Hitzeschockproteine (hsp) wirken als Chaperone zellprotektiv beim Einfluss von Stressfaktoren. Es konnte gezeigt werden, dass eine Influenza A-Infektion in Monozyten zu einer Induktion von hsp 40, hsp 60 und hsp 90 auf molekularer Ebene führt. Dies hat möglicherweise gleichzeitig pro- und antivirale Auswirkungen: zum einen helfen Chaperone bei der Zusammensetzung der Virionen, zum anderen ist hsp 60 als TLR 4-Ligand aber auch als Vermittler einer Immunantwort gegen das Virus beteiligt.

Eine effektive Immunantwort ist entscheidend von einer effizienten Antigenpräsentation abhängig. Bestimmte immunogene Fragmente der Influenzavirus-Antigene können ausschließlich durch **Immunproteasomen** (IP) generiert werden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch die Infektion mit Influenza-Viren in Monozyten auf molekularer Ebene der Wechsel vom Standard- zum Immunproteasom induziert wird. Die Replikationsfähigkeit der Viren ist dafür nicht notwendig. LPS als bakterieller Stimulus konnte den Wechsel zum IP nicht bewirken. Eine Kostimulation aus A/PR/8 und LPS reduzierte die Transkription der Standard-Komponenten, induzierte jedoch im Gegenzug *nicht* die IP-Komponenten.

Es war bislang unbekannt, über welche Rezeptoren Influenza-induzierte Signale vermittelt werden. Durch Studien mit blockierenden Antikörpern und knockout-Mäusen wurde **CD 14** als wesentliches Molekül in diesem Zusammenhang identifiziert. Das Blockieren des Rezeptors hatte eine stark reduzierte oder sogar komplett inhibierte Freisetzung verschiedener Zytokine, CXC- und CC-Chemokine aus Monozyten nach einer Influenza-Infektion zur Folge. Für diesen Effekt ist die Replikationsfähigkeit sowie die Neuraminidase der Viren nicht notwendig. Welcher Rezeptor für die eigentliche Signaltransduktion verantwortlich ist, konnte bisher nicht geklärt werden. **TLR 2** und **TLR 4**, die beide mit CD 14 interagieren, haben diese Funktion nicht, wie durch Studien in knockout-Mäusen belegt werden konnte.

Die **Expression von CD 14, TLR 2 und TLR 4** auf molekularer Ebene in Monozyten wurde durch eine Infektion mit A/PR/8 stark reduziert, 12 h p.i. fehlte CD 14 auch auf der Zelloberfläche völlig. Möglicherweise ist dies ein Auslöser für die Apoptose, durch die die meisten Monozyten nach einer Influenza-Infektion sterben. Für die Regulation der TLR 4-Transkription ist eine intakte Virushülle ausreichend, während die Replikationsfähigkeit keine Rolle spielt. Im Gegensatz dazu war für die Reduktion der TLR 2-Expression die vollständige Replikationsfähigkeit notwendig. Eine Kostimulation aus A/PR/8 und LPS inhibierte die Transkription von TLR 2 und TLR 4 völlig. Die Influenza-induzierte Suppression dieser Moleküle könnte Sekundärinfektionen mit CD 14- bzw. TLR-

assoziierten Erregern, wie z.B. gramnegativen Bakterien und Mycoplasmen begünstigen, da eine äquivalente Immunantwort nicht induziert werden kann.

Polymyxin B neutralisiert als Antibiotikum gramnegative Bakterien und deren Endotoxin LPS. In dieser Arbeit wurde dargestellt, dass auch das Influenza-Virus A/PR/8 durch Polymyxin B inaktiviert wird, so dass eine Immunreaktion der Monozyten nach der "Infektion" ausbleibt. Auch Viren, denen die Replikationsfähigkeit fehlt, wurden durch das Antibiotikum neutralisiert. Die antivirale Wirkung erklärt sich möglicherweise durch eine Detergens-ähnliche Einlagerung in die Virushülle, die deren Integrität zerstört und dadurch die Interaktion mit den zellulären Rezeptoren verhindert.

Insgesamt tragen die Daten dieser Arbeit zur genaueren Charakterisierung der Wechselwirkungen zwischen Influenza A-Viren und humanen Monozyten bei. Durch die Interaktion des Virus mit dem Rezeptor CD 14 wird die Immunantwort durch Chemokine und Zytokine initiiert. In der Zelle zeigt sich eine insgesamt stark erhöhte Transkriptionsaktivität, und durch den Austausch der Proteasomen gegen Immunproteasomen wird die optimale Präsentation von Virusantigenen gewährleistet. Gleichzeitig werden durch die Infektion verschiedene pattern recognition receptors vermindert exprimiert, so dass in der Folge eine erhöhte Anfälligkeit der Zelle gegenüber einer Vielzahl von Pathogenen besteht.

VI. Literaturverzeichnis

Abbas, A., Lichtman, A., & Pober, J. (1994). Cellular and Molecular Immunology. 2. Auflage. WB Saunders Company, Philadelphia.

Akira, S., Takeda, K., Kaisho, T., 2001. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. Nat Immunol, 2: 675-680.

Alexopoulou, L., Holt, A.C., Medzhitov, R., Flavell, R.A., 2001. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. Nature, 413: 732-738.

Amici, C., Santoro, M.G., 1991. Suppression of virus replication by prostaglandin A is associated with heat shock protein synthesis. J Gen Virol, 72: 1877-1885.

Antal-Szalmas, P., 2000. Evaluation of CD 14 in host defence. Eur J Clin Invest, 30: 167-179.

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

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

Bazan, J.F., Bacon, K.B., Hardiman, G., Wang, W., Soo, K., Rossi, D., Greaves, D.R., Zlotnik, A., Schall, T., 1997. A new class of membrane-bound chemokine with a CX_3C motif. Nature, 385: 640-644.

Bazzoni, F., Cassatella, M.A., Rossi, F., Ceska, M., Dewald, B., Baggiolini, M. 1991. Phagocytosing neutrophils produce and release high amounts of the neutrophil-activating peptide 1/interleukin 8. J Exp Med, 173: 771-774.

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

Bodkin, D.K., Knudson, D.L. 1985. Assessment of sequence relatedness of double-stranded RNA genes by RNA-RNA blot hybridization. J Virol Methods, 10: 45-52.

Bowie, A., Kiss-Toth, E., Symons, J.A., Smith, G.L., Dower, S.K., O´Neill, A.J., 2000. A46R and A52R from vaccinia viurs are antagonists of host IL-1 and toll-like receptor signaling. Proc Natl Acad Sci, 97: 10162-10167.

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

Brenner, B.G., Wainberg, M.A., 1999. Heat shock protein-based therapeutic strategies against human immunodeficiency virus type 1 infection. Infect Dis Obstet Gynecol, 7: 80-90.

Bruemmer-Smith, S., Stüber, F., Schroeder, S., 2001. Protective functions of intracellular heat-shock protein 70-expression in patients with severe sepsis. Intensive Care Med, 27: 1835-1841.

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

Carswell, E.A., Old, L.J., Kassel, R.L., Green, S., Fiore, N., Williamson, B., 1975. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. Proc Natl Acad Sci U S A, 72: 3666-3670.

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

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

Chen, W., Norbury, C.C., Cho, Y., Yewdell, J.W., Bennink, J.R., 2001. Immunoproteasomes shape immunodominance hierarchies of antiviral CD 8^+ T cells at the levels of T cell repertoire and presentation of viral antigens. J Exp Med, 193: 1319-1326.

Chuntharapai, A., Lee, J., Hébert, C.A., Kim, K.J., 1994. Monoclonal antibodies detect different distribution patterns of IL-8 receptor A and IL-8 receptor B on human peripheral blood leukocytes. J Immunol, 153: 5682.

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

da Silva Correia, J., Soldau, K., Christen, U., Tobias, P.S., Ulevitch, R.J., 2001. Lipopolysaccharide is in close proximity to each of the proteins in its membrane receptor complex. Transfer from CD14 to TLR4 and MD-2. J Biol Chem, 276: 21129-21135.

Dubitsky, A., Brown, J., Brown, J., Brandwein, H. 1992. Chemiluminiscent detection of DNA on nylon membranes. Biotechniques, 13: 392-400.

Dybdahl, B., Wahba, A., Lien, E., Flo, T.H., Waage, A., Qureshi, N., Sellevold, O.F., Espevik, T., Sundan, A., 2002. Inflammatory response after open heart surgery: release of heat-shock protein 70 and signaling through toll-like receptor-4. Circulation, 105: 685-690.

Feigenblum, D., Schneider R.J., 1993. Modification of eukaryotic initiation factor 4F during infection by influenza virus. J Virol, 67: 3027-3035.

Feng, Y., Broder, C.C., Kennedy, P.E., Berger, E.A. 1996. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor (see comments). Science, 272: 872-877.

Fesq, H., 1997. Induktion des programmierten Zelltodes (Apoptose) in Influenza A-Virus infizierten peripheren humanen Blutmonozyten. Dissertation.

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

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

Fink, A., 1999. Chaperone-mediated protein folding. Physiol Rev, 79: 425-449.

Flo, T.H., Halaas, O., Torp, S., Ryan, L., Lien, E., Dybdahl, B., Sundan, A., Espevik, T., 2001. Differential expression of toll-like receptor 2 in human cells. J Leukoc Biol, 69: 474-481.

Fuller, S., von Bonsdorff, C.H., Simons, K. 1984. Vesicular stomatitis virus infects and matures only through the basolateral surface of the polarized epithelial cell line, MDCK. Cell, 38: 65-77.

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

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

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

Gileadi, U., Moins-Teisserenc, H.T., Correa, I., Booth, B.L., Dunbar, P.R., Sewell, A.K., Trowsdale, J., Phillips, R.E., Cerundolo, V., 1999. Generation of an immundominant CTL epiope is affected by proteasome subunit compsition and stability of the antigenic protein. J Immunol, 163: 6045-6052.

Glotzer, J.B., Saltik, M., Chiocca, S., Michou, A.I., Moseley, P., Cotten, M., 2000. Activation of heat-shock response by an adenovirus is essential for virus replication. Nature, 407: 207-211.

Goldberg, D.A. 1980. Isolation and partial characterization of the Drosophila alcohol dehydrogenase gene. Proc Natl Sci USA, 87, 9769-9773.

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

Griffin, T.A., Nandi, D., Cruz, M., Fehling, H.J., van Kaer, L., Monaco, J.J., Cobert, R.A., 1998. Immunoproteasome assembly: cooperative incorporation of interferon-gamma-inducible subunits. J Exp Med, 187: 97-104.

Groettrup, M., Khan, S., Schwarz, K., Schmidtke, G., 2001. Interferon-gamma-inducible exchanges of 20 S proteasome active site subunits: why? Biochimie, 83: 367-372.

Gronenborn A.M., Clore, G.M., 1991. Modeling the three-dimensional structure of the monocyte chemoattractant and activating protein MCAF/MCP-1 on the basis of the solution structure of interleukin-8. Protein Eng, 4: 263-269.

Habich, C., Baumgart, K., Kolb, H., Burkart, V., 2002. The receptor for heat shock protein 60 on macrophages is saturable, specific, and distinct from receptors for other heat shock proteins. J Immunol, 168: 569-576.

Hahn, H., Falke, D., Klein, P., 1991. Medizinische Mikrobiologie. 1. Auflage. Springer Verlag.

Hallermalm, K., Seki, K., Wei, C., Castelli, C., Rivoltini, L., Kiessling, R., Levitskaya, J., 2001. Tumor necrosis factor-alpha induces coordinated changes in major histocompatibility class I presentation pathway resulting in increased stability of class I comlexes at the cell surface. Blood, 98: 1108-1015.

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

Hashimoto, C., Hudson, K.L., Anderson, K.V., 1988. The Toll gene of Drosophila required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. Cell, 52: 269-279.

Heidenreich, S., Schmidt, M., August, C., Cullen, P., Rademaekers, A., Pauels, H.G., 1997. Regulation of human monocyte apoptosis by the CD14 molecule. J Immunol 159: 3178-3188.

Hofmann, P., Sprenger, H., Kaufmann, A., Bender, A., Hasse, C., Nain, M., Gemsa, D., 1997. Susceptibility of mononuclear phagocytes to influenza A virus infection and possible role in the antiviral response. J Leukoc Biol 61: 408-414.

Holtke, H.J., Sagner, G., Kessler, C., Schmitz, G. 1992. Sensitive chemiluminescent detection of digoxigenin-labeled nucleic acids: a fast and simple protocol and its application. Biotechniques, 12: 104-113.

Hoshino, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Ogawa, T., Takeda, Y., Takeda, K., Akira, S., 1999. Toll-like receptor 4-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. J Immunol, 162: 3749-3752.

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

Hung, J.J., Chung, C.S., Chang, W., 2002. Molecular chaperone hsp90 is important for vaccinia virus growth in cells. J Virol, 76: 1379-1390.

Imai, T., Hieshima, K., Haskell, C., Baba, M., Nagira, M., Nishimura, M., Kakizaki, M., Takagi, S., Nomiyama, H., Schall, T., Yoshie, O., 1997. Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX_3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion. Cell 91: 521-530.

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

Jindal, S., Young, R.A., 1992. Vaccinia virus infection induces a stress response that leads to association of hsp70 with viral proteins. J Virol, 66: 5357-5362.

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

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

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

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

Kelner, G.S., Kennedy, J., Bacon, K.B., Kleyensteuber, S., Largaespada, D.A., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Bazan, J.F., Moore, K.W., Schall. T.J., 1994. Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine. Science, 266: 1395-1399.

Khan, S., van Den Broek, M., Schwarz, K., de Giuli, R., Diener, P.A., Groettrup, M., 2001. Immunoproteasomes largely replace constitutive proteasomes during an anitviral and antibacterial immune response in the liver. J Immunol, 167: 6859-6868.

Koch, P.J., Frank, J., Schüler, J., Kahle, C., Bradaczek, H., 1999. Thermodynamics and structural studies of the interaction of polymyxin B with deep rough mutant lipopolysaccharides. J Colloid Interface Sci, 213: 557-564.

Kurt-Jones, E.A., Popova, L., Kwinn, L., Haynes, L.M., Jones, L.P., Tripp, R.A., Walsh, E.E., Freeman, M.W., Golenbock, D.T., Anderson, L.J., Finberg, R.W., 2000. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. Nat Immunol, 1: 398-402.

Landmann, R., Müller, B., Zimmerli, W., 2000. CD 14, new aspects of ligand and signal diversity. Microbes and Infection, 2: 295-304.

Lehrbach, H., Diamond, D., Wozney, J.M., Boedtker, 1977. RNA molecular weight determinants by gel electrophoresis under denaturating conditions, a critical reexamination. Biochemistry 16: 97-101.

Macagno, A., Gilliet, M., Sallusto, F., Lanzavecchia, A., Nestle, F.O., Groettrup, M., 1999. Dendritic cells up-regulate immunoproteasomes and the proteasome regulator PA28 during maturation. Eur J Immunol, 29: 4037-4042.

MacAry, P.A., Lindsay, M., Scott, M.A., Craig, J.I., Luzio, J.P., Lehner, P.J., 2001. Mobilization of MHC class I molecules from late endosomes to the cell surface following activation of CD 34-derived human Langerhans cells. Proc Natl Acad Sci USA, 98: 3982-3987.

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

Mc Ginnis, W., Levine, M.S., Hafen, E., Kuroiwa, A., Gehring, W.J., 1984. A conserved DNA sequence in homoeotic genes of the Drosophila Antennadedia and bithorax complexes. Nature, 308: 428-433.

Means, T.K., Golenbock, D.T., Fenton, M.J., 2000. Structure and function of Toll-like receptor proteins. Life Sciences, 68: 241-258.

Medzhitov, R., Janeway, C., 2000. Innate immunity. N Engl J Med, 343: 338-344.

Melville, M.W., Hansen, W.J., Freeman, B.C., Welch, W.J., Katze, M.G., 1997. The molecular chaperone hsp40 regulates the activity of $P58^{IPK}$, the cellular inhibitor of PKR. Proc Natl Acad Sci USA, 94: 97-102.

Miettinen, M., Sareneva, T., Julkunen, I., Matikainen, S., 2001. IFNs activate toll-like receptor gene expression in viral infections. Genes Immun, 2: 349-355.

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

Morel, S., Levy, F., Burlet-Schiltz, O., Brasseur, F., Probst-Kepper, M., Peitrequin, A.L., Monsarrat, B., Van Velthoven, R., Cerottini, J.C., Boon, T., Gairin, J.E., Van den Eynde, B., 2000. Processing of some antigens by the standard proteasome but not by the immunoproteasome results in poor presentation by dendritic cells. Immunity, 12: 107-117.

Muzio, M., Bosisio, D., Polentarutti, N., D´amico, G., Stoppacciaro, A., Mancinelli, R., van´t Veer, C., Penton-Rol, G., Ruco, L.P., Allavena, P., Mantovani, A., 2000. Differential expression and regulation of toll-like receptors in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells.

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

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

Ohashi, K., Burkart, V., Flohe, S., Kolb, H., 2000. Heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the Toll-like receptor 4 complex. J Immunol, 164: 558-561.

Ozinsky, A., Underhill, D.M., Fontenot, J.D., Hajjar, A.M., Smith, K.D., Wilson, C.B., Schroeder, L., Aderem, A., 2000. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system ist defined by cooperation between Toll-like receptors. Proc Natl Acad Sci USA, 97: 13766-13771.

Pan, Y., Lloyd, C., Zhou, H., Dolich, S., Deeds, J., Gonzalo, J., Vath, J., Gosselin, M., Ma, J., Dussault, B., Woolf, E., Alperin, G., Culpepper, J., Gutierrez-Ramos, J.C., Gearing, D. Neurotactin, a membrane-anchored chemokine upregulated in brain inflammation. Nature, 387: 611-617.

Papadopoulos, N.G., Stanciu, L.A., Papi, A., Holgate, S.T., Johnston, S.L., 2002. Rhinovirus-induced alterations on peripheral blood mononuclear cell phenotype and costimulatory molecule expression in normal and atopic asthmatic subjects. Clin Exp Allergy, 32: 537-542.

Paul, I., & William, E. (Hrsg.) (1983). Fundamental Immunology. 3. Auflage. Raven Press, New York.

Pauligk, C., 1997. Induktion von Zytokinen und Chemokinen in neutrophilen Granulozyten durch bakterielles Lipopolysaccharid und Influenza A-Virus. Diplomarbeit.

Ponniah, S., Doherty, P.C., Eichelberger, M., 1996. Selective response of γδ T-cell hybridomas to orthomyxovirus-infected cells. J Virol, 70: 17-22.

Rampart, M., Herman, A.G., Grillet, B., Opdenakker, G., van Damme, J., 1992. Development and application of a radioimmunoassay for interleukin-8: detection of interleukin-8 in synovial fluids from patients with inflammatory joint disease. Lab Invest, 66: 512-518.

Rassa, J.C., Meyers, J.L., Zhang, Y., Kudaravalli, R., Ross, S.R., 2002. Murine retroviruses activate B cells via interaction with toll-like rceptor 4. Proc Natl Acad Sci USA, 19: 2281-2286.

Raza, M.W., Blackwell, C.C., Elton, R.A., Weir, D.M., 2000. Bactericidal activity of a monocytic cell line (THP-1) against common respiratory tract bacterial pathogens is depressed after infection with respiratory syncytial virus. J Med Microbiol, 49: 227-233.

Re, F., Strominger, J.L., 2001. Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 differentially activate human dendritic cells. J Biol Chem, 276: 37692-37699.

Rock, K.L., Goldberg, A.L., 1999. Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. Annu Rev Immunol, 17: 739-779.

Sagara, J., Kawai, A., 1992. Identification of heat shock protein 70 in the rabies virion. Virology, 190: 845-848.

Santucci, M.B., Amicosante, M., Cicconi, R., Montesano, C., Casarini, M., Giosue, S., Bisetti, A., Colizzi, V., Fraziano, M., 2000. Mycobacterium tuberculosis-induced apoptosis in monocytes/macrophages: early membrane modifications and intracellular mycobacterial viability. J Infect Dis, 181: 1506-1509.

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

Schröder, J.M., 1992. Generation of NAP-1 and related peptides in psoriasis and other inflammatory skin diseases. Cytokines, 4: 54-76.

Schütt, C., 1999. Fighting infection: the role of lipopolysaccharide binding proteins CD 14 and LBP. Pathobiology, 67: 227-229.

Schwarz, K., van den Broek, M., Kostka, S., Kraft, R., Soza, A., Schmidtke, G., Kloetzel, P-M., Groettrup, M., 2000. Overexpression of the proteasome subunits LMP2, LMP7 and MECL-1, but not PA28αβ, enhances the presentation of an immunodominant lymphocytic choriomeningitis virus T cell epitope. J Immunol, 165: 768-778.

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

Seed, B., 1992. Attachment of nucleic acids to nitrocellulose and diazoniumsubstituted supports. In: Genetic engineering: Principles and methods. Vol 4. Setlow, J.K., Hollaender, A (editors). Plenum Publishing New York, Page 91.

Sharp, F.R., Massa, S.M., Swanson, R.A., 1999. Heat-shock protein protection. TINS, 22: 97-99.

Shimizu, K., Iguchi, A., Gomyou, R., Ono, Y., 1999. Influenza virus inhibits cleavage of the hsp70 pre-mRNAs at the polyadenylation site. Virology, 254: 213-219.

Sijts, A., Ruppert, T., Rehermann, B., Schmidt, M., Koszinowski, U., Kloetzel, P-M., 2000. Efficient generation of a hepatitis B virus cytotoxic T lymphocyte epitope requires the structural features of immunoproteasomes. J Exp Med, 191: 503-513.

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

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

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

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

Strudwick, S., Borden, K.L., 2002. The emerging roles of translation factor eIF4E in the nucleus. Differentiation, 70: 10-22.

Stuart-Harris, C.A. 1961. Twenty years of influenza epidemies. Am Re Respir Dis, 83: 54-67.

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

Takeuchi, O., Kaufmann, A., Grote, K., Kawai, T., Hoshino, K., 2000. Cutting edge: preferentially the R-stereoisomer of the mycoplasmal lipopeptide macrophage-activating lipopeptide-2 activates immune cells through a toll-like receptor 2- and MyD88-dependent signaling pathway. J Immunol, 164: 554-557.

Takeuchi, O., Akira, S., 2001. Toll-like receptors; their physiological role and signal transduction system. Int Immunopharmacol, 1: 625-635.

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

Tanaka, K., Kasahara, M., 1998. The MHC class I ligand-generating system: roles of immunoproteasomes and the interferon-γ-inducible proteasome activator PA28. Immunol Rev, 163: 161-176.

Thomas, P.S. 1980. Hybridisation of denatured RNA and small DNA-Fragments transferred to nitrocellulose. Proc Natl Acad Sci USA, 77: 5201-5205.

Tobias, P.S., Soldau, K., Ulevitch, R.J., 1986. Isolation of a lipopolysaccharide-binding acute phase reactant from rabbit serum. J Exp Med, 164: 777-793.

Underhill, D.M., Ozinsky, A., 2002. Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. Curr Opin Immunol, 14: 103-110.

Vaillancourt, R.E., Weeden, N.F., Garvin, D.F. 1992. Increasing the efficiency and economy of the chemiluminescent detection of DNA. Biotechniques, 13: 339-340.

van den Eynde, B.J., Morel, S., 2001. Differential processing of class-I-restricted epitopes by the standard proteasome and the immunoproteasome. Curr Opin Immunol, 13: 147-153.

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

Volkman, A., Gewans, J.L., 1963. The origin of macrophage from human bone marrow in the rat. J Exp Med, 128: 514.

Wahl, G.M., Berger, S.L., Kimmel, A.R. 1987. Molecular hybridisation of immobilized nucleic acids: theoretical concepts and practical considerations. Methods Enzymol, 152: 399-407.

Waterson, A.P. 1962. Two kinds of myxoviruses. Nature 193: 1163-1164.

White, D.O., Fenner, F.J. 1994. Medical Virology. 4th edition. Academic press, San Diego.

Whitham, S., Dinesh-Kumar, S.P., Choi, D., Hehl, R, Corr., C., Baker, B., 1994. The product of the tobacco mosaic virus resistance gene N: similarity to toll and the interleukin-1 receptor. Cell, 78: 1101-1115.

Wiese, A., Münstermann, M., Gutsmann, T., Lindner, B., Kawahara, K., Zähringer, U., Seydel, U., 1998. Molecular mechanisms of polymyxin B-membrane interactions: direct correlation between surface charge density and self-promoted transport. J Membrane Biol, 162: 127-138.

Ye, L., Liu, Y., Yang, S., Liao, W., Wang, C., 2001. Increased expression of hsp70 and co-localization with nuclear protein in cells infected with the Hantaan virus. Chin Med J (Engl), 114: 535-539.

Yoshie, O., Imai, T., Nomiyama, H., 1997. Novel lymphocyte-specific CC chemokines and their receptors. J Leukoc Biol, 62: 634-644.

Yoshimura, A., Lien, E., Toumanen, E., Dziarski, R., Golenbock, D.T., 1999. Recognition of gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2. J Immunol, 163: 1-5.

Zhu, H., Cong, J.P., Shenk, T., 1997. Use of differential display analysis to assess the effect of human cytomegalovirus infection on the accumulation of cellular RNAs: induction of interferon-responsive RNAs. Proc Natl Acad Sci USA, 94: 13985-13990.

Zlotnik, A., Yoshie, O., 2000. Chemokines: A new classification system and their role in immunity. Immunity, 12: 121-127.

Lebenslauf

persönliche Daten:

Name:	Claudia Pauligk
geboren:	25.2.1973 in Weilburg
Eltern:	Gerhard Pauligk
	Dr. Renate Pauligk, geb. Noack

Schulbildung/Studium:

Grundschule: Christian-Spielmann-Schule Weilburg	1979-1983
Gymnasium Philippinum Weilburg	1983-1992
Abitur	Juni 1992
Studium der Humanbiologie, Philipps-Universität Marburg	1992-1996
Vordiplom	1994
Diplomarbeit am Institut für Immunologie, Universität Marburg	1996-1997
Diplom Humanbiologie	Nov. 1997
Promotionsarbeit am Institut für Immunologie, Universität Marburg unter Leitung von Prof. Dr. D. Gemsa	seit 1.2.1998

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren Universitätsprofessoren und Dozenten:

Aumüller, Beato, Bestgen, Daut, Elsässer, Fischer, Frenking, Fuhs, Garten, Gemsa, Grzeschik, Habermehl, Hartmann, Haustein, Herrler, Hoffmann, Jenc, Jungclas, Kadenbach, Kern, Kirchner, Klenk, Koch, Koolmann, Lang, Lefkovits, M. Löffler, H. Löffler, Lorberth, Lührmann, Maaß, R. Müller, U. Müller, Niessing, Rogausch, Röhm, Schachtschabel, Schäfer, Schmidt, Schulz, Schwarz, Sedlacek, Seifart, J. Seitz, K. A. Seitz, Slenczka, Steinmetz, Suske, Voigt, von Löw, Wagner, Westermann, Westphal, Wiegandt.

Danksagung

Mein erster Dank gilt Professor Dr. Diethard Gemsa, der mir diese Arbeit in seinem Institut im Rahmen eines DFG-geförderten Projektes ermöglichte und ihre Entstehung in vielen fachlichen und weniger fachlichen Diskussionen begleitete.

Nicht weniger danken möchte ich Dr. Andreas Kaufmann, der mich in allen Stadien dieser Arbeit aufs Beste betreute und geduldig alternative Wege suchte, wenn meine Versuche in einer Sackgasse gelandet waren.

Den Mitarbeitern der Laborgruppe Molekulare Infektiologie des Forschungszentrums Borstel danke ich herzlich für die Hilfe bei den Versuchen mit knockout-Mäusen, den Mitarbeitern des Instituts für Virologie in Marburg für die Sequenzierung diverser Proben.

Ein grosser Dank geht an alle Kollegen im Institut. Die stete Hilfsbereitschaft und gute Arbeitsatmosphäre waren die angenehme Konstante im Laboralltag. Besonders Marianne Nain und dem "Duo infernale", bestehend aus Marion Gohl und Ute Arndt, verdanke ich nicht nur fachbezogene Unterstützung, sondern viele Unternehmungen und Gespräche, die so ungefähr alle Bereiche ausserhalb der Immunologie abdeckten.

Zuletzt möchte ich meiner Familie und den Freunden danken, die sich während der gesamten Dauer meiner Arbeit immer wieder interessiert an den Fortschritten zeigten und mir halfen, Rückschläge zu überwinden.

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Humanmedizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel "Molekulare Wechselwirkungen zwischen Influenza A-Viren und humanen Monozyten: Genregulation und Signalübertragung" im Institut für Immunologie des Medizinischen Zentrums für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie mit Medizinaluntersuchungsamt der Philipps-Universität Marburg unter Leitung von Herrn Prof. Dr. D. Gemsa und Unterstützung durch Herrn Dr. A. Kaufmann ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung keine als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation eingereicht.

Marburg, den 28.10.2002

(Claudia Pauligk)