

Rolle und Funktion von TREM1 in der Immunantwort auf virale und bakterielle Leberinfektionen

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

im Fachbereich Biologie der Fakultät für
Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Jan-Hendrik Kozik
aus Bremen

Hamburg, April 2015

Gutachter

1. PD Dr. rer. nat. Johannes Herkel

I. Medizinische Klinik und Poliklinik des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf

2. Prof. Dr. rer. nat. Thorsten Burmester

Zoologisches Institut an der Universität Hamburg

Tag der Disputation

24. Juli 2015

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Virale Leberentzündungen.....	1
1.2	Lymphozytäres Choriomeningitis Virus (LCMV).....	2
1.3	LCMV-Struktur.....	4
1.4	LCMV-Infektionszyklus.....	5
1.5	<i>Listeria monocytogenes</i>	6
1.6	<i>Listeria monocytogenes</i> -Infektionszyklus.....	7
1.7	Das Immunsystem.....	8
1.8	Zelluläre Immunantwort.....	8
1.9	Das angeborene Immunsystem.....	10
1.10	Muster-erkennende Rezeptoren (PRRs).....	10
1.11	Toll-like Rezeptoren (TLRs).....	11
1.12	NOD-like Rezeptoren (NLRs).....	11
1.13	RIG-I-like Rezeptoren (RLRs).....	12
1.14	Die TREM-Rezeptor Familie.....	13
1.15	Expression von TREM1.....	14
1.16	Struktur von TREM1.....	15
1.17	TREM1-Signaltransduktion.....	15
1.18	TREM1-Ligand.....	17
1.19	Funktion von TREM1.....	18
1.20	Physiologische Relevanz von TREM1.....	19
1.21	sTREM1.....	20
1.22	Funktion von sTREM1.....	21
1.23	Klinische Relevanz von sTREM1.....	22
1.24	Zielsetzung.....	24
2.	Material und Methoden	25
2.1	Materialien und Geräte.....	25
2.1.1	Laborgeräte.....	25
2.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	26
2.1.3	Chemikalien, Enzyme und Lösungen.....	28
2.1.4	Kits.....	31
2.1.5	qPCR Taqman Sonden.....	31
2.1.6	SYBR Green Real Time qPCR Primer und Sequenzen.....	31
2.1.7	Antikörper für immunhistochemische- und Immunfluoreszenzfärbungen.....	32
2.1.8	Antikörper für durchflusszytometrische Analysen.....	32
2.1.9	Antikörper für den Focus Forming Assay.....	33
2.1.10	Antikörper für die Zellisolation.....	33
2.1.11	Antikörper für die Komplementlyse von nichtparenchymatischen Leberzellen.....	33

Inhaltsverzeichnis

2.1.12	Antikörper für Western-Blot-Analysen.....	33
2.1.13	Protease- und Phosphataseinhibitoren.....	33
2.1.14	Zellkulturmedien und Nährmediumsplatten	34
2.1.15	Puffer und Lösungen.....	34
2.1.16	Software	36
2.2	Methoden	37
2.2.1	Versuchstiere	37
2.2.1.1	Haltung von Versuchsmäusen	37
2.2.1.2	Zucht und Erhaltung von Mauslinien.....	37
2.2.1.3	Isolation von genomischer DNA aus Schwanzbiopsien.....	37
2.2.1.4	Semiquantitative PCR.....	38
2.2.1.5	DNA Gelelektrophorese	38
2.2.1.6	Laborchemische Untersuchungen von Mäuseblut.....	39
2.2.2	Patientenmaterial	39
2.2.2.1	Gewinnung von Serum aus Vollblut.....	39
2.2.2.2	Blutserum von Patienten mit viralen Lebererkrankungen.....	39
2.2.3	Mausversuche <i>in vivo</i>	40
2.2.3.1	Produktion von Lymphozytärem Choriomeningitis Virus (LCMV) <i>in vitro</i>	40
2.2.3.2	LCMV-Infektion von Versuchsmäusen.....	40
2.2.3.3	Aufarbeitung von LCMV-haltigen Gewebeproben	40
2.2.3.4	Ansetzen des FFA.....	41
2.2.3.5	Entwicklung des FFA	41
2.2.3.6	Anzucht von <i>Listeria monocytogenes</i>	41
2.2.3.7	<i>Listeria monocytogenes</i> -Infektion von Versuchsmäusen	42
2.2.3.8	Analyse der <i>Listeria monocytogenes</i> -Titer im Lebergewebe.....	42
2.2.3.9	<i>In vivo</i> Depletion von Neutrophilen Granulozyten.....	42
2.2.3.10	Intravenöse Applikation von proinflammatorischen Mediatoren <i>in vivo</i>	42
2.2.4	Zellbiologische Methoden	43
2.2.4.1	Kultivierung von L929-Zellen <i>in vitro</i>	43
2.2.4.2	Kollagenisierung von Mikrotiterplatten	43
2.2.4.3	Kultivierung von primären Zellen <i>in vitro</i>	44
2.2.4.4	Stimulation von primären Zellen <i>in vitro</i>	44
2.2.4.5	Isolation von primären Hepatozyten	44
2.2.4.6	Komplementlyse von nichtparenchymatischen Leberzellen	45
2.2.4.7	Isolation von mononukleären Leberzellen	46
2.2.4.8	Isolation von nichtparenchymatischen Leberzellen	46
2.2.4.9	Isolation von primären Milzzellen.....	47
2.2.4.10	Magnetische Zellisolation (MACS).....	47
2.2.4.11	Isolation von Neutrophilen Granulozyten aus primären Milzzellen.....	48
2.2.4.12	Restimulation von CD8 T-Zellen	48
2.2.4.13	Mikroskopische Zellzahlbestimmung	49
2.2.5	Molekularbiologische Methoden	49
2.2.5.1	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren und Proteinen	49
2.2.5.2	RNA Isolation aus primären Zellen	49

Inhaltsverzeichnis

2.2.5.3	RNA Isolation aus Lebergewebe	50
2.2.5.4	Synthese von cDNA	50
2.2.5.5	Quantitative Echtzeit PCR (qPCR)	50
2.2.6	Proteinbiochemische Methoden.....	51
2.2.6.1	Western-Blot-Analyse	51
2.2.6.1.1	Proteinisolation aus Lebergewebe.....	51
2.2.6.1.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen aus Lebergewebe.....	52
2.2.6.1.3	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	52
2.2.6.1.4	Membrantransfer von Proteinen	52
2.2.6.1.5	Immunoblot	53
2.2.7	Immunologische Methoden.....	53
2.2.7.1	Enzymgekoppelter Immunadsorptionsassay (ELISA)	53
2.2.7.2	Durchflusszytometrie.....	54
2.2.7.2.1	Vitalitätsfärbung im Durchflusszytometer	54
2.2.7.2.2	Oberflächenfärbung	55
2.2.7.2.3	Vitalitäts- und Oberflächenfärbung von primären Hepatozyten.....	55
2.2.7.2.4	Intrazelluläre Zytokinfärbung.....	55
2.2.8	Histologie	56
2.2.8.1	Anfertigung von Paraffinschnitten	56
2.2.8.2	Hämatoxylin-Eosin (H&E)-Färbung von Paraffinschnitten.....	56
2.2.8.3	Immunhistochemische Färbungen von Paraffinschnitten.....	57
2.2.8.4	Anfertigung von Gefrierschnitten	58
2.2.8.5	Immunfluoreszenzfärbungen von Gefrierschnitten	58
2.2.8.6	Fluoreszenzmarkierung von Antikörpern	58
2.2.8.7	Auswertung von immunhistochemischen- und Immunfluoreszenzfärbungen	59
2.2.8.8	Modifizierter histologischer Aktivitätsindex	59
2.2.9	Bioinformatische Methoden	59
2.2.9.1	Generierung von Primersequenzen.....	59
2.2.9.2	Analyse von Transkriptionsfaktorbindestellen	59
2.2.9.3	Statistische Auswertung.....	60
3.	Ergebnisse	61
3.1	LCMV-Infektion von C57BL/6 Mäusen als Modellsystem für eine nicht-zytopathische akute virale Hepatitis.....	61
3.1.1	LCMV Z-RNA-Menge im Lebergewebe von LCMV-infizierten C57BL/6 Mäusen	61
3.1.2	LCMV-Proteinexpression im Lebergewebe von LCMV-infizierten C57BL/6 Mäusen.....	62
3.1.3	LCMV-Infektion von primären Hepatozyten aus C57BL/6 Mäusen.....	63
3.1.4	Histopathologische Analyse von Lebergewebe aus LCMV-infizierten C57BL/6 Mäusen	64
3.1.5	Serumtransaminasen-Werte in LCMV-infizierten C57BL/6 Mäusen	65
3.2	Rolle und Funktion von TREM1 in LCMV-infizierten Mäusen	66
3.2.1	TREM1-Proteinexpression im Lebergewebe von C57BL/6 Mäusen	66
3.2.2	Transkriptionsfaktorbindestellen im Promoter des <i>Trem1</i> -Gens in <i>Mus musculus</i>	66
3.2.3	TREM1-RNA-Expression im Lebergewebe von TLR-Liganden-behandelten C57BL/6 Mäusen	67

Inhaltsverzeichnis

3.2.4	sTREM1-Freisetzung in TLR-Liganden-behandelten C57BL/6 Mäusen	68
3.2.5	TREM1-RNA-Expression im Lebergewebe von LCMV-infizierten C57BL/6 Mäusen.....	69
3.2.6	DAP12-RNA-Expression im Lebergewebe von LCMV-infizierten C57BL/6 Mäusen	70
3.2.7	sTREM1-Freisetzung in LCMV-infizierten C57BL/6 Mäusen	71
3.2.8	LCMV Z-RNA-Menge im Lebergewebe von LCMV-infizierten TREM1 ^{-/-} und TREM1 ^{+/+} Mäusen	72
3.2.9	LCMV FFU in der Leber von LCMV-infizierten TREM1 ^{-/-} und TREM1 ^{+/+} Mäusen	74
3.2.10	Histologische Analyse der LCMV-Proteinexpression im Lebergewebe von LCMV-infizierten TREM1 ^{-/-} und TREM1 ^{+/+} Mäusen.....	75
3.2.11	Histopathologische Analyse der Leberschädigung in LCMV-infizierten TREM1 ^{-/-} und TREM1 ^{+/+} Mäusen	76
3.2.12	Serumtransaminasen-Werte in LCMV-infizierten TREM1 ^{-/-} und TREM1 ^{+/+} Mäusen ...	77
3.2.13	CD8- und TREM1-Expression im Lebergewebe von LCMV-infizierten TREM1 ^{-/-} und TREM1 ^{+/+} Mäusen	79
3.2.14	CD8+ T-Zell-Aktivierung im Lebergewebe von LCMV-infizierten TREM1 ^{-/-} und TREM1 ^{+/+} Mäusen	80
3.2.15	F4/80- und TREM1-Expression im Lebergewebe von LCMV-infizierten TREM1 ^{-/-} und TREM1 ^{+/+} Mäusen	81
3.2.16	LY6G- und TREM1-Expression im Lebergewebe von LCMV-infizierten TREM1 ^{-/-} und TREM1 ^{+/+} Mäusen	82
3.2.17	TREM1- und LY6G-Ko-Expression auf Neutrophilen Granulozyten aus LCMV-infizierten TREM1 ^{-/-} und TREM1 ^{+/+} Mäusen	83
3.2.18	LY6G- und DAP12-Expression im Lebergewebe von LCMV-infizierten TREM1 ^{-/-} und TREM1 ^{+/+} Mäusen	84
3.2.19	LCMV-RNA-Menge in LCMV-infizierten C57BL/6 Mäusen nach der Depletion von LY6G+ Neutrophilen Granulozyten	85
3.2.20	TREM1- und LY6G-Proteinexpression in LCMV-infizierten C57BL/6 Mäusen nach der Depletion von LY6G+ Neutrophilen Granulozyten.....	86
3.2.21	Genexpression proinflammatorischer Zytokine in LCMV-infizierten Neutrophilen Granulozyten <i>in vitro</i>	87
3.2.22	Genexpression proinflammatorischer Zytokine in Neutrophilen Granulozyten aus LCMV-infizierten TREM1 ^{-/-} und TREM1 ^{+/+} Mäusen.....	88
3.2.23	Genexpression proinflammatorischer Zytokine im Lebergewebe von LCMV-infizierten TREM1 ^{-/-} und TREM1 ^{+/+} Mäusen	89
3.2.24	Histologische Analyse der HMGB1-Expression im Lebergewebe von LCMV-infizierten C57BL/6 Mäusen	91
3.2.25	HMGB1-Genexpression im Lebergewebe von LCMV-infizierten C57BL/6 Mäusen	91
3.2.26	Histologische Analyse der HMGB1- und TREM1-RNA-Expression im Lebergewebe von LCMV-infizierten C57BL/6 Mäusen.....	92
3.2.27	TREM1-RNA-Expression in Neutrophilen Granulozyten aus C57BL/6 Mäusen	93
3.2.28	sTREM1-Freisetzung durch Leberzellen aus C57BL/6 Mäusen	94
3.2.29	sTREM1-Freisetzung durch Neutrophile Granulozyten aus C57BL/6 Mäusen	95
3.2.30	CCL2/MCP1- und TNF α -RNA-Expression in LCMV-infizierten und HMGB1-stimulierten TREM1 ^{-/-} und TREM1 ^{+/+} Mäusen	96
3.3	Rolle und Funktion von TREM1 in <i>Listeria monocytogenes</i> -infizierten Mäusen	98
3.3.1	TREM1-RNA-Expression im Lebergewebe von <i>Listeria monocytogenes</i> -infizierten Mäusen	98
3.3.2	sTREM1-Freisetzung in <i>Listeria monocytogenes</i> -infizierten C57BL/6 Mäusen	99

3.3.3	<i>Listeria monocytogenes</i> -Titer im Lebergewebe von <i>L. monocytogenes</i> -infizierten TREM1 -/- und TREM1 +/+ Mäusen	100
3.3.4	Histologische Analyse des Leberschadens in <i>Listeria monocytogenes</i> -infizierten TREM1 -/- und TREM1 +/+ Mäusen	101
3.3.5	Serumtransaminasen-Werte in <i>Listeria monocytogenes</i> -infizierten TREM1 -/- und TREM1 +/+ Mäusen	102
3.4	sTREM1-Serumkonzentration in HBV- und HCV-Patienten	103
4.	Diskussion	104
4.1	Funktionelle Relevanz von TREM1 in LCMV WE-infizierten Mäusen	104
4.2	TREM1-Ligand	107
4.3	sTREM1 in LCMV WE-infizierten Mäusen	109
4.4	Funktionelle Relevanz von TREM1 in <i>Listeria monocytogenes</i> -infizierten Mäusen	111
4.5	Funktionelle Relevanz von sTREM1 in Patienten mit viralen Lebererkrankungen	113
5.	Zusammenfassung	115
6.	Summary	117
7.	Literaturverzeichnis	118
8.	Abkürzungsverzeichnis	131
9.	Publikationen	136
10.	Danksagung	137
11.	Eidesstattliche Erklärung	139

1. Einleitung

1.1 Virale Leberentzündungen

Der Begriff Hepatitis bezeichnet eine entzündliche Erkrankung der Leber (lat. hepar). Leberentzündungen können sowohl durch Toxine, Medikamente und Alkoholmissbrauch, aber auch durch Viren und Bakterien verursacht werden (Anthony *et al.*, 1978). Mit weltweit mehr als 2 Milliarden erkrankten Menschen zählen virale Leberinfektionen zu den häufigsten Auslösern für eine Hepatitis (Lavanchy, 2004; Saeed *et al.*, 2014).

Virale Lebererkrankungen werden i.d.R. von einer heterogenen Gruppe von Hepatitis-Viren (Hepatitis-A-Virus [HAV], Hepatitis-B-Virus [HBV], Hepatitis-C-Virus [HCV], Hepatitis-D-Virus [HDV] und Hepatitis-E-Virus [HEV]) verursacht, können aber auch als Begleiterkrankung anderer systemischer Virusinfektionen (Adenovirus [ADV], Cytomegalievirus [CMV], Epstein-Barr-Virus [EBV], Herpes-simplex-Virus [HSV]) auftreten (Gallegos-Orozco und Rakela-Brodner, 2010).

Eine Ansteckung mit Hepatitis-Viren kann fäkal/oral (HAV, HEV) oder über den Austausch von Körperflüssigkeiten wie Blut und Sperma erfolgen (HBV, HCV, HDV) (WHO 2014). Zu den häufigsten Symptomen nach einer viralen Hepatitis zählen unspezifische Manifestationen wie Übelkeit, Unwohlsein, Müdigkeit und Abgeschlagenheit aber auch leberspezifische Symptome wie Gelbsucht (Ikterus) und ein Anstieg der Serumtransaminasen-Werte (Wasley *et al.*, 2008).

Der Verlauf einer viralen Hepatitis ist vom Immunzustand des Wirts und vom Virustyp abhängig. Während Infektionen mit HAV und HEV in der Regel akut verlaufen und spontan vom Immunsystem geheilt werden, können HBV- und HCV-Erkrankungen nach einer anfänglich akuten Phase in eine chronische Hepatitis übergehen (Krenkel *et al.*, 2014; Saeed *et al.*, 2014). Im Gegensatz zu den anderen Hepatitis-Viren treten HDV-Infektionen nur nach einer Ko- oder Superinfektion mit HBV auf und erhöhen die Wahrscheinlichkeit für die Entstehung einer chronischen oder fulminanten Hepatitis (WHO, 2001d).

Akute Leberinfektionen heilen in der Regel vollständig aus, können aber auch schwere Begleitsymptome wie akutes Leberversagen verursachen. So sterben jedes Jahr mehr als 50.000 Menschen an den Folgen einer HAV- oder HEV-Infektion (WHOa 2014, WHOe 2014). Im Gegensatz hierzu kommt es bei ca. 10% der HBV-Patienten und 70% der HCV-Patienten zu einer Chronifizierung der Hepatitis (WHO, 2014b; WHO, 2014c).

Weltweit sind mehr als 350 Millionen Menschen mit HBV und 170 Millionen Menschen mit HCV chronisch infiziert (Saeed *et al.*, 2014). Weder HBV noch HCV sind zytopathisch, d.h., dass der Verlauf der Hepatitis durch die Interaktion des Immunsystems mit dem Virus

bestimmt wird. Die chronische Zerstörung virusinfizierter Leberzellen durch das Immunsystem und die kontinuierliche Proliferation des Leberparenchyms führen zu einem strukturellen Umbau des Lebergewebes, wodurch die Entstehung eines Hepatozellulären Karzinoms (HCC) begünstigt wird (Guidotti und Chisari, 2006). In 20% der chronisch infizierten HCV-Patienten wird innerhalb von 20 Jahren die Entstehung einer Leberzirrhose beobachtet, die bei 2,5% der Patienten zu der Entstehung eines HCC führt (Brown, 2005). Jedes Jahr sterben somit weltweit mehr als 780.000 HBV-Patienten und bis zu 500.000 HCV-Patienten an den Folgen einer chronischen viralen Hepatitis (WHO, 2014b; WHO, 2014c). Chronische virale Leberinfektionen sind mit einem Anteil von bis zu 80% an der Anzahl aller diagnostizierter HCCs eine der führenden Indikationen für eine Lebertransplantation (Chinnadurai *et al.*, 2012; El-Serag, 2012).

Immunzellen sind entscheidend an der Ausheilung akuter Leberinfektionen, aber auch an der chronischen Schädigung des Lebergewebes beteiligt (Herkelel *et al.*, 2005; Lohse *et al.*, 2010). Bisher sind die Faktoren, die nach einer akuten Hepatitis zu einer Chronifizierung oder Klärung von intrazellulären Pathogenen führen, jedoch nur unzureichend erforscht. Um zu verstehen, warum es nach einer viralen Leberinfektion in einigen Patienten zu einem akuten Krankheitsverlauf und in anderen Fällen jedoch zu einer Chronifizierung der Infektion kommt, ist es notwendig, die molekularen Mechanismen zu identifizieren, die eine Aktivierung und Regulation des Immunsystems bewirken.

1.2 Lymphozytäres Choriomeningitis Virus (LCMV)

Die experimentelle Infektion von Mäusen mit dem Lymphozytären Choriomeningitis Virus (LCMV) ist ein etabliertes Modellsystem für die Erforschung immunregulatorischer Mechanismen in der Leber (Zinkernagel, 2002).

LCMV gehört zu der Gruppe der *Arenaviridae*. Die Bezeichnung Arenavirus (lat. Sand) leitet sich von den körnigen, in das Virion eingelagerten Ribosomen ab, die in elektronenmikroskopischen Aufnahmen des Virus erkennbar sind (Oldstone und Campbell, 2011) (siehe Abb. 1.1).

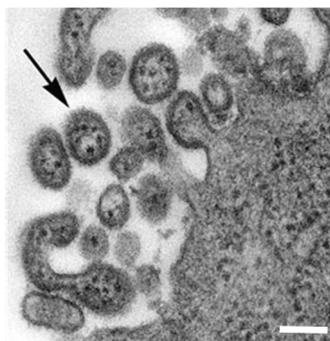


Abb. 1.1: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines LCMV-Virions (Pfeil) nach der Freisetzung durch eine infizierte Wirtszelle, modifiziert nach Cynthia *et al.*, 2013 (Längenstandard=100nm).

Die Familie der *Arenaviridae* umfasst mehr als 22 Virusspezies, zu denen neben LCMV, auch hochpathogene Vertreter wie das Lassa-Virus oder das Machupo-Virus zählen (Charrel *et al.*, 2008). Die geographische Verbreitung der *Arenaviridae* ist an das natürliche Vorkommen ihrer Wirtstiere gebunden (Salazar-Bravo *et al.*, 2002).

LCMV, dessen Hauptwirt die Hausmaus ist, wurde erstmals im Jahr 1933 von Charles Armstrong beschrieben (Armstrong und Lillie, 1934). Die Übertragung des Virus auf den Menschen kann über Kot, Speichel und Urin von infizierten Tieren erfolgen (Bowen *et al.*, 1975; Hotchin *et al.*, 1974). Außerdem wurde die Übertragung des Virus durch LCMV-infizierte Organtransplantate berichtet (Fischer *et al.*, 2006).

In immunkompetenten Menschen verläuft die Infektion häufig asymptomatisch (35%) oder mit grippeähnlichen Symptomen wie Fieber, Kopf- und Gliederschmerzen (50%) (Rousseau *et al.*, 1997). In seltenen Fällen (15%) kann es unter Beteiligung des Zentralnervensystems (ZNS) zu einer Meningitis oder Enzephalitis kommen (Roebroek *et al.*, 1994). Darüber hinaus kann die transplazentare Übertragung des Virus in Schwangeren schwere neurologische Schäden bei Neugeborenen oder den Abort des Fötus verursachen (Mets *et al.*, 2000).

Die Virulenz des Erregers ist sowohl auf den Immunzustand des Wirts als auch auf die molekularen Determinanten des Virus zurückzuführen. Bisher wurden 6 verschiedene LCMV-Stämme (Armstrong [ARM], WE, Traub, UBC, Albany, Pasteur) und die von ihnen abgeleiteten Virusisolate (CA 1371, ARM E-350, ARM 53b, ARM clone 13, Docile, Agressive) identifiziert, die sich sowohl in ihrer Gewebespezifität als auch in ihrer Pathologie und Infektionsdauer unterscheiden (Dutko und Oldstone, 1983; Barthold und Smith, 2007).

Eine Infektion mit dem LCMV-Stamm WE kann in Mäusen zu einer akuten viralen Hepatitis führen, in deren Verlauf es nach einer initialen Infektion von Kupffer-Zellen zu einer Infektion von Hepatozyten kommt (Bergthaler *et al.*, 2007; Zinkernagel *et al.*, 1986).

LCMV ist, wie HBV und HCV, nicht-zytotoxisch, d.h. dass die Gewebeschädigung im Verlauf der Infektion nicht durch das Virus sondern durch das Immunsystem erfolgt (Leist *et al.*, 1989). Die Erkennung und Zerstörung von LCMV-infizierten Zellen ist besonders auf die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen zurückzuführen. Infektionsstudien zeigen, dass CD8+ T-Zell-defiziente Mäuse nicht in der Lage sind, LCMV-infizierte Zellen dauerhaft zu eliminieren (Zinkernagel, 2002). Darüber hinaus kommt es in der initialen Phase der Infektion zu einer Immunantwort des angeborenen Immunsystems. Die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine durch Makrophagen und Neutrophile Granulozyten führt in der akuten Phase der Entzündung zu einer Verstärkung des Gewebeschadens (Biron *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2009).

1.3 LCMV-Struktur

LCMV ist ein sphärisches, umhülltes, negativ-Strang RNA-Virus mit einem Durchmesser von 40 nm - 200 nm (Buchmeier et al., 2007) (siehe Abb. 1.2 A).

Das Genom besteht aus zwei einzelsträngigen RNA Molekülen. Das größere Segment (7,2 kbp), das als L-RNA bezeichnet wird, kodiert für die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase (L) und das Matrixprotein Z (Harnish *et al.*, 1983; Singh *et al.*, 1987). Das kleinere Segment (3,4 kbp), die S-RNA, kodiert für das Nukleoprotein (NP) und ein Vorläufermolekül des Glykoproteins (GPC) (Riviere *et al.*, 1985). Beide Gensegmente werden gegenläufig abgelesen und sind von einer intergenischen Region (IGR) getrennt, die als Transkriptionsterminator fungiert. Die Enden der viralen Gensegmente sind hochkonserviert und bestehen aus einer komplementären Basensequenz, die während der Transkription und Translation über Eigenpaarungen der viralen Polymerase als Ansatzstelle dient (Lee *et al.*, 2002) (siehe Abb. 1.2 B).

Die genomische RNA bildet zusammen mit der viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase und dem Nukleoprotein einen Ribonukleoproteinkomplex (RNP), der von der Virushülle umgeben ist (Fuller-Pace und Southern, 1989). Die Innenseite der Virushülle wird durch das Matrixprotein Z stabilisiert (Fehling *et al.*, 2012). Das Vorläuferprotein GPC wird nach der Translation in ein Transmembranprotein (GP2) und ein extrazelluläres Protein (GP1) gespalten, die miteinander in der Virushülle assoziiert sind (Burns und Buchmeier, 1991).

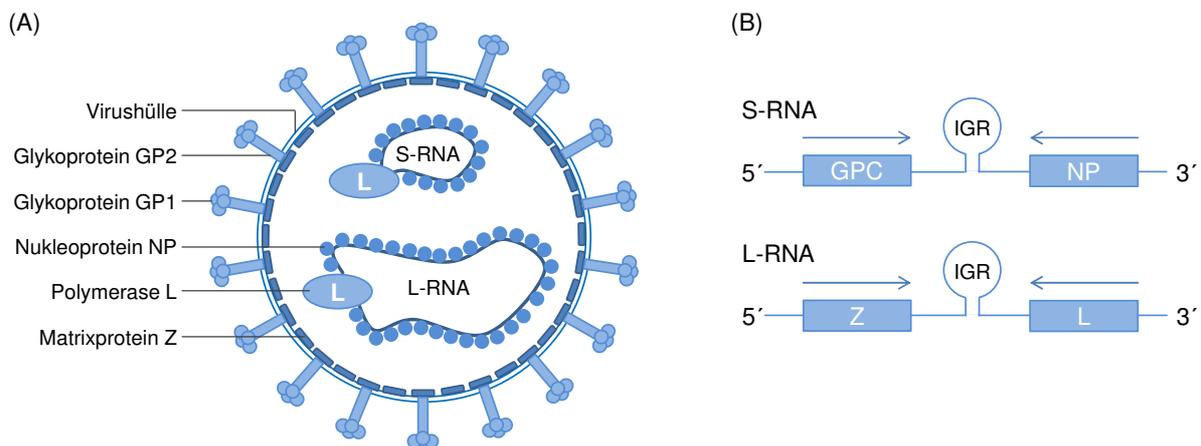


Abb. 1.2: (A) Schematische Darstellung der strukturellen Organisation eines LCMV Virions. (B) Schematische Darstellung der genomischen LCMV RNA-Segmente, modifiziert nach Fehling *et al.*, 2012; Modrow *et al.*, 2013 (GPC=Glykoprotein Vorläufermolekül, IGR=intergenische Region, L=RNA-abhängige RNA-Polymerase, NP=Nukleoprotein, Z=Matrixprotein).

1.4 LCMV-Infektionszyklus

LCMV besitzt ein breites Wirtszellspektrum. Die Infektion einer Zelle erfolgt durch die Bindung von GP1 an den Rezeptor α -Dystroglykan. α -Dystroglykan wird in zahlreichen Geweben exprimiert und ermöglicht die Interaktion mit extrazellulären Matrixproteinen (Oldstone und Campbell, 2011).

Nach der Rezeptor-vermittelten Endozytose des Virions führt die Ansäuerung des Endosoms zu einer GP2-abhängigen Fusion der Virushülle mit der Endosomenmembran (Di Simone *et al.*, 1994; Rojek *et al.*, 2008). Nach der Freisetzung des viralen Ribonukleokapsids im Zytoplasma induziert die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase die Transkription der L- und NP-mRNA. Durch die Anreicherung von NP im Zytoplasma vermittelt L die Replikation der genomischen L- und S-Segmente sowie die Expression der GPC- und Z-mRNA (Lee *et al.*, 2000; Pinschewer *et al.*, 2003). GPC ist ein Typ I Transmembranprotein und wird als Vorläuferprotein im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums synthetisiert. Während des Transports an die Zelloberfläche wird GPC im trans-Golgi-Netzwerk glykosyliert und in die homotetrameren Glykoproteine GP1 und GP2 gespalten (Lenz *et al.*, 2001). An der Zelloberfläche vermittelt das Matrixprotein Z die Assemblierung neuer Virionen und bewirkt die Freisetzung reifer Viruspartikel durch Knospung (Fehling *et al.*, 2012; Perez *et al.*, 2003) (siehe Abb. 1.3).

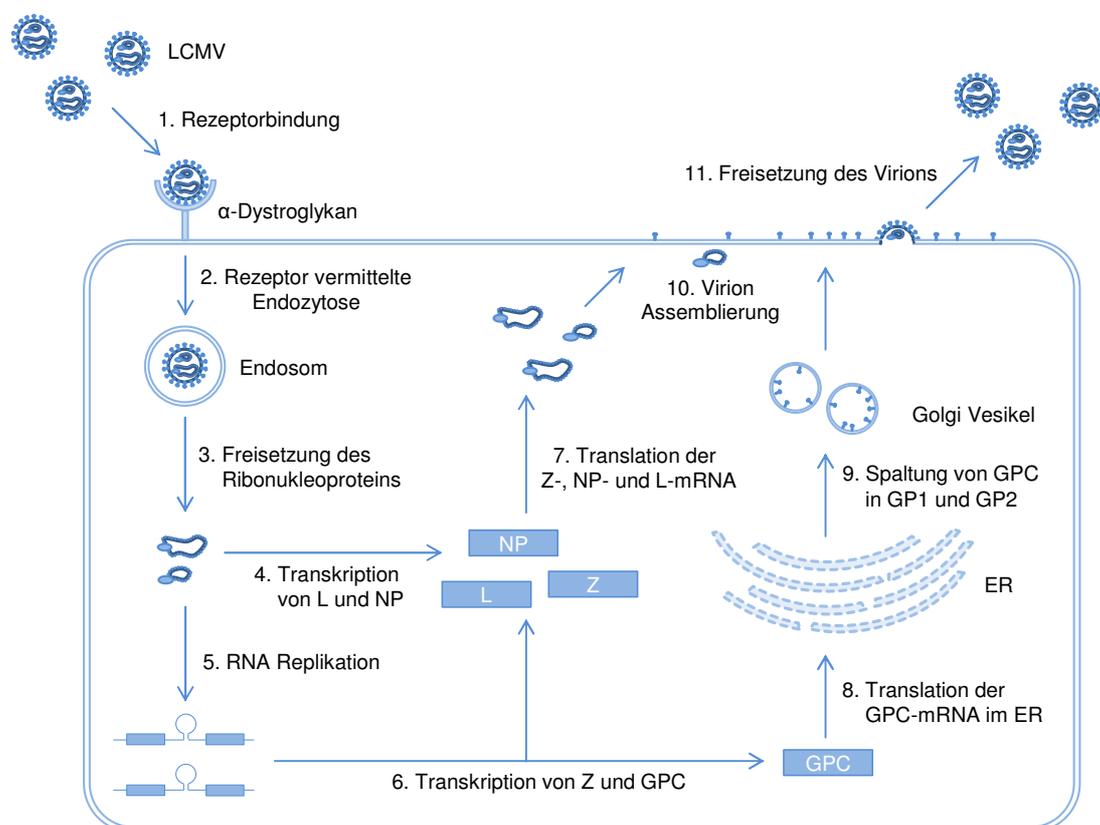


Abb. 1.3: Schematische Darstellung des LCMV-Replikationszyklus, modifiziert nach Fehling *et al.*, 2012 (ER=Endoplasmatisches Retikulum, GP=Glykoprotein, L=virale Polymerase, NP=Nukleoprotein, Z=Matrixprotein).

1.5 *Listeria monocytogenes*

Neben Viren können auch Bakterien Auslöser entzündlicher Lebererkrankungen sein (Anthony *et al.*, 1978). Die experimentelle Infektion von Mäusen mit *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) ist ein etabliertes Modellsystem für die Infektion und Pathogenese von intrazellulären Bakterien in der Leber (Vázquez-Boland *et al.*, 2001).

L. monocytogenes ist ein Gram-positives, stäbchenförmiges, nicht-sporenbildendes, fakultativ intrazelluläres Bakterium mit einer Größe von 0,4 x 1 - 1,5 µm (Vázquez-Boland *et al.*, 2001) (siehe Abb. 1.4).

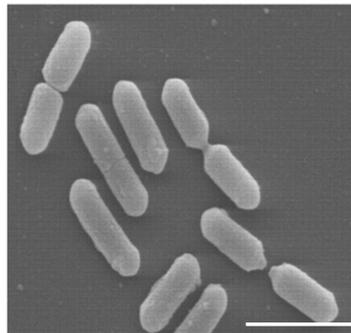


Abb. 1.4: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von *Listeria monocytogenes*, modifiziert nach Pilgrim *et al.*, 2003 (Längenstandard=2µm).

Der Erreger ist ubiquitär in der Umwelt verbreitet und resistent gegen äußere Umwelteinflüsse (Gray und Killinger, 1966). *L. monocytogenes* ist sowohl für Menschen als auch für Tiere pathogen. Die Aufnahme des Erregers erfolgt über kontaminierte tierische Lebensmittel und unzureichend prozessierte Milchprodukte (Farber und Peterkin, 1991).

Im Menschen kann eine Infektion mit *L. monocytogenes* zu Gastroenteritis und grippeähnlichen Symptomen wie Fieber, Muskelschmerzen, Durchfall, Übelkeit aber auch Sepsis führen (Yildiz *et al.*, 2007). Da Listerien die Blut-Hirn-Schranke überwinden können, zählen auch Erkrankungen des zentralen Nervensystems, wie Meningitis und Meningoenzephalitis, zu den beschriebenen Krankheitsbildern nach einer Listerien-Infektion (Drevets und Bronze, 2008). Durch den Übertritt der Plazentabariere besteht in Schwangeren außerdem ein erhöhtes Risiko für Fehl- und Totgeburten (Ramaswamy *et al.*, 2007). Listerien-Infektionen zählen mit einer Mortalitätsrate von bis zu 30% zu den tödlichsten bakteriellen Infektionskrankheiten weltweit (Vázquez-Boland *et al.*, 2001).

Neben dem Darm ist die Leber das von einer Listerien-Infektion am zweithäufigsten betroffene Organ (Ramaswamy *et al.*, 2007). Durch die Vermehrung des Erregers im Leberparenchym und die anschließende Zerstörung der infizierten Zellen durch das Immunsystem kann es im Verlauf einer Listerien-Infektion zu der Entstehung fokaler Nekrosen und Granulome im Lebergewebe kommen (Drevets und Bronze, 2008).

Sowohl leberresidente Makrophagen (Kupffer-Zellen) als auch Monozyten, Neutrophile Granulozyten und zytotoxische T-Zellen sind entscheidend an der Beseitigung einer Listerien-Infektion beteiligt (Zenewicz und Shen, 2007).

In der Frühphase der Infektion migrieren Neutrophile Granulozyten in infizierte Gewebereiche und vermitteln die Zerstörung infizierter Leberzellen (Conlan und North, 1991). Außerdem werden Listerien im Blut von Kupffer-Zellen und Monozyten phagozytiert und durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) abgetötet (Conlan und North, 1992). Darüber hinaus sind CD8+ T-Zellen entscheidend an der langfristigen Kontrolle des Erregers beteiligt (Pamer, 2004). So konnte gezeigt werden, dass 5-7 Tage nach einer Listerien-Infektion die Zerstörung von infizierten Parenchymzellen durch aktivierte zytotoxische CD8+ T-Zellen erfolgt (Vázquez-Boland *et al.*, 2001).

1.6 *Listeria monocytogenes*-Infektionszyklus

Zu Beginn einer Listerien-Infektion führt die Interaktion des bakteriellen Oberflächenproteins Internalin A (InIA) mit E-Cadherin auf Epithelzellen des Darms zu der Rezeptor-vermittelten Endozytose des Erregers (Seveau *et al.*, 2007). Nach der Aufnahme von *L. monocytogenes* in die Darmzellen bewirkt die Freisetzung von Listeriolysin (LLO) und der Phosphatidylinositol-spezifischen Phospholipase C (PI-PLC) die Lyse der Phagosomenmembran und ermöglicht den Übertritt des Erregers in das Zellinnere (Kayal und Charbit, 2006). Im Zytosol induziert das bakterielle Oberflächenprotein ActA (Actin assembly-inducing protein) die Polymerisation von F-Aktin und erlaubt, neben der Fortbewegung des Erregers, auch die transzelluläre Migration in benachbarte Zellen (Lambrechts *et al.*, 2008). Nach dem Zellübertritt kommt es durch das bakterielle Enzym Lecithinase (PLC-B) zu der Lyse der Phagosomenmembran und zu der Freisetzung des Bakteriums in das Zytoplasma (Freitag *et al.*, 2009; Tilney und Portnoy, 1989) (siehe Abb. 1.5).

L. monocytogenes kann nach der Vermehrung im Darm über das Blut oder Lymphe in die Leber disseminieren (Conlan und North, 1992). Im Leberparenchym bewirkt die Interaktion des bakteriellen Oberflächenproteins Internalin B (InIB) mit dem Hepatozyten-Rezeptor HGFR (hepatocyte growth factor receptor) die Rezeptor-vermittelte Endozytose des Bakteriums (Pizarro-Cerdá und Cossart, 2006). Durch die Proliferation und Invasion von benachbarten Leberzellen kommt es zu der Ausbreitung des Erregers im Leberparenchym (Vázquez-Boland *et al.*, 2001) (siehe Abb. 1.5).

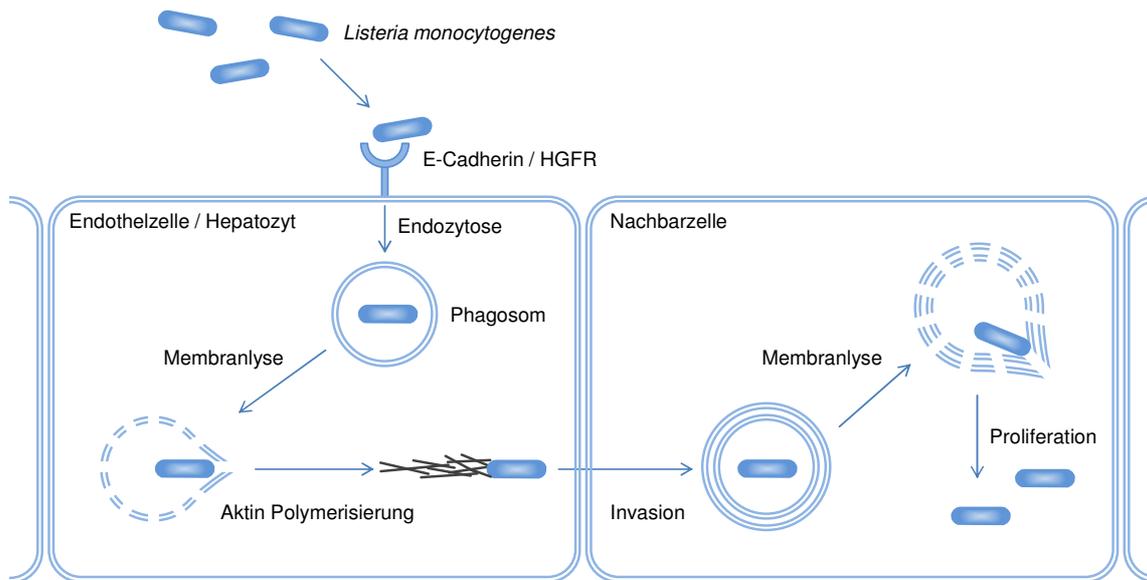


Abb. 1.5: Schematische Darstellung der Infektion von Darmepithelzellen/Hepatozyten durch *Listeria monocytogenes* und der transzellulären Invasion benachbarter Parenchymzellen, modifiziert nach Hamon *et al.*, 2006; Tilney und Portnoy, 1989 (HGFR=hepatocyte growth factor receptor).

1.7 Das Immunsystem

Das Immunsystem hat die Aufgabe in den Körper eindringende Pathogene zu erkennen und zu eliminieren. Hierfür unterteilen sich die Effektoren des Immunsystems in das angeborene Immunsystem und den entwicklungsgeschichtlich jüngeren Teil des Immunsystems, das adaptive Immunsystem (Hoffmann *et al.*, 1999).

Sowohl T-Zellen als auch B-Zellen und die von ihnen freigesetzten Antikörper sind Teil des adaptiven Immunsystems. Das adaptive Immunsystem ermöglicht die Ausbildung von Gedächtniszellen und bewirkt einen Langzeitschutz vor wiederkehrenden Infektionen. Im Gegensatz hierzu vermittelt das angeborene Immunsystem die initiale Infektabwehr und bewirkt die Aktivierung adaptiver Abwehrmechanismen. Neben den mechanischen Barrieren, die ein physisches Eindringen von Schädlingen in den Organismus verhindern, sind Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen, NK-Zellen sowie eine Vielzahl löslicher Proteine zentraler Bestandteil der angeborenen Immunität (Akira *et al.*, 2006; Medzhitov und Janeway, 2000).

1.8 Zelluläre Immunantwort

Intrazelluläre Pathogene wie LCMV und *Listeria monocytogenes* sind nach dem Eindringen in eine Wirtszelle vor humoralen Immunreaktionen geschützt. Die Klärung einer

intrazellulären Infektion erfordert daher eine gerichtete Aktivierung zellspezifischer Abwehrmechanismen (Pamer, 2004; Zenewicz und Shen, 2007).

Haupteffektoren des adaptiven Immunsystems für die Beseitigung intrazellulärer Krankheitserreger sind CD8⁺ T-Zellen (Andersen *et al.*, 2006; Lang, 2010). Nach der T-Zell-Generierung im Knochenmark und der Einwanderung in den Thymus kommt es durch die somatische Rekombination im Genlocus des T-Zell-Rezeptors zu der Entstehung antigenspezifischer naiver T-Zell-Rezeptor Klone.

Die Differenzierung naiver CD8⁺ T-Zellen in zytotoxische T-Effektorzellen erfordert neben der Bindung des T-Zell-Rezeptors an ein von einer antigenpräsentierenden Zelle (APZ) auf einem MHC-I (major histocompatibility complex I) Molekül präsentierten Antigen, die Aktivierung des CD8-Ko-Rezeptors sowie die Stimulation durch kostimulatorische Moleküle (CD80 und CD86) und Interleukin 2 (Andersen *et al.*, 2006).

Zytotoxische CD8⁺ T-Zellen können virusinfizierte Zellen antigenspezifisch über die Bindung des T-Zell-Rezeptors an ein auf einem MHC-I Molekül präsentierten Antigen erkennen und abtöten. Nach ihrer Aktivierung sezernieren zytotoxische CD8⁺ T-Zellen Perforin/Granzym B und induzieren über die Interaktion von FAS-L (FAS-Ligand) mit FAS die Aktivierung apoptotischer Signalwege, wodurch es zu dem programmierten Zelltod der Zielzelle kommt (Chowdhury und Lieberman, 2008; Nagata und Golstein, 1995). Darüber hinaus vermitteln zytotoxische CD8⁺ T-Zellen über die Freisetzung von TNF α und IFN γ die Expression antiviraler Moleküle (MHC-I, FAS) und erhöhen die Sensitivität von infizierten Zellen für apoptotische Signale (Andersen *et al.*, 2006; Guidotti *et al.*, 1996).

Zusätzlich zu den zytotoxischen CD8⁺ T-Effektorzellen sind auch Zellen des angeborenen Immunsystems entscheidend an der Klärung von intrazellulären Infektionen beteiligt. So sind NK-Zellen in der Lage, infizierte Zellen über eine aberrante MHC-Expression zu erkennen und durch die Sekretion von Granzym B und Perforin abzutöten (Zeromski *et al.*, 2011). Neben der Phagozytose von Pathogenen und der Freisetzung proinflammatorischer Zytokine (TNF α , IL6, IL1 β) sezernieren Neutrophile Granulozyten, Monozyten und Makrophagen Chemokine, die eine Rekrutierung von adaptiven Immunzellen in infizierte Gewebereiche ermöglichen (Guidotti und Chisari, 2001). Außerdem modulieren insbesondere dendritische Zellen die Präsentation von Antigenen auf MHC-Molekülen und beeinflussen die Aktivierung zytotoxischer CD8⁺ T-Zellen durch die Expression kostimulatorischer Moleküle (Iwasaki und Medzhitov, 2004).

Im Gegensatz zum angeborenen Immunsystem erfolgt eine Immunreaktion durch adaptive Immunzellen frühestens 4-7 Tage nach der initialen Infektion. Da die Zellen des angeborenen Immunsystems jedoch unmittelbar durch den Kontakt mit einem Krankheitserreger aktiviert werden, vermitteln angeborene Immunzellen auch in der frühen Phase einer Infektion einen effizienten Schutz (Medzhitov, 2001).

1.9 Das angeborene Immunsystem

Die Pathogenerkennung durch das angeborene Immunsystem unterscheidet sich grundsätzlich von der Aktivierung des adaptiven Immunsystems. Im Gegensatz zum adaptiven Immunsystem erfolgt die Aktivierung des angeborenen Immunsystems durch die Erkennung konservierter Pathogen-assoziiertes molekularer Muster (PAMPs). PAMPs sind exogene Strukturmotive oder Moleküle (wie z.B. Lipopolysaccharide [LPS], Peptidoglykane [PGN], Lipoteichonsäuren [LTA], Flagellin und bakterielle oder virale Nukleinsäuren), die charakteristisch für mikrobielle Pathogene sind und einen hohen Konservierungsgrad aufweisen. PAMPs werden von Zellen des angeborenen Immunsystems durch Muster-erkennende Rezeptoren (PRRs) detektiert. Da PAMPs nur eine geringe Variabilität aufweisen, werden PRRs, im Gegensatz zu den klonalen Rezeptoren des adaptiven Immunsystems, von Keimbahn-kodierten Genen exprimiert (Akira *et al.*, 2006; Janeway und Medzhitov, 2002; Medzhitov und Janeway, 2000).

Neben PAMPs erkennen PRRs auch endogene Schaden-assoziierte Muster (DAMPs). Hierbei handelt es sich um Moleküle (wie z.B. endogene Nukleinsäuren, ATP [Adenosintriphosphat], HMGB1 [high-mobility group protein B1]), die von körpereigenen Zellen passiv nach einer Zellschädigung freigesetzt werden können (Jounai *et al.*, 2013; Karin *et al.*, 2006; Newton und Dixit, 2012). PRRs sind somit in der Lage, Entzündungsreaktionen nach dem Kontakt mit infektiösen Bakterien, Viren und Pilzen sowie aseptischen Stimuli zu initiieren.

1.10 Muster-erkennende Rezeptoren (PRRs)

PRRs sind eine heterogene Gruppe von Proteinen, die in lösliche- (Mannose-bindende Lektin [MBL], LPS-bindendes Protein [LBP], C-reaktives Protein [CRP]), membranständige- (Scavenger-Rezeptoren, C-Typ Lektin Rezeptoren, Toll-like Rezeptoren [TLRs], und TREMs [triggering receptors expressed on myeloid cells]) und intrazelluläre Rezeptoren (NOD-like Rezeptoren [NLRs] und RIG-I-like Rezeptoren [RLRs]) unterteilt werden (Du Clos und Mold, 2011; Janeway und Medzhitov, 2002; Kerrigan und Brown, 2009).

Während lösliche PRRs Pathogene opsonieren oder die Aktivierung des Komplement-Systems induzieren, vermitteln membranständige PRRs, wie Scavenger-Rezeptoren und CLRs, die Phagozytose von bakteriellen oder viralen Pathogenen und bewirken deren Degradation. Im Gegensatz hierzu handelt es sich bei TLRs, NLRs und RLRs um Signaltransduktions-aktivierende Rezeptoren, die eine Schlüsselrolle bei der Regulation und Expression proinflammatorischer Mediatoren einnehmen (Janeway und Medzhitov, 2002; Kawai und Akira, 2011).

1.11 Toll-like Rezeptoren (TLRs)

TLRs sind transmembrane Proteine, die auf der Zelloberfläche (TLR1, -2, -4, -5, -6, -10) oder in endosomalen Kompartimenten (TLR3, -7, -8, -9) exprimiert werden. TLRs bestehen aus einer extrazellulären LRR (leucine-rich repeats)-Ligandenbindungsdomäne und einer intrazellulären Signaltransduktionsdomäne (Toll/IL-1R [TIR]). Bisher wurden 10 humane und 12 murine TLRs charakterisiert. Mit Ausnahme von TLR10 konnten für alle TLRs aktivierende Liganden identifiziert werden (Akira und Takeda, 2004; Akira *et al.*, 2006; Kawai und Akira, 2011).

Während TLR2 in Kombination mit TLR1 und TLR6 bakterielle Lipoproteine und Zymosan von Hefen erkennt, konnte für TLR4 die Aktivierung durch bakterielles LPS, virale Oberflächenproteine und endogene DAMPs nachgewiesen werden. TLR3 und TLR7/TLR8 detektieren virale einzelsträngige bzw. doppelsträngige RNA. TLR5 wird durch bakterielles Flagellin aktiviert und TLR9 bindet sowohl virale als auch bakterielle CpG DNA. Des Weiteren erhöht die Interaktion einzelner TLRs mit Ko-Rezeptoren wie z.B. CD14, CD36 oder MD2 (lymphocyte antigen 96) das Ligandenerkennungsspektrum (Kawai und Akira, 2011; O'Neill *et al.*, 2013).

Die Signaltransduktion aller TLRs, mit Ausnahme von TLR3, induziert die MyD88 (myeloid differentiation primary response gene 88)-abhängige Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-kappaB (nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells), an der die Signalmoleküle IRAK1/4 (Interleukin-1 receptor-associated kinase 1/4), TRAF6 (TNF receptor-associated factor 6), TAK1 (transforming growth factor β -activated kinase-1) und der IKK (I κ B kinase)-Komplex beteiligt sind. TLR4 und TLR3 vermitteln außerdem über TRAF3 und TBK1 (TANK-binding kinase 1)/IKK ϵ eine TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β)-abhängige Aktivierung von IRF3 (Interferon regulatory factor 3) und IRF7. Darüber hinaus induzieren TLR7, TLR8 und TLR9 über IRAK1/4, TRAF6, TAK1 und IKK α die MyD88-abhängige Aktivierung von IRF7 (Kawai und Akira, 2011; O'Neill *et al.*, 2013).

Die Aktivierung von TLRs führt somit in Abhängigkeit von dem eingeschlagenen Signalweg zu der Transkription proinflammatorischer Zytokine, Chemokine, Interferone und kostimulatorischer Oberflächenmoleküle. TLRs vermitteln somit eine wichtige Regulation von Abwehrmechanismen gegen bakterielle und virale Pathogene (Akira *et al.*, 2006).

1.12 NOD-like Rezeptoren (NLRs)

Im Gegensatz zu TLRs sind NLRs auf die Erkennung von intrazellulären Pathogenen spezialisiert. Die NLR-Genfamilie umfasst mindestens 23 Gene im Menschen und 34 Gene

in der Maus. NLRs bestehen aus einer Leucin-reichen Liganden-Bindungsdomäne, einer NOD (nucleotide-binding oligomerization)-Oligomerisierungsdomäne und einer CARD (caspase recruitment domain), PYD (pyrin domain) oder BIR (baculovirus inhibitor of apoptosis repeat)-Effektordomäne (Franchi *et al.*, 2009).

Die am besten charakterisierten Proteine der NLR-Genfamilie sind NOD1 und NOD2. Sowohl NOD1 als auch NOD2 werden durch Peptidoglykan aktiviert. Während NOD1 das Dipeptid γ -D-Glu-meso-DAP, das vornehmlich im Peptidoglykan von Gram-negativen Bakterien vorkommt erkennt, wird NOD2 durch das Muramyldipeptid MurNAc-L-Ala-D-isoGln (MDP), das sowohl von Gram-positiven als auch von Gram-negativen Bakterien exprimiert wird, aktiviert. Sowohl NOD1 als auch NOD2 rekrutieren nach der Bindung eines Liganden die Kinase RIP2 und induzieren über den IKK-Komplex die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-kappaB (Akira *et al.*, 2006).

NOD1 und NOD2 bewirken somit nach einer Infektion mit intrazellulären Bakterien (wie z.B. *Listeria monocytogenes*) die Expression proinflammatorischer Mediatoren und Chemokine (Akira *et al.*, 2006). Weitere Studien deuten außerdem auf eine Interaktion von NOD2 mit MAVS (mitochondrial antiviral signaling protein) hin. So konnte gezeigt werden, dass NOD2 nach der Infektion mit Paramyxoviren über TRAF3 und TBK1/IKK ϵ eine MAVS-abhängige Aktivierung von IRF3 bewirkt (Sabbah *et al.*, 2009). NLRs vermitteln daher möglicherweise auch eine wichtige Regulation von Abwehrmechanismen gegen virale Erreger.

1.13 RIG-I-like Rezeptoren (RLRs)

RLRs sind intrazelluläre PRRs, die sowohl virale 5'-triphosphorierte ssRNA (einzelssträngige RNA) als auch virale dsRNA (dopplesträngige RNA) im Zytoplasma von infizierten Zellen detektieren (Kawai und Akira, 2007). Die beiden am besten charakterisierten Mitglieder der RLR Familie sind RIG-I (retinoic acid inducible gene I) und MDA5 (melanoma differentiation-associated protein 5). RLRs bestehen aus einer DExD/H box RNA-Helikase Liganden-Bindungsdomäne und einer CARD-Effektordomäne (Yoneyama *et al.*, 2004). Die Interaktion von ss/dsRNA mit der RLR Ligandenbindungsdomäne bewirkt die Bindung der CARD Effektordomäne an MAVS. MAVS induziert über die Signalmoleküle TRAF3 und TBK1/IKK ϵ die Regulation der Transkriptionsfaktoren IRF3 und IRF7 und vermittelt über die Rekrutierung von TRAF6, TAK1 und des IKK-Komplex die Aktivierung von NF-kappaB. RLRs regulieren somit die Transkription proinflammatorischer Zytokine, Chemokine und Typ-I-Interferone und induzieren wichtige Abwehrmechanismen gegen virale Pathogene (Akira *et al.*, 2006).

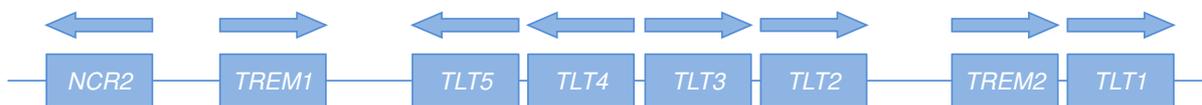
1.14 Die TREM-Rezeptor Familie

Im Gegensatz zu TLRs, NLRs und RLRs ist die funktionelle Bedeutung von TREMs (triggering receptor expressed on myeloid cells) im Verlauf von infektiösen Entzündungsprozessen noch nicht vollständig verstanden (McGonagle *et al.*, 2007; Weber *et al.*, 2014).

Die erstmals im Jahr 2000 durch Bouchon *et al.* beschriebenen Gene TREM1 und TREM2 wurden aufgrund ihrer Homologie zu dem auf NK-Zellen exprimierten Rezeptor NKp44 identifiziert (Bouchon *et al.*, 2000; Cantoni *et al.*, 1999). Wegen ihrer mehrheitlichen Expression auf Neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Dendritischen Zellen wurden die Rezeptoren als „**T**rigg**e**ring **R**ece**p**to**r**s **E**xpr**e**ssed on **M**yeloid **C**ells“ (TREMs) bezeichnet (Bouchon *et al.*, 2000; Bouchon *et al.*, 2001b). Die Gene der TREM-Familie sind in Genclustern angeordnet und wurden bisher am umfassendsten in *Homo sapiens* und *Mus musculus* charakterisiert (siehe Abb. 1.6). Funktionelle TREM-Homologe konnten außerdem in *Sus scrofa*, *Bos taurus*, und *Gallus gallus* nachgewiesen werden (Ramanathan *et al.*, 2004, 2005; Viertlboeck *et al.*, 2006). Zusätzlich zu TREM1 und TREM2 konnte in *Mus musculus* auch ein für den Rezeptor TREM3-kodierendes Gen identifiziert werden (Chung *et al.*, 2002). Ein Homolog des Gens *NCR2*, das im Menschen für den NK-Zell-Rezeptor Nkp44 kodiert, konnte in *Mus musculus* nicht nachgewiesen werden (Allcock *et al.*, 2003).

Neben den Genen der TREM-Familie wurden im TREM-Gencluster außerdem mehrere als „**T**REM-**L**ike-**T**ranscripts“ (TLT) bezeichnete Gene identifiziert. TLT1, TLT2 und TLT3 werden auf Thrombozyten und deren Vorläuferzellen sowie auf myeloiden und lymphoiden Zellen exprimiert (Halpert *et al.*, 2011; King *et al.*, 2006; Washington *et al.*, 2002). Eine Expression von funktionellen Genprodukten für TLT4, TLT5 und TLT6 konnte bisher nicht nachgewiesen werden (Allcock *et al.*, 2003). Aufgrund von Sequenzhomologien wird vermutet, dass die TREM- und TLT-Gene von einem gemeinsamen Vorläufergen abstammen (Colonna, 2003).

(A) *Homo sapiens*, Chromosom 6p21



(B) *Mus musculus*, Chromosom 17C3



Abb. 1.6: Schematische Darstellung des TREM-Genclusters in (A) *Homo sapiens* und (B) *Mus musculus*, modifiziert nach Allcock *et al.*, 2003.

1.15 Expression von TREM1

TREM1 ist der bisher am umfangreichsten charakterisierte Rezeptor der TREM-Rezeptorgenfamilie.

Die Transkription des *TREM1*-Gens führt zu der Expression einer RNA mit 4 Exons (siehe Abb. 1.7), die nach der Translation in eine Polypeptidkette mit einer Länge von 234 Aminosäuren umgeschrieben wird (Allcock *et al.*, 2003; Gingras *et al.*, 2002).

TREM1 mRNA



Abb. 1.7: Schematische Darstellung der *TREM1*-Genstruktur, modifiziert nach Allcock *et al.*, 2003 (UTR=untranslatierte Region, bp=Basenpaare).

TREM1 wird sowohl auf Neutrophilen Granulozyten als auch auf Monozyten und Makrophagen exprimiert (Bouchon *et al.*, 2000). Zellkulturanalysen deuten darauf hin, dass die Expression von TREM1 durch TLR-Liganden sowie durch bakterielle oder virale Oberflächenbestandteile induziert werden kann (Bleharski *et al.*, 2003; Bouchon *et al.*, 2000; Mohamadzadeh *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2010). Im Gegensatz hierzu lassen Studien in humanen Monozyten einen reprimierenden Effekt der Zytokine TGF β (transforming growth factor β) und IL10 auf die Expression von TREM1 vermuten (Schenk *et al.*, 2005).

Zusätzlich zu der TREM1-Expression auf myeloiden Zellen konnte die Expression von TREM1 auch in Leber Sinusoidalen Endothelzellen (LSECs), Ito-Zellen und hepatischen Makrophagen nachgewiesen werden. So konnte gezeigt werden, dass die Expression von TREM1 in LSECs und hepatischen Makrophagen durch Endotoxin induzierbar ist (Chen *et al.*, 2008; Liao *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2012).

Auf molekularer Ebene erfolgt die Expression von TREM1 durch ein komplexes Zusammenspiel von Transkriptionsfaktoren. Während die basale TREM1-Expression durch die Transkriptionsfaktoren C/EBP α (CCAAT/enhancer-binding protein alpha) und NF-kappaB (p50/p50) reguliert wird, sind die Transkriptionsfaktoren CREB (cAMP response element-binding protein) und AP1 (c-fos/c-Jun) sowie NF-kappaB (p50/p65) an der Induktion der TREM1-Expression nach der Stimulation mit bakteriellem Endotoxin beteiligt (Hosoda *et al.*, 2011; Kastenbauer und Ziegler-Heitbrock, 1999).

1.16 Struktur von TREM1

TREM1 ist ein Typ I Transmembranrezeptor mit einer Masse von 30 kDa und besteht aus einer extrazellulären (194 Aminosäuren), einer transmembranen (29 Aminosäuren) und einer intrazellulären Domäne (5 Aminosäuren) (Kelker *et al.*, 2004; Radaev *et al.*, 2003). Die extrazelluläre Domäne weist strukturelle Homologien zu den Rezeptoren der Immunglobulin-Superfamilie (Ig-sf) auf und enthält eine Immunglobulin V-Typ Domäne mit der Konsensussequenz Asp-XXX-Gly-XXX-Tyr-XXX-Cys. Die Transmembrandomäne ist über eine kurze Prolin-reiche Sequenz mit der extrazellulären Domäne verbunden und ermöglicht über einen positiv geladenen Lysin-Rest die Interaktion mit dem ITAM (immunoreceptor tyrosine based activation motif) Signal-Adaptorprotein DAP12 (DNAX-activating protein of 12 kDa) (Bouchon *et al.*, 2000). Die intrazelluläre Domäne von TREM1 weist keine konservierten Struktur motive auf. TREM1 ist daher für die Signalweiterleitung auf die Interaktion mit dem Signal-Adapterprotein DAP12 angewiesen (siehe Abb. 1.8).

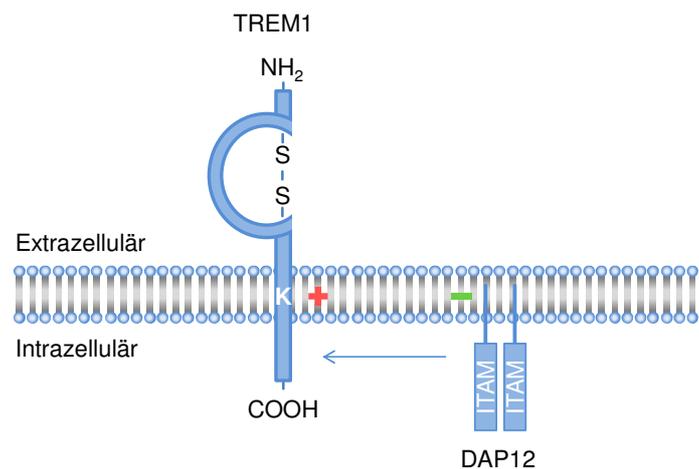


Abb. 1.8: Schematische Darstellung des strukturellen Aufbaus von TREM1 und DAP12, modifiziert nach (Colonna und Facchetti, 2003) ((-)=negative Ladung, (+)=positive Ladung, COOH=Carboxylgruppe, ITAM=immunoreceptor tyrosine-based activation motif, K=Lysin, NH₂=Aminogruppe, S=Cystein, S-S=Disulfidbrücke).

1.17 TREM1-Signaltransduktion

Die Bindung eines Liganden an die extrazelluläre Domäne von TREM1 führt über eine Konformationsänderung in der Transmembranregion von TREM1 zu der Interaktion von TREM1 und DAP12 (Bouchon *et al.*, 2000; Colonna und Facchetti, 2003). Nach der Bindung von DAP12 an TREM1 induziert SRC (sarcoma) die Phosphorylierung der ITAM-Domäne von DAP12, wodurch die Tyrosinkinase SYK (spleen tyrosine kinase) an den TREM1/DAP12-Rezeptorkomplex rekrutiert wird (siehe Abb. 1.8 und 1.9).

Anschließend induziert SYK die Aktivierung des ERK1/2- (extrazellulär Signal-regulierte Kinase 1/2), JAK2- (Janus Kinase 2), PKC- (Phosphokinase C), AKT- (Proteinkinase B), PLC- (Phospholipase C) und des CARD9/BCL10/MALT1- (caspase-associated recruitment domain 9/B-cell lymphoma/leukemia 10/mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1) Signalwegs (Arts *et al.*, 2013; Hara *et al.*, 2007; Hara und Saito, 2009).

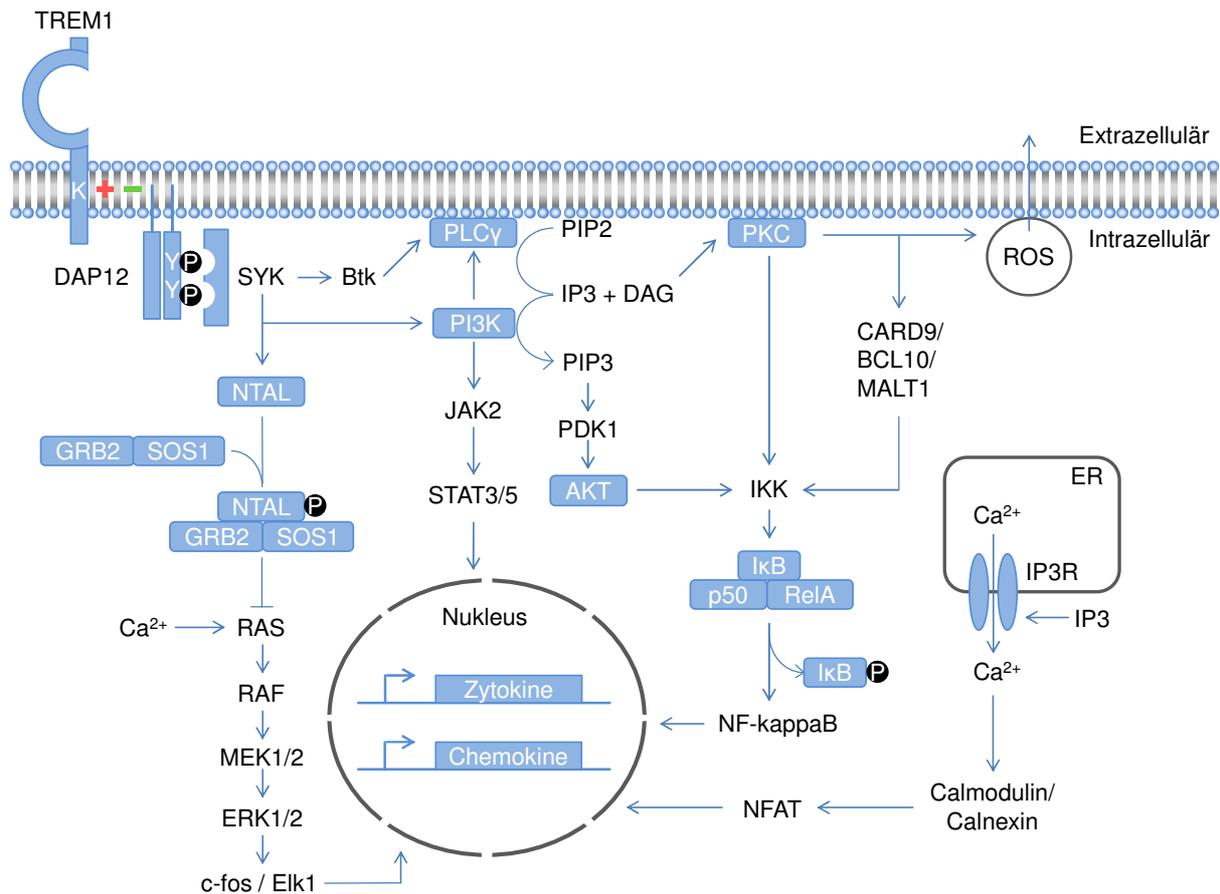


Abb. 1.9: Schematische Darstellung der TREM1-Signaltransduktion, modifiziert nach Arts *et al.*, 2013; Colonna und Faccetti, 2003; Tessarz und Cerwenka, 2008 (+/=positive Ladung, -=negative Ladung, AKT=Proteinkinase B, BCL10=B-cell lymphoma/leukemia 10, BTK1=Bruton's tyrosine kinase, Ca2+=Kalzium, CARD9=caspase-associated recruitment domain 9, DAG=Diacylglycerol, DAP12=DNAX-activating protein of 12 kDa, IκB=inhibitor of kappa B, IKK=IκB kinase, Elk1=ETS domain-containing protein Elk-1, ER=Endoplasmatisches Retikulum, ERK1/2=extracellular signal-regulated kinase 1/2, GRB2=growth factor receptor-bound protein 2, IP3=Inositoltrisphosphat, IP3R=Inositoltrisphosphat-Rezeptor, JAK2=Januskinase 2, MALT1=mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1, MEK1/2=extracellular signal-regulated kinase kinase, NFAT=nuclear factor of activated T-cells, NF-κappaB=nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NTAL=non-T cell activation linker, P=Phosphat, PDK1=phosphoinositide dependent protein kinase-1, PI3K=Phosphoinositid-3-Kinase, PIP2=Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat, PIP3=Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat, PLC=Phospholipase C, RAF=rapidly accelerated fibrosarcoma, RAS=rat sarcoma, ROS=reaktive Sauerstoffspezies, SOS1=son of sevenless homolog 1, STAT3/5=signal transducer and activator of transcription 3/5, SYK=spleen tyrosine kinase, TREM1=triggering receptor expressed on myeloid cells 1, Y=Tyrosin).

Die Aktivierung von TREM1 führt neben einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration somit zu der Aktivierung der proinflammatorischen Transkriptionsfaktoren AP1 (c-fos / c-jun), Elk1 (ETS domain-containing protein Elk-1), STAT3/5 (signal transducer and activator of transcription 3/5) und NF-kappaB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) (Bouchon *et al.*, 2000).

Außerdem induziert TREM1 die Phosphorylierung von NTAL (non-T cell activation linker). Da phosphoryliertes NTAL die Rekrutierung von GRB2 (growth factor receptor-bound protein 2) und SOS1 (sons of sevenless homolog 1) vermittelt, wirkt TREM1 einer Hyperaktivierung des RAS-Signalwegs entgegen (Tessarz *et al.*, 2007).

1.18 TREM1-Ligand

Bisher konnte ein Ligand für die Aktivierung von TREM1 nicht eindeutig identifiziert werden. Dennoch deuten mehrere Studien darauf hin, dass TREM1 sowohl durch körpereigene (endogene) als auch durch exogene Faktoren stimuliert werden kann.

In Zellkulturanalysen konnten Haselmayer *et al.* zeigen, dass ein möglicher TREM1-Ligand auf Thrombozyten exprimiert wird, da es zu einer konzentrationsabhängigen Bindung eines löslichen TREM1-Fusionsproteins (TREM1-Fc) an Thrombozyten kommt (Haselmayer *et al.*, 2007).

Weitere Analysen lassen die Expression eines TREM1-Liganden auf Neutrophilen Granulozyten vermuten. Unter Verwendung eines TREM1-spezifischen mTREM1/IgG1 Tetramers konnten Gibot *et al.* nachweisen, dass ein möglicher TREM1-Ligand auf peripheren und peritonealen Neutrophilen Granulozyten im Verlauf einer bakteriellen Peritonitis exprimiert wird (Gibot *et al.*, 2006b).

Darüber hinaus konnten Wu *et al.* das Protein HMGB1, das von nekrotischen Zellen freigesetzt wird, als möglichen endogenen Liganden für TREM1 identifizieren. So konnte gezeigt werden, dass es nach der Immunpräzipitation von nekrotischem Zelllysate aus Hepatozyten zu einer spezifischen Interaktion von HMGB1 mit TREM1 kommt (Wu *et al.*, 2012).

Funktionelle Analysen deuten außerdem auf eine Aktivierung von TREM1 durch virale Hüllproteine hin. Mohamadzadeh *et al.* konnten nachweisen, dass die Stimulation von Neutrophilen Granulozyten mit Ebola- und Marburg-Viren zu einer TREM1-abhängigen Expression der Zytokine TNF α und IL1 β führt (Mohamadzadeh *et al.*, 2006).

Weitere Untersuchungen lassen ebenfalls eine Aktivierung von TREM1 durch bakterielle Oberflächenbestandteile vermuten. So wurde gezeigt, dass die Inkubation von myeloiden Zellen mit aufgereinigten Zellwandbestandteilen von *Staphylococcus aureus* und

Pseudomonas aeruginosa zu einer TREM1-abhängigen Expression entzündungsfördernder Zytokine führt (Yu *et al.*, 2010).

1.19 Funktion von TREM1

Da ein Ligand für die Aktivierung von TREM1 bisher nicht eindeutig identifiziert werden konnte, beruhen funktionelle Studien zu TREM1 auf der Verwendung agonistischer Antikörper oder inhibitorischer Peptide.

So konnten mehrere Arbeitsgruppen zeigen, dass die Aktivierung von TREM1 auf Monozyten durch einen agonistischen Antikörper zu einer erhöhten Expression der proinflammatorischen Zytokine IL8, MCP1/CCL2 und TNF α sowie einer verringerten Expression des antiinflammatorischen Zytokins IL10 führt (Bleharski *et al.*, 2003; Bouchon *et al.*, 2000). Außerdem wurde in Neutrophilen Granulozyten eine stimulierende Wirkung von TREM1 auf die Freisetzung von MPO (Myeloperoxidase), reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) sowie eine vermehrte Expression der Adhäsionsmoleküle CD29, CD11c, CD49e, CD11b, CD49d und CD18 nachgewiesen (Bouchon *et al.*, 2000).

Zellkulturanalysen lassen ebenfalls einen möglichen Einfluss von TREM1 auf die Aktivierung von adaptiven Immunzellen vermuten. So konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von TREM1 auf Monozyten und Neutrophilen Granulozyten zu einer vermehrten Expression der kostimulatorischen Moleküle CD1a, CD40, CD86 (B7.2), CD54 (ICAM-1), CD83 sowie CD32 (FcRII) und HLA-DR (MHC-II) führt (Bleharski *et al.*, 2003; Bouchon *et al.*, 2000).

Darüber hinaus konnten Bouchon *et al.* nachweisen, dass TREM1 eine synergistische Aktivierung anderer PRRs vermittelt. *In vitro* Studien deuten darauf hin, dass die Kostimulation von TREM1 mit TLR4 oder NOD2 zu einer verstärkten Expression der Zytokine TNF α und IL1 β führt. Da die Aktivierung von TLR4 oder NOD2 außerdem die Expression von TREM1 induziert, wird vermutet, dass TREM1 die Produktion proinflammatorischer Zytokine über einen positiven Rückkopplungsmechanismus verstärkt (siehe Abb. 1.10) (Bleharski *et al.*, 2003; Bouchon *et al.*, 2001).

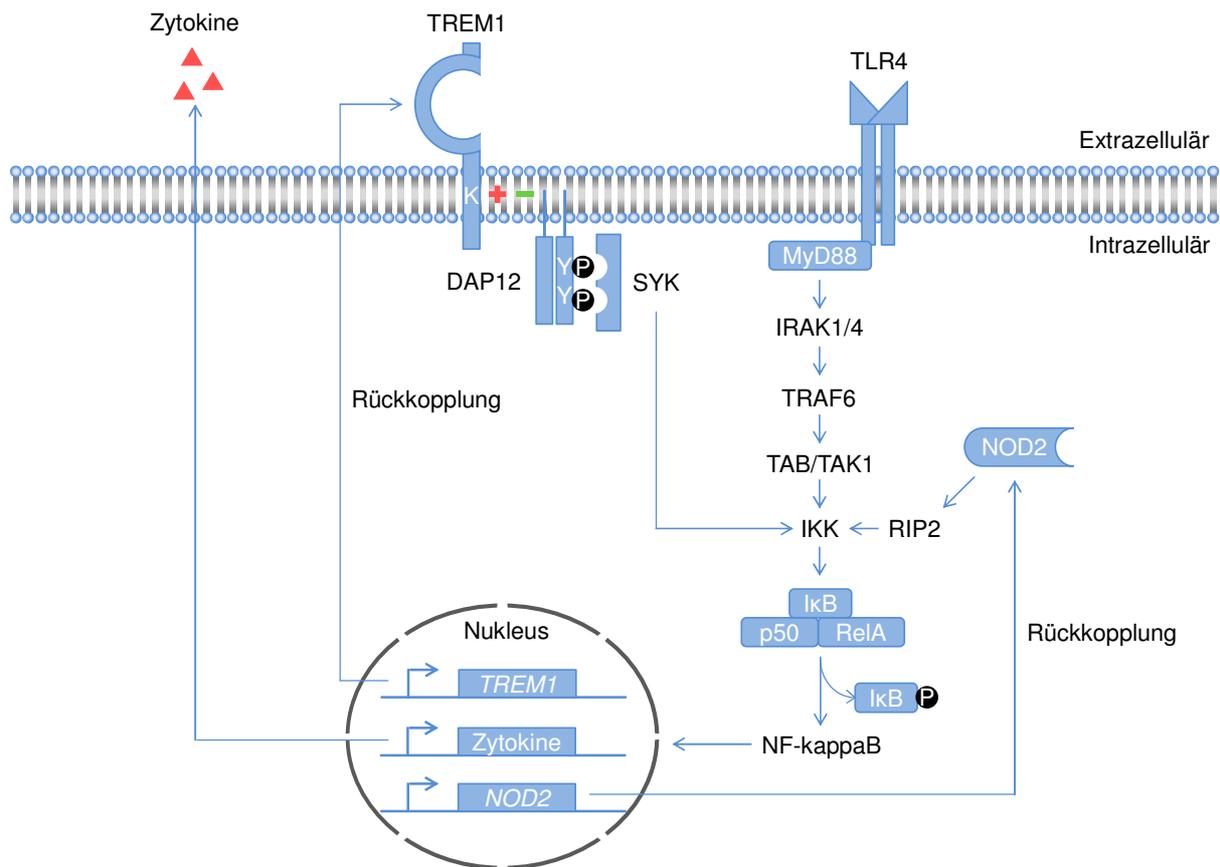


Abb. 1.10: Schematische Darstellung der synergistischen Aktivierung von TREM1, TLR4 und NOD2, nach Bleharski *et al.*, 2003; Bouchon *et al.*, 2001; Kelsall, 2005 (+=positive Ladung, -=negative Ladung, DAP12=DNAX-activating protein of 12 kDa, IKK=I κ B Kinase, IRAK1/4=Interleukin-1 receptor-associated kinase 1/4, MyD88=Myeloid differentiation primary response gene 88, NF-kappaB=nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NOD2=Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2, P=Phosphat, TAB=TAK-binding protein, TAK1=Transforming growth factor β activated kinase-1, RIP2=receptor interacting protein 2, SYK=Spleen tyrosine kinase, TLR4=Toll-like Rezeptor 4, TRAF=TNF receptor-associated factor, TREM1=triggering receptor expressed on myeloid cells 1, Y=Lysin).

1.20 Physiologische Relevanz von TREM1

Neben einer aktivierenden Funktion von TREM1 lassen *in vivo* Studien einen möglichen Einfluss von TREM1 auf akute und chronische Entzündungsprozesse vermuten.

So konnten Gibot *et al.* zeigen, dass LPS behandelte Mäuse nach der Behandlung mit einem TREM1-spezifischen inhibitorischem Peptid (LP17) resistent gegen eine letale Gabe von Endotoxin sind und eine höhere Überlebensrate aufweisen (Gibot *et al.*, 2006b; Gibot *et al.*, 2004a).

Weitere Analysen in einem Pneumonie Modell deuten darauf hin, dass TREM1 die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen moduliert. So konnte nachgewiesen werden, dass die Inhibierung von TREM1 mit LP17 zu einer verringerten Sekretion von

TNF α , IL1 β und IL6 in Ratten nach der Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa* führt (Gibot *et al.*, 2006a).

Ein möglicher Einfluss von TREM1 konnte auch auf die Migration von Immunzellen beschrieben werden. So wurde gezeigt, dass die transepitheliale Migration von Neutrophilen Granulozyten in den Atemwegen von TREM1-defizienten Mäusen gestört ist (Klesney-Tait *et al.*, 2013).

Funktionelle Analysen in einem viralen Infektionsmodell lassen außerdem eine Beteiligung von TREM1 bei viralen Infektionen vermuten. So konnte gezeigt werden, dass TREM1-defiziente Mäuse nach der Infektion mit Influenza-Viren sowohl eine reduzierte Gewebeschädigung als auch eine verringerte Anzahl von Entzündungszellen im Lungengewebe aufweisen (Weber *et al.*, 2014).

Weitere Studien in einem CD4⁺ T-Zell- und Dextransulfat-vermittelten Kolitismodell deuten außerdem auf eine Beteiligung von TREM1 an aseptischen Entzündungsprozessen hin. So konnte nachgewiesen werden, dass es in TREM1-defizienten Mäusen zu einer reduzierten Gewebeschädigung und einer verringerten Anzahl von Entzündungszellen im Darm kommt (Weber *et al.*, 2014).

Darüber hinaus scheint TREM1 einen Einfluss auf die Tumorentstehung in der Leber zu haben. Wu *et al.* konnten zeigen, dass TREM1-defiziente Mäuse nach der Gabe von DEN (Diethylnitrosamin) ein signifikant verringertes Risiko für die Entstehung eines HCC aufweisen (Wu *et al.*, 2012).

In klinischen Studien lässt eine Anreicherung von TREM1 in Hautläsionen von Psoriasis-Patienten außerdem auf eine Beteiligung von TREM1 an autoimmunen Entzündungsprozessen schließen (Hyder *et al.*, 2013). Darüber hinaus konnte in Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (IBD) eine Korrelation zwischen dem Erkrankungsgrad und der Expression von TREM1 auf Makrophagen des Darms ermittelt werden (Schenk *et al.*, 2007).

1.21 sTREM1

Neben einer membrangebundenen Isoform von TREM1 konnte im Blut von Sepsis-Patienten eine lösliche TREM1-Rezeptorvariante (sTREM1) nachgewiesen werden (Gibot *et al.*, 2004a; Knapp *et al.*, 2004).

sTREM1 besitzt eine molekulare Masse von 27 kDa und kann von Monozyten und Neutrophilen Granulozyten nach der Stimulation mit LPS, LTA und *Streptococcus pneumoniae* freigesetzt werden (Knapp *et al.*, 2004). Zellkulturanalysen deuten darauf hin, dass die Sekretion von sTREM1 auch durch virale Oberflächenbestandteile induziert werden kann. So konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von Neutrophilen Granulozyten mit

Ebola- und Marburg-Viren zu der Freisetzung von sTREM1 führt (Mohamadzadeh *et al.*, 2006).

Zusätzlich zu der Sekretion durch myeloide Zellen konnte die Freisetzung von sTREM1 auch durch Leberzellen nachgewiesen werden. Liao *et al.* konnten zeigen, dass die Stimulation von Ito-Zellen mit Zellkulturüberständen von Tumorzellen zu der Freisetzung von sTREM1 führt (Liao *et al.*, 2012).

Ein Mechanismus für die Freisetzung von sTREM1 konnte bisher nicht eindeutig identifiziert werden. Gegensätzliche Studien lassen vermuten, dass die Freisetzung von sTREM1 durch alternatives Spleißen oder die proteolytische Spaltung von TREM1 erfolgt.

So konnten Gingras *et al.* zeigen, dass eine um 193 bp verkürzte TREM1-mRNA (*TREM1sv*), die nicht für die Transmembrandomäne von TREM1 kodiert, in humanem Lungen- und Lebergewebe exprimiert wird. Da die Freisetzung von sTREM1 in Neutrophilen Granulozyten durch Cycloheximid blockiert wird, wurde postuliert, dass sTREM1 durch die Translation einer alternativ gespleißten TREM1-mRNA sezerniert wird (Begum *et al.*, 2004; Gingras *et al.*, 2002; Mahdy *et al.*, 2006).

Im Gegensatz hierzu konnten Gomez-Pina *et al.* zeigen, dass es nach der Behandlung von Monozyten und Neutrophilen Granulozyten mit einem Metalloproteaseinhibitor zu einer Stabilisierung von TREM1 und einer verringerten Freisetzung von sTREM1 kommt. Da außerdem die Expression einer verkürzten TREM1-mRNA nicht nachgewiesen werden konnte, wurde geschlussfolgert, dass die Freisetzung von sTREM1 auf die proteolytische Spaltung von TREM1 zurückzuführen ist (Gomez-Pina *et al.*, 2007).

1.22 Funktion von sTREM1

Während die Aktivierung von TREM1 zu einer erhöhten Expression proinflammatorischer Zytokine führt (siehe 1.20), wird für sTREM1 eine inhibierende Funktion angenommen. Funktionelle Studien deuten darauf hin, dass sTREM1 mit TREM1 um die Bindung eines Liganden konkurriert (siehe Abb. 1.11) So konnte gezeigt werden, dass Mäuse nach der Gabe eines löslichen TREM1-Fusionsproteins resistent gegen eine letale Dosis Endotoxin sind (Bouchon *et al.*, 2001; Gibot *et al.*, 2004b).

Weitere Analysen in einem bakteriellen Peritonitis-Modell konnten zeigen, dass die Behandlung von Mäusen mit einem löslichen TREM1-Fusionsprotein zu einer verringerten Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine TNF α und IL1 β führt (Bouchon *et al.*, 2001).

Auch humane Studien deuten auf eine antiinflammatorische Wirkung von sTREM1 hin. So konnte in Patienten mit beatmungsassoziierter Pneumonie (BAP) eine Korrelation zwischen der Freisetzung von sTREM1 und der Konzentration des antiinflammatorischen Zytokins IL10 ermittelt werden (Giamarellos-Bourboulis *et al.*, 2006).

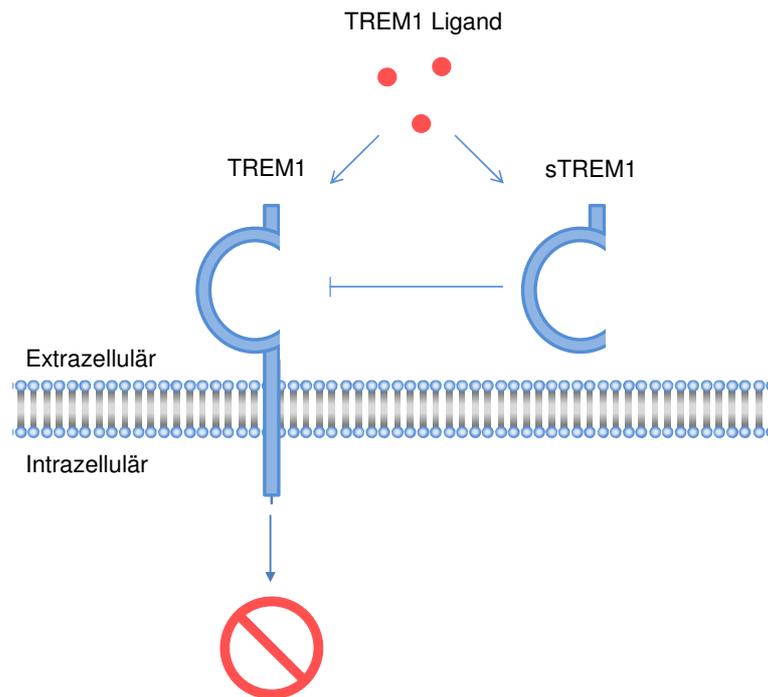


Abb. 1.11: Schematische Darstellung der kompetitiven Antagonisierung von TREM1 durch sTREM1, nach Gibot *et al.*, 2004b; Gingras *et al.*, 2002; Gomez-Pina *et al.*, 2007.

1.23 Klinische Relevanz von sTREM1

Neben einer immunregulatorischen Funktion von sTREM1 deuten mehrere Studien auf eine klinische Relevanz von sTREM1 bei akuten und chronischen Entzündungsprozessen hin.

So konnten Gibot *et al.* nachweisen, dass die Konzentration von sTREM1 in der bronchoalveolären Lavage (BAL) von Pneumonie-Patienten signifikant erhöht ist und eine Differenzierung von aseptischen und bakteriell-infizierten Patienten erlaubt (Gibot *et al.*, 2004a). Weitere Studien in Sepsis-Patienten konnten außerdem zeigen, dass die Plasmakonzentration von sTREM1 mit dem Schweregrad einer Sepsis korreliert und im Vergleich zu CRP (C-reaktives Protein) und Procalcitonin eine genauere Unterscheidung von bakterieller Sepsis und SIRS (Systemisches inflammatorisches Response-Syndrom) ermöglicht (Gibot *et al.*, 2005; Gibot *et al.*, 2004c; Oku *et al.*, 2013).

Darüber hinaus deuten erhöhte sTREM1 Blutwerte in Patienten mit autoimmunen Erkrankungen auf eine klinische Relevanz von sTREM1 bei aseptischen Entzündungsprozessen hin. So konnten Molad *et al.* zeigen, dass die Konzentration von sTREM1 im Blut von Patienten mit Lupus erythematodes im Vergleich zu gesunden Kontrollen signifikant erhöht ist (Molad *et al.*, 2013). Auch in Patienten mit Rheumatoider Arthritis konnte eine positive Korrelation zwischen dem Grad der Erkrankung und der Konzentration an freigesetztem sTREM1 ermittelt werden (Choi *et al.*, 2012). Klinische Studien zeigen außerdem, dass die sTREM1-Konzentration im Serum von Patienten mit

allergischem Asthma Bronchiale sowohl mit dem Grad der Erkrankung als auch mit der Anzahl an Neutrophilen Granulozyten im Lungengewebe korreliert (Bucova *et al.*, 2012).

Darüber hinaus konnte eine klinische Relevanz von sTREM1 in Leberstudien nachgewiesen werden. Liao *et al.* konnten zeigen, dass die Konzentration von sTREM1 im Blut von Tumorpatienten mit der Malignität eines HCC korreliert (Liao *et al.*, 2012).

Außerdem deuten Analysen in Pankreatitis-Patienten auf eine mögliche klinische Relevanz von sTREM1 in Patienten mit einer infektiösen Erkrankung der Bauchspeicheldrüse hin (Yasuda *et al.*, 2008).

1.24 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle und Funktion von TREM1 (triggering receptor expressed on myeloid cells 1) im Verlauf einer 1) viralen und einer 2) bakteriellen Leberentzündung zu untersuchen. Hierdurch sollte ein besseres Verständnis der Immunantwort auf Leberinfektionen erzielt und die Eignung von TREM1 als mögliches Therapieziel bei Leberinfektionen geklärt werden.

- 1) Die experimentelle Infektion von Mäusen mit dem Lymphozytären Choriomeningitis Virus (LCMV) ist ein etabliertes Modellsystem für eine akute nicht-zytotoxische virale Hepatitis (Herkel *et al.*, 2005; Lohse *et al.*, 2010; Zinkernagel *et al.*, 1986). In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass TREM1 den Aktivierungszustand von Immunzellen beeinflussen kann (Bouchon *et al.*, 2001).

Um zu ermitteln, ob TREM1 eine funktionelle Relevanz im Verlauf einer viralen Hepatitis besitzt, sollte im Lebergewebe von naiven und LCMV WE-infizierten Mäusen (I) die Kinetik der TREM1/sTREM1-Expression quantifiziert werden, (II) der Einfluss viraler TLR-Liganden auf die Expression von TREM1 untersucht werden und (III) die Expression von TREM1 in der Leber zellspezifisch charakterisiert werden.

Da Immunzellen sowohl an der Ausheilung akuter Leberinfektionen, aber auch an der chronischen Schädigung des Lebergewebes beteiligt sind (Herkel *et al.*, 2005; Lohse *et al.*, 2010), sollte in LCMV-infizierten TREM1 *+/+* und TREM1 *-/-* Mäusen (IV) der Einfluss von TREM1 auf die Aktivierung von CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen analysiert werden, (V) die Virustiter und Leberentzündungswerte vergleichend quantifiziert werden sowie (VI) die Stimulation von TREM1 durch LCMV und Schaden-assoziierte molekulare Muster untersucht werden.

Da weitere Studien darauf hindeuten, dass sTREM1 ein Biomarker für akute und chronische Entzündungsprozesse ist (Bucova *et al.*, 2012; Choi *et al.*, 2012; Gibot, 2006), und um zu untersuchen, ob sTREM1 ein Entzündungsmarker in Patienten mit viralen Leberinfektionen sein könnte, sollte außerdem (VII) die sTREM1-Konzentration im Blut von HBV- und HCV-Patienten mit der sTREM1-Konzentration im Blut von gesunden Kontrollen verglichen werden.

- 2) *L. monocytogenes* ist ein etabliertes Modellsystem für die Infektion und Pathogenese von intrazellulären Bakterien (Vázquez-Boland *et al.*, 2001).

Um zu ermitteln, ob TREM1 eine funktionelle Relevanz im Verlauf einer bakteriellen Leberinfektion besitzt, sollte im Lebergewebe von *L. monocytogenes*-infizierten Mäusen (VIII) die Expression von TREM1/sTREM1 untersucht werden, (IX) der Einfluss von bakteriellen TLR-Liganden auf die Expression von TREM1 analysiert werden und (X) die Leberschädigung sowie (XI) die bakteriellen Titer im Lebergewebe von TREM1 *+/+* und TREM1 *-/-* Mäusen vergleichend quantifiziert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien und Geräte

2.1.1 Laborgeräte

Gerätebezeichnung	Hersteller
Adapter für Gewebehomogenisator 12 x 15 ml „TeenPrep™“	MP Biomedicals Germany GmbH, Eschwege, Deutschland
Adapter für Gewebehomogenisator 24 x 2 ml „QuickPrep™“	MP Biomedicals Germany GmbH, Eschwege, Deutschland
Analysewaage „Scout Pro“	Ohaus, Nänikon, Schweiz
Autoklav „VX-120“	Systec GmbH, Wettengel, Deutschland
CO ₂ Inkubator	Panasonic Biomedical Sales Europe B.V., Etten Leur, Niederlande
DNA Gelelektrophoresekammer	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Drucker „IR1024IF“	Canon Deutschland GmbH, Krefeld, Deutschland
Durchflusszytometer „LSR II“	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Eisbehälter „Magic Touch“	Bel-Art Products, Wayne, USA
Elektrische Pipettierhilfe	INTEGRA Biosciences GmbH, Fernwald, Deutschland
ELISA-Analysegerät „MRX TC II“	Dynex Technologies GmbH, Denkendorf, Deutschland
Flockeneismaschine „AF-10“	Scotsman Ice Systems, Frimont S.P.A., Italien
Geldokumentationssystem „Chemidoc XRS“	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Gelkamm für DNA Gelelektrophoresekammer	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Gelkammer „Mini-PROTEAN Tetra Cell“	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Gewebehomogenisator „FastPrep-24™“	MP Biomedicals Germany GmbH, Eschwege, Deutschland
Glas Färbeküvette	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Glas Gewindeflaschen	DURAN Group GmbH, Wertheim/Main, Deutschland
Heizschüttler „Thermomixer Comfort“	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Klinische Chemie-Analysegerät „Hitachi Modular E170“	Hitachi Europe GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Kryotom „Microm HM550“	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Kühlschrank (-20°C) „Economic Froster Super“	Robert Bosch GmbH, Stuttgart Deutschland
Kühltruhe (-80°C) „Ultra Low“	Panasonic Biomedical Sales Europe B.V., Etten Leur, Niederlande
Kühlzentrifuge „Centrifuge 5810 R“	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Kühlschrank (4°C)	Philipp Kirsch GmbH, Offenburg, Deutschland
Licht- und Fluoreszenzmikroskop „BZ-9000“	Keyence Deutschland GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland
Magnetrührer	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland

Magnetständer „MACS MultiStand“	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
Mikrotiterplatten Analysegerät „EL808“	Bio Tek, Bad Friedrichshall, Deutschland
Mikrotom „Cut 5062“	Slee, Mainz, Deutschland
Mikrowelle „micromaxx“	Medion AG, Essen, Deutschland
NanoDrop UV/Vis-Spektralphotometer	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
PCR-Thermocycler „DNA Engine DYAD“	MJ Research, St. Bruno, Kanada
Perfusionspumpe	Ismatec, Wertheim, Deutschland
Personal Computer „Optiplex 765“	Dell GmbH, Frankfurt, Deutschland
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg Deutschland
Präparationsbesteck	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
qPCR Analysegerät „Lightcycler 1.5“	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
qPCR Analysegerät „StepOnePlus™“	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Reaktionsgefäßständer „Rotilabo®“	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Restrainer	A. Hartenstein Gesellschaft für Labor- und Medizintechnik mbH, Würzburg, Deutschland
Rollmixer „Stuart SRT6“	Bibby Scientific Limited, Staffordshire, Vereinigtes Königreich
Rotor für Kühlzentrifuge „F45-30-11“	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Rotor für Tischzentrifuge „A-4-44“	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Rückflusskühler	Lenz Laborglas, Wertheim, Deutschland
Schüttelwasserbad „GFL 1083“	GFL - Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
Sicherheitswerkbank „Lamin Air“	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Spannungsquelle „1000 / 500“	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Tischmikroskop „DM IRB“	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland
Tisch-pH/Ionen-Messgerät SevenCompact™ S220	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tischzentrifuge „Centrifuge 5417R“	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Trennmagnet „QuadroMACS™“	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
Ultraschallstab „Sonopuls HD2070“	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
Vortexer „Reax 2000“	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Western-Blot-System „Mini Trans-Blot® Cell“	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Produktbezeichnung	Hersteller
Abdeckfolien für Mikrotiterplatten	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Anti PE-MicroBeads	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
Braunülen „Vasofix Safety“	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

Dako Pen	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Deckgläschen	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Entsorgungsbeutel	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Filter „Steriflip“ 0,22 µm	Merck, Darmstadt, Deutschland
Flüssigkeitsreservoir	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Glaskapillaren für Lightcycler 1.5	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Kanülen „Sterican“	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Keramikkugeln	MP Biomedicals Germany GmbH, Eschwege, Deutschland
Kompensationspartikel „CompBeads“	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Küvette für „Dimension Vista®“	Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Eschborn, Deutschland
MACS LS Säule	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
Metallsieb 100 µm	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Mikrotomklingen „C35 TYPE“	Feather Safety Razor Co., Ltd., Tokio, Japan
Multiwell-Platte, NUNC™ MaxiSorp™	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Nitril Schutzhandschuhe „Micro-Touch“	Ansell GmbH, München, Deutschland
Nylonsieb „Cell Strainer“ 40 µm + 100 µm	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Nylonsieb „Pre-Separation Filters“	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
Objektträger „SuperFrost®“	Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland
Parafilm M	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
PCR-Gefäß „Biosphere Multiply“	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Petrischalen	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Polystyrol-Röhrchen 5 ml	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
PVDF-Membran „Immun-Blot®“ (0,2 µm)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Reaktionsgefäße 1,5 ml und 2 ml	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße 15 ml und 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Reaktionsplatte „MicroAmp® Fast Optical 96-Well“	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
RNA-freie Reaktionsgefäße „Biosphere“ 1,5 ml und 2 ml	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Seidenfaden	RESORBA Wundversorgung GmbH & Co. KG, Nürnberg, Deutschland
Spritzen „BD Plastipak™“	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

Serologische Pipetten	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Sterilfilter „Filtropur V50“	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Zählkammer „C-Chip Neubauer improved“	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Zellkultur Mikrotiterplatten mit Flach- und Rundboden 6-Well, 24-Well, 96-Well	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturflaschen	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland

2.1.3 Chemikalien, Enzyme und Lösungen

Produktbezeichnung	Hersteller
Acrylamid (40%ige Lösung) „Rotiphorese® Gel 40“	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Antifect N liquid	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland
Antigen Unmasking Solution „H-3300“ pH 6,0	Vector Laboratories LTD., Peterborough, Vereinigtes Königreich
Dextramer LCMV gp33-41 (KAVYNFATC)	Immudex, Fruebjergvej, Dänemark
APS	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Azeton	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Hamburg, Deutschland
BD GolgiStop™ (Monensin A)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA) „Fraction V“	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Bromphenolblau	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
CaCl ₂ x 2H ₂ O	Merck, Darmstadt, Deutschland
Diaminobenzidin (DAB)	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
DNA Farbstoff „GelRed“	Biotium Inc., Hayward, USA
DNA Standard „Gene Ruler DNA Ladder mix“	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
DNase I	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
DreamTaq PCR Master Mix (2X)	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) GlutaMAX™, 4,5 g/l (D+)-Glucose, Pyruvat	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) Pulver, (D+)-Glucose, Pyruvat	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
ECL Western-Blot-Substrat	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
EDTA	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Einbettmedium für Gewebestücke „Tissue Tek®“	Sakura Finetek Europe B.V., Alphen aan den Rijn, Niederlande
Einbettmedium für Immunfluoreszenzschnitte „Fluoromount“	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland

Einbettmedium für Paraffinschnitte „Eukitt®“	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
Eosin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Esel Normalserum	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd, Newmarket, England
Essigsäure (100%)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS)	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Formaldehyd (37%ige Lösung)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Glycerol	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
Glycin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Glykogen	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
H ₂ O ₂ (30%ige Lösung)	Merck, Darmstadt, Deutschland
H ₂ SO ₄ (2 N)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Hämalaun nach Mayer, gebrauchsfertige Lösung	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
HCL (1 M)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
HEPES Pufferan®	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Hoechst 33258	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Humanes Insulin (10 mg/ml)	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) GlutaMAX™, 25 mM HEPES	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
KCl	Merck KGaA, Frankfurt, Deutschland
Ketamin	aniMedica GmbH, Senden, Deutschland
KH ₂ PO ₄	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
KHCO ₃	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Kollagen „Collagen R“ 0,2%	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Kollagenase „NB 4G Proved Grade“	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
L-Glutamin (200 mM)	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
L-Leucin Methylester	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
Meerschweinchen Komplement	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methanol	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Methylcellulose Methocel® MC	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
MgCl ₂ x 6H ₂ O	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
MgSO ₄ x 7H ₂ O	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Milchpulver	InterTee GmbH, Norderstedt, Deutschland

N ₂ (flüssig)	Linde AG, Pullach, Deutschland
Na ₂ HPO ₄	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
NaCl	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
NH ₄ Cl	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Nuklease-freies H ₂ O	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
OptiPrep™	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
Paraformaldehyd	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin / Streptomycin (10.000 U/ml / 10.000 µg/ml)	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Percoll	GE Healthcare, München, Deutschland
Proteinase K „PCR Grade“ (20 mg/ml)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Protein-Standard „Page Ruler Plus Prestained Ladder“	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
RNase A	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI) 1640 GlutaMAX™	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Rotiphorese® Gel 30	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
SDS	Merck, Darmstadt, Deutschland
Steriles Wasser „Aqua ad injectabilia“	Baxter, Unterschleißheim, Deutschland
TEMED	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin)	Kem-En-Tec Diagnostics A/S, Taastrup, Dänemark
T-PER Tissue Protein Extraction Reagent	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
TRIS „Trizma®base“	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
TRIS Pufferan	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Trizol LS	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Trypanblau (0,4%ige Lösung)	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Trypsin-EDTA (0,05 %)	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Tryptic Soy Broth	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Tween® 20	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Williams E Medium [-] Glutamin	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Xylazin (Rompun®) (2%ige Lösung)	Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland
Xylol	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Hamburg, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
Pacific Orange Succimidyl Ester (PACO-NHS)	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland

2.1.4 Kits

Produktbezeichnung	Hersteller
Alexa Fluor® 488 Antibody Labeling Kit	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
BCA Protein Assay Kit	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
cDNA-Synthese Kit „AMV“	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
cDNA-Synthese Kit „High-Capacity“	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
EnVision™ Kit	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Human TREM-1 DuoSet	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
Mouse TREM-1 DuoSet	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
Neutrophil Isolation Kit	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
NucleoSpin® TriPrep Kit	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
Reaktionslösung „DNA Master SYBR Green I“ für qPCR Analysegerät „Lightcycler 1.5“	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Reaktionslösung „Probe Fast“ für qPCR Analysegerät „StepOnePlus™“	Kapa Biosystems Inc., Wilmington, USA

2.1.5 qPCR Taqman Sonden

Zielgen	Farbstoff	Zielspezies	Hersteller	Artikelnummer
CCL2/MCP1	FAM	Maus	Life Technologies	Mm00441242_m1
CXCL1	FAM	Maus	Life Technologies	Mm04207460_m1
HMGB1	FAM	Maus	Life Technologies	Mm00849805_gH
IFNA1	FAM	Maus	Life Technologies	Mm03030145_gH
IL1-β	FAM	Maus	Life Technologies	Mm00434228_m1
IL-6	FAM	Maus	Life Technologies	Mm00446190_m1
PPIA	FAM	Maus	Life Technologies	Mm02342429_g1
TNF-α	FAM	Maus	Life Technologies	Mm00443258_m1
TREM1	FAM	Maus	Life Technologies	Mm01278455_m1
TYROBP	FAM	Maus	Life Technologies	Mm00449152_m1

2.1.6 SYBR Green Real Time qPCR Primer und Sequenzen

Zielgen	Sequenz 5'→3'	Sequenz 3'→5'	Annealing-Temperatur [°C]	MgCl ₂ [μl 25 mM]
LCMV Z	CAGACACCACCTAT CTTGG	ACCTTCAGTTTGGTT GGC	68	1,6 – 2,4
PPIA	GGGTTCCCTCCTTC ACAG	GGACCTGTATGCTTT AGGA	60 - 68	1,6 – 2,4
TREM1	Qiagen Primer Assay QT00153979		60	1,6

2.1.7 Antikörper für immunhistochemische- und Immunfluoreszenzfärbungen

Antigen	Farbstoff / Enzym	Ziel-spezies	Wirts-spezies	Klon	Konzentration	Hersteller	Artikel-nummer
-	-	-	IgG Ziege	-	1:100	Santa Cruz	sc-2028
-	-	-	IgG Kaninchen	-	1:100	Santa Cruz	sc-2027
-	-	-	IgG Ratte	-	1:100	Santa Cruz	sc-2026
-	-	-	IgG Maus	-	1:100	Sigma	I5381
CD16/CD32	-	Maus	Ratte	93	1:50	eBioscience	14-0161-81
CD8	PE	Maus	Ratte	53-6.7	1:50 - 100	Abcam	ab25498
F4/80	Alexa Fluor 647	Maus	Ratte	Cl:A3-1	1:300	Biolegend	122610
HMGB1	-	Mensch, Maus	Kaninchen	-	1:300 - 1:400	Antikoerper-online	ABIN671616
IgG	Alexa Fluor 546	Kaninchen	Esel	-	1:1300	Life Technologies	A10040
IgG	HRP	Kaninchen	Schwein	-	1:100	DAKO	P0399
IgG	Alexa Fluor 488	Ratte	Esel	-	1:1300	Life Technologies	A-21206
IgG	Alexa Fluor 488	Ziege	Esel	-	1:1300	Life Technologies	A-11055
IgG	Alexa Fluor 546	Ziege	Esel	-	1:1300	Life Technologies	A-11056
IgG	Alexa Fluor 633	Ziege	Esel	-	1:700	Life Technologies	A-21082
IgG	HRP	Ziege	Kaninchen	-	1:200	DAKO	P0449
LCMV-NP	-	-	Ratte	VL4	1:200	Bio X Cell	BE0106
LY6G	Alexa Fluor 647	Maus	Ratte	1A8	1:300	Biolegend	127610
TREM1	-	Maus	Ziege	-	1:300	R&D	AF1187
TYROBP	-	Maus	Ziege	-	1:100	Santa Cruz	SC7853

2.1.8 Antikörper für durchflusszytometrische Analysen

Antigen	Farbstoff	Ziel-spezies	Wirts-spezies	Klon	Isotyp	Hersteller	Artikel-nummer
CD107	FITC	Maus	Ratte	1D4B	IgG2A κ	BD	553793
CD16/CD32	-	Maus	Ratte	93	IgG2A λ	eBioscience	14-0161-81
CD8	PE	Maus	Ratte	53-6.7	IgG2A κ	BD	553033
IFNγ	Alexa Fluor 488	Maus	Ratte	XMG1.2	IgG1 κ	BD	557724
LY6G	PE	Maus	Ratte	1A8	IgG2A κ	Biolegend	127610
TNFα	APC	Maus	Ratte	MP6-XT22	IgG1	BD	554420
TREM1	APC	Maus	Ratte	174031	IgG2A	R&D	AF1187

2.1.9 Antikörper für den Focus Forming Assay

Antigen	Farbstoff / Enzym	Ziel-spezies	Wirts-spezies	Klon	Konzentration	Hersteller	Artikelnummer
LCMV-NP	-	-	Ratte	VL4	1:250	Bio X Cell	BE0106
Ratte IgG	HRP	Ratte	Kaninchen	-	1:250	Dako	P0450

2.1.10 Antikörper für die Zellisolation

Antigen	Farbstoff / Enzym	Ziel-spezies	Wirts-spezies	Klon	Hersteller	Artikelnummer
CD146	PE	Maus	Ratte	ME-9F1	Biologend	134703
F4/80	PE	Maus	Ratte	Cl:A3-1	Biologend	122615
LY6G	PE	Maus	Ratte	1A8	Biologend	127610

2.1.11 Antikörper für die Komplementlyse von nichtparenchymatischen Leberzellen

Zielzelle	Antigen	Verdünnung	Hersteller	Artikelnummer	Klon
-	Ratte IgG κ	1:100	ATCC	TIB-216	MAR18.5
B-Zellen	B220 /CD45R	1:50	Eigene Hybridom Aufreinigung		
Kupffer-Zellen	F4/80	1:200	Eigene Hybridom Aufreinigung		
Lymphozyten	CD45	1:200	Eigene Hybridom Aufreinigung		
Makrophagen, Neutrophilen Granulozyten, NK-Zellen	MAC-1	1:50	Eigene Hybridom Aufreinigung		
Mastzellen	B17	1:100	Eigene Hybridom Aufreinigung		
Monozyten	CD11c	1:200	MBLI	M100-3	223H7

2.1.12 Antikörper für Western-Blot-Analysen

Antigen	Farbstoff / Enzym	Ziel-spezies	Wirts-spezies	Konzentration	Hersteller	Artikelnummer
Aktin	HRP	Maus	Ratte	1:200	Santa Cruz	sc-1616 HRP
TREM1	-	Maus	Ziege	0,1 µg/ml	R&D	AF1187
Ziegen IgG	HRP	Ziege	IgG Kaninchen	1:2000	DAKO	P044901-2

2.1.13 Protease- und Phosphataseinhibitoren

Inhibitor	Endkonzentration	Hersteller
cOmplete Mini Protease Inhibitor Cocktail	1 Tablette / 10 ml Lysepuffer	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Leupeptin	1 µg/ml	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
Na ₃ VO ₄	2 mM	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
NaF	10 mM	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland

2.1.14 Zellkulturmedien und NährmediumsplattenHepatozyten-Medium, sterilfiltriert

1x Williams E Medium [-] Glutamin	
FCS	10%
HEPES	20 mM
Insulin	0,02%
L-Glutamin	5%
P/S	1%

IMDM-Medium, sterilfiltriert

1x IMDM, GlutaMAX™, 25 mM HEPES	
FCS	10%
L-Glutamin	5%
P/S	1%

L929-Medium, sterilfiltriert

1x RPMI 1640, GlutaMAX™	
FCS	5-10%
P/S	1%

FFA-Medium, sterilfiltriert

1x DMEM, GlutaMAX™, Glucose, Pyruvat	
FCS	5%
P/S	1%

Trypton-Soja-Medium

H ₂ O	1 L
Bacto Trypton	17,0 g
Bacto Soyton	3,0 g
Glucose	2,5 g
NaCl	5,0 g
K ₂ CO ₃	2,5 g
auf pH 7,4 eingestellt	

Trypton-Soja-Agar

H ₂ O	1 L
Bacto Trypton	17,0 g
Bacto Soyton	3,0 g
Glucose	2,5 g
NaCl	5,0 g
K ₂ CO ₃	2,5 g
Agarose	20 g

2.1.15 Puffer und Lösungen1x PBS, sterilfiltriert

H ₂ O	
KCl	2,7 mM
KH ₂ PO ₄	1,5 mM
Na ₂ HPO ₄	6,5 mM
NaCl	137 mM
auf pH 7,4 eingestellt	

1x TBS, sterilfiltriert

H ₂ O	
KCl	2 mM
NaCl	150 mM
Tris Base	25 mM
auf pH 7,8 eingestellt	

1x TBST

H ₂ O	
NaCl	300 mM
Tris	20 mM
Tween 20	0,05%
auf pH 7,6 eingestellt	

10x TBE

H ₂ O	
TRIS Base	1 M
Borsäure	83 mM
EDTA	10 mM

ACK-Puffer

H ₂ O	
EDTA	100 mM
KHCO ₃	10 mM
NH ₄ Cl	150 mM

MACS-Puffer, sterilfiltriert

1x PBS	
BSA	0,5%
EDTA	2,5 mM

Narkose-Lösung

1x PBS	
Ketamin	36%
Xylazil (2%)	28%

Blockpuffer

1x TBST	
Milchpulver	5%

Transfer-Puffer

H ₂ O	
Tris	48 mM
Glycin	39 mM
Methanol	20%
auf pH 9,2 eingestellt	

Hepatozyten-Puffer III, sterilfiltriert

1x PBS	
NaCl	142 mM
KCl	6,7 mM
HEPES	10 mM
CaCl ₂ x 2H ₂ O	1,2 mM
auf pH 7,4 eingestellt	

Komplementlysepuffer, sterilfiltriert

Hepatozyten-Medium	
L-Leucin Methylester	4,6%
Meerschweinchen-Komplement	2,5%

5x Proteinprobenpuffer

Tris 1M	2 ml
Glycerin	4 ml
SDS (20%)	2ml
Bromphenolblau	400 µl
H ₂ O	600 µl
β-Mercaptoethanol	1 ml
auf pH 7,5 eingestellt	

RNase-Puffer

H ₂ O	860 ml
Formalin (37%)	140 ml
KH ₂ PO ₄	9,07 g
Na ₂ HPO ₄	11,86 g

12,5 % Acrylamid Trenngel Lösung

H ₂ O	
Acrylamid (40%)	74 ml
Tris 1,5M pH 8,8	12,5 ml
SDS (10%)	12,5 ml
Glycerol	1 ml
+ 25 µl APS (10%)	
+ 12,5 µl TEMED	

Triton X-100-Lösung

1x PBS	
Triton X-100	1%
auf pH 7,4 eingestellt	

ELISA-Waschpuffer

1x PBS	
Tween 20	0,05%

Hepatozyten-Puffer I, sterilfiltriert

1x PBS	
NaCl	142 mM
KCl	6,7 mM
HEPES	10 mM
auf pH 7,4 eingestellt	

Hepatozyten-Puffer II, sterilfiltriert

1x PBS	
NaCl	68 mM
KCl	6,7 mM
HEPES	100 mM
CaCl ₂ x 2H ₂ O	4,8 mM
auf pH 7,6 eingestellt	

4%ige Formalin-Lösung

H ₂ O	
Tris pH 8,0	10 mM
EDTA	1 mM
RNase A	20µg/ml

Proteinase K-Lysepuffer

H ₂ O	
Tris pH 8,0	100 mM
EDTA	5 mM
NaCl	200 mM
SDS	0,20%
3 µl Proteinase K (20mg/ml) wurden mit 80 µl Proteinase K-Puffer versetzt	

Eosin-Färbelösung

H ₂ O	
Eosin G	0,10%
200 ml 0,1% Eosin-Lösung wurden mit 150 µl Essigsäure (100%) versetzt	

5% Acrylamid Sammelgel Lösung

H ₂ O	74 ml
Acrylamid (40%)	12,5 ml
Tris 1M pH 6,8	12,5 ml
SDS (10%)	1 ml
+ 20 µl APS (10%)	
+ 10 µl TEMED	

Gey's balanced salt solution (GBBS)

1x PBS	
(D+)-Glucose	5,5 mM
CaCl ₂ x 2H ₂ O	1,6 mM
HEPES	10 mM
KCl	5 mM
KH ₂ PO ₄	0,2 mM
MgCl ₂ x 6H ₂ O	0,9 mM
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,3 mM
Na ₂ HPO ₄	1,7 mM
NaCl	137 mM
NaHCO ₃	2,7 mM

auf pH 7,4 eingestellt

10x SDS-PAGE Laufpuffer

H ₂ O	
Tris base	500 mM
Glycin	1,9 M
SDS	70 mM

2.1.16 Software

Produktbezeichnung	Hersteller
ALGGEN Promo	(Messeguer <i>et al.</i> , 2002), (Farre <i>et al.</i> , 2003)
BZ-II Analyzer	Keyence Deutschland GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland
BZ-II Viewer	Keyence Deutschland GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland
Endnote x7	Thomson Reuters, New York, USA
FACS DivaDTM Software 5.0.1	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
GraphPad Prism 6.01	GraphPad Software Inc., La Jolla, USA
PerIPrimer	(Marshall, 2004)
TBase	Abase, Gundelfingen, Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 Versuchstiere

2.2.1.1 Haltung von Versuchsmäusen

Die Zucht und Haltung von Versuchsmäusen (siehe Tab. 2.1) erfolgte in der Versuchstierhaltung (VTH) des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE). Sämtliche Tiere wurden bei einer Temperatur von 20°C unter spezifisch pathogenfreien (SPF) Bedingungen gehalten und mit Futter und Trinkwasser *ad libitum* versorgt. LCMV Infektionsversuche an Mäusen erfolgten im Heinrich-Pette-Institut, Leibniz-Institut für Experimentelle Virologie (HPI) (siehe 2.2.3.2). Listerien-Infektionen wurden im Institut für Immunologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf durchgeführt (siehe 2.2.3.7). Alle tierexperimentellen Arbeiten erfolgten nach Genehmigung durch die Behörde für Soziales, Familie, Gesundheit und Verbraucherschutz der Stadt Hamburg.

Tab. 2.1: Übersicht der verwendeten Mauslinien

Liniename	Hintergrund	Genetische Veränderungen
Wildtyp	C57BL/6	-
TREM1 -/-	C57BL/6	Homozygote TREM1-Defizienz in allen Körperzellen

2.2.1.2 Zucht und Erhaltung von Mauslinien

Für *in vivo* Studien wurden Mäuse im Alter zwischen 8 und 15 Wochen verwendet. Als Kontrolltiere für TREM1-defiziente Mäuse (TREM1 -/-) dienten TREM1 +/+ Wurfgeschwister oder C57BL/6 Wildtyp (WT) Mäuse. Der genetische Status der Versuchstiere wurde durch die semiquantitative PCR-Analyse (siehe 2.2.1.4) von genomischer DNA aus Schwanzbiopsien (siehe 2.2.1.3) ermittelt.

2.2.1.3 Isolation von genomischer DNA aus Schwanzbiopsien

Für die Isolation von genomischer DNA aus Schwanzbiopsien wurden biopsierte Gewebestücke über Nacht in Proteinase K-Lysepuffer (siehe 2.1.15) bei 55°C und 700 rpm in einem Heizschüttler (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) verdaut. Durch Erhitzen auf 95°C für 15 Minuten wurde das Enzym inaktiviert und der Gewebeverdau gestoppt. Zu der Lösung wurden 300 µl RNase-Puffer (siehe 2.1.15) hinzugefügt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. 2 µl des resultierenden Reaktionsansatzes wurden als DNA-Matrize für die semiquantitative PCR-Analyse verwendet (siehe 2.2.1.4).

2.2.1.4 Semiquantitative PCR

Für die PCR-Amplifikation wurden 2 µl Gewebelysat nach Proteinase K-Verdau (siehe 2.2.13) bzw. 0,5 µl cDNA (siehe 2.2.5.4) in ein PCR-Reaktionsgefäß überführt. Zu dem Ansatz wurden jeweils 12,5 µl 2x DreamTaq PCR Master Mix (Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland) und 0,15 µl Primer (1 pM) (siehe 2.1.6) hinzugefügt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz mit Nuklease-freiem Wasser (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) auf 25 µl aufgefüllt. Die PCR-Reaktion erfolgte in einem Thermocycler (MJ Research, St. Bruno, Kanada) (siehe Tab. 2.2).

Tab. 2.2: Protokoll für die Amplifikation von Nukleinsäuren mittels semiquantitativer PCR

Temperatur	Dauer	Bezeichnung	Zyklen
95°C	5 min	Initiale Denaturierung	-
95°C	30 s	Zyklische Denaturierung	40
60°C – 68°C (Primerabhängig, siehe 2.1.6)	30 s	Annealing	40
72°C	30 s (100 bp / 4s)	Elongation	40
72°C	5 min	Finale Elongation	-
4°C	∞	Endphase	-

2.2.1.5 DNA Gelelektrophorese

Für die größenspezifische Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde 1 g Agarose in 100 ml 0,5x TBE-Puffer (siehe 2.1.15) gelöst und für 2 Minuten in einer Mikrowelle (Medion AG, Essen, Deutschland) erhitzt. Die Lösung wurde mit dem DNA-Farbstoff „GelRed“ (Biotium Inc., Hayward, USA) (1:25000) versetzt und in eine DNA Gelelektrophoresekammer (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) überführt. Mit Hilfe eines Gelkamms (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) wurden Probenaschen in dem Gel erzeugt. Nach dem Abkühlen wurde der Gelkamm entfernt und das Gel mit 0,5x TBE-Puffer überschichtet. Anschließend wurde das Gel beladen und die Proben durch das Anlegen einer Spannung (200 V – 500 V) elektrisch aufgetrennt. Als Größenmarker wurde der DNA Standard Gene Ruler DNA Ladder mix (Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland) verwendet. Die Analyse der aufgetrennten DNA-Fragmente erfolgte mit dem Geldokumentationssystem „Chemidoc XRS“ (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland).

2.2.1.6 Laborchemische Untersuchungen von Mäuseblut

Für die Konzentrationsmessung der Alanin-Aminotransferase (ALT) im Blutserum von Mäusen wurden die Tiere durch zervikale Dislokation unter Narkose getötet und das Peritoneum eröffnet. Anschließend wurde der Herzbeutel mit einer Kanüle durch das Diaphragma punktiert und das Vollblut aus dem Herzen abgenommen. Das Blut wurde mit 2 µl 0,5 M EDTA pH 8 versetzt und anschließend für 10 Minuten bei 3000 rpm und 4°C zentrifugiert. 50 µl des Überstands wurden mit 150 µl PBS verdünnt. Die Lagerung des Blutplasmas erfolgte bei -80°C. Die Bestimmung der laborchemischen Parameter erfolgte im Routinelabor des Instituts für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf.

2.2.2 Patientenmaterial

2.2.2.1 Gewinnung von Serum aus Vollblut

Die Gewinnung von Serum erfolgte durch die Entnahme von 5 ml Vollblut in ein Serum-Blutabnahmeröhrchen (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland). Das Vollblut wurde anschließend für 10 Minuten bei 430 g und 4°C zentrifugiert und die Überstände bei -80°C bis zu ihrer weiteren Verwendung gelagert.

2.2.2.2 Blutserum von Patienten mit viralen Lebererkrankungen

Blutseren von Hepatitis-B-Virus (HBV)- und Hepatitis-C-Virus (HCV)-Patienten wurden vom Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf bereitgestellt (siehe Tab. 2.3). Das Blutserum von gesunden Probanden diente als Kontrolle. Die Diagnose der HBV- und HCV-Patienten erfolgte nach den Leitlinien der European Association for the Study of the Liver (EASL, 2012; EASL 2014). Die sTREM1-Konzentration (siehe 2.2.7.1) wurde insgesamt in 34 HBV-, 29 HCV-Patienten sowie 17 Kontrollen analysiert. Die mittlere Viruslast in HBV-Patienten betrug $9,67 \cdot 10^7$ IU/ml. In HCV Patienten waren durchschnittlich $1,31 \cdot 10^7$ IU/ml nachweisbar.

Tab. 2.3: Charakteristika von Patientengruppen mit viralen Lebererkrankungen

Gruppe	Anzahl [n]	Alter [Jahre] Ø/min/max	Geschlecht (♂/♀) [%]	Viruslast [IU/ml] Ø/min/max
Kontrolle	17	30,5 / 26 / 45	65 / 35	- / - / -
HBV	18	42 / 34 / 59	71 / 29	$9,67 \cdot 10^7$ / 30 / $8 \cdot 10^8$
HCV	15	52 / 46 / 77	78 / 22	$1,31 \cdot 10^7$ / 20000 / $8 \cdot 10^7$

HBV = Hepatitis-B-Virus; HCV = Hepatitis-C-Virus; IU = Internationale Einheiten; ♂ = männlich; ♀ = weiblich; Ø = Durchschnitt; min = Minimum; max = Maximum; Angabe von Alter, Geschlecht und Viruslast sofern bekannt

2.2.3 Mausversuche *in vivo*

2.2.3.1 Produktion von Lymphozytärem Choriomeningitis Virus (LCMV) *in vitro*

Zur Herstellung von LCMV WE wurden 15 ml L929-Zellen ($1,5 \cdot 10^5$ Zellen/ml in FFA-Medium) in eine T-75 Zellkulturflasche überführt und über Nacht kultiviert. Nach einer Verdopplung der Zellzahl wurden die Zellen mit einer multiplicity of infection (MOI) von 0,01 FFU (focus forming units) LCMV WE / Zelle in 5 ml FFA-Medium infiziert und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Um die L929-Zellen zu verteilen wurde die Zellkulturflasche alle 10 Minuten geschwenkt und anschließend 5 ml FFA-Medium zu den Zellen hinzugefügt. Nach einer Inkubation für 48 Stunden bei 37°C und 5 % CO₂ wurde der virushaltige Zellkulturüberstand entfernt, für 5 Minuten bei 430 g und 4°C zentrifugiert und bei -80°C gelagert. Zu den bereits verwendeten Zellen wurden erneut 10 ml FFA-Medium gegeben und für 24 Stunden bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Am nächsten Tag wurde der Zellkulturüberstand abgenommen, für 5 Minuten bei 430 g und 4°C zentrifugiert und mit dem bereits zuvor eingefrorenen Zellkulturüberstand vereinigt. Für die Lagerung wurden die Zellüberstände in 1,5 ml aliquotiert und bei -80°C eingefroren. Die Virustiterbestimmung in den Zellkulturüberständen erfolgte mittels focus forming assay (FFA) (siehe 2.2.3.4 – 2.2.3.5).

2.2.3.2 LCMV-Infektion von Versuchsmäusen

Für die LCMV-Infektion wurden die Mäuse in einer Haltevorrichtung fixiert und mit Rotlicht bestrahlt. Die LCMV-Infektion erfolgte intravenös (i.v.) über die Schwanzvene mit $1 \cdot 10^6$ FFU LCMV WE in 200 µl PBS.

2.2.3.3 Aufarbeitung von LCMV-haltigen Gewebeproben

Die Bestimmung der LCMV-Titer in Zellkulturüberständen und Lebergewebe erfolgte mittels focus forming assay (FFA) (Battegay *et al.*, 1991). Hierfür wurde das Lebergewebe zusammen mit Keramikugeln und 4 ml FFA-Medium in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und unter ständigem Kühlen mit dem Gewebezerkleinerer FastPrep-24TM (MP Biomedicals Germany GmbH, Eschwege, Deutschland) für 30 Sekunden homogenisiert. Anschließend wurde das Gewebe für 5 Minuten bei 260 g und 4°C zentrifugiert und die Überstände bei -80°C gelagert.

2.2.3.4 Ansetzen des FFA

Für den FFA wurden 200 µl L929-Zellen in FFA-Medium mit einer Konzentration von $8 \cdot 10^5$ Zellen/ml in eine 24-Well Mikrotiterplatte ausgesät und mit einer seriellen Verdünnung (1:10) virushaltiger Zell- oder Organüberstände für 2 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 200 µl einer 1:1 Lösung aus 2x DMEM und 2% Methylzellulose überschichtet und für 48 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

2.2.3.5 Entwicklung des FFA

Für die Entwicklung des FFA wurde die Methylzellulose abgekippt und die L929-Zellen mit 200 µl 4% Formalin in PBS für 30 Minuten fixiert. Anschließend wurden die L929-Zellen zweimal mit 200 µl PBS gewaschen und die Zellmembran für 20 Minuten mit 200 µl einer 1%igen Triton X-100 Lösung permeabilisiert. Die Triton X-100 Lösung wurde durch erneutes Waschen mit PBS entfernt und die Zellen zur Blockierung unspezifischer Antikörperbindungsstellen für 60 Minuten bei Raumtemperatur mit 200 µl einer 10%igen FCS-Lösung in PBS überschichtet. Um die LCMV-infizierten Zellen Antikörper-spezifisch zu markieren wurde die Blockierungslösung entfernt und 200 µl des anti LCMV-NP Primärantikörpers (siehe 2.1.9) (1:250 in PBS) hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten wurde die Antikörperlösung entfernt und die Zellen zweimal mit 200 µl PBS gewaschen. Anschließend wurden 200 µl des Meerrettich-Peroxidase (HRP)-gekoppelten Sekundärantikörpers (siehe 2.1.9) (1:250 in PBS) zu den Zellen gegeben und diese für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit 200 µl PBS gewaschen und die LCMV-infizierten Zellen unter Verwendung des EnVision™ Kits Antikörper-spezifisch angefärbt. Die Farbreaktion wurde nach 30 – 120 Sekunden durch Zugabe von 500 µl H₂O abgestoppt. Anschließend wurden die Platten getrocknet und die LCMV Foci unter dem Mikroskop gezählt. Für die Berechnung der Focus Forming Units / Leber wurde das Gesamtgewicht der Leber mit dem im FFA verwendeten Anteil ins Verhältnis gesetzt.

2.2.3.6 Anzucht von *Listeria monocytogenes*

Für die Anzucht von *Listeria monocytogenes* wurden vermehrungsfähige *L. monocytogenes* auf Trypton-Soja-Agar-Platten (siehe 2.1.14) ausplattiert und bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Angewachsene Kolonien wurden für die weitere Anzucht auf Trypton-Soja-Agar-Platten ausgestrichen oder für die Beimpfung von Trypton-Soja-Medium verwendet.

2.2.3.7 *Listeria monocytogenes*-Infektion von Versuchsmäusen

Die *L. monocytogenes*-Infektion erfolgte intravenös (i.v.) über die Schwanzvene mit $2 \cdot 10^4$ *L. monocytogenes* in 200 μ l PBS (siehe 2.2.3.6). Die *L. monocytogenes*-Infektion wurde in Kooperation mit M. Sc. Karsten Lücke und Prof. Dr. rer. nat. Hans-Willi Mittrücker aus dem Institut für Immunologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf durchgeführt.

2.2.3.8 Analyse der *Listeria monocytogenes*-Titer im Lebergewebe

Um die Anzahl vermehrungsfähiger Listerien im Lebergewebe von *L. monocytogenes*-infizierten Mäusen zu bestimmen, wurden die Mäuse unter Narkose durch zervikale Dislokation getötet und die Lebern entnommen. Anschließend wurden die Lebern homogenisiert und in einer seriellen Verdünnung in PBS auf Trypton-Soja-Agar-Platten ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Kolonien gezählt und die *L. monocytogenes* Titer / Leber berechnet.

2.2.3.9 *In vivo* Depletion von Neutrophilen Granulozyten

Für die Depletion von LY6G⁺ Zellen in C57BL/6 Mäusen wurden 500 μ g Depletionsantikörper (siehe Tab. 2.4) in 200 μ l PBS gelöst und den Versuchsmäusen 24 Stunden vor und alle 48 Stunden nach der Infektion mit LCMV (siehe 2.2.3.2) intraperitoneal (i.p.) appliziert. Am neunten Infektionstag wurden die Mäuse unter Narkose durch zervikale Dislokation getötet und die Organe entnommen. Die Behandlung der Kontrollgruppe erfolgte mit einem gegen ein Pseudoantigen gerichteten Kontrollantikörper (siehe Tab. 2.4).

Tab. 2.4: Antikörper für *in vivo* Depletionsstudien

Bezeichnung	Antigen	Farbstoff	Zielspezies	Wirtspezies	Klon	Isotyp	Hersteller	Artikelnummer
Depletionsantikörper	LY6G	-	Maus	Ratte	1A8	IgG2A	Bio X Cell	BE0075-1
Kontrollantikörper	Trinitrophenol	-	Maus	Ratte	2A3	IgG2A	Bio X Cell	BE0089

2.2.3.10 Intravenöse Applikation von proinflammatorischen Mediatoren *in vivo*

Die systemische Gabe von proinflammatorischen Mediatoren (siehe Tab. 2.5) erfolgte intravenös (i.v.) über die Schwanzvene in 200 μ l PBS. 18 Stunden nach der Injektion wurden

die Mäuse unter Narkose durch zervikale Dislokation getötet und die Leber für weitere Analysen entnommen.

Tab. 2.5: Proinflammatorische Mediatoren für die intravenöse Behandlung von Mäusen *in vivo*

Name	Eingesetzte Menge / Maus	Hersteller	Artikelnummer
LPS O55:B5	2 - 20 µg	Sigma	L6529
Poly(I:C)	200 µg	Invivogen	tIrl-pic

2.2.4 Zellbiologische Methoden

2.2.4.1 Kultivierung von L929-Zellen *in vitro*

Die Maus Fibroblastenzelllinie L929 wurde in T-175 Zellkulturflaschen in 10 ml L929-Medium (siehe 2.1.15) bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Die L929-Zellen wurden alle 48 bis 72 Stunden passagiert. Hierfür wurde das Zellkulturmedium verworfen und die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 2 ml einer 0,5%igen Trypsin-EDTA Lösung (Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland) vom Boden der Zellkulturschale abgelöst und in 10 ml L929-Medium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und für 5 Minuten bei 430 g zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen und die sedimentierten Zellen in 10 ml L929-Medium aufgenommen. Anschließend wurde 1 ml der Zellsuspension in eine neue T-175 Zellkulturflasche überführt und mit 9 ml L929-Medium im Verhältnis 1:10 verdünnt.

2.2.4.2 Kollagenisierung von Mikrotiterplatten

Um die Adhäsion von primären Zellen in 6- und 24-Well Mikrotiterplatten zu erhöhen, wurde die Oberfläche der Mikrotiterplatten mit Kollagen beschichtet. Hierfür wurde eine 0,2%ige Kollagenlösung (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland) im Verhältnis 1:10 mit sterilem H₂O verdünnt und jeweils 600 µl (6-Well) bzw. 300 µl (24-Well) in die Vertiefungen der Well-Platten pipettiert. Die Mikrotiterplatten wurden für 30 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die Lösung abgenommen und die Wells (Vertiefungen) mit 600 µl (6-Well) bzw. 300 µl (24-Well) PBS gewaschen. Nach dem erneuten Entfernen der Lösung wurden die kollagenisierten Mikrotiterplatten bis zu ihrer Verwendung bei 4°C gelagert.

2.2.4.3 Kultivierung von primären Zellen *in vitro*

Primäre Hepatozyten wurden in kollagenisierten (siehe 2.2.4.2) 6-Well Mikrotiterplatten mit einer Konzentration von $5 \cdot 10^5$ Zellen/Well in 1 ml Hepatozyten-Medium (siehe 2.1.15) kultiviert. Die Anzucht von Kupffer-Zellen (KCs) und Leber Sinusoidalen Endothelzellen (LSECs) erfolgte in kollagenisierten 24-Well Mikrotiterplatten. KCs und LSECs wurden mit einer Konzentration von $1 \cdot 10^6$ Zellen/Well in 500 μ l IMDM-Medium ausplattiert. Neutrophile Granulozyten wurden in 200 μ l IMDM-Medium mit einer Konzentration von $1-5 \cdot 10^5$ Zellen/Well in 96-Well Mikrotiterplatten kultiviert.

2.2.4.4 Stimulation von primären Zellen *in vitro*

Um die Genexpression (siehe 2.2.5.5) und sTREM1 Sekretion (siehe 2.2.7.1) von primären Zellen *in vitro* zu analysieren, wurden die Zellen für bis zu 72 Stunden in Anwesenheit eines proinflammatorischen Liganden (siehe Tab. 2.6) inkubiert. Nach der Stimulation wurde das Medium in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und zum Entfernen von toten Zellen und Zelltrümmern für 10 Minuten bei 10000 g und 4°C zentrifugiert. Für die Isolation der RNA wurden die in der Mikrotiterplatte verbliebenen Zellen in 750 μ l Trizol LS (Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland) und 250 μ l PBS aufgenommen. Die Lagerung der Zellysate und Zellkulturüberstände erfolgte bei -80°C.

Tab. 2.6: Liganden für die Stimulation von primären Zellen *in vitro*

Ligand	Zielspezies	Konzentration / MOI	Hersteller	Artikelnummer
HMGB1	Mensch	1 – 10 μ g/ml	R&D	1690-HMB-025
LCMV WE	Mensch / Maus	10 – 0,01	-	-
LPS O55:B5	-	1 – 20 ng/ml	Sigma	L6529
Poly(I:C)	-	2 μ g/ml	Invivogen	tlrl-pic

2.2.4.5 Isolation von primären Hepatozyten

Für die Isolation von primären Hepatozyten wurden die Mäuse betäubt, getötet, der Bauchraum eröffnet und die Leber freigelegt. Eine Braunüle (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) wurde in die *Vena portis hepatis* eingeführt und mit einem Seidenfaden (RESORBA Wundversorgung GmbH & Co. KG, Nürnberg, Deutschland) fixiert. Anschließend wurde die *Vena cava inferior* eröffnet und die Leber über die Braunüle luftblasenfrei mit 100 ml Hepatozyten-Puffer I (siehe 2.1.15) (10 ml/Minute, 37°C) perfundiert. Für den Verdau des Lebergewebes wurde die Leber mit 0,15 PZ-U/ml Kollagenase (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland) (Aktivität $\geq 0,18$ PZ-U/mg nach Wunsch und Heidrich, 1963) in 50 ml Hepatozyten-Puffer II (siehe 2.1.15) (8 ml/Minute, 37°C)

perfundiert und die Leber vorsichtig entnommen. Das Organ wurde in eine Petrischale überführt und in 10 ml Hepatozyten-Puffer III (siehe 2.1.15) aufgenommen. Um die Hepatozyten aus der Leber freizusetzen, wurde die Leberkapsel mit einer Schere perforiert und das Lebergewebe in der Petrischale ausgestrichen. Anschließend wurde die Zellsuspension durch ein 100 µm Nylonsieb (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) gegeben und der Durchfluss in einem 50 ml Reaktionsgefäß aufgefangen. Die Zellsuspension wurde mit Hepatozyten-Puffer III auf 50 ml aufgefüllt und für 5 Minuten bei 30 g und 4°C mit einer Anlaufzeit von 30 Sekunden ohne Bremse zentrifugiert. Zum Waschen der Hepatozyten wurde der Überstand verworfen und die Zellen in 20 ml Hepatozyten-Medium (siehe 2.1.15) resuspendiert. Nach dem erneuten Zentrifugieren wurde der Überstand verworfen und die Hepatozyten in 10 ml Hepatozyten-Medium aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen gezählt und bis zu ihrer weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

2.2.4.6 Komplementlyse von nichtparenchymatischen Leberzellen

Um die Reinheit von primären Hepatozyten zu erhöhen wurden B-Zellen, Kupffer-Zellen, Lymphozyten, Makrophagen, Neutrophile Granulozyten, NK-Zellen, Mastzellen sowie Monozyten Antikörper-spezifisch lysiert. Hierfür wurden die Zellen zusammen mit den Primärantikörpern (siehe 2.1.11) in 1 ml Hepatozyten-Medium aufgenommen und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in 50 ml Hepatozyten-Medium gewaschen und für 4 Minuten bei 30 g und 4°C mit einer Anlaufzeit von 30 Sekunden ohne Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen zusammen mit dem Sekundärantikörper MAR18.5 (siehe 2.1.11) in 1 ml Hepatozyten-Medium auf Eis inkubiert. Danach wurden die Hepatozyten erneut in 50 ml Hepatozyten-Medium gewaschen und für 4 Minuten bei 4°C mit einer Anlaufzeit von 30 Sekunden ohne Bremse zentrifugiert. Zum Lysieren der antikörpermarkierten Zellen wurde der Überstand verworfen und die Zellen für 20 Minuten in 1 ml Komplementlysepuffer (siehe 2.1.15) bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Hepatozyten zum Entfernen von toten Zellen und Zelltrümmern mit 50 ml Hepatozyten-Medium gewaschen und für 4 Minuten bei 4°C mit einer Anlaufzeit von 30 Sekunden ohne Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 10 ml Hepatozyten-Medium resuspendiert. Schließlich wurden die Zellen gezählt und bis zu ihrer weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

2.2.4.7 Isolation von mononukleären Leberzellen

Für die Isolation von mononukleären Zellen aus Lebergewebe wurden die Mäuse betäubt, getötet und der Bauchraum eröffnet. Die Leber wurde freigelegt und über die *Vena porta hepatis* mit 2 ml PBS perfundiert. Anschließend wurde die Leber mit einem Spritzenstempel durch ein 100 µm Nylonsieb in ein 50 ml Reaktionsgefäß gedrückt und in 30 ml PBS aufgenommen. Die Zellsuspension wurde für 5 Minuten bei 250 g und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Danach wurden die Zellen in 5 ml 40%igem Percoll (GE Healthcare, München, Deutschland) in DMEM-Medium aufgenommen und zu 3 ml einer 70%igen Percoll-Lösung gegeben. Die Zelllösung wurde anschließend für 20 Minuten bei 530 g und 20°C zentrifugiert und die oberste Flüssigkeitsphase entfernt. Die verbleibende Zellsuspension wurde in ein neues 50 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 40 ml PBS resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen für 5 Minuten mit 250 g bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zur Lyse der Erythrozyten wurden die Zellen in 1 ml ACK Puffer aufgenommen. Nach 1 Minute wurde die Zelllyse durch das Hinzufügen von 20 ml PBS abgestoppt und die Zellsuspension durch ein 40 µm Nylonsieb (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) gegeben. Die Zellen wurden erneut für 5 Minuten bei 250 g und 20°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Schließlich wurden die Zellen in 500 µl PBS resuspendiert und bis zu ihrer weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

2.2.4.8 Isolation von nichtparenchymatischen Leberzellen

Für die Isolation von primären nichtparenchymatischen Leberzellen (Kupfer-Zellen, Leber Sinusoidalen Endothelzellen [LSEC] und Neutrophilen Granulozyten aus Lebergewebe) wurden die Mäuse betäubt, getötet, der Bauchraum eröffnet und die Leber freigelegt. Die Leber wurde über die *Vena portis hepatis* mit 0,5 % Kollagenase in 5 ml GBSS-Puffer (siehe 2.1.15) perfundiert, den Mäusen entnommen und in eine Petrischale überführt. Anschließend wurde die Leber in 2 ml GBSS-Puffer mit 0,5 % Kollagenase aufgenommen und mit einer Schere zerkleinert. Das Leberhomogenisat wurde in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und für 25 Minuten im Wasserbad bei 37°C verdaut. Um das Verklumpen von Zellen zu verhindern wurden zu dem Ansatz 50 µl DNase I (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) hinzugefügt. Nach dem Verdau wurde das Lebergewebe mit einem Spritzenstempel durch ein 100 µm Sieb in ein 50 ml Reaktionsgefäß gedrückt und in 50 ml PBS aufgenommen. Die Zellsuspension wurde bei Raumtemperatur zweimal für 4 Minuten mit 40 g zentrifugiert. Danach wurden die sedimentierten Zellen verworfen, der Überstand in ein neues 50 ml Reaktionsgefäß überführt und die Suspension bei Raumtemperatur für 7 Minuten bei 430 g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und die Zellen auf ein Endvolumen von 5 ml mit PBS eingestellt. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml

Reaktionsgefäß überführt, mit 2 ml OptiPrep™ (Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland) vermischt und vorsichtig mit 1 ml PBS überschichtet. Um die Zellen aufzutrennen, wurde die Zellsuspension bei Raumtemperatur für 40 Minuten mit 400 g ohne Bremse zentrifugiert. Die nichtparenchymatischen Leberzellen oberhalb der OptiPrep™-Phase wurden entnommen und in ein neues 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Zum Waschen wurden die Zellen in 15 ml PBS resuspendiert und bei Raumtemperatur für 10 Minuten mit 430 g zentrifugiert. Anschließend wurde der Zellüberstand verworfen und die Zellen in 1 ml MACS-Puffer auf Eis gelagert.

2.2.4.9 Isolation von primären Milzzellen

Für die Isolation von primären Milzzellen wurden die Mäuse unter Narkose durch zervikale Dislokation getötet und die Milzen nach dem Eröffnen des Bauchraums entnommen. Die Milzen wurden mit einem Spritzenstempel durch ein 100 µm Nylonsieb (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) gedrückt und die Zellen in 20 ml PBS aufgenommen. Anschließend wurde die Zellsuspension für 5 Minuten bei 430 g und 4°C zentrifugiert und der Zellüberstand verworfen. Zur Lyse der Erythrozyten wurden die Zellen in 1 ml ACK Puffer aufgenommen und für 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lyse wurde durch die Zugabe von 20 ml PBS abgestoppt und die Zellsuspension durch ein 40 µm Nylonsieb (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) gegeben. Anschließend wurden die Zellen für 5 Minuten bei 430 g und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in 1 ml MACS-Puffer aufgenommen, gezählt und bis zu ihrer weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

2.2.4.10 Magnetische Zellisolation (MACS)

Für die antigenspezifische Isolation von Zielzellen aus einer Zellsuspension wurden die Zellen in 1 ml MACS-Puffer aufgenommen und in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Zur Absättigung von unspezifischen Antikörperbindestellen wurden 5 µl Maus IgG (siehe 2.1.7) zu den Zellen gegeben. Danach wurden die Zellen gezählt, mit 15 ml PBS gewaschen und für 10 Minuten bei 430 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen jeweils in 90 µl MACS-Puffer / $1 \cdot 10^7$ Zellen und 1 µl anti CD16/CD32 / $1 \cdot 10^7$ Zellen aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen für 10 Minuten bei 4°C inkubiert und 1 µl des Isolations-Antikörpers (siehe 2.1.10) / $1 \cdot 10^7$ Zellen hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten bei 4°C im Dunkeln wurden die Zellen mit 15 ml MACS-Puffer gewaschen und für 10 Minuten bei 430 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 90 µl MACS-Puffer / $1 \cdot 10^7$ Zellen aufgenommen. Jeweils 10 µl anti-PE MicroBeads (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland) wurden zu $1 \cdot 10^7$ Zellen

hinzugefügt und für 15 Minuten im Dunkeln bei 4°C inkubiert. Zum Entfernen von ungebundenen MicroBeads wurden die Zellen mit 15 ml MACS-Puffer gewaschen und für 10 Minuten bei 430 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 1 ml MACS-Puffer aufgenommen. Eine MACS LS Säule (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland) wurde in einem QuadroMACS Magneten (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland) fixiert und mit 3 ml MACS-Puffer äquilibriert. Danach wurde die Zellsuspension auf die MACS LS Säule gegeben und dreimal mit 3 ml MACS-Puffer gewaschen. Der Durchfluss wurde verworfen und die Zellen in der Säule mit 5 ml PBS in ein 15 ml Reaktionsgefäß eluiert. Anschließend wurden die Zellen gezählt und bis zu Ihrer weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

2.2.4.11 Isolation von Neutrophilen Granulozyten aus primären Milzzellen

Für die Isolation von Neutrophilen Granulozyten aus primären Milzzellen wurde das „Neutrophil Isolation Kit“ (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland) verwendet. Alle Schritte erfolgten nach Herstellerangaben. Die Auftrennung der Zellen erfolgte mit einer LS-Magnetsäule und dem „QuadroMACS™“ System (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland). Nach der Isolation wurden die Neutrophilen Granulozyten für 10 Minuten bei 300 g und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in 500 µl IMDM-Medium (siehe 2.1.15) resuspendiert und bis zu ihrer Verwendung auf Eis gelagert.

2.2.4.12 Restimulation von CD8 T-Zellen

Für die Restimulation von CD8 T-Zellen aus Lebergewebe wurden $1,5 \cdot 10^6$ mononukleäre Zellen (siehe 2.2.4.7) in 1 ml PBS aufgenommen und jeweils 200 µl der Zellsuspension in die Vertiefung einer 96-Well Mikrotiterplatte gegeben. Die LCMV-spezifische Restimulation von CD8+ T-Zellen erfolgte mit 3 µl APC-gekoppeltem Dextramer, bestehend aus immundominantem MHC I (H-2Db)-restringiertem LCMV Peptid gp33-41 (KAVYNFATC) (Immudex, Fruebjergvej, Dänemark) und kostimulatorischen Molekülen. Um die Sekretion von Zytokinen in das Zellmedium zu verhindern, wurde jeweils 1 µl/ml Monensin A (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) zu den Zellen hinzugefügt. Die Zellen wurden für 4 Stunden bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurde der Überstand entfernt, die Zellen in 200 µl PBS aufgenommen und für die spätere durchflusszytometrische Analyse (siehe 2.2.7.2) in ein 5 ml Polystyrol-Röhrchen überführt.

2.2.4.13 Mikroskopische Zellzahlbestimmung

Um die Anzahl von vitalen Zellen in einer Zellsuspension zu bestimmen wurde die Suspension im Verhältnis 1:2, 1:10 oder 1:100 mit Trypanblau versetzt und 10 µl der verdünnten Suspension in eine Neubauer-Zählkammer überführt. Da nur tote Zellen Trypanblau aufnehmen, können anhand des Trypanblau-Ausschlusses vitale von toten Zellen unterschieden werden. Für die Ermittlung der Gesamtzellzahl wurden die vitalen Zellen in 2 Großquadranten mikroskopisch ermittelt und mit dem Verdünnungsfaktor, dem Kammerfaktor und dem Probenvolumen verrechnet:

$$\frac{\text{Ø Zellzahl / Großquadrat}}{\text{Großquadrat}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \frac{\text{Kammerfaktor}}{(10^4)} \times \text{Volumen [ml]} = \text{Gesamtzellzahl}$$

2.2.5 Molekularbiologische Methoden

2.2.5.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren und Proteinen

Die Messung der Reinheit und Konzentration von Nukleinsäuren und Proteinen erfolgte mittels NanoDrop UV/Vis-Spektralphotometer (Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland). Nukleinsäurekonzentrationen wurden mit einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Proteinkonzentrationen wurden mit einer Wellenlänge von 280 nm gemessen.

2.2.5.2 RNA-Isolation aus primären Zellen

Bis zu $1 \cdot 10^6$ primäre Zellen wurden in 250 µl PBS oder Medium gelöst und in 750 µl Trizol LS (Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland) lysiert. Die Lösung wurde für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und über Nacht bei 80°C gelagert. Nach dem Auftauen wurden 10 µl Glykogen (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) und 200 µl Chloroform zu der Lösung hinzugefügt. Anschließend wurde das Lysat gevortext und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Isolation der RNA wurde das Lysat für 15 Minuten bei 12000 g und 4°C zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µl 100% Isopropanol vermischt. Zum Fällen der RNA wurde die Lösung über Nacht bei -20°C gelagert und am nächsten Tag für 30 Minuten bei 12000 g und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und die sedimentierte RNA in 700 µl 70% Ethanol gewaschen. Die Lösung wurde für 10 Minuten bei 12000 g und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zum Entfernen von Lösungsmittelrückständen wurde die RNA für 30 Minuten unter dem Abzug getrocknet und in

30 µl Nuklease-freiem Wasser (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) aufgenommen. Die RNA wurde für 5 Minuten bei 60°C inkubiert und bis zur ihrer weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.5.3 RNA-Isolation aus Lebergewebe

Für die Isolation von RNA aus Lebergewebe wurde das NucleoSpin® TriPrep Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland) verwendet. Die RNA-Isolation erfolgte nach Herstellerangaben. Die isolierte RNA wurde in 60 µl Nuklease-freiem Wasser (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) aufgenommen und bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.5.4 Synthese von cDNA

Für die Synthese von cDNA aus RNA wurden das cDNA-Synthese Kit „AMV“ (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) oder das „High-Capacity“ Kit (Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Die Umschreibung von RNA in cDNA erfolgte nach Herstellerangaben. Es wurden jeweils 1000 ng RNA/Reaktion eingesetzt.

2.2.5.5 Quantitative Echtzeit PCR (qPCR)

Für Genexpressionsanalysen und den Nachweis der LCMV Z-RNA in Lebergewebe wurden das „DNA Master SYBR Green I“ Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) bzw. das „Probe Fast“ Kit (Kapa Biosystems, Inc., Wilmington, USA) verwendet. SYBR Green Analysen wurden mit selbstgenerierten Primern oder Qiagen Primer Assays (siehe 2.1.6) auf einem „Lightcycler 1.5“-System (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) durchgeführt (siehe Tab. 2.7).

Tab. 2.7: PCR-Protokoll für die Amplifikation von Nukleinsäuren mit dem „Lightcycler 1.5“-System

Temperatur	Dauer	Bezeichnung	Zyklen
95°C	10 min	Initiale Denaturierung	-
95°C	10 s	Zyklische Denaturierung	45
60°C – 68°C (primerabhängig)	5 s	Annealing	45
72°C	7 s	Elongation	45
95°C	0 s	Finale Denaturierung	-
65°C → 90°C	0,1°C / s	Schmelzkurve	-
40°C	30 s	Endphase	-

Genexpressionsanalysen mit Taqman Sonden (siehe 2.1.5) erfolgten auf einem „StepOnePlus™“-System (Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland) (siehe Tab. 2.8). Pro Versuchsansatz wurde 1 µl cDNA eingesetzt.

Tab. 2.8: PCR-Protokoll für die Amplifikation von Nukleinsäuren mit dem „StepOnePlus™“-System

Temperatur	Dauer	Bezeichnung	Zyklen
95 °C	20 s	Initiale Denaturierung	-
95 °C	1 s	Zyklische Denaturierung	40
60°C	20 s	Annealing + Elongation	40

Die Berechnung der relativen Genexpression erfolgte durch Verrechnung der CP-Werte (crossing points) nach der $\Delta\Delta\text{CP}$ -Methode (Pfaffl, 2001). Sämtliche Messergebnisse wurden auf das Haushaltsgen PPIA (Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase-A) (Tatsumi *et al.*, 2008) normalisiert. Für die Berechnung der relativen Expressionsunterschiede wurde in jedem Zyklus eine Verdoppelung der DNA-Menge vorausgesetzt:

$$\Delta\text{CP} = \text{CP Zielgen} - \text{CP Haushaltsgen (PPIA)}$$

$$\Delta\Delta\text{CP} = \Delta\text{CP Probe} - \Delta\text{CP Kontrolle}$$

$$\text{Relativer Expressionsunterschied} = 2^{-\Delta\Delta\text{CP}}$$

2.2.6 Proteinbiochemische Methoden

2.2.6.1 Western-Blot-Analyse

Die Western-Blot-Analyse ist ein Verfahren, bei dem einzelne Proteine in einem Proteingemisch durch die Verwendung eines antigenspezifischen Antikörpers detektiert werden können. Hierfür wurden die Proteine zunächst aus dem Lebergewebe isoliert (siehe 2.2.6.1.1), im elektrischen Feld nach ihrer Größe aufgetrennt (siehe 2.2.6.1.3) und auf eine Membran übertragen (siehe 2.2.6.1.4). Der Nachweis der Zielproteine erfolgte mittels Immunoblot (siehe 2.2.6.1.5).

2.2.6.1.1 Proteinisolation aus Lebergewebe

Für die Proteinisolation aus Lebergewebe wurde die Leber in T-PER Lysepuffer (Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland) aufgenommen und mit einem Ultraschall

Homogenisator (BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland) auf Eis sonifiziert. Um den enzymatischen Abbau von Proteinen während der Isolation zu verhindern, wurden dem Lysespuffer Protease- und Phosphataseinhibitoren (siehe 2.1.13) zugesetzt. Zur Entfernung von Zelltrümmern wurde das Lysat für 20 Minuten bei 13000 g und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet verworfen und der Überstand in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Das Lysat wurde bei -80°C gelagert.

2.2.6.1.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen aus Lebergewebe

Für die Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen aus Lebergewebe wurde das BCA Protein Assay Kit (Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland) verwendet. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte nach Herstellerangaben. Jeweils 10 µl Leberlysat wurden in einer geeigneten Verdünnung mit 200 µl BCA-Lösung vermischt und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Lösung in eine Mikrotiterplatte überführt und die optische Dichte im Photometer (Bio Tek, Bad Friedrichshall, Deutschland) bei 540 nm gemessen. Mit Hilfe eines Proteinstandards wurde eine Eichreihe erstellt und die Messwerte photometrisch quantifiziert. Die Proben wurden mit H₂O und 5x Proteinprobenpuffer (siehe 2.1.15) auf eine Konzentration von 375 µg/ml eingestellt und bei -20°C gelagert.

2.2.6.1.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die größenspezifische Auftrennung von Proteinen im elektrischen Feld wurde das Mini-PROTEAN Tetra Cell-System verwendet (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland). Jeweils 1,5 cm dicke Acrylamid-Sammel- und -Trenngele (siehe 2.1.15) wurden in eine Gelkammer überführt und mit SDS-PAGE Laufpuffer (siehe 2.1.15) äquilibriert. Die Lysate wurden für 10 Minuten bei 95°C aufgeköcht und jeweils 15 µg der Proben in die Geltaschen des Sammelgels pipettiert. Durch das Anlegen einer Spannung von 100 - 160 V für ~1,5 Stunden wurden die Proteine elektrisch aufgetrennt. Als Referenz für die Größe der aufgetrennten Fragmente wurde der Protein-Standard „Page Ruler Plus Prestained Ladder“ (Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland) verwendet.

2.2.6.1.4 Membrantransfer von Proteinen

Der Transfer der elektrisch aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte mittels Wet-/Tank-Blot-Verfahren. Hierfür wurde die Nitrozellulosemembran in Transfer-Puffer äquilibriert und zusammen mit einem SDS-Gel in der Haltevorrichtung eines Mini

Trans-Blot® Cell-Systems (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) fixiert. Die Kammer wurde mit Transfer-Puffer (siehe 2.1.15) befüllt und die Proteine durch das Anlegen eines Stroms von 300 mA für 1 Stunde auf die Nitrozellulosemembran transferiert. Anschließend wurde die Membran in 50 ml TBST (siehe 2.1.15) gewaschen und im Dunkeln bei 4°C gelagert.

2.2.6.1.5 Immunoblot

Für den antikörpervermittelten Nachweis von Proteinen auf einer Nitrozellulosemembran wurde die Membran über Nacht bei 4°C in 50 ml Blockpuffer (siehe 2.1.15) inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal für 5 Minuten in 50 ml TBST gewaschen und der Primärantikörper (siehe 2.1.12) in 50 ml Blockpuffer auf die Membran gegeben. Die Inkubation des Primärantikörpers erfolgte über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag wurde die Lösung verworfen und die Membran dreimal für 5 Minuten mit TBST gewaschen. Ein für den Primärantikörper spezifischer HRP-gekoppelter Sekundärantikörper (siehe 2.1.12) wurde in Blockpuffer auf die Membran gegeben und für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal für 5 Minuten mit TBST gewaschen und in 10 ml ECL Substrat-Lösung (Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland) inkubiert. Die Detektion der Chemilumineszenz-Reaktion erfolgte mit dem Geldokumentationssystem Chemidoc XRS (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland).

2.2.7 Immunologische Methoden

2.2.7.1 Enzymgekoppelter Immunadsorptionsassay (ELISA)

Der enzymgekoppelte Immunadsorptionstest ist ein Antikörper-basiertes Nachweisverfahren zur Konzentrationsbestimmung von löslichen Proteinen. Für den Nachweis von sTREM1 in Blutplasma, Blutseren und Zellkulturüberständen wurden das Human TREM-1 DuoSet und das Mouse TREM-1 DuoSet (R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland) verwendet (siehe 2.1.4). NUNC™ MaxiSorp™ Mikrotiterplatten wurden über Nacht bei Raumtemperatur mit dem sTREM1 spezifischen Primärantikörper beschichtet. Am nächsten Tag wurde die Primärantikörperlösung durch dreimaliges Waschen mit ELISA-Waschpuffer (siehe 2.1.15) entfernt und unspezifische Antikörperbindestellen durch Inkubation mit 300 µl 1% BSA in PBS für 1 Stunde bei Raumtemperatur abgesättigt. Nach dem erneuten Waschen mit ELISA-Waschpuffer wurden 100 µl des Probenmaterials und jeweils 100 µl einer seriellen Verdünnung des Proteinstandards in die Wells gegeben und diese für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Lösung durch das Spülen mit ELISA-

Waschpuffer entfernt. Danach wurden 100 µl des biotinylierten Sekundärantikörpers in die Mikrotiterplatte gegeben und diese für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen mit ELISA-Waschpuffer wurde eine Verdünnung der Streptavidin-gekoppelten Meerrettichperoxidase (HRP) in die Mikrotiterplatte pipettiert und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Ungebundene HRP wurde durch Waschen mit ELISA-Waschpuffer entfernt und eine HRP-vermittelte Farbreaktion durch das Hinzufügen von 100 µl 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) Substratlösung (Kem-En-Tec Diagnostics A/S, Taastrup, Dänemark) in den Wells induziert. Die Farbreaktion wurde nach 20 Minuten durch die Zugabe von 50 µl 2N H₂SO₄ abgestoppt und die optische Dichte bei 450 nm photometrisch (Dynex Technologies GmbH, Denkendorf, Deutschland) bestimmt.

2.2.7.2 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein optisches Analyseverfahren, bei dem Zellen in einem Laserstrahl nach Größe, Form, Struktur und Färbung charakterisiert werden können. Bei allen Untersuchungen wurden nur Färbungen von Einzelzellen berücksichtigt. Um bei der gleichzeitigen Verwendung mehrerer Fluorophore eine Überlagerung der Fluoreszenzspektren zu kompensieren, wurden Einzelfärbungen aller verwendeten Fluorophore angefertigt. Zur Unterscheidung von lebenden und toten Zellen wurden die analysierten Zellen einer Vitalitätsfärbung mit Pacific Orange Succimidyl Ester unterzogen. Sämtliche Messungen wurden mit Hilfe des Durchflusszytometers LSR II (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) durchgeführt. Für die statistischen Auswertungen wurde die Software FACS DivaDTM 5.0.1 (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) verwendet.

2.2.7.2.1 Vitalitätsfärbung im Durchflusszytometer

Um im Durchflusszytometer lebende von toten Zellen unterscheiden zu können, wurden die Zellen mit dem Farbstoff Pacific Orange Succimidyl Ester (PACO-NHS) (Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland) angefärbt. PACO-NHS wird nur von toten Zellen aufgenommen und reagiert im Zellinneren von toten Zellen mit freien Aminen. Vitale Zellen, die im Gegensatz zu toten Zellen eine intakte Zellmembran besitzen, nehmen PACO-NHS nicht auf und werden somit nicht angefärbt. Für die Vitalitätsfärbung wurden $1 \cdot 10^5$ Zellen in ein 5 ml Polystyrol-Röhrchen überführt und in 2 ml PBS aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen für 5 Minuten bei 430 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in 200 µl PACO-NHS-Lösung (1:1000 PACO-NHS in PBS) aufgenommen und im Dunkeln für 25 Minuten bei 4°C inkubiert. Zum Waschen wurden die Zellen in 2 ml PBS

aufgenommen und für 5 Minuten bei 430 g und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und die Zellen in 100 µl PBS resuspendiert.

2.2.7.2.2 Oberflächenfärbung

Für die durchflusszytometrische Oberflächenfärbung von extrazellulären Membranproteinen wurden $1 \cdot 10^5$ - $1 \cdot 10^6$ Zellen in 2 ml PBS aufgenommen und in ein 5 ml Polystyrol-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden für 5 Minuten bei 430 g und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Für die Unterscheidung von lebenden und toten Zellen wurde eine Vitalitätsfärbung (siehe 2.2.7.2.1) durchgeführt. Zur Absättigung von FC-Rezeptoren wurde jeweils 1 µl anti CD16/CD32 zu $1 \cdot 10^6$ Zellen gegeben und die Zellen für 5 Minuten bei 4°C inkubiert. Um ungebundene Antikörper zu entfernen, wurden 2 ml PBS zu den Zellen gegeben und für 5 Minuten bei 430 g und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und die Zellen in 100 µl PBS aufgenommen. Jeweils 1 µl der fluoreszenzmarkierten Antikörper (siehe 2.1.8) wurde zu den Zellen gegeben und für 10 Minuten im Dunkeln bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 2 ml PBS gewaschen und für 5 Minuten bei 430 g und 4°C zentrifugiert. Nach dem Entfernen des Zellüberstands wurden die Zellen in 300 µl PBS resuspendiert und im Durchflusszytometer analysiert. Optional wurden die Zellen in 400 µl 1% PFA über Nacht fixiert.

2.2.7.2.3 Vitalitäts- und Oberflächenfärbung von primären Hepatozyten

Die Vitalitäts- und Oberflächenfärbung von primären Hepatozyten im Durchflusszytometer erfolgte analog zu 2.2.4.5 und 2.2.7.2.1. Aufgrund der hohen Anfälligkeit von Hepatozyten für mechanische Belastungen und Scherkräfte wurden sämtliche Zentrifugationsschritte ohne Bremse durchgeführt.

2.2.7.2.4 Intrazelluläre Zytokinfärbung

Für die spezifische Anfärbung von intrazellulären Zytokinen wie z.B. IFN γ und TNF α wurden die Zellmembran von $1 \cdot 10^6$ fixierten mononukleären Zellen (siehe 2.2.4.7) für 5 Minuten mit 2 ml 2% BSA und 0,5% Saponin in PBS permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen für 5 Minuten bei 250 g und 20°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen mit jeweils 1 µl des fluoreszenzmarkierten Antikörpers für 20 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Zum Entfernen von ungebundenen Antikörpern wurden die Zellen in 2 ml 2% BSA und 0,5% Saponin in PBS resuspendiert und für 5 Minuten bei 250 g und 20°C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und die Zellen in 300 µl PBS aufgenommen.

Intrazelluläre Zytokinfärbungen erfolgten in enger Zusammenarbeit mit Dr. rer. nat. Tanja Trautmann.

2.2.8 Histologie

2.2.8.1 Anfertigung von Paraffinschnitten

Für das Anfertigen von Paraffinschnitten aus Lebergewebe wurde den Mäusen der *Lobus hepatis sinister lateralis* entnommen und über Nacht in 4%iger Formalin-Lösung bei Raumtemperatur fixiert. Am nächsten Tag wurden die Lebern für 2 Stunden in destilliertes Wasser überführt und für jeweils 1 Stunde mit einer aufsteigenden Alkoholreihe in 20%igem-, 40%igem- und 70%igem Isopropanol entwässert. Das Einbetten der Lebern in Paraffin erfolgte in der Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf. Aus den in Paraffin eingebetteten Organen wurden am Mikrotom (Slee, Mainz, Deutschland) 3 µm dicke Schnitte angefertigt und auf Superfrost Objektträger (Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland) überführt.

2.2.8.2 Hämatoxylin-Eosin (H&E)-Färbung von Paraffinschnitten

In Paraffin fixierte Leberschnitte (siehe 2.2.8.1) wurden dreimal für 5 Minuten in Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe für jeweils 5 Minuten in 100%igem, 90%igem, 70%igem und 50%igem Ethanol rehydriert. Anschließend wurden die Schnitte für 2 Minuten mit entsalztem Wasser gespült und für 10 Minuten in Hämalaun-Lösung nach Mayer (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) bei Raumtemperatur inkubiert. Die Organschnitte wurden kurz in entsalztem Wasser gespült und für 15 Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut. Anschließend wurden die Schnitte für 2 Minuten in entsalztem Wasser gewaschen und für 1 Minute in eine Eosin-Färbelösung (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) überführt. Nach dem erneuten Waschen in Leitungswasser wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe für jeweils 2 Minuten in 50%igem, 70%igem, 90%igem und 100%igem Ethanol entwässert. Schließlich wurden die Schnitte dreimal für 3 Minuten in Xylol inkubiert und mit Eukitt Eindeckmedium (Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland) überschichtet. Die Schnitte wurden über Nacht bei Raumtemperatur gelagert und am nächsten Tag mikroskopisch ausgewertet.

2.2.8.3 Immunhistochemische Färbungen von Paraffinschnitten

Für die antigenspezifische Anfärbung von Paraffinschnitten wurden Leberschnitte dreimal für 5 Minuten in Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe für jeweils 5 Minuten in 100%igem, 90%igem, 70%igem und 50%igem Ethanol rehydriert. Die Schnitte wurden zunächst für 2 Minuten in entsalztem Wasser gewaschen und danach für 2 Minuten in TBS (siehe 2.1.15) überführt. Für die Demaskierung von Antigenen wurden die Schnitte in einer Mikrowelle (Medion AG, Essen, Deutschland) für 10 Minuten in Antigen Unmasking Solution (Vector Laboratories LTD., Peterborough, Vereinigtes Königreich) gekocht und für 10 Minuten bei Raumtemperatur abgekühlt. Die Schnitte wurden dann für 5 Minuten in TBS überführt und zweimal für 2 Minuten in TBS gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte zur Blockierung von endogenen Peroxidasen für 30 Minuten in 30% H₂O₂ in TBS bei Raumtemperatur inkubiert und für 1 Minute in TBS gewaschen. Um die Gewebeschnitte auf einem Objektträger voneinander abzugrenzen, wurden die Schnitte mit einem Fettstift (Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) umrandet und anschließend dreimal für 1 Minute mit TBS gewaschen. Die Blockierung von unspezifischen Antikörperbindestellen erfolgte durch die Inkubation mit 5% Normalserum in 1% BSA in PBS für 60 Minuten bei Raumtemperatur. Für die antigenspezifische Anfärbung von Gewebestrukturen wurden anschließend 100 µl des mit 5 % Normalserum in PBS verdünnten Primärantikörpers (siehe 2.1.7) auf die Schnitte gegeben und über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Lösung entfernt und die Schnitte dreimal für 3 Minuten in TBS gewaschen. 100 µl des HRP gekoppelten und für den Primärantikörper spezifischen Sekundärantikörpers (siehe 2.1.7) wurden in einer geeigneten Verdünnung mit 5 % Normalserum in PBS auf die Schnitte gegeben und für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Visualisierung der gebundenen Antikörper erfolgte mit dem Envision Kit (Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland). Zu den Schnitten wurde das 1:100 in Substratlösung verdünnte DAB-Chromogen hinzugegeben und die Farbreaktion nach 30 bis 60 Sekunden durch Inkubation in TBS abgestoppt. Anschließend wurden die Schnitte in entsalztem Wasser gewaschen und die Zellkerne für 90 Sekunden in Hämalaun-Lösung nach Mayer (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) gegengefärbt. Die Schnitte wurden anschließend in entsalztem Wasser gewaschen, für 10 Minuten gebläut und in entsalztem Wasser gespült. Schließlich wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert (siehe 2.2.8.2) und mit Eukitt Eindeckmedium (Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland) überschichtet. Die Schnitte wurden über Nacht bei Raumtemperatur gelagert und am nächsten Tag mikroskopisch ausgewertet.

2.2.8.4 Anfertigung von Gefrierschnitten

Um Kryoschnitte aus Lebergewebe anzufertigen wurde den Mäusen der *Lobus Hepatis sinister medialis* und der *Lobus hepatis dexter medialis* entnommen und in Tissue Tek® (Sakura Finetek Europe B.V., Alphen aan den Rijn, Niederlande) auf Trockeneis eingebettet. Mit einem Kryotom (Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland) wurden 8 µm große Gewebeschnitte angefertigt und auf SuperFrost® Objektträger (Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland) überführt. Die Lagerung der Kryoschnitte erfolgte bei -80°C.

2.2.8.5 Immunfluoreszenzfärbungen von Gefrierschnitten

Die bei -80°C gelagerten Gefrierschnitte (siehe 2.2.8.4) wurden für 15 Minuten in Aceton bei Raumtemperatur fixiert und dreimal für 3 Minuten in PBS gewaschen. Zur Absättigung von unspezifischen Antikörperbindestellen wurden die Schnitte für 1 Stunde blockiert (1% BSA, 5% Normalserum und 1:50 αCD16/CD32 in PBS) und nach dem Abkippen der Blockierlösung mit einer geeigneten Verdünnung des Primärantikörpers (siehe 2.1.7) für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Schnitte wurden dreimal mit PBS gewaschen und anschließend mit einer geeigneten Konzentration eines für den Primärantikörper spezifischen Sekundärantikörpers (siehe 2.1.7) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Abkippen der Antikörperlösung wurden die Schnitte dreimal für 3 Minuten mit PBS gewaschen und die Zellkerne mit Hoechst 33258 (1:10000 in PBS) (Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland) gegengefärbt. Schließlich wurden die Schnitte mit Fluoromount Eindeckmedium (Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) überschichtet und über Nacht bei 4°C gelagert. Die mikroskopische Auswertung der Fluoreszenzfärbung erfolgte am nächsten Tag.

2.2.8.6 Fluoreszenzmarkierung von Antikörpern

Für die Fluoreszenzmarkierung von ungekoppelten Antikörpern wurden das Alexa Fluor® 488 Antibody Labeling Kit und das Alexa Fluor® 546 Antibody Labeling Kit (Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland) verwendet (siehe 2.1.4). Sämtliche Schritte erfolgten nach Herstellerangaben. Als Ausgangsmaterial für die Kopplungsreaktion wurden 100 µl Antikörper mit einer Konzentration von 1000 µg/ml eingesetzt.

2.2.8.7 Auswertung von immunhistochemischen- und Immunfluoreszenzfärbungen

Die Auswertung und Dokumentation von immunhistochemischen und Immunfluoreszenzfärbungen (siehe 2.2.8.5 und 2.2.8.6) erfolgte mit Hilfe des Licht- und Fluoreszenzmikroskops BZ-9000 (Keyence Deutschland GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland). Für die Nachbearbeitung der Bilder wurde die Software BZ-II Analyzer (Keyence Deutschland GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland) verwendet.

2.2.8.8 Modifizierter histologischer Aktivitätsindex

Zur histopathologischen Bestimmung des Entzündungsgrades von Lebergewebe wurden H&E-gefärbte Paraffinschnitte nach dem modifizierten histologischen Aktivitätsindex (mHAI-Score) (Ishak *et al.*, 1995) von einem Pathologen verblindet ausgewertet. Der mHAI-Score beschreibt auf einer Skala von 0-18 den Grad der periportalen oder periseptalen Grenzzonenhepatitis (Interface Hepatitis), der konfluierenden Nekrose, der Einzelzelluntergänge und der portalen Entzündung.

2.2.9 Bioinformatische Methoden

2.2.9.1 Generierung von Primersequenzen

Verwendete Primersequenzen (siehe 2.1.6) basieren auf den Genomsequenzen der ENSEMBL-Datenbank (Flicek *et al.*, 2014) und des Basic Local Alignment Search Tools (BLAST) (Altschul *et al.*, 1990). Die Berechnung der Schmelzpunkte sowie die Vorhersage möglicher Sekundärstrukturen erfolgte mit der Software PerlPrimer (Marshall, 2004) (siehe 2.1.16).

2.2.9.2 Analyse von Transkriptionsfaktorbindestellen

Die Analyse von Transkriptionsfaktorbindestellen *in silico* erfolgte innerhalb der ersten 1000 Basenpaare oberhalb des Transkriptionsstarts des murinen TREM1-Gens. Für die Berechnung der Transkriptionsfaktorbindestellen wurde die Software ALGGEN Promo (Farre *et al.*, 2003; Messeguer *et al.*, 2002) verwendet. Genabschnitte mit einem Score von über 90% wurden als signifikant angesehen.

2.2.9.3 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Versuchsergebnisse erfolgte mit dem Statistik- und Grafikprogramm GraphPad Prism 6.01 (siehe 2.1.16). Versuchsergebnisse mit einem p-Wert von $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) und $p < 0,0001$ (****) wurden als signifikant unterschiedlich erachtet. Die Signifikanzniveaus von normalverteilten Testgruppen wurden mittels t-Tests für ungepaarte Stichproben ermittelt. Zur Überprüfung von Stichproben aus nicht normalverteilten Gruppen wurde der Mann-Whitney-Test verwendet. Die Signifikanz in humanen Patientenkohorten wurde mittels einfaktorieller Varianzanalyse (one-way ANOVA) nach Kruskal-Wallis mit Dunn`s Multiple Comparison Test bestimmt. Die Darstellung der Messergebnisse erfolgte als Median oder Mittelwert \pm Standardfehler.

3. Ergebnisse

3.1 LCMV-Infektion von C57BL/6 Mäusen als Modellsystem für eine nicht-zytopathische akute virale Hepatitis

Um die Funktion von TREM1 im Verlauf einer viralen Hepatitis zu untersuchen, wurde zunächst ein virales Leberinfektionsmodell etabliert. Hierfür wurden C57BL/6 Mäuse mit LCMV WE infiziert und der Verlauf der LCMV-Infektion charakterisiert (siehe 3.1.1 - 3.1.3). Außerdem wurde das Lebergewebe von LCMV-infizierten C57BL/6 Mäusen histopathologisch untersucht (siehe 3.1.4) und die Serumtransaminasen-Werte im Blut der LCMV-infizierten Mäuse quantifiziert (siehe 3.1.5).

3.1.1 LCMV Z-RNA-Menge im Lebergewebe von LCMV-infizierten C57BL/6 Mäusen

Um die Viruslast im Lebergewebe von LCMV-infizierten Mäusen zu untersuchen, wurden C57BL/6 Mäuse mit $1 \cdot 10^6$ FFU LCMV WE i.v. infiziert und die LCMV Z-RNA-Menge 1, 4, 7, 9, 12, 15 und 18 Tage nach der Infektion mittels qPCR relativ quantifiziert (siehe Abb. 3.1).

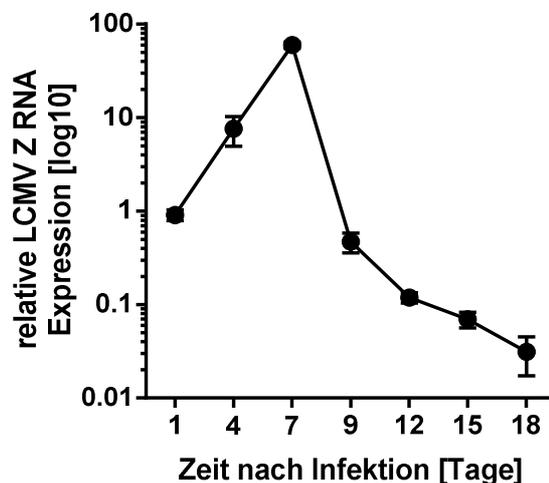


Abb. 3.1: Relative Quantifizierung der LCMV Z-RNA-Menge im Lebergewebe von C57BL/6 Mäusen 1, 4, 7, 9, 12, 15 und 18 Tage nach der Infektion mit $1 \cdot 10^6$ FFU LCMV WE (n=4).

Bereits einen Tag nach der Infektion ($0,906 \pm 0,1227$) war die LCMV Z-RNA im Lebergewebe der LCMV-infizierten Mäuse nachweisbar. Zwischen Tag 4 ($7,58 \pm 2,665$) und Tag 7 ($59,86 \pm 4,496$) kam es zu einem deutlichen Anstieg der Viruslast. Nach dem Erreichen des Höhepunkts der LCMV-Infektion an Tag 7 war an den Tagen 9 ($0,4678 \pm 0,116$), 12 ($0,1183 \pm 0,01484$), 15 ($0,06939 \pm 0,01303$) und 18 ($0,03113 \pm 0,01394$) ein

Rückgang der LCMV Z-RNA-Menge zu beobachten. In uninfizierten Mäusen war die LCMV Z-RNA nicht nachweisbar.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass es im Verlauf der LCMV-Infektion zu einer massiven Vermehrung des Virus im Lebergewebe der LCMV-infizierten C57BL/6 Mäuse kam.

3.1.2 LCMV-Proteinexpression im Lebergewebe von LCMV-infizierten C57BL/6 Mäusen

Um die Anzahl und Verteilung von Virus-infizierten Zellen im Lebergewebe der LCMV-infizierten C57BL/6 Mäuse zu charakterisieren, wurden Kryoschnitte aus dem Lebergewebe von C57BL/6 Mäusen 4, 7, 9, 12 und 15 Tage nach der Infektion mit $1 \cdot 10^6$ FFU LCMV WE angefertigt und immunhistochemisch auf die Expression des LCMV-Nukleoproteins (NP) untersucht (siehe Abb. 3.2).

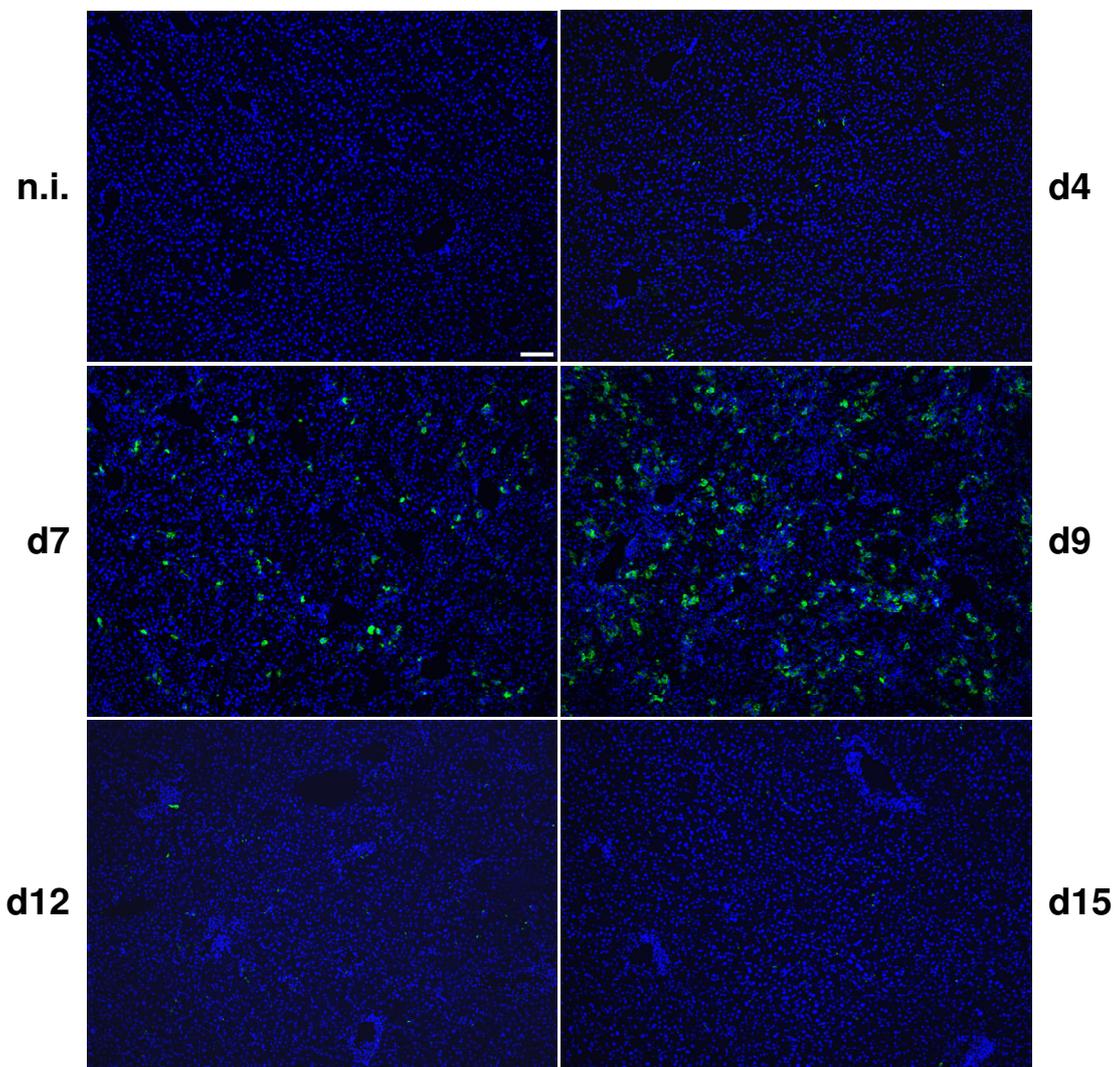


Abb. 3.2: Immunfluoreszenzfarbung von LCMV NP (Grün) in Kryoschnitten aus dem Lebergewebe von C57BL/6 Mäusen 4, 7, 9, 12 und 15 Tage nach der Infektion mit $1 \cdot 10^6$ FFU LCMV WE und uninfizierten Kontrolltieren (n.i. = uninfiziert, Skala = 100 μ m, Vergrößerung = 10x).

4 Tage nach der Infektion waren im Lebergewebe der LCMV-infizierten Mäuse vereinzelt Virus-infizierte Zellen entlang der Sinusoide nachweisbar. Zwischen Tag 7 und Tag 9 kam es zu einer diffusen Infektion von Hepatozyten, wohingegen an Tag 12 LCMV-infizierte Leberzellen nur sporadisch nachweisbar waren. Weder an Tag 15 noch in uninfizierten Kontrollen waren LCMV-infizierte Leberzellen zu beobachten.

Die Ergebnisse zeigen, dass es im Verlauf der LCMV-Infektion zu einer massiven Virusvermehrung in parenchymatischen Leberzellen kam.

3.1.3 LCMV-Infektion von primären Hepatozyten aus C57BL/6 Mäusen

Um die LCMV-Infektion von Hepatozyten zeit- und konzentrationsabhängig zu charakterisieren, wurden primäre Hepatozyten aus C57BL/6 Mäusen für 24, 48 und 72 Stunden mit einer MOI von 10, 1, 0,1 und 0,01 LCMV WE *in vitro* infiziert und die Expression des LCMV Nukleoproteins (NP) immunhistologisch bestimmt (siehe Abb. 3.3).

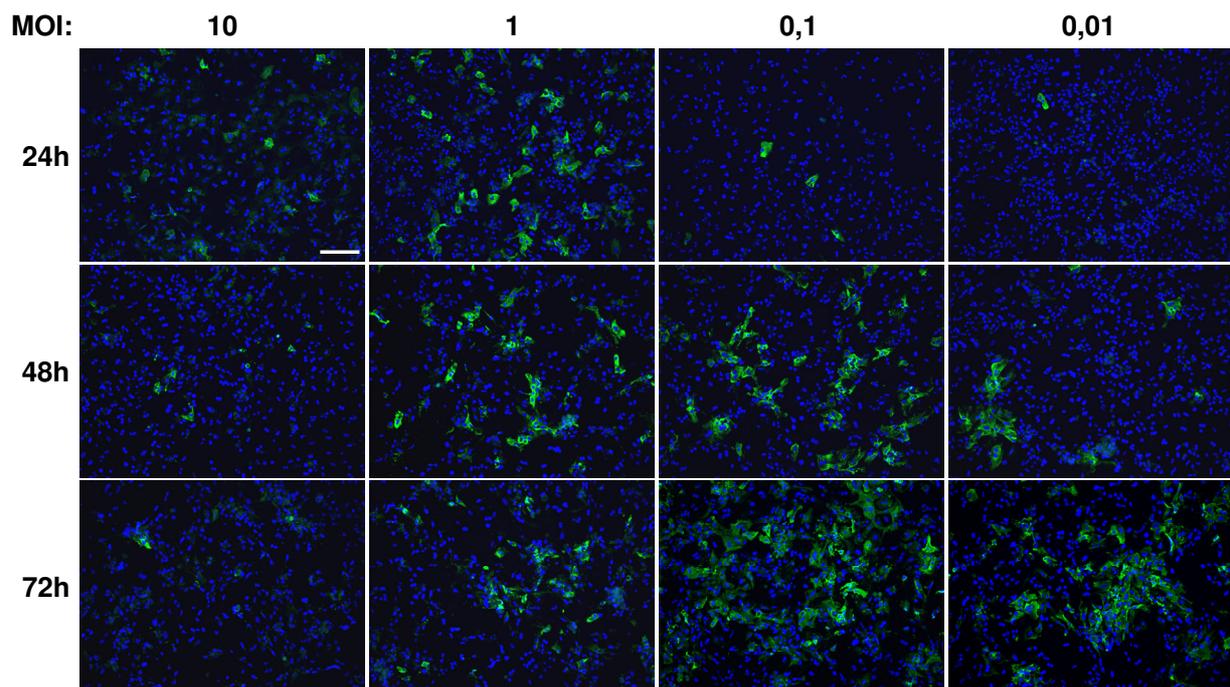


Abb. 3.3: Immunfluoreszenzfärbung der Expression von LCMV NP (Grün) in primären Hepatozyten aus C57BL/6 Mäusen 24, 48 und 72 Stunden nach der Infektion mit einer MOI von 10, 1, 0,1 und 0,01 LCMV WE (Skala = 200 μ m, Vergrößerung = 10x).

LCMV-infizierte primäre Hepatozyten waren sowohl nach der Infektion mit einer MOI von 10 als auch nach der Infektion mit 1, 0,1 oder 0,01 MOI LCMV WE *in vitro* nachweisbar. Während LCMV-infizierte primäre Hepatozyten nach der Infektion mit 10 oder 1 MOI LCMV WE bereits nach einer Infektionsdauer von 24 Stunden nachgewiesen werden

konnten, kam es in primären Hepatozyten, die mit einer MOI von 0,1 oder 0,01 MOI LCMV WE infiziert wurden, erst nach 48 oder 72 Stunden zu einer deutlich erhöhten Virusvermehrung.

Aus der Untersuchung geht hervor, dass sowohl die Viruskonzentration als auch die Infektionsdauer einen Einfluss auf die Anzahl der LCMV-infizierten primären Hepatozyten hatte.

3.1.4 Histopathologische Analyse von Lebergewebe aus LCMV-infizierten C57BL/6 Mäusen

Um zu untersuchen, ob es in LCMV-infizierten Mäusen zu einer pathologischen Veränderung des Lebergewebes kommt, wurden H&E-gefärbte Gewebeschnitte aus der Leber von LCMV-infizierten C57BL/6 Mäusen 9 Tage nach der Infektion mit $1 \cdot 10^6$ FFU LCMV WE angefertigt und histopathologisch untersucht (siehe Abb. 3.4).

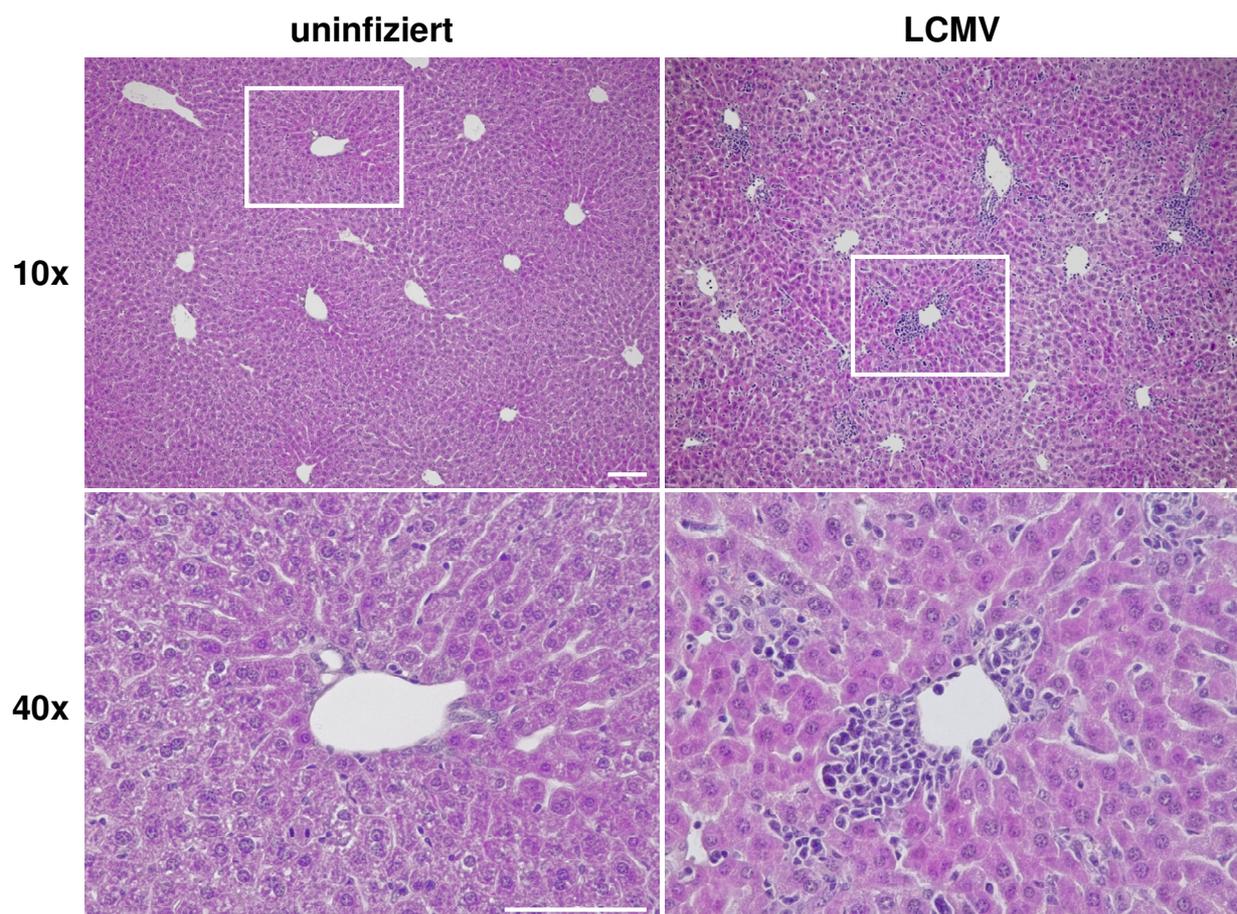


Abb. 3.4: H&E-Färbung von Lebergewebe aus C57BL/6 Mäusen 9 Tage nach der Infektion mit $1 \cdot 10^6$ FFU LCMV WE und uninfizierten Kontrolltieren (Skala = 100 μm).

Im Lebergewebe der LCMV-infizierten Mäuse waren massive Ansammlungen von Immunzellen und eine großflächige Schädigung des Lebergewebes nachweisbar. Es kam zu

zahlreichen Einzelzelluntergängen und konfluenten Nekrosen. Ansammlungen von infiltrierenden Leukozyten waren sowohl periportal als auch diffus im Lebergewebe verteilt. In uninfizierten Kontrollmäusen waren pathologische Veränderungen des Lebergewebes nicht nachweisbar.

Die Analyse zeigt, dass es im Verlauf der LCMV-Infektion sowohl zu einer Schädigung von parenchymatischen Leberzellen als auch zur Infiltration von Immunzellen in das Lebergewebe der LCMV-infizierten Mäuse kam.

3.1.5 Serumtransaminasen-Werte in LCMV-infizierten C57BL/6 Mäusen

Um die Schädigung des Lebergewebes in LCMV-infizierten Mäusen zu quantifizieren, wurde die Konzentration des Leberzell-spezifischen Enzyms Alanin-Aminotransferase (ALT) 1, 4, 7, 9, 12, 15 und 18 Tage nach der Infektion von C57BL/6 Mäusen mit $1 \cdot 10^6$ FFU LCMV im Blutplasma der infizierten Tiere ermittelt (siehe Abb. 3.5).

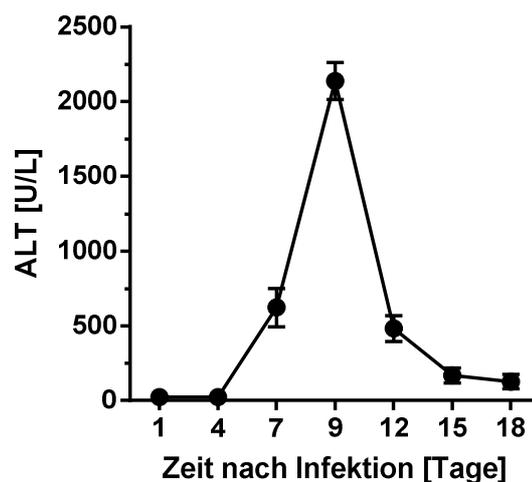


Abb. 3.5: Konzentration des Leberzell-spezifischen Enzyms Alanin-Aminotransferase (ALT) in Blutplasma aus C57BL/6 Mäusen 1, 4, 7, 9, 12, 15 und 18 Tage nach der Infektion mit $1 \cdot 10^6$ FFU LCMV WE (n=5-9).

Weder an Tag 1 (24 ± 0 U/L) noch an Tag 4 (24 ± 0 U/L) waren ALT-Werte oberhalb der Detektionsgrenze von 24 U/L im Blutplasma der LCMV-infizierten Mäuse nachweisbar. 7 Tage nach der Infektion kam es zu einem deutlichen Anstieg der ALT-Werte ($621,7 \pm 127,5$ U/L). Im Gegensatz zu Tag 9 ($2138 \pm 124,4$ U/L), an dem sich die Zunahme der ALT-Werte weiter fortsetzte, war an den Tagen 12 ($482 \pm 86,97$ U/L), 15 ($168 \pm 50,93$ U/L) und 18 ($125,3 \pm 48,04$ U/L) ein Rückgang der ALT-Werte festzustellen.

Die Analyse weist darauf hin, dass es im Verlauf der LCMV-Infektion zu einer akuten Schädigung des Lebergewebes kam.

3.2 Rolle und Funktion von TREM1 in LCMV-infizierten Mäusen

Um die Rolle und Funktion von TREM1 im Verlauf einer akuten viralen Hepatitis zu untersuchen, wurden C57BL/6 Mäuse mit LCMV WE infiziert und die Expression von TREM1 und des TREM1 Signal-Adapterproteins DAP12 im Lebergewebe der LCMV-infizierten Mäuse analysiert (siehe 3.2.1 - 3.2.7). Darüber hinaus wurde der Einfluss von TREM1 auf den Infektionsverlauf in LCMV-infizierten TREM1 $-/-$ und TREM1 $+/+$ Mäusen untersucht (3.2.8 - 3.2.10) und die Leberschädigung in LCMV-infizierten TREM1 $-/-$ und TREM1 $+/+$ Mäusen quantifiziert (siehe 3.2.11 - 3.2.12). Außerdem wurde der Einfluss von TREM1 auf die Aktivierung von TREM1 $-/-$ und TREM1 $+/+$ LCMV-spezifischen CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen analysiert (siehe 3.2.13 – 3.2.14) und TREM1-exprimierende Zellen funktionell charakterisiert (siehe 3.2.15 - 3.2.30).

3.2.1 TREM1-Proteinexpression im Lebergewebe von C57BL/6 Mäusen

TREM1 besitzt eine Masse von 30 kDa (Bouchon *et al.*, 2000). Um zu untersuchen, ob TREM1 in der Leber von naiven C57BL/6 Mäusen exprimiert wird, wurden Leberlysate aus unbehandelten C57BL/6 Mäusen angefertigt und mittels Western-Blot-Analyse auf die Expression von TREM1 analysiert (siehe Abb. 3.6).

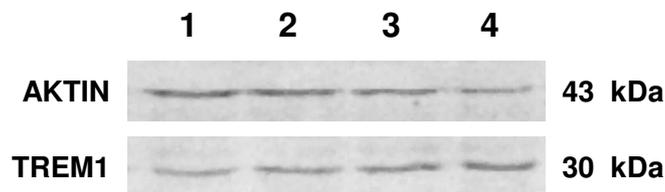


Abb. 3.6: Western-Blot-Analyse der TREM1-Proteinexpression im Lebergewebe von C57BL/6 Mäusen (n=4).

In den Leberlysaten konnte eine Bande mit einer Größe von 30 kDa ermittelt werden. Da TREM1 eine molekulare Masse von 30 kDa besitzt, lassen die Ergebnisse vermuten, dass TREM1 im Lebergewebe von naiven C57BL/6 Mäuse konstitutiv exprimiert wird.

3.2.2 Transkriptionsfaktorbindestellen im Promoter des *Trem1*-Gens in *Mus musculus*

Um zu untersuchen, ob die Expression von TREM1 durch aktivierende oder antivirale Transkriptionsfaktoren induziert werden kann, wurde der Promotor des *Trem1*-Gens in *Mus musculus* 1-1000 Basenpaare oberhalb des Transkriptionsstarts auf konservierte Transkriptionsfaktorbindestellen untersucht (siehe Abb. 3.7).

```

-1000                                     AP-1                                     -901
GGGGATGGAGTGTGTGTGGGGAGATGGAATGTGTGTGGGGGAAGGGAATGTGTCTGAGGTAGTGTCTGAGTCAGGGTTTCTATTCTGCACAAACATCAT
                                     AP-1
-900                                     -801
GGCCAAAAGCAAGTTGGGGAGGAAAGGGTTTATTTGGCTTACACTTCCATACTGCTGTTTCATACCAAGGAAGTCAGGACTGGAATTAAGCAGGTCAG

-800                                     -701
GAAACAGGAGCTGATGCAGAGGCCATGGAGGGGAAGTTCCTACTGGCTTGCTTCCCTGGCTTGGCTCAGCCTGCTCTTAAGAACCAAGATTACCAGCC
                                     NF-kappaB
-700                                     -601
CAGAGATGGTCCCACCTACAAGGGCCTTTCCACCTTGATCACTAATTGAGAAAATGCCTTACAGTTGGATCTCATGGAGGCATTTCTCAACTGAAGCT

-600                                     -501
CCTTTTTCTGTGATAACTCCAGCTGTGTCAAGTTGACACAAAAGCTAGCCTGTACAGGTAGGGACCACAGGGAGAAAGAAGAGAGAGGGGTCATCAGCCTG

-500                                     -401
AGGCAGGATGCATCATGAGCAAGTGCCAAGAAAAGCTTGCCCTGAAGACAGACAGTTACAGCAGAAGCAGCCAGGCAGGACCGAATGGCAAGGAACTT

-400                                     -301
TGGCTGGGAAATAGCGAAATAGCATAGAGGGTTAAAAAATGTGAATATCTGCCAGTTCTAGTGCTTTAAAGCTTGTGGAAAGATCCAACAGGCCCTCTG
                                     NF-kappaB
-300                                     -201
TCTCAATTACTCAGGAGCTAAATGGGCTGGGGTAGGGTGGGGTGGCGATTCTACCCATCCCCCTCCACAAAATTATTACAATACAAAAGAAAATAATTT

-200                                     -101
TTCAGAGAAGAGGAAACTGAGGTCCAAGAGCTTTAACTGAGGTTTGAGCACAGTCCCCTGAACTTCTTACTGATGTCAGCCCGCAGGGTGGCCAGTGA
                                     STAT1
-100                                     -1
CAGTACCTTACCTCCCAGGAATGGCCTCACATCCTGTTGTGAAACTTTCCAGAGAGTCTGGGTACAAGGGTGTCTTCTAGCTGTCCCAGCAGCCACAGA

```

Abb. 3.7: *In silico* Analyse von hochkonservierten Transkriptionsfaktorbindestellen im Promotor des *Trem1*-Gens in *Mus musculus* 1-1000 Basenpaare oberhalb des Transkriptionsstarts (STAT1: -201 bp → -192 bp; NF-kappaB: -395 bp → -386 bp; NF-kappaB: -771 bp → -762 bp; AP-1: -934 bp → -924 bp; AP-1: -936 bp → -928 bp).

Im Promotor des murinen *Trem1*-Gens konnten mehrere hochkonservierte Transkriptionsfaktorbindestellen nachgewiesen werden. So zeigten sich mögliche Sequenzmotive für STAT1 (-201 bp → -192 bp), NF-kappaB (-395 bp → -386 bp; -771 bp → -762 bp) und AP-1 (-934 bp → -924 bp; -936 bp → -928 bp).

Die Analyse deutet darauf hin, dass die Expression des *Trem1*-Gens in *Mus musculus* durch aktivierende und antivirale Transkriptionsfaktoren induziert werden kann.

3.2.3 TREM1-RNA-Expression im Lebergewebe von TLR-Liganden-behandelten C57BL/6 Mäusen

In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass die Expression von TREM1 durch TLR-Liganden stimuliert werden kann (Bleharski *et al.*, 2003). Um zu untersuchen, ob die Expression von TREM1 im Lebergewebe von C57BL/6 Mäusen durch bakterielle (LPS) oder virale (Poly[I:C]) TLR-Liganden induziert werden kann, wurde die TREM1-RNA-Expression im Lebergewebe von C57BL/6 Mäusen 24 Stunden nach der Stimulation mit LPS (20 µg/Maus) und Poly(I:C) (200 µg/Maus) relativ quantifiziert (siehe Abb. 3.8).

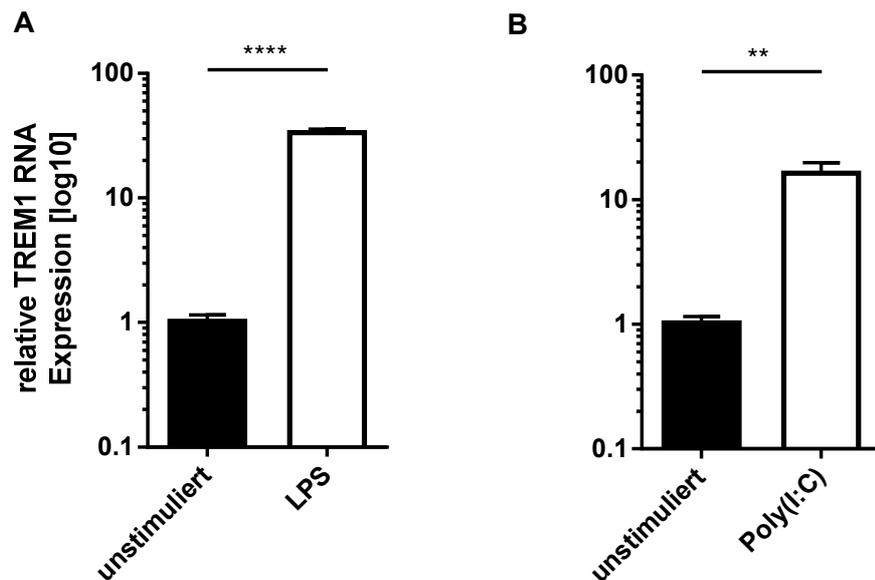


Abb. 3.8: Relative TREM1-Genexpression im Lebergewebe von C57BL/6 Mäusen 24 Stunden nach der Behandlung mit (A) LPS (20 µg/Maus) und (B) Poly(I:C) (200 µg/Maus) ((A) n=4, ****p=0,0001; (B) n=4-6, **p=0,0069).

So konnte gezeigt werden, dass die TREM1-RNA-Expression sowohl in LPS-behandelten Mäusen (unstimuliert: $1,026 \pm 0,1241$ vs. LPS: $33,30 \pm 2,375$; ****p=0,0001) als auch in Poly(I:C)-behandelten Mäusen (unstimuliert: $1,026 \pm 0,1241$ vs. Poly[I:C]: $16,39 \pm 3,409$; **p=0,0069) signifikant höher war, als in unbehandelten Kontrolltieren.

Aus der Analyse geht hervor, dass die Expression von TREM1 im Lebergewebe der C57BL/6 Mäuse sowohl durch virale als auch durch bakterielle TLR-Liganden induziert werden konnte.

3.2.4 sTREM1-Freisetzung in TLR-Liganden-behandelten C57BL/6 Mäusen

sTREM1 ist ein Entzündungsmarker, der nach der Aktivierung von TREM1-exprimierenden Zellen freigesetzt wird und erhöht im Blut von Pneumonie-Patienten vorliegt (Gibot *et al.*, 2004a; Gingras *et al.*, 2002; Gomez-Pina *et al.*, 2007). Um die Freisetzung von sTREM1 in C57BL/6 Mäusen nach der Behandlung mit bakteriellen und viralen TLR-Liganden zu untersuchen, wurde die sTREM1-Konzentration im Blut von C57BL/6 Mäusen 24 Stunden nach der Behandlung mit LPS (20 µg/Maus) und Poly(I:C) (200 µg/Maus) mittels ELISA bestimmt (siehe Abb. 3.9).

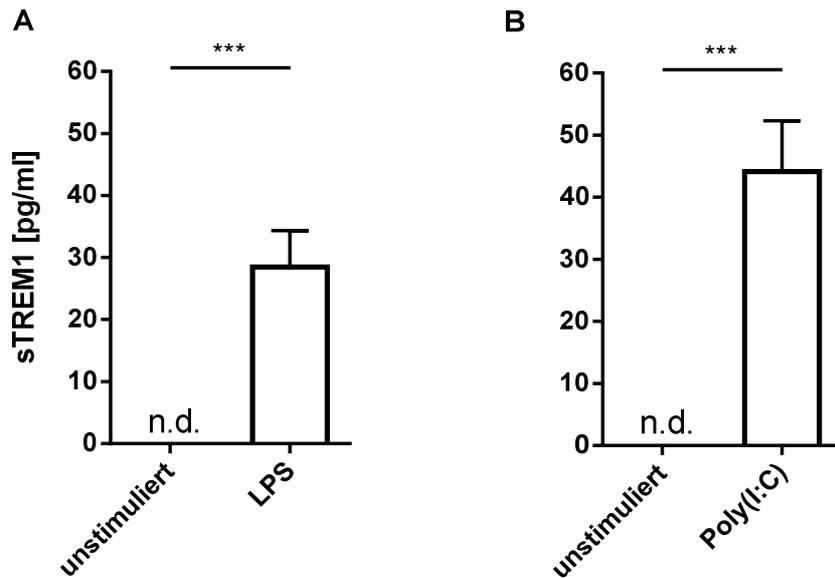


Abb. 3.9: sTREM1-Konzentration im Blut von C57BL/6 Mäusen 24 Stunden nach der Behandlung mit (A) LPS (20 µg/Maus) und (B) Poly(I:C) (200 µg/Maus) ((A) n=8, ***p=0,0003; (B) n=8-9, ***p=0,0001) (n.d.=nicht nachweisbar).

Sowohl in LPS-behandelten (unstimuliert: $0,0 \pm 0,0$ vs. LPS: $28,49 \pm 5,871$; ***p=0,0003) als auch in Poly(I:C)-behandelten C57BL/6 Mäusen (unstimuliert: $0,0 \pm 0,0$ vs. Poly[I:C]: $44,12 \pm 8,193$; ***p=0,0001) war 24 Stunden nach der TLR-Stimulation die Freisetzung von sTREM1 signifikant erhöht. In naiven C57BL/6 Mäusen war die Sekretion von sTREM1 nicht nachweisbar.

Aus der Analyse geht hervor, dass die Freisetzung von sTREM1 in C57BL/6 Mäusen sowohl durch virale als auch durch bakterielle TLR-Liganden induziert werden konnte.

3.2.5 TREM1-RNA-Expression im Lebergewebe von LCMV-infizierten C57BL/6 Mäusen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass TREM1 in der Leber von naiven C57BL/6 Mäusen konstitutiv exprimiert wird (siehe 3.2.1) und im Lebergewebe von Poly(I:C)-behandelten Mäusen eine signifikant erhöhte TREM1 Genexpression nachgewiesen werden konnte (siehe 3.2.3), sollte die TREM1-Expression in der Leber von LCMV-infizierten Mäusen charakterisiert werden. Hierfür wurden C57BL/6 Mäuse mit $1 \cdot 10^6$ FFU LCMV WE i.v. infiziert und die Expression der TREM1-RNA im Lebergewebe der LCMV-infizierten Mäuse 1, 4, 7, 9, 12, 15 und 18 Tage nach der Infektion relativ quantifiziert (siehe Abb. 3.10).

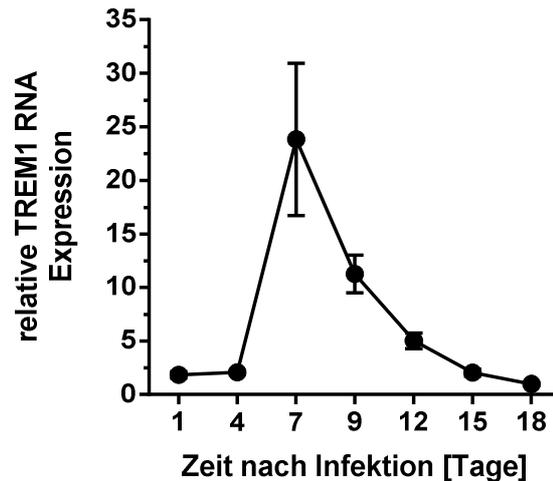


Abb. 3.10: Relative TREM1-Genexpression im Lebergewebe von C57BL/6 Mäusen 1, 4, 7, 9, 12, 15 und 18 Tage nach der Infektion mit $1 \cdot 10^6$ FFU LCMV WE (n=4-9).

Während im Lebergewebe der LCMV-infizierten Mäuse an Tag 1 ($1,845 \pm 0,2920$) und an Tag 4 ($2,069 \pm 0,1843$) nur eine geringe Expression der TREM1-RNA nachgewiesen werden konnte, war an Tag 7 ($33,94 \pm 7,110$) ein deutlicher Anstieg der TREM1-Expression nachweisbar. Nach dem Höhepunkt der TREM1-Expression an Tag 7 kam es an den Tagen 9 ($16,03 \pm 1,769$), 12 ($7,14 \pm 0,7516$), 15 ($2,91 \pm 0,3322$) und 18 ($1,39 \pm 0,1460$) zu einem Rückgang der TREM1-RNA-Expression. 18 Tage nach der Infektion befand sich die TREM1-RNA-Expression auf der Höhe des TREM1-Genexpressionsniveaus von Tag 1.

Aus der Untersuchung geht hervor, dass es im Verlauf der LCMV-Infektion zu einem signifikanten Anstieg der TREM1-RNA-Expression im Lebergewebe der LCMV-infizierten Mäuse kam.

3.2.6 DAP12-RNA-Expression im Lebergewebe von LCMV-infizierten C57BL/6 Mäusen

TREM1 besitzt keine Signaldomäne und ist für die Signalweiterleitung auf die Interaktion mit dem ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) Signal-Adapterprotein DAP12 angewiesen (Tessarz und Cerwenka, 2008). Um die DAP12-Expression in der Leber von LCMV-infizierten Mäusen zu untersuchen, wurden C57BL/6 Mäuse mit $1 \cdot 10^6$ FFU LCMV WE i.v. infiziert und die DAP12-Expression 1, 4, 7, 9, 12, 15 und 18 Tage nach der Infektion relativ quantifiziert (siehe Abb. 3.11).

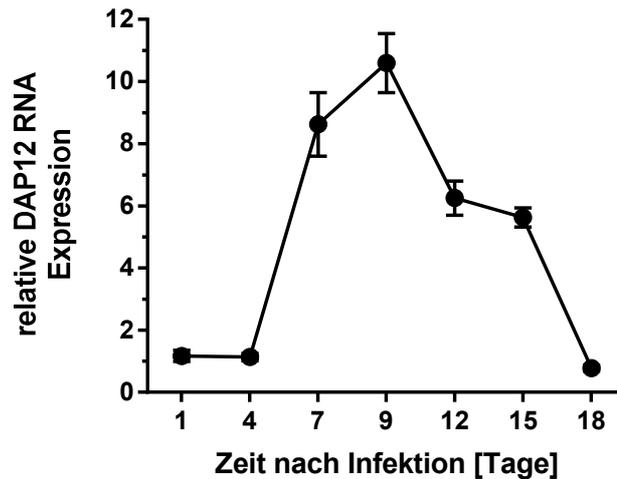


Abb. 3.11: Relative DAP12-RNA-Expression im Lebergewebe von C57BL/6 Mäusen 1, 4, 7, 9, 12, 15 und 18 Tage nach der Infektion mit $1 \cdot 10^6$ FFU LCMV WE (n=4).

Zwischen Tag 1 ($1,173 \pm 0,1795$) und Tag 4 ($1,132 \pm 0,1199$) war im Lebergewebe der LCMV-infizierten Mäuse eine geringe Expression der DAP12-RNA nachweisbar. 7 Tage ($8,62 \pm 1,023$) nach der Infektion kam es zu einem starken Anstieg der DAP12-RNA-Expression, der sich an Tag 9 ($10,56 \pm 0,9497$) weiter fortsetzte. Im Gegensatz hierzu war an den Tagen 12 ($6,24 \pm 0,5509$), 15 ($5,63 \pm 0,3098$) und 18 ($0,76 \pm 0,0930$) ein Rückgang der DAP12-RNA-Expression zu beobachten. 18 Tage nach der Infektion befand sich die DAP12-RNA-Expression auf der gleichen Höhe wie an Tag 1.

Die Untersuchung zeigt, dass es im Verlauf der LCMV-Infektion zu einer signifikant erhöhten DAP12-RNA-Expression im Lebergewebe der LCMV-infizierten Mäuse kam.

3.2.7 sTREM1-Freisetzung in LCMV-infizierten C57BL/6 Mäusen

Nachdem in LCMV-infizierten Mäusen eine signifikant erhöhte TREM1-RNA-Expression nachgewiesen werden konnte (siehe 3.2.5) und es in LPS- und Poly(I:C)-behandelten Mäusen zu einer signifikant erhöhten Freisetzung der löslichen TREM1-Rezeptorvariante sTREM1 kam (siehe 3.2.4), sollte die sTREM1-Freisetzung in LCMV-infizierten Mäusen quantifiziert werden. Hierfür wurden C57BL/6 Mäuse mit $1 \cdot 10^6$ FFU LCMV WE i.v. infiziert und die sTREM1-Konzentration 1, 4, 7, 9, 12, 15 und 18 Tage nach der Infektion sowohl im Blut als auch im Urin der LCMV-infizierten Mäuse bestimmt (siehe Abb. 3.12).

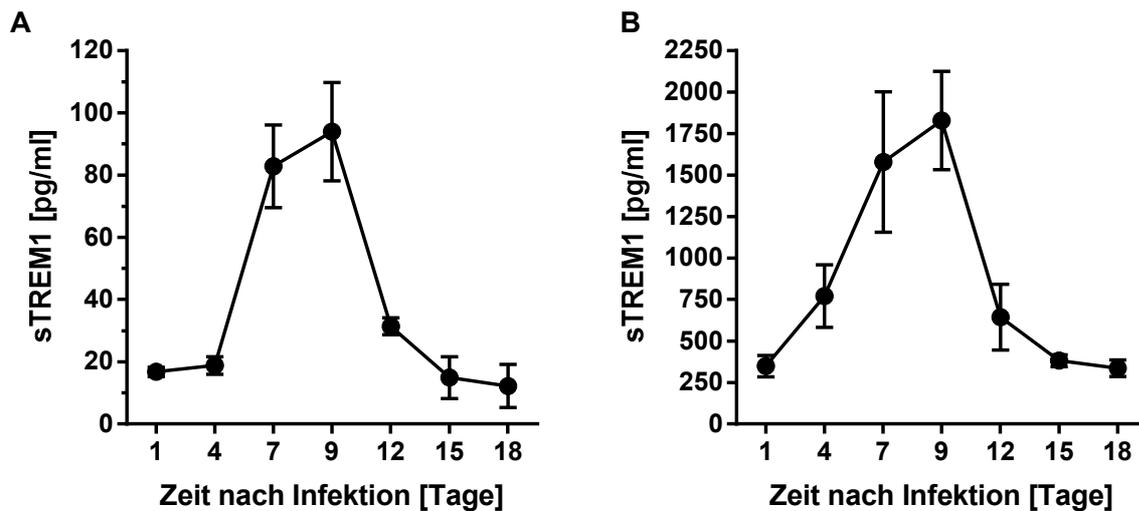


Abb. 3.12: sTREM1-Konzentration in (A) Blutplasma und (B) Urin aus C57BL/6 Mäusen 1, 4, 7, 9, 12, 15 und 18 Tage nach der Infektion mit $1 \cdot 10^6$ FFU LCMV WE (n=4-9).

Bereits 1 Tag nach der Infektion war die Freisetzung von sTREM1 sowohl im Blut als auch im Urin der LCMV-infizierten Mäuse nachweisbar (Blutplasma: 16,73 pg/ml; Urin: 349,37 pg/ml). Zwischen Tag 4 (Blutplasma: 18,87 pg/ml; Urin: 772,16 pg/ml) und Tag 7 (Blutplasma: 82,8 pg/ml; Urin: 1578,76 pg/ml) kam es zu einem starken Anstieg der sTREM1-Konzentration. Nach dem Höhepunkt der sTREM1-Sekretion an Tag 9 (Blutplasma: 93,96 pg/ml; Urin: 1828,03 pg/ml) war an den Tagen 12 (Blutplasma: 31,38 pg/ml; Urin: 644,117 pg/ml), 15 (Blutplasma: 14,91 pg/ml; Urin: 381,378 pg/ml) und 18 (Blutplasma: 12,266 pg/ml; Urin: 336,985 pg/ml) ein Rückgang der sTREM1-Freisetzung zu beobachten. Die Analysen zeigen, dass es im Verlauf der LCMV-Infektion zu einem deutlichen Anstieg der sTREM1 Konzentration im Blut und im Urin der LCMV-infizierten Mäuse kam.

3.2.8 LCMV Z-RNA-Menge im Lebergewebe von LCMV-infizierten TREM1^{-/-} und TREM1^{+/+} Mäusen

Vorarbeiten deuten auf eine entzündungsfördernde Wirkung von TREM1 bei bakteriellen, fungalen und autoimmunen Erkrankungen hin (Bouchon *et al.*, 2001; Buckland *et al.*, 2011; Bucova *et al.*, 2012). Um den Einfluss von TREM1 auf den Infektionsverlauf in der Leber von LCMV-infizierten Mäusen zu untersuchen, wurden TREM1^{-/-} und TREM1^{+/+} Mäuse für 4, 7, 9 und 12 Tage mit $1 \cdot 10^6$ FFU LCMV WE infiziert und die Viruslast im Lebergewebe der LCMV-infizierten TREM1^{-/-} und TREM1^{+/+} Mäuse relativ quantifiziert (siehe Abb. 3.13). Sowohl in LCMV-infizierten TREM1^{-/-} Mäusen als auch in LCMV-infizierten TREM1^{+/+} Mäusen konnte zwischen Tag 4 und Tag 7 ein Anstieg der Viruslast in der Leber nachgewiesen werden. An den Tagen 9 und 12 kam es in beiden Mausgruppen zu einem

Rückgang der LCMV Z-RNA-Menge. Im Vergleich zu der Kontrollgruppe war die Viruslast in TREM1 $-/-$ Mäusen an Tag 4 (TREM1 $+/+$: 1,5447; TREM1 $-/-$: 0,9967; $p=0,1108$) und an Tag 7 (TREM1 $+/+$: 9,8721; TREM1 $-/-$: 3,2351; $p=0,2597$) tendenziell erhöht. An Tag 9 (TREM1 $+/+$: 1,1030; TREM1 $-/-$: 0,0350; $*p=0,0312$) und an Tag 12 (TREM1 $+/+$: 0,0069; TREM1 $-/-$: 0,0289; $*p=0,0308$) war in TREM1 $-/-$ Mäusen eine signifikant verringerte Viruslast nachweisbar.

Die Analyse deutet darauf hin, dass es im Lebergewebe der LCMV-infizierten TREM1 $-/-$ Mäusen zu einer signifikant schnelleren Elimination des Virus kam als in LCMV-infizierten TREM1 $+/+$ Mäusen.

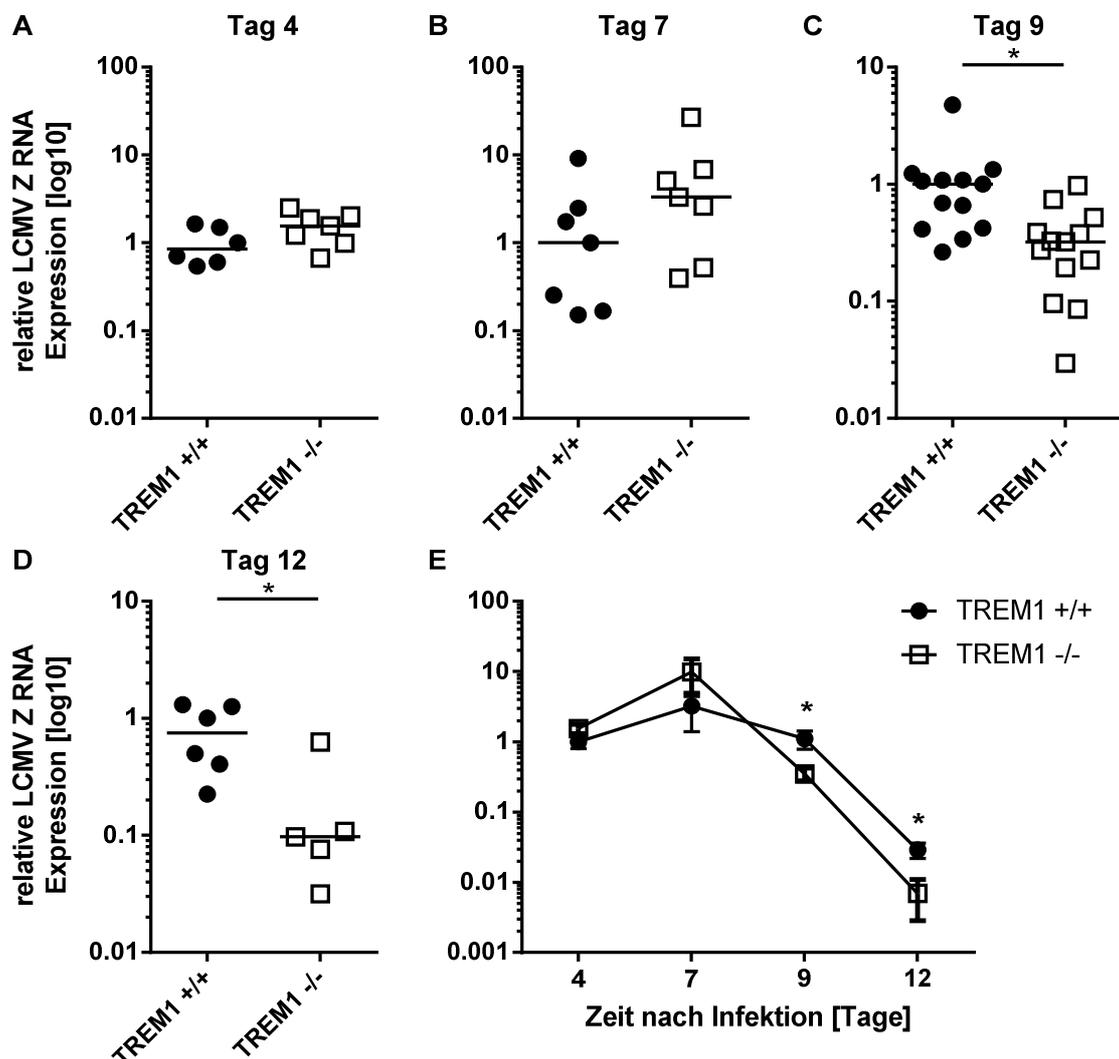


Abb. 3.13: Relative Quantifizierung der LCMV Z-RNA-Menge im Lebergewebe von TREM1 $-/-$ und TREM1 $+/+$ Mäusen (A) 4, (B) 7, (C) 9 und (D) 12 Tage nach der der Infektion mit $1 \cdot 10^6$ FFU LCMV WE. (E) Kinetik der LCMV Z-RNA-Menge im Lebergewebe von TREM1 $-/-$ und TREM1 $+/+$ Mäusen 4-12 Tage nach der Infektion mit $1 \cdot 10^6$ FFU LCMV WE ((A) $n=6-7$; $p=0,1108$ (B) $n=7$; $p=0,2597$ (C) $n=13$; $*p=0,0312$ (D) $n=5-6$; $*p=0,0308$ (E) $n=4-13$; $*p \leq 0,05$).

3.2.9 LCMV FFU in der Leber von LCMV-infizierten TREM1 $-/-$ und TREM1 $+/+$ Mäusen

Um einem möglichen Einfluss von TREM1 auf die Anzahl der infektiösen Viruspartikel im Lebergewebe der LCMV-infizierten Mäuse zu untersuchen, wurden TREM1 $-/-$ und TREM1 $+/+$ Mäuse für 4, 7, 9 und 12 Tage mit $1 \cdot 10^6$ FFU LCMV WE infiziert und die Anzahl der Focus Forming Units (FFU) mittels Focus Forming Assay ermittelt (siehe Abb. 3.14).

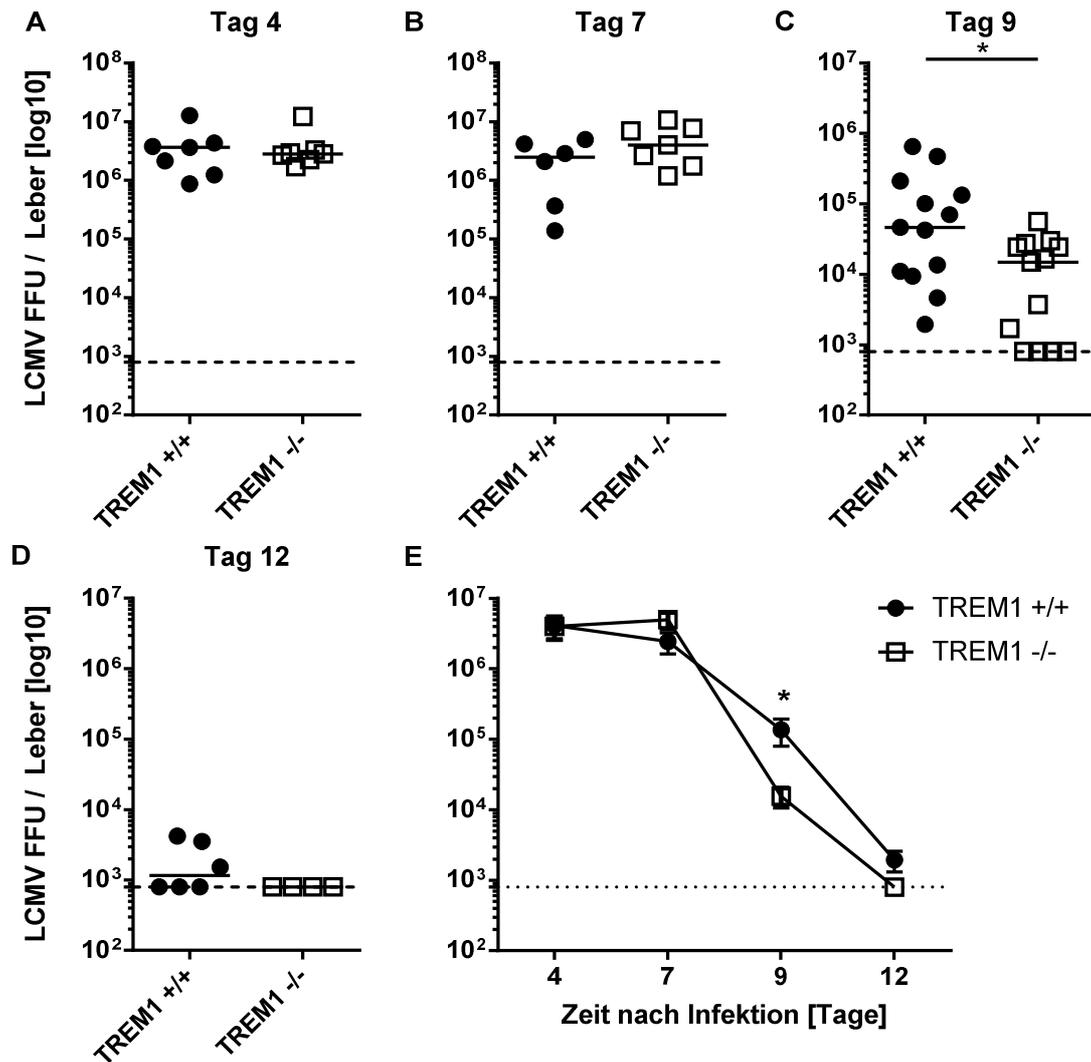


Abb. 3.14: LCMV Focus Forming Units (FFU) im Lebergewebe von TREM1 $-/-$ und TREM1 $+/+$ Mäusen (A) 4, (B) 7, (C) 9 und (D) 12 Tage nach der Infektion mit $1 \cdot 10^6$ FFU LCMV WE. (E) Kinetik der Focus Forming Units (FFU) im Lebergewebe von TREM1 $-/-$ und TREM1 $+/+$ Mäusen 4-12 Tage nach der Infektion mit $1 \cdot 10^6$ FFU LCMV WE ((A) $n=7$; $p=0,9563$ (B) $n=6-7$; $p=0,1435$ (C) $n=13$; $*p=0,0425$ (D) $n=4-6$; $p=0,1816$ (E) $n=4-13$; $*p \leq 0,05$; \cdots =Detektionsgrenze).

Sowohl in TREM1 $-/-$ als auch in TREM1 $+/+$ Mäusen waren an Tag 4 und an Tag 7 hohe Virustiter im Lebergewebe der infizierten Mäuse nachweisbar. Zwischen Tag 7 und Tag 12 kam es zu einer verringerten Anzahl der LCMV FFU/Leber. Weder an Tag 4 (TREM1 $+/+$: $3,6 \cdot 10^6$ FFU; TREM1 $-/-$: $2,8 \cdot 10^6$ FFU; $p=0,9563$) noch an Tag 7 (TREM1 $+/+$: $2,49 \cdot 10^6$;

TREM1 $-/-$: $4,0 \cdot 10^6$ FFU; $p=0,1435$) waren signifikante Unterschiede in der Höhe der Virustiter zwischen den beiden Mausgruppen zu beobachten. Im Gegensatz hierzu war in den TREM1 $-/-$ Mäusen an Tag 9 eine signifikant verringerte Viruslast nachweisbar (TREM1 $+/+$: $4,6 \cdot 10^4$ FFU; TREM1 $-/-$: $1,4 \cdot 10^4$ FFU; $*p=0,0425$). Sowohl in TREM1 $-/-$ als auch in TREM1 $+/+$ Mäusen näherte sich die Viruskonzentration an Tag 12 (TREM1 $+/+$: 1162 FFU; TREM1 $-/-$: 800 FFU; $p=0,1816$) der Detektionsgrenze von 800 FFU/Leber an. Die Befunde zeigen, dass es im Lebergewebe der LCMV-infizierten TREM1 $-/-$ Mäusen zu einer signifikant schnelleren Klärung von infektiösen Viruspartikeln kam als in LCMV-infizierten TREM1 $+/+$ Mäusen.

3.2.10 Histologische Analyse der LCMV-Proteinexpression im Lebergewebe von LCMV-infizierten TREM1 $-/-$ und TREM1 $+/+$ Mäusen

Um den Einfluss der TREM1-Expression auf die Anzahl und Verteilung von LCMV-infizierten Leberzellen zu untersuchen, wurden Kryoschnitte aus dem Lebergewebe von LCMV-infizierten TREM1 $-/-$ und TREM1 $+/+$ Mäusen 9 Tage nach der Infektion mit $1 \cdot 10^6$ FFU LCMV WE angefertigt und die Expression von LCMV NP immunhistochemisch analysiert (siehe Abb. 3.15)

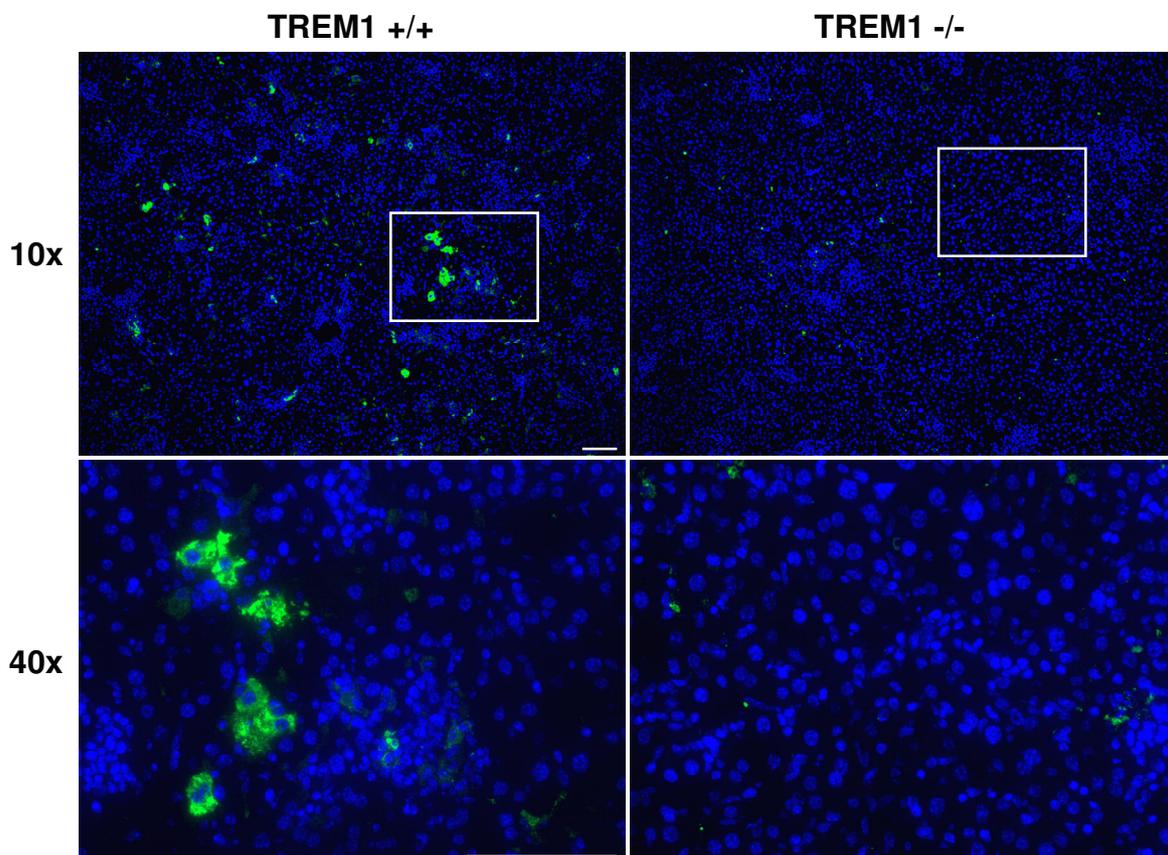


Abb. 3.15: Immunfluoreszenzfärbung der LCMV NP-Expression (Grün) im Lebergewebe von TREM1 $-/-$ und TREM1 $+/+$ Mäusen 9 Tage nach der Infektion mit $1 \cdot 10^6$ FFU LCMV WE (Skala = 100 μ m).

Während in LCMV-infizierten TREM1 +/+ Mäusen Gruppen von LCMV-infizierten Hepatozyten diffus verteilt im Lebergewebe nachweisbar waren, konnten in LCMV-infizierten TREM1 -/- Mäusen, LCMV-infizierte Leberzellen nicht oder nur vereinzelt beobachtet werden. LCMV+ Zelltrümmer waren sowohl in TREM1 -/- als auch in TREM1 +/+ Mäusen zu ermitteln.

Aus der Untersuchung geht hervor, dass es im Lebergewebe der LCMV-infizierten TREM1 -/- Mäuse zu einer signifikant schnelleren Elimination von Virus-infizierten parenchymatischen Leberzellen kam als in LCMV-infizierten TREM1 +/+ Mäusen.

3.2.11 Histopathologische Analyse der Leberschädigung in LCMV-infizierten TREM1 -/- und TREM1 +/+ Mäusen

Um den Grad der Leberschädigung in LCMV-infizierten TREM1 -/- und TREM1 +/+ Mäusen zu untersuchen, wurden H&E-gefärbte Leberschnitte aus TREM1 -/- und TREM1 +/+ Mäusen 4, 7, 9 und 12 Tage nach der Infektion mit $1 \cdot 10^6$ FFU LCMV WE angefertigt und histopathologisch analysiert (siehe Abb. 3.16).

Sowohl in TREM1 -/- als auch in TREM1 +/+ Mäusen kam es im Verlauf der LCMV-Infektion neben einer Schädigung des Lebergewebes zu einer Infiltration von Immunzellen in das Leberparenchym.

An Tag 4 nach der Infektion waren im Lebergewebe von TREM1 -/- und TREM1 +/+ Mäusen vereinzelte Einzelzelluntergänge nachweisbar (mHAI TREM1 +/+ 1 vs. mHAI TREM1 -/- 1; $p=0,3536$). An Tag 7 konnten sowohl in TREM1 -/- als auch in TREM1 +/+ Mäusen eine vermehrte Anzahl von Einzelzellnekrosen und eine periportale Interface-Hepatitis beobachtet werden (mHAI TREM1 +/+ 9 vs. mHAI TREM1 -/- 8; $p=0,4011$). An Tag 9 war sowohl in TREM1 -/- als auch in TREM1 +/+ Mäusen eine hohe Anzahl von Einzelzellnekrosen und eine periportale Interface Hepatitis festzustellen. Im Vergleich zu der Entzündung in TREM1 +/+ Mäusen war der Grad der Leberschädigung in TREM1 -/- Mäusen tendenziell verringert (mHAI TREM1 +/+ 9 vs. mHAI TREM1 -/- 7,5; $p=0,4550$). Vereinzelt kam es im Lebergewebe zu extramedullärer Hämatopoese. Sowohl in TREM1 -/- als auch in TREM1 +/+ Mäusen zeigten sich 9 Tage nach der Infektion steatotische Fetteinlagerungen. An Tag 12 war der Grad der Leberschädigung in TREM1 -/- Mäusen signifikant verringert (mHAI TREM1 +/+ 8 vs. mHAI TREM1 -/- 6; $*p=0,0398$). Eine Leberfibrose war weder in TREM1 -/- noch in TREM1 +/+ Mäusen zu beobachten.

Die Ergebnisse zeigen, dass es LCMV-infizierten TREM1 -/- Mäusen zu einer signifikant verringerten pathologischen Schädigung des Lebergewebes kam als in LCMV-infizierten TREM1 +/+ Mäusen.

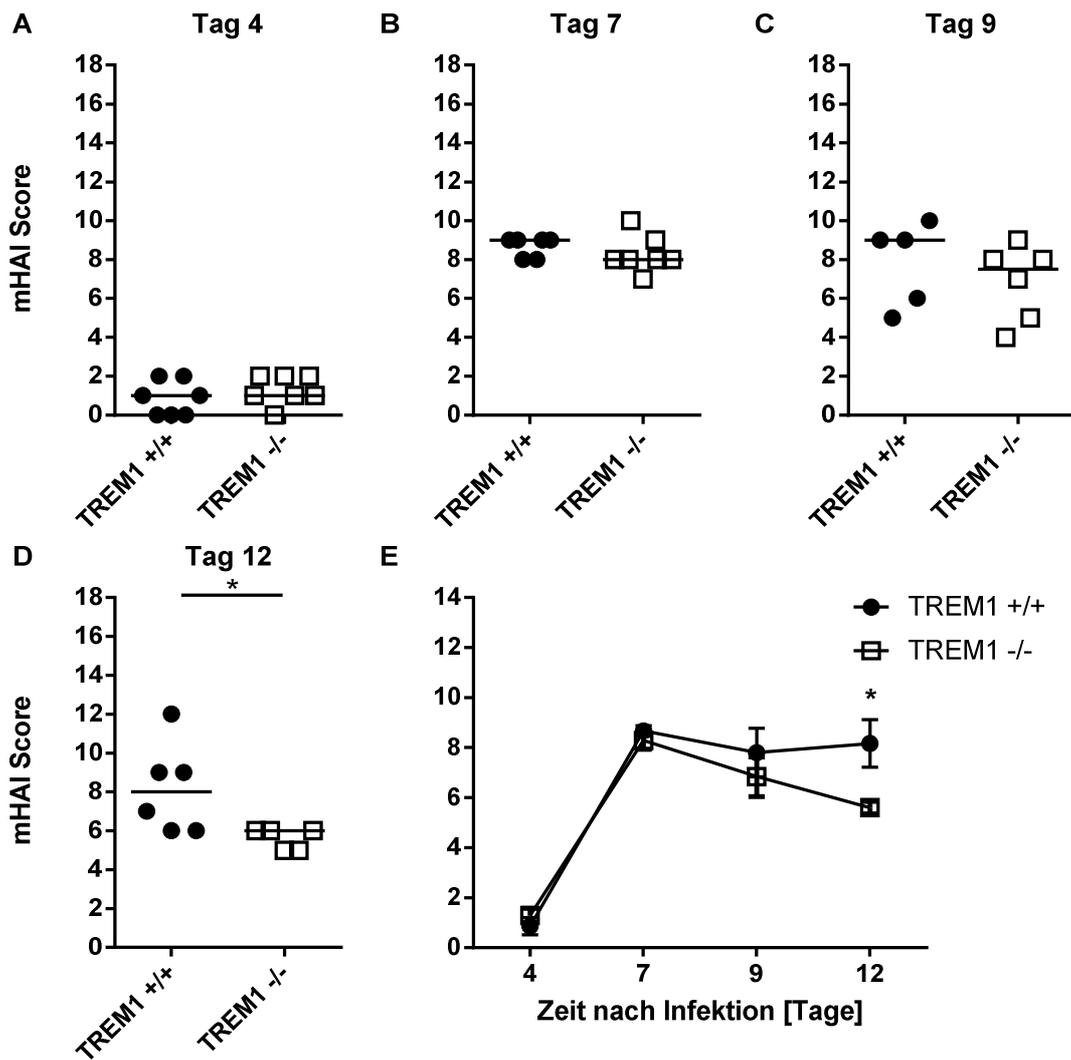


Abb. 3.16: Histologischer Aktivitätsindex (mHAI) im Lebergewebe von TREM1 $-/-$ und TREM1 $+/+$ Mäusen (A) 4, (B) 7, (C) 9 und (D) 12 Tage nach der Infektion mit $1 \cdot 10^6$ FFU LCMV WE. (E) Kinetik des Histologischen Aktivitätsindex im Lebergewebe von TREM1 $-/-$ und TREM1 $+/+$ Mäusen 4-12 Tage nach der Infektion mit $1 \cdot 10^6$ FFU LCMV WE ((A) $n=7$; $p=0,3536$ (B) $n=6-7$; $p=0,4011$ (C) $n=5-6$; $p=0,4550$ (D) $n=6$; $*p=0,0398$ (E) $n=5-7$; $*p \leq 0,05$).

3.2.12 Serumtransaminasen-Werte in LCMV-infizierten TREM1 $-/-$ und TREM1 $+/+$ Mäusen

Um die Leberschädigung in LCMV WE-infizierten TREM1 $-/-$ und TREM1 $+/+$ Mäusen zu quantifizieren, wurden TREM1 $-/-$ und TREM1 $+/+$ Mäuse mit $1 \cdot 10^6$ FFU LCMV WE infiziert und die Konzentration des Leberzell-spezifischen Enzyms Alanin-Aminotransferase (ALT) 1, 4, 7, 9 und 12 Tage nach Infektionsbeginn im Blut der Tiere ermittelt (siehe Abb. 3.17).

Sowohl in LCMV-infizierten TREM1 $-/-$ als auch in TREM1 $+/+$ Mäusen kam es zwischen Tag 4 und Tag 7 zu einem Anstieg der ALT-Werte. An Tag 9 sowie an Tag 12 war in beiden Mausgruppen ein Rückgang der Leberentzündungswerte zu beobachten. Weder an Tag 4 noch an Tag 7 waren signifikante Unterschiede in der Höhe der ALT-Werte in TREM1 $-/-$ und

TREM1 $+/+$ Mäusen messbar. Während in TREM1 $-/-$ Mäusen jedoch an Tag 9 eine signifikant verringerte Leberschädigung nachgewiesen werden konnte, näherten sich an Tag 12 die Leberwerte in beiden Mausgruppen der Detektionsgrenze von 24 U/L an.

Aus der Analyse geht hervor, dass es in LCMV-infizierten TREM1 $-/-$ Mäusen zu einer signifikant verringerten Schädigung von parenchymatischen Leberzellen kam als in TREM1 $+/+$ Mäusen.

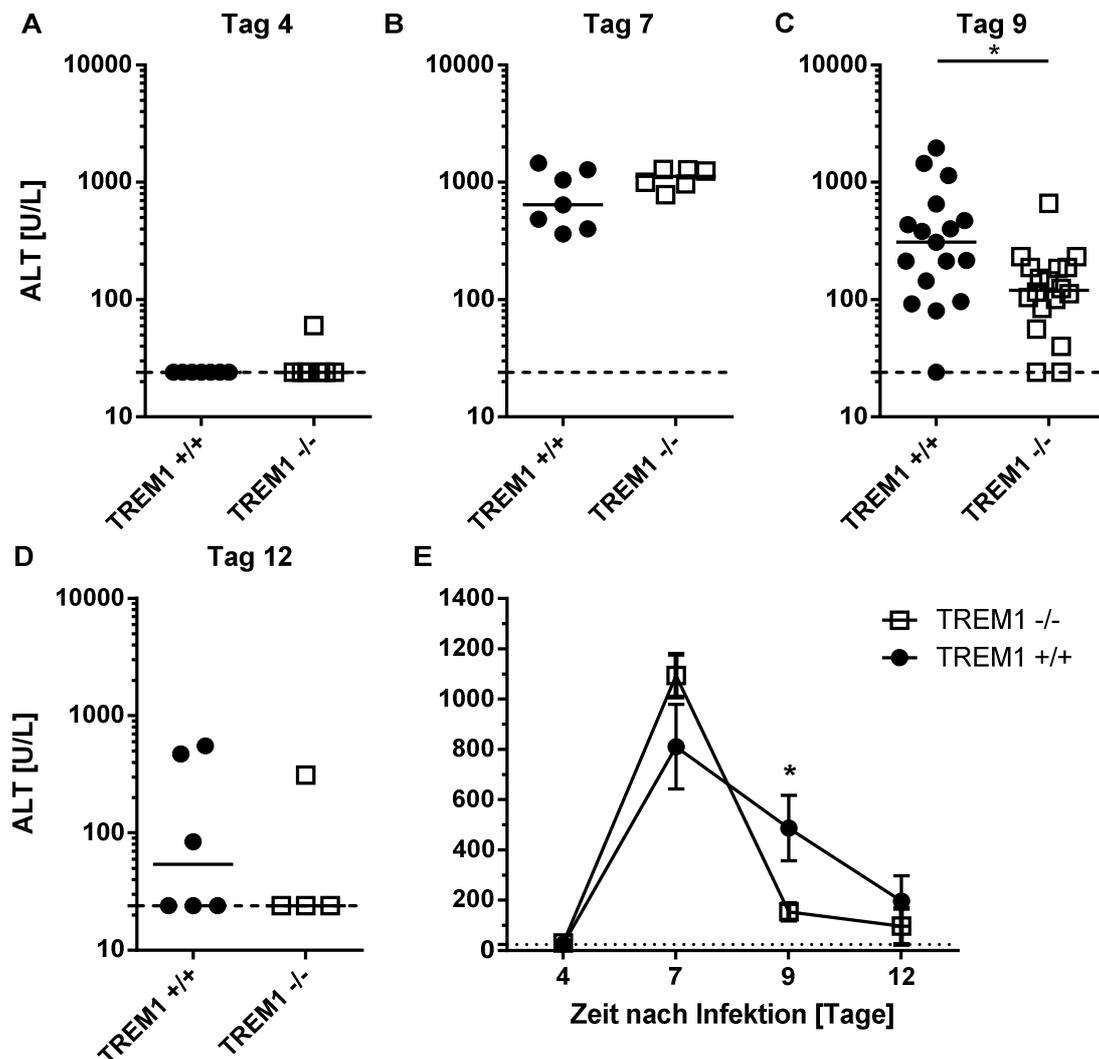


Abb. 3.17: Konzentration des Leberzell-spezifischen Enzyms Alanin-Aminotransferase (ALT) in Blutplasma aus TREM1 $-/-$ und TREM1 $+/+$ Mäusen (A) 4, (B) 7, (C) 9 und (D) 12 Tage nach der Infektion mit $1 \cdot 10^6$ FFU LCMV WE. (E) Kinetik der ALT-Werte in Blutplasma aus TREM1 $-/-$ und TREM1 $+/+$ Mäusen 4-12 Tage nach der Infektion mit $1 \cdot 10^6$ FFU LCMV WE. ((A) $n=7$; $p=0,337$ (B) $n=6-7$; $p=0,1835$ (C) $n=17-18$; $*p=0,0163$ (D) $n=4-6$; $p=0,4870$ (E) $n=4-18$; $*p \leq 0,05$; \cdots =Detektionsgrenze).

3.2.13 CD8- und TREM1-Expression im Lebergewebe von LCMV-infizierten TREM1 $-/-$ und TREM1 $+/+$ Mäusen

Zytotoxische CD8⁺ T-Zellen spielen eine Schlüsselrolle bei der Elimination von LCMV-infizierten Leberzellen (Trautmann *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2012; Zinkernagel *et al.*, 1986). Um zu untersuchen, ob TREM1 auf zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen exprimiert wird, wurden Kryoschnitte aus dem Lebergewebe von LCMV-infizierten TREM1 $-/-$ und TREM1 $+/+$ Mäusen 9 Tage nach der Infektion mit $1 \cdot 10^6$ FFU LCMV WE angefertigt und die Expression von TREM1 auf CD8⁺ T-Zellen immunhistochemisch analysiert (siehe Abb. 3.18).

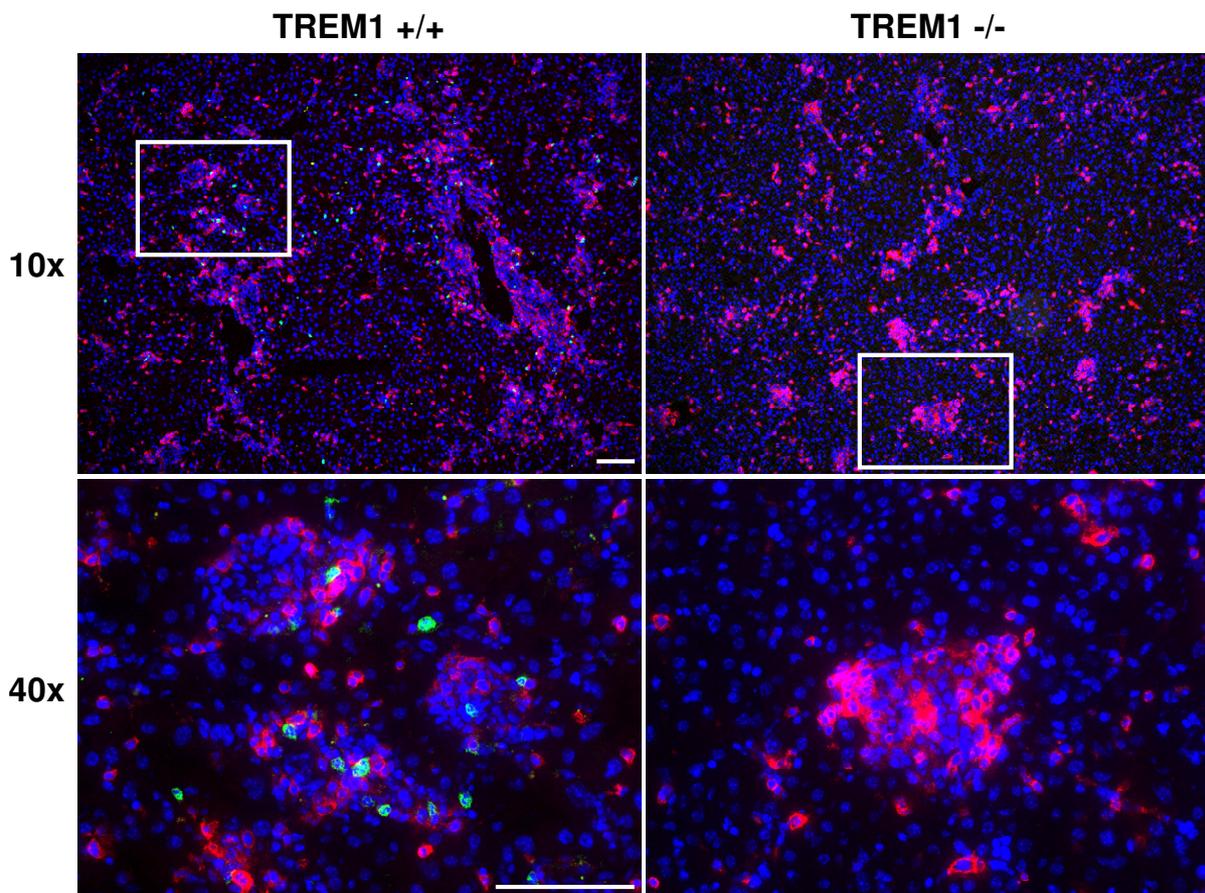


Abb. 3.18: Immunfluoreszenzfärbung der TREM1- (Grün) und CD8- (Rot) Expression im Lebergewebe von TREM1 $-/-$ und TREM1 $+/+$ Mäusen 9 Tage nach der Infektion mit $1 \cdot 10^6$ FFU LCMV WE (Skala = 100 μ m).

Im Lebergewebe der LCMV-infizierten TREM1 $+/+$ und TREM1 $-/-$ Mäusen waren massive CD8⁺ T-Zellinfiltrate nachweisbar. Im Gegensatz zu der Expression von TREM1 in TREM1 $+/+$ Mäusen konnte die Expression von TREM1 in TREM1 $-/-$ Mäuse nicht nachgewiesen werden. TREM1⁺ Zellen waren im Lebergewebe der LCMV-infizierten TREM1 $+/+$ Mäuse sowohl perivaskulär als auch diffus verteilt. TREM1⁺ Zellen besaßen einen gelappten Zellkern und wiesen eine Größe von bis zu 10 μ m auf. Teilweise konnte in

TREM1 $+/+$ Mäusen die Interaktion von TREM1 $+$ Zellen und CD8 $+$ T-Zellen beobachtet werden. Die Expression von TREM1 war auf CD8 $+$ T-Zellen nicht nachweisbar.

Aus der Analyse geht hervor, dass TREM1 im Lebergewebe der LCMV-infizierten Mäuse nicht auf zytotoxischen CD8 $+$ T-Zellen exprimiert wurde.

3.2.14 CD8 $+$ T-Zell-Aktivierung im Lebergewebe von LCMV-infizierten TREM1 $-/-$ und TREM1 $+/+$ Mäusen

Um den Einfluss von TREM1 auf die Rekrutierung und Aktivierung von LCMV-spezifischen CD8 $+$ T-Zellen zu analysieren, wurden CD8 $+$ T-Zellen aus dem Lebergewebe von TREM1 $-/-$ und TREM1 $+/+$ Mäusen 9 Tage nach der Infektion mit $1 \cdot 10^6$ FFU LCMV WE isoliert und nach der Restimulation mit dem LCMV-spezifischen Peptid GP33 durchflusszytometrisch auf die Expression der proinflammatorischen Zytokine IFN γ und TNF α sowie des Degranulationsmarkers CD107 untersucht (siehe Abb. 3.19).

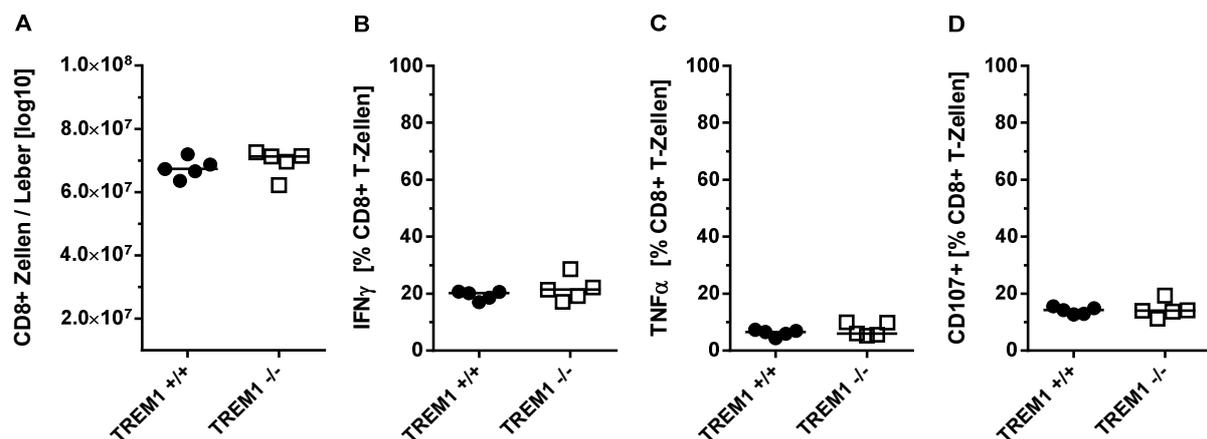


Abb. 3.19: Durchflusszytometrische Analyse der CD8 $+$ T-Zellen aus dem Lebergewebe von LCMV-infizierten TREM1 $-/-$ und TREM1 $+/+$ Mäusen. (A) Anzahl der CD8 $+$ T-Zellen/Leber aus TREM1 $-/-$ und TREM1 $+/+$ Mäusen 9 Tage nach der Infektion mit $1 \cdot 10^6$ FFU LCMV WE. Anteil der (B) IFN γ $+$ und (C) TNF α $+$ und (D) CD107 $+$ CD8 $+$ T-Zellen aus der Leber von TREM1 $-/-$ und TREM1 $+/+$ Mäusen 9 Tage nach der Infektion mit $1 \cdot 10^6$ FFU LCMV WE und Restimulation mit GP33 ((A) $n=5$; $p=0,4644$; (B) $n=5$; $p=0,3070$; (C) $n=5$; $p=0,3784$ (D) $n=5$; $p=0,7779$).

9 Tage nach der Infektion waren im Lebergewebe der LCMV-infizierten TREM1 $-/-$ und TREM1 $+/+$ Mäuse weder Unterschiede in der Anzahl noch der Aktivierung der CD8 $+$ T-Zellen nachweisbar. Während aus TREM1 $-/-$ Mäusen $6,66 \cdot 10^7$ CD8 $+$ T-Zellen/Leber isoliert werden konnten, waren in TREM1 $+/+$ Mäusen $6,96 \cdot 10^7$ CD8 $+$ T-Zellen/Leber nachweisbar ($p=0,4644$). Nach der Isolation und Restimulation mit dem LCMV-spezifischen Peptid GP33 konnte die Expression von IFN γ in 20,6 % der LCMV-spezifischen CD8 $+$ T-Zellen aus TREM1 $-/-$ Mäusen und 22,1 % der LCMV-spezifischen CD8 $+$ T-Zellen aus TREM1 $+/+$ Mäusen detektiert werden ($p=0,3070$). Die Expression von TNF α war in 4,3 % der LCMV-spezifischen CD8 $+$ T-Zellen aus TREM1 $-/-$ Mäusen und 9,8 % der LCMV-spezifischen CD8 $+$

T-Zellen aus TREM1 $+/+$ Mäusen nachweisbar ($p=0,3784$). Darüber hinaus konnte die Expression des Degranulationsmarkers CD107 auf 14,2 % der LCMV-spezifischen CD8+ T-Zellen aus TREM1 $-/-$ Mäusen und auf 14 % der LCMV-spezifischen CD8+ T-Zellen aus TREM1 $-/-$ Mäusen nachgewiesen werden ($p=0,7779$).

Die Untersuchung weist darauf hin, dass TREM1 keinen Einfluss auf die Rekrutierung oder die Aktivierung von CD8+ T-Zellen im Lebergewebe der LCMV-infizierten Mäuse hatte.

3.2.15 F4/80- und TREM1-Expression im Lebergewebe von LCMV-infizierten TREM1 $-/-$ und TREM1 $+/+$ Mäusen

Kupfer-Zellen können körperfremde Strukturen phagozytieren und sind während einer viralen Hepatitis an dem Übergang von angeborener zu adaptiver Immunität beteiligt (Heydtmann, 2009). Um die Expression von TREM1 auf F4/80+ Kupfer-Zellen zu analysieren, wurden Kryoschnitte aus dem Lebergewebe von LCMV-infizierten TREM1 $-/-$ und TREM1 $+/+$ Mäusen 9 Tage nach der Infektion mit $1 \cdot 10^6$ FFU LCMV WE angefertigt und die Expression von TREM1 und F4/80 immunhistochemisch untersucht (siehe Abb. 3.20).

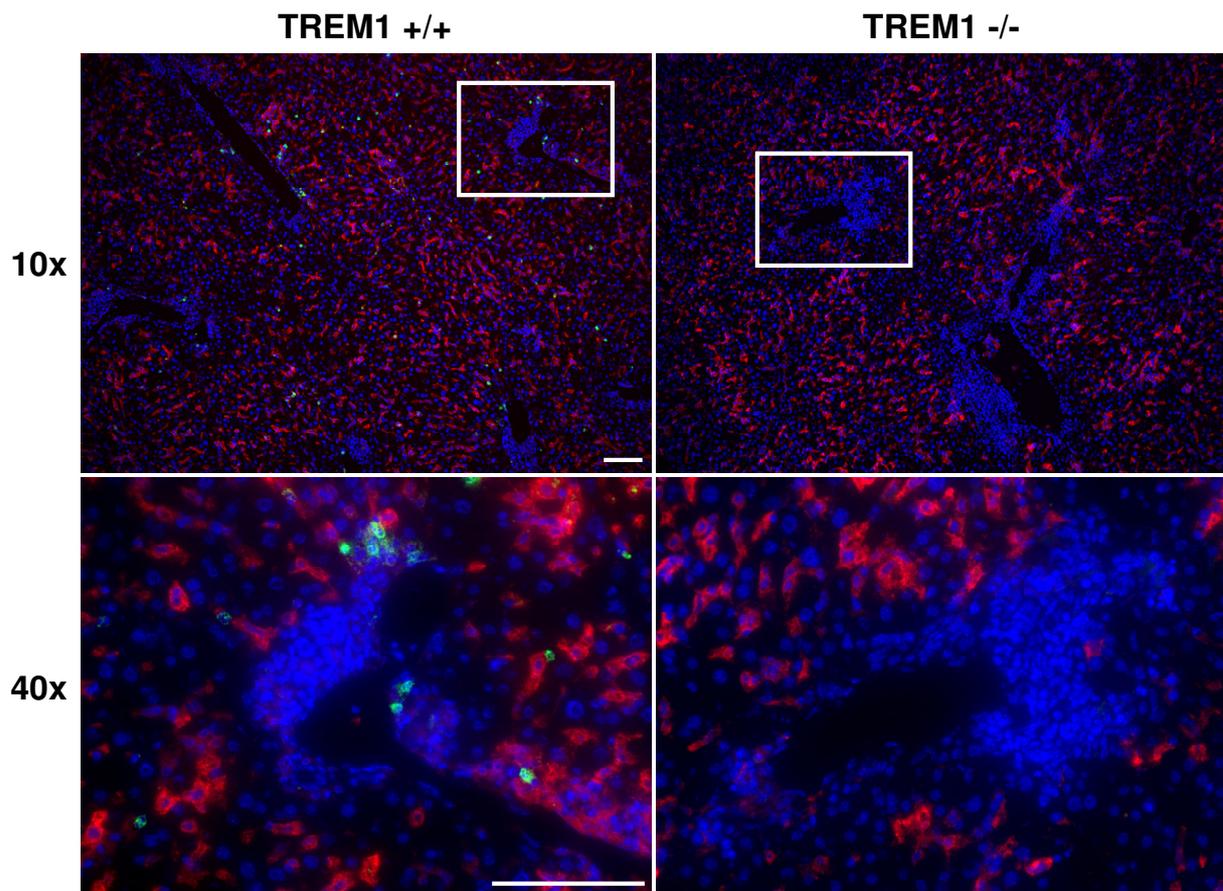


Abb. 3.20: Immunfluoreszenzfärbung der TREM1- (Grün) und F4/80- (Rot) Expression im Lebergewebe von TREM1 $-/-$ und TREM1 $+/+$ Mäusen 9 Tage nach der Infektion mit $1 \cdot 10^6$ FFU LCMV WE (Skala = 100 μm).

Im Lebergewebe der LCMV-infizierten TREM1 $+/+$ und TREM1 $-/-$ Mäusen waren Ansammlungen von F4/80+ Kupffer-Zellen entlang der Sinusoide zu erkennen. TREM1+ Zellen konnten in TREM1 $-/-$ Mäusen nicht nachgewiesen werden. Im Lebergewebe von TREM1 $+/+$ Mäusen waren perivaskulär und diffus verteilte TREM1+ Zellen zu beobachten. In TREM1 $+/+$ Mäusen kam es zu Zell-Zell-Interaktionen zwischen F4/80+ Kupffer-Zellen und TREM1+ Zellen. Vereinzelt war die Phagozytose von TREM1+ Zellen durch F4/80+ Kupffer-Zellen zu beobachten.

Aus der Analyse geht hervor, dass TREM1 im Lebergewebe der LCMV-infizierten Mäuse nicht auf F4/80+ Kupffer-Zellen exprimiert wurde.

3.2.16 LY6G- und TREM1-Expression im Lebergewebe von LCMV-infizierten TREM1 $-/-$ und TREM1 $+/+$ Mäusen

Vorarbeiten deuten auf eine entzündungsfördernde Wirkung von Neutrophilen Granulozyten bei viralen Leberinfektionen hin (Sitia *et al.*, 2002). Um die Expression von TREM1 auf LY6G+ Neutrophilen Granulozyten zu untersuchen, wurden Kryoschnitte aus dem Lebergewebe von LCMV-infizierten TREM1 $-/-$ und TREM1 $+/+$ Mäusen 9 Tage nach der Infektion mit $1 \cdot 10^6$ FFU LCMV WE angefertigt und die Expression von TREM1 und LY6G immunhistochemisch analysiert (siehe Abb. 3.21).

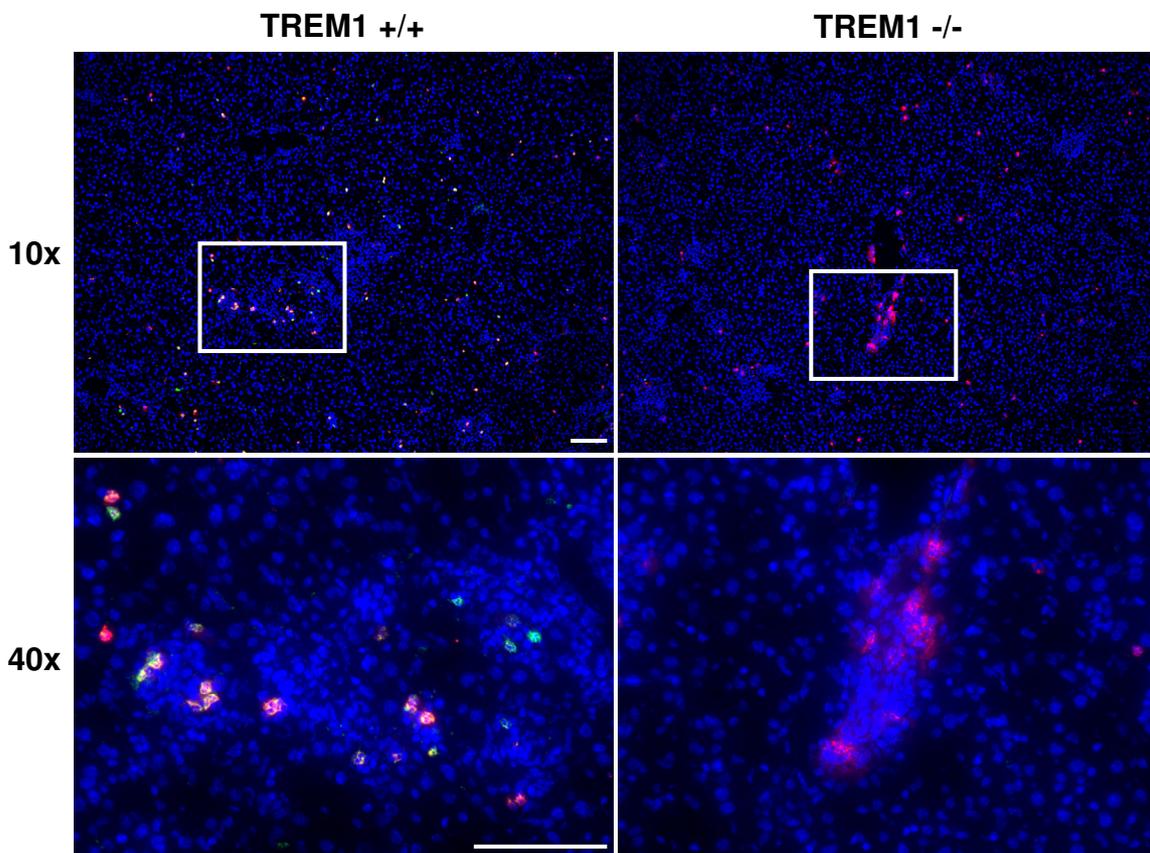


Abb. 3.21: Immunfluoreszenzfärbung der TREM1- (Grün) und LY6G- (Rot) Expression im Lebergewebe von TREM1 $-/-$ und TREM1 $+/+$ Mäusen 9 Tage nach der Infektion mit $1 \cdot 10^6$ FFU LCMV WE (Skala = 100 μ m).

LY6G⁺ Neutrophile Granulozyten waren sowohl im Lebergewebe der LCMV-infizierten TREM1^{-/-} Mäuse als auch in TREM1^{+/+} Mäusen nachweisbar. Die Expression von TREM1 war in TREM1^{-/-} Mäusen nicht feststellbar. In TREM1^{+/+} Mäusen konnte die Ko-Expression von TREM1 auf LY6G⁺ Zellen nachgewiesen werden. TREM1⁺ LY6G⁺ Neutrophile Granulozyten waren in LCMV-infizierten TREM1^{+/+} Mäusen sowohl diffus als auch perivaskulär lokalisiert.

Aus der Analyse geht hervor, dass TREM1 im Lebergewebe der LCMV-infizierten Mäuse auf Neutrophilen Granulozyten exprimiert wurde.

3.2.17 TREM1- und LY6G-Ko-Expression auf Neutrophilen Granulozyten aus LCMV-infizierten TREM1^{-/-} und TREM1^{+/+} Mäusen

Um zu validieren, dass TREM1 von Neutrophilen Granulozyten exprimiert wird, wurden LY6G⁺ Neutrophile Granulozyten aus dem Lebergewebe von TREM1^{-/-} und TREM1^{+/+} Mäusen 9 Tage nach der Infektion mit $1 \cdot 10^6$ LCMV WE isoliert und durchflusszytometrisch auf die Ko-Expression von LY6G und TREM1 untersucht (siehe Abb. 3.22)

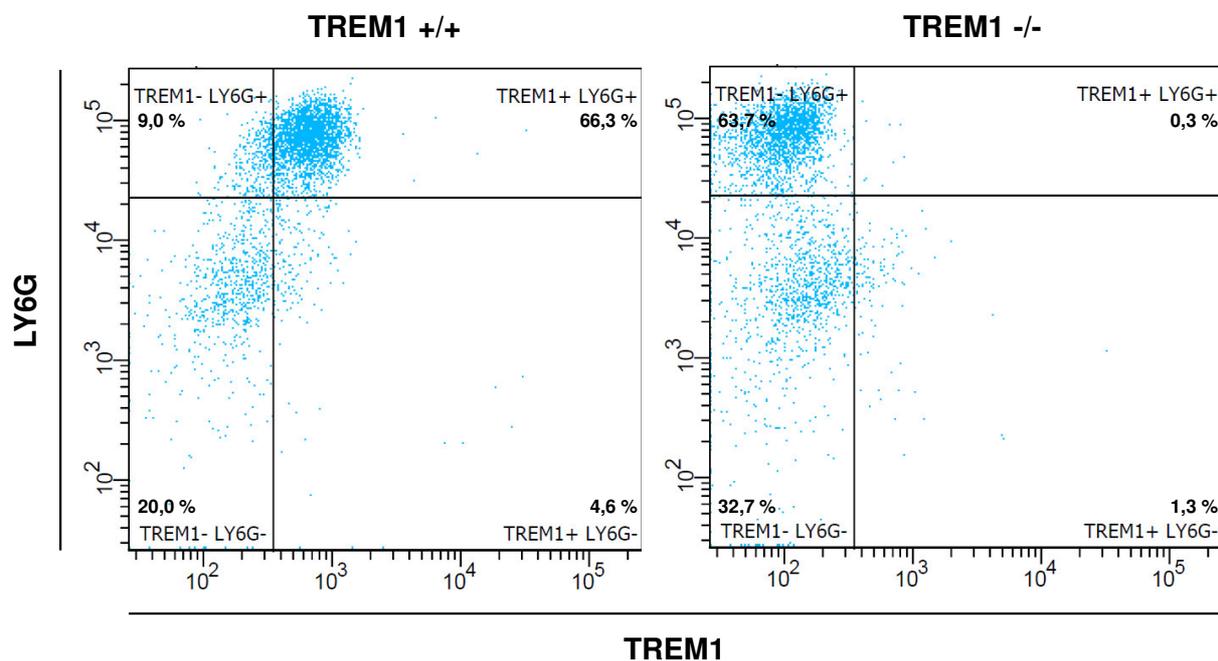


Abb. 3.22: Durchflusszytometrische Analyse der TREM1 und LY6G Expression auf Neutrophilen Granulozyten aus dem Lebergewebe von TREM1^{-/-} und TREM1^{+/+} Mäusen 9 Tage nach der Infektion mit $1 \cdot 10^6$ FFU LCMV WE (n=5).

In Neutrophilen Granulozyten aus LCMV-infizierten TREM1^{-/-} Mäusen war die Expression von TREM1 nicht nachweisbar (TREM1^{-/-}: TREM1⁻ LY6G⁻: 32,7%; TREM1⁻ LY6G⁺: 63,7%; TREM1⁺ LY6G⁺ 0,3%; TREM1⁺ LY6G⁻: 1,3 %). Jedoch konnte auf bis zu 90 % der LY6G⁺

Neutrophilen Granulozyten aus LCMV-infizierten TREM1 $+/+$ Mäusen die Ko-Expression von TREM1 mit LY6G detektiert werden (TREM1 $+/+$: TREM1- LY6G-: 20,0%; TREM1- LY6G+: 9%; TREM1+ LY6G+ 66,3%; TREM1+ LY6G-: 4,6 %).

Die Analyse bestätigt, dass es im Lebergewebe der LCMV-infizierten Mäuse zu der Ko-Expression von TREM1 auf LY6G+ Neutrophilen Granulozyten kam.

3.2.18 LY6G- und DAP12-Expression im Lebergewebe von LCMV-infizierten TREM1 $-/-$ und TREM1 $+/+$ Mäusen

Um zu analysieren, ob das TREM1 Signal-Adapterprotein DAP12 auf Neutrophilen Granulozyten exprimiert wird, wurden Kryoschnitte aus dem Lebergewebe von LCMV-infizierten TREM1 $-/-$ und TREM1 $+/+$ Mäusen 9 Tage nach der Infektion mit $1 \cdot 10^6$ FFU LCMV WE angefertigt und auf die Expression von LY6G und DAP12 immunhistologisch untersucht (siehe Abb. 3.23).

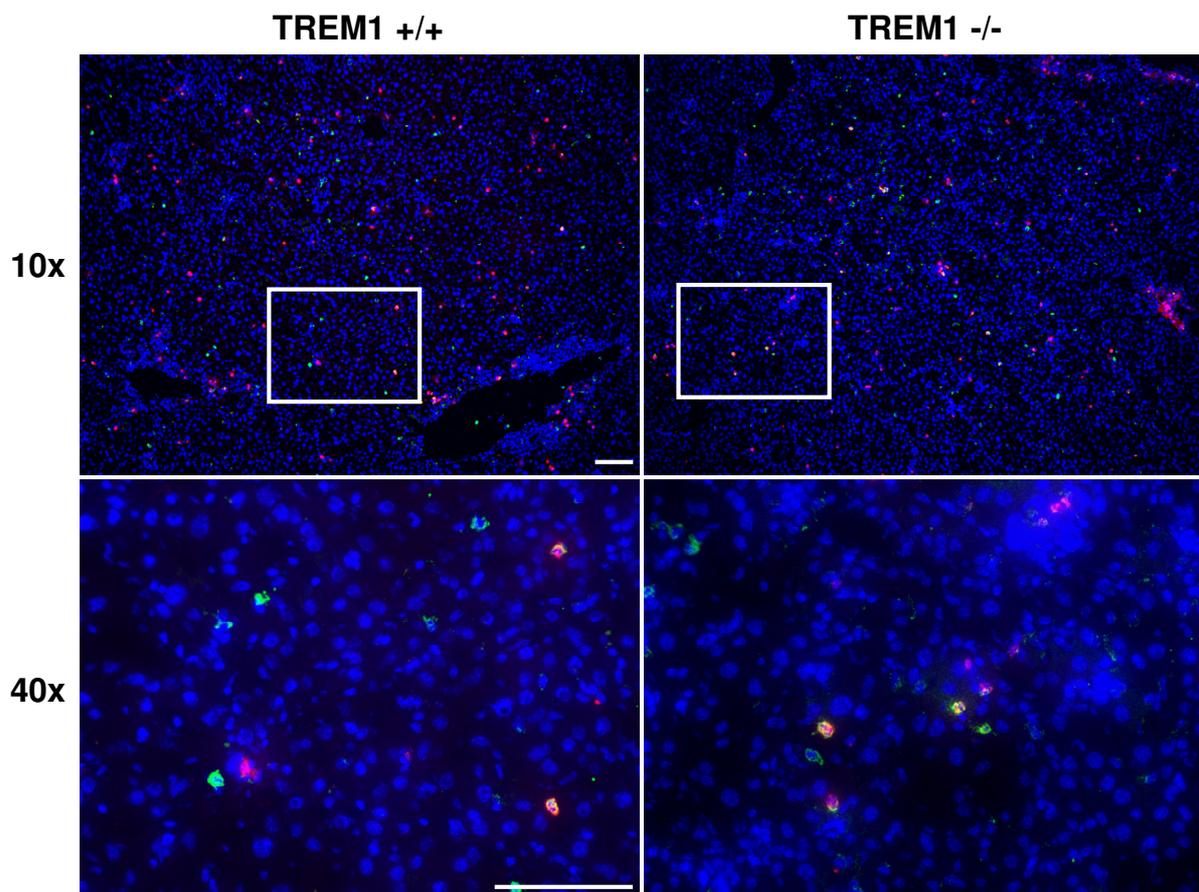


Abb. 3.23: Immunfluoreszenzfärbung der LY6G- (Grün) und DAP12- (Rot) Expression im Lebergewebe von TREM1 $-/-$ und TREM1 $+/+$ Mäusen 9 Tage nach der Infektion mit $1 \cdot 10^6$ FFU LCMV WE (Skala = 100 μ m).

Im Lebergewebe der LCMV-infizierten TREM1 $+/+$ und TREM1 $-/-$ Mäusen waren perivaskulär und diffus verteilte Ansammlungen von DAP12+ Zellen zu beobachten. Die

Expression von DAP12 war sowohl auf LY6G+ Zellen als auch auf LY6G- Zellen nachweisbar. Vereinzelt konnte die Ko-Expression von DAP12 in LY6G+ Zellen nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass es im Lebergewebe der LCMV-infizierten Mäuse zu der Ko-Expression von DAP12 auf LY6G+ Neutrophilen Granulozyten kam.

3.2.19 LCMV-RNA-Menge in LCMV-infizierten C57BL/6 Mäusen nach der Depletion von LY6G+ Neutrophilen Granulozyten

Um den Einfluss von Neutrophilen Granulozyten auf den Verlauf der Virusinfektion in LCMV-infizierten Mäusen zu untersuchen, wurden LY6G+ Neutrophile Granulozyten in C57BL/6 Mäusen Antikörper-abhängig depletiert und der Verlauf der LCMV-Infektion 9 Tage nach der Infektion mit $1 \cdot 10^6$ FFU LCMV WE im Lebergewebe der LCMV-infizierten Mäuse relativ quantifiziert. (siehe Abb. 3.24).

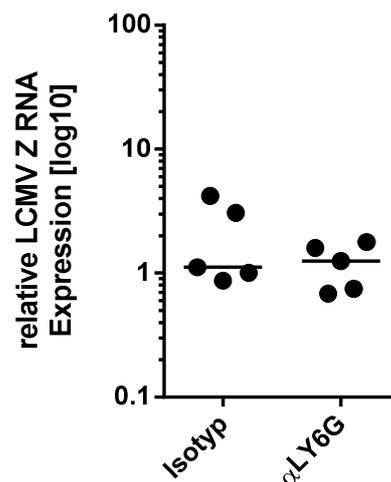


Abb. 3.24: Relative Quantifizierung der LCMV Z-RNA-Menge im Lebergewebe von LY6G-depletierten C57BL/6 Mäusen und Isotyp-behandelten Kontrollen 9 Tage nach der Infektion mit $1 \cdot 10^6$ FFU LCMV WE *in vivo* (Isotyp: n=5; αLY6G: n=5; p=0,2706).

9 Tage nach der Infektion war sowohl im Lebergewebe der LY6G-depletierten Mäuse als auch in Isotyp-behandelten Kontrollen die LCMV Z-RNA nachweisbar. Signifikante Unterschiede in der Viruslast waren zwischen den beiden Mausgruppen nicht zu beobachten (Isotyp: 1,113 vs. αLY6G: 1,253; p=0,2706).

Die Untersuchung zeigt, dass die Depletion von Neutrophilen Granulozyten keinen Einfluss auf die Viruslast im Lebergewebe der LCMV-infizierten Mäuse hatte.

3.2.20 TREM1- und LY6G-Proteinexpression in LCMV-infizierten C57BL/6 Mäusen nach der Depletion von LY6G+ Neutrophilen Granulozyten

Um zu untersuchen, ob es in α LY6G-behandelten Mäusen zu einer vollständigen Depletion von LY6G+ Neutrophilen Granulozyten kam, wurden Kryoschnitte aus dem Lebergewebe von α LY6G- und Isotyp-behandelten C57BL/6 Mäusen 9 Tage nach der Infektion mit $1 \cdot 10^6$ FFU LCMV WE angefertigt und die Expression von LY6G und TREM1 immunhistochemisch analysiert (siehe Abb. 3.25).

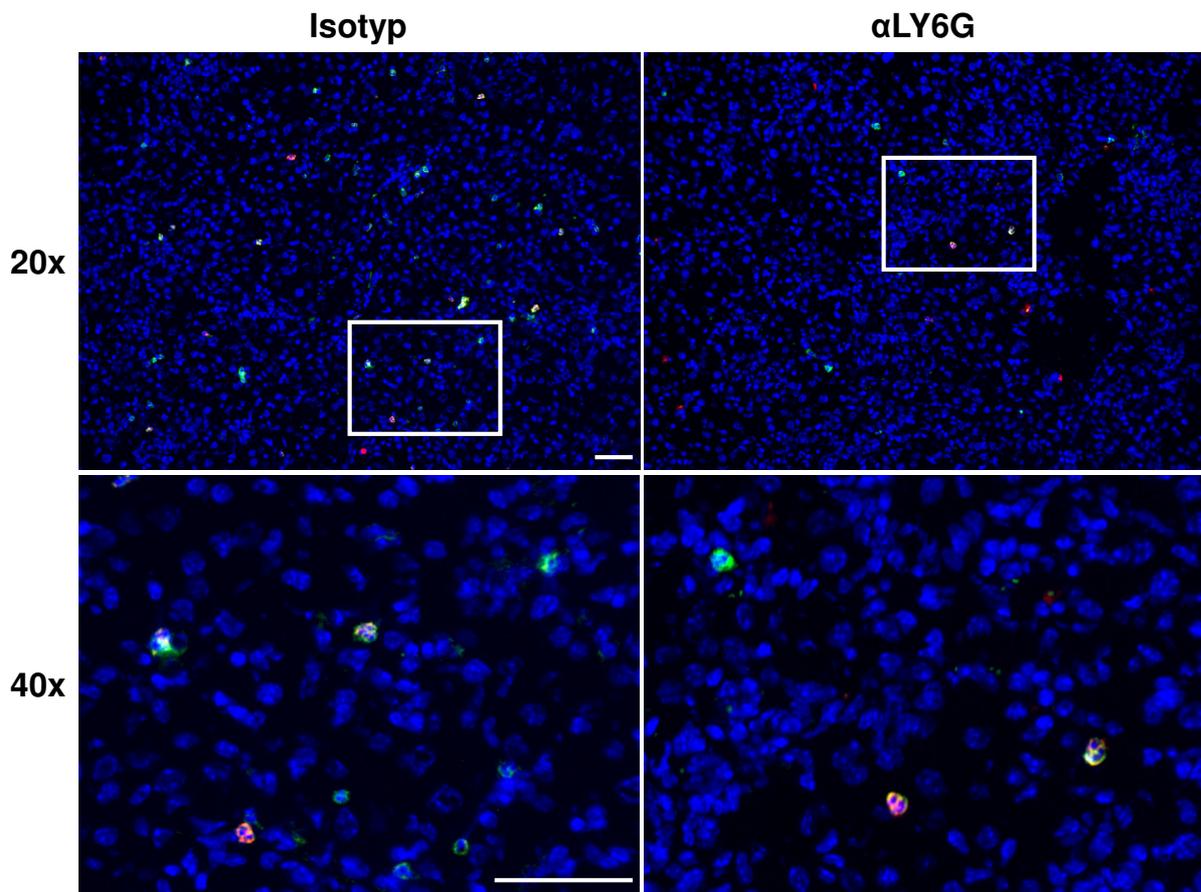


Abb. 3.25: Immunfluoreszenzfärbung der TREM1- (grün) und LY6G- (rot) Expression in Kryoschnitten aus dem Lebergewebe von LY6G-depletierten und Isotyp-behandelten C57BL/6 Mäusen 9 Tage nach der Infektion mit $1 \cdot 10^6$ FFU LCMV WE (Skala = 50 μ m).

Sowohl in LY6G-depletierten Mäusen als auch in Isotyp-behandelten Kontrollen waren LY6G+ Leberzellen nachweisbar. Vereinzelt kam es in LY6G-depletierten Mäusen zu einer Antikörper-abhängigen Maskierung des LY6G-Antigens. TREM1+ Neutrophile Granulozyten waren sowohl in LY6G-depletierten Mäusen als auch in Isotyp-behandelten Kontrollen zu detektieren.

Die Untersuchung deutet darauf hin, dass es im Lebergewebe der α LY6G-behandelten Mäuse zu einer unvollständigen Depletion von Neutrophilen Granulozyten kam.

3.2.21 Genexpression proinflammatorischer Zytokine in LCMV-infizierten Neutrophilen Granulozyten *in vitro*

Um den Einfluss von LCMV auf die Aktivierung von Neutrophilen Granulozyten zu untersuchen, wurden LY6G+ Neutrophile Granulozyten aus C57BL/6 Mäusen isoliert und die Expression der proinflammatorischen Zytokine/Chemokine MCP1/CCL2, TNF α , IL6, IL1 β , CXCL1 und IFN α 6h nach der Infektion mit 5 MOI LCMV WE *in vitro* relativ quantifiziert (siehe Abb. 3.26).

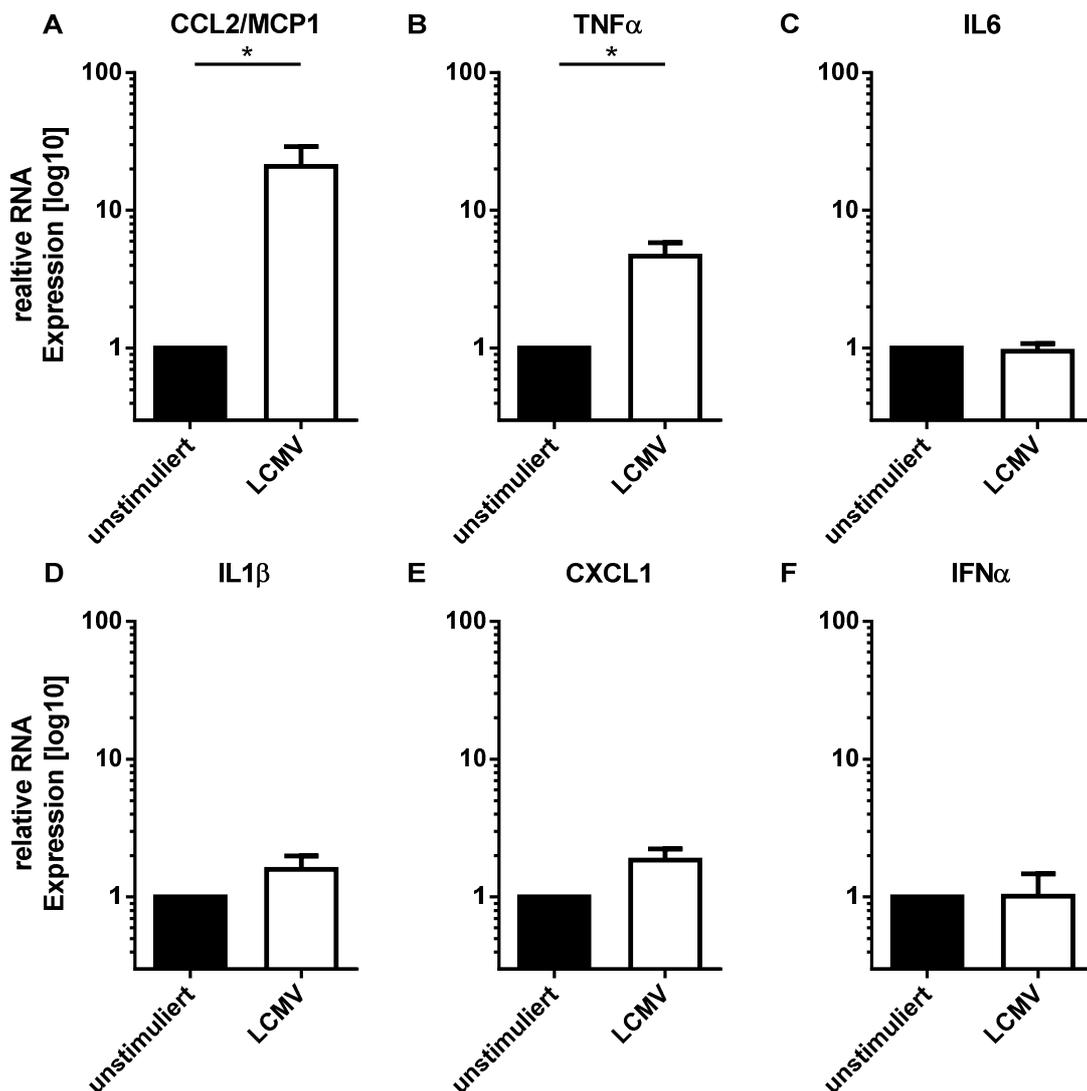


Abb. 3.26: Relative RNA-Expression von (A) MCP1/CCL2, (B) TNF α , (C) IL6, (D) IL1 β , (E) CXCL1 und (F) IFN α in Neutrophilen Granulozyten aus C57BL/6 Mäusen 6 Stunden nach der Infektion mit 5 MOI LCMV WE *in vitro* ((A) n=6; *p=0,0338 (B) n=5-6; *p=0,018 (C) n=5; p=0,7107 (D) n=6; p=0,1682 (E) n=5; p=0,0565 (F) n=5; p=0,9713).

Die Expression von MCP1/CCL2, TNF α , IL6, IL1 β , CXCL1 und IFN α war sowohl in LCMV-behandelten Neutrophilen Granulozyten als auch in unstimulierten Kontrollzellen nachweisbar. 6 Stunden nach der LCMV-Infektion war die Expression von CCL2/MCP1

(unstimuliert: $1,0 \pm 0$ vs. LCMV: $20,89 \pm 0$; $*p=0,0338$) und $\text{TNF}\alpha$ (unstimuliert: $1,0 \pm 0$ vs. LCMV: $5,388 \pm 1,112$; $*p=0,018$) in LCMV-behandelten Neutrophilen Granulozyten im Vergleich zu uninfizierten Neutrophilen Granulozyten signifikant erhöht. Eine signifikant unterschiedliche Expression von IL6 (unstimuliert: $1,0 \pm 0$ vs. LCMV: $0,9503 \pm 0,129$; $p=0,7107$), IL1 β (unstimuliert: $1,0 \pm 0$ vs. LCMV: $1,586 \pm 0,3946$; $p=0,1682$), CXCL1 (unstimuliert: $1,0 \pm 0$ vs. LCMV: $1,858 \pm 0,3851$; $p=0,0565$) und IFN α (unstimuliert: $1,0 \pm 0$ vs. LCMV: $1,017 \pm 0,4536$; $p=0,9713$) war in LCMV-behandelten Neutrophilen Granulozyten nicht nachweisbar.

Die Analyse zeigt, dass es nach der Stimulation von Neutrophilen Granulozyten mit LCMV zu einer signifikant erhöhten Expression der entzündungsfördernden Gene CCL2/MCP1 und $\text{TNF}\alpha$ kam.

3.2.22 Genexpression proinflammatorischer Zytokine in Neutrophilen Granulozyten aus LCMV-infizierten TREM1 -/- und TREM1 +/+ Mäusen

Um den Einfluss von TREM1 auf den Aktivierungszustand von Neutrophilen Granulozyten zu untersuchen, wurden Neutrophile Granulozyten aus dem Lebergewebe von TREM1 -/- und TREM1 +/+ Mäusen 9 Tage nach der Infektion mit $1 \cdot 10^6$ FFU LCMV WE isoliert und *ex vivo* auf die Expression der proinflammatorischen Zytokine/Chemokine MCP1/CCL2, $\text{TNF}\alpha$, IL6, IL1 β , CXCL1 und IFN α untersucht (siehe Abb. 3.27).

Die Expression der proinflammatorischen Zytokine/Chemokine MCP1/CCL2 (TREM1 +/+ : $1,0$ vs. TREM1 -/- : $0,618$), $\text{TNF}\alpha$ (TREM1 +/+ : $1,0$ vs. TREM1 -/- : $0,545$), IL6 (TREM1 +/+ : $1,0$ vs. TREM1 -/- : $0,890$), IL1 β (TREM1 +/+ : $1,0$ vs. TREM1 -/- : $0,543$), CXCL1 (TREM1 +/+ : $1,0$ vs. TREM1 -/- : $0,731$) und IFN α (TREM1 +/+ : $1,0$ vs. TREM1 -/- : $0,8$) war sowohl in TREM1 +/+ als auch in TREM1 -/- Neutrophilen Granulozyten nachweisbar. Im Vergleich zu der Genexpression in Neutrophilen Granulozyten aus LCMV-infizierten TREM1 +/+ Mäusen, war die Expression der proinflammatorischen Zytokine CCL2/MCP1-, $\text{TNF}\alpha$ -, IL1 β -, CXCL1- und IFN α in Neutrophilen Granulozyten aus LCMV-infizierten TREM1 -/- Mäusen tendenziell verringert.

Die Analyse deutet darauf hin, dass es in TREM1 -/- Neutrophilen Granulozyten aus LCMV-infizierten Mäusen zu einer tendenziell verringerten Expression proinflammatorischer Zytokine kam.

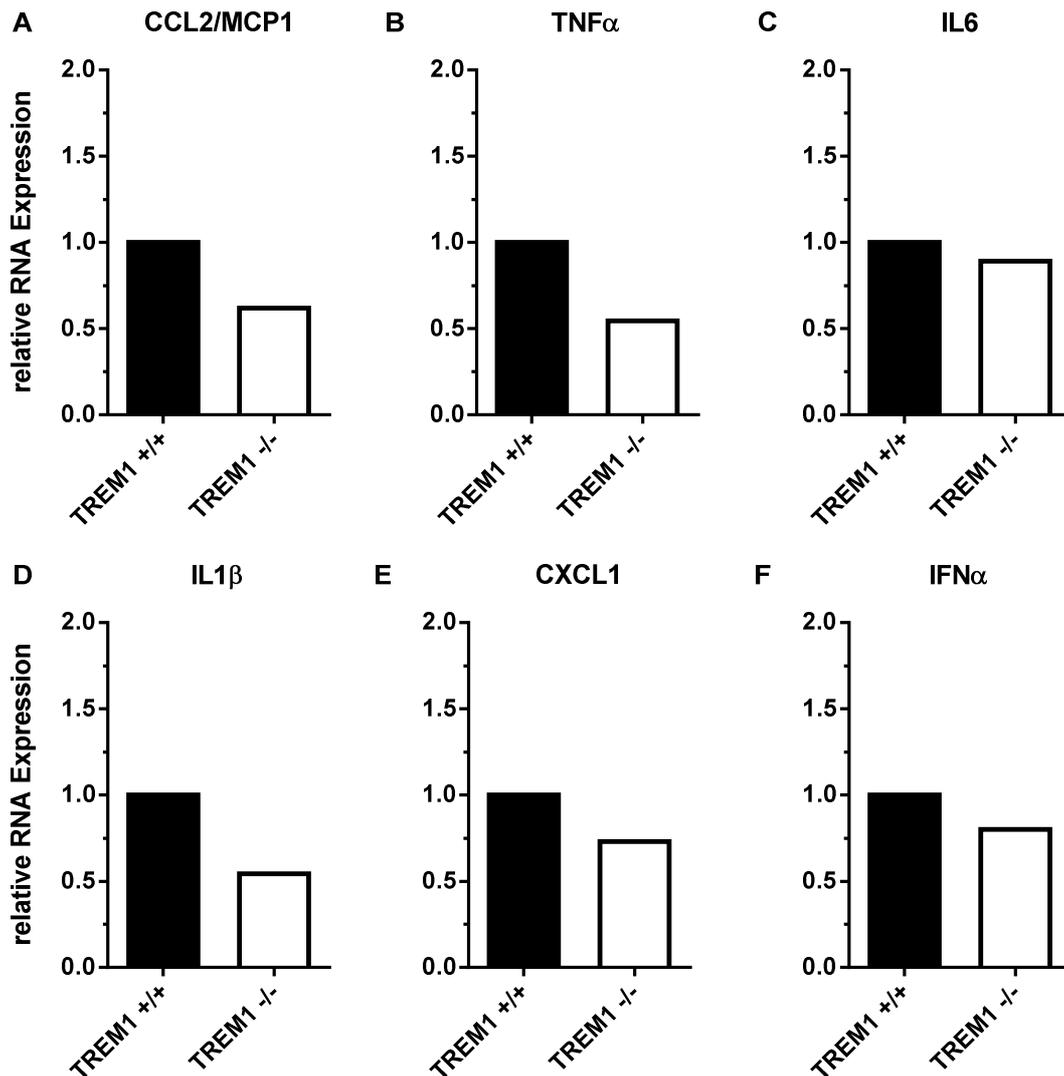


Abb. 3.27: Relative RNA-Expression der proinflammatorischen Zytokine/Chemokine (A) CCL2/MCP1, (B) TNF α , (C) IL6, (D) IL1 β , (E) CXCL1, und (F) IFN α in Neutrophilen Granulozyten nach der Isolation aus der Leber von LCMV-infizierten TREM1 $-/-$ und TREM1 $+/+$ Mäusen *ex vivo* (5 Mäuse/Gruppe).

3.2.23 Genexpression proinflammatorischer Zytokine im Lebergewebe von LCMV-infizierten TREM1 $-/-$ und TREM1 $+/+$ Mäusen

Um den Einfluss von TREM1 auf die Expression der entzündungsfördernden Zytokine/Chemokine MCP1/CCL2, TNF α , IL6, IL1 β , CXCL1 und IFN α im Lebergewebe von LCMV-infizierten Mäusen zu untersuchen, wurden TREM1 $-/-$ und TREM1 $+/+$ Mäuse mit $1 \cdot 10^6$ FFU LCMV WE infiziert und die Expression der proinflammatorischen Zytokine/Chemokine MCP1/CCL2, TNF α , IL6, IL1 β , CXCL1 und IFN α relativ quantifiziert (siehe Abb. 3.28).

Sowohl in TREM1 $+/+$ Mäusen als auch in TREM1 $-/-$ Mäusen war 4 Tage nach der LCMV-Infektion die Expression der Zytokine/Chemokine MCP1/CCL2, TNF α , IL6, IL1 β , CXCL1 und

IFN α im Lebergewebe nachweisbar. Im Vergleich zu der Genexpression in TREM1 +/+ Mäusen war die Expression von CCL2/MCP1 (TREM1 +/+ : 1,115 \pm 0,102 vs. TREM1 -/- : 0,699 \pm 0,05; **p=0,0053) und TNF α (TREM1 +/+ : 1,067 \pm 0,098 vs. TREM1 -/- : 0,7511 \pm 0,05; *p=0,0198) in TREM1 -/- Mäusen signifikant verringert. Signifikante Expressionsunterschiede konnten in TREM1 +/+ und TREM1 -/- Mäusen für IL6 (TREM1 +/+ : 1,182 \pm 0,077 vs. TREM1 -/- : 1,100 \pm 0,211; p=0,704), IL1 β (TREM1 +/+ : 1,095 \pm 0,085 vs. TREM1 -/- : 0,994 \pm 0,073; p=0,386), CXCL1 (TREM1 +/+ : 0,930 \pm 0,078 vs. TREM1 -/- : 0,751 \pm 0,174; p=0,344) und IFN α (TREM1 +/+ : 1,129 \pm 0,257 vs. TREM1 -/- : 1,084 \pm 0,343; *p=0,918) nicht nachgewiesen werden.

Die Untersuchungen zeigen, dass es im Lebergewebe der LCMV-infizierten TREM1 -/- Mäuse zu einer signifikant verringerten Expression der proinflammatorischen Zytokine/Chemokine CCL2/MCP1 und TNF α kam.

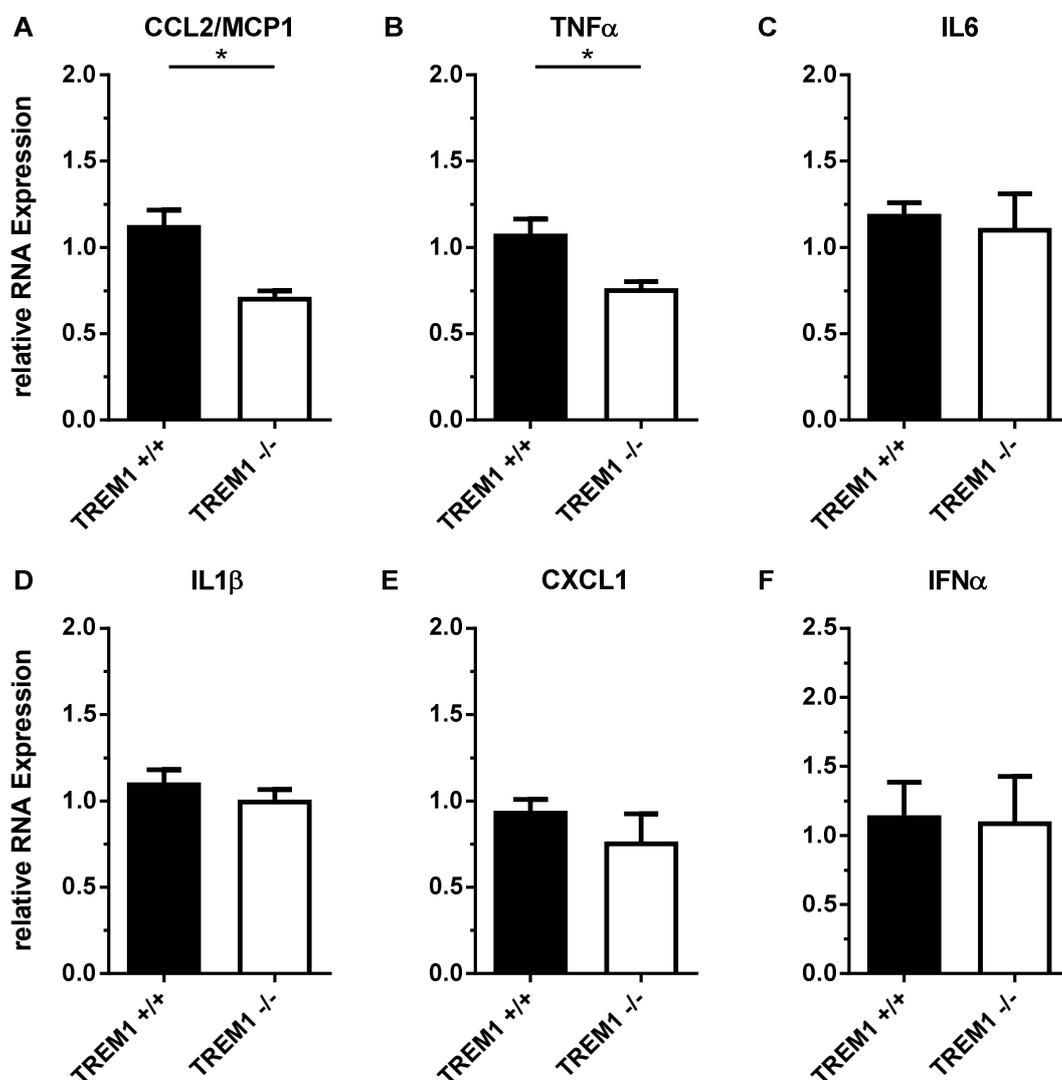


Abb. 3.28: Relative RNA-Expression von (A) MCP1/CCL2, (B) TNF α , (C) IL6, (D) IL1 β , (E) CXCL1 und (F) IFN α im Lebergewebe von TREM1 -/- und TREM1 +/+ Mäusen 4 Tage nach der der Infektion mit 1*10⁶ FFU LCMV WE ((A) n=6-7; **p=0,0053 (B) n=6-7; *p=0,0198 (C) n=6-7; p=0,704 (D) n=7; p=0,386 (E) n=6-7; p=0,344 (F) n=5-6; p=0,918).

3.2.24 Histologische Analyse der HMGB1-Expression im Lebergewebe von LCMV-infizierten C57BL/6 Mäusen

Vorarbeiten deuten darauf hin, dass HMGB1 spezifisch an TREM1 bindet (Wu *et al.*, 2012). Um zu untersuchen, ob HMGB1 in der Leber von LCMV-infizierten Mäusen exprimiert wird, wurden C57BL/6 Mäuse mit $1 \cdot 10^6$ FFU LCMV WE i.v. infiziert und die HMGB1-Expression im Lebergewebe der LCMV-infizierten Mäuse immunhistochemisch analysiert (siehe Abb. 3.29).

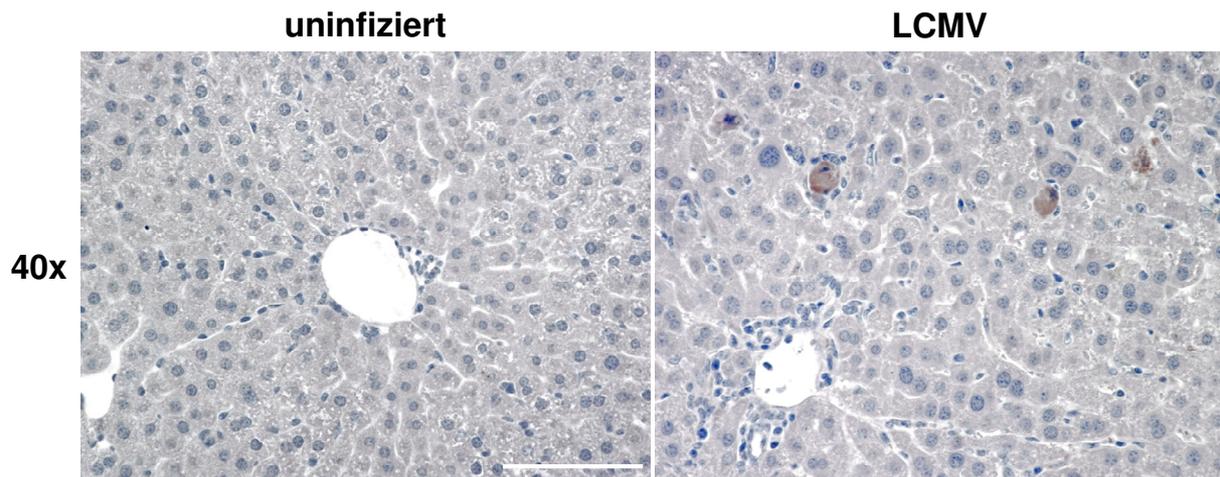


Abb. 3.29: Immunhistochemische Färbung der HMGB1-Expression (Braun) im Lebergewebe von C57BL/6 Mäusen 9 Tage nach der Infektion mit $1 \cdot 10^6$ FFU LCMV WE und uninfizierten Kontrolltieren (Skala = 100 µm).

9 Tage nach der Infektion waren im Lebergewebe der LCMV-infizierten C57BL/6 Mäuse HMGB1+ Zellen und Zelltrümmer nachweisbar. HMGB1-exprimierende Zellen waren mit Neutrophilen Granulozyten räumlich eng assoziiert und wiesen nekrotische Zellveränderungen auf. In uninfizierten Kontrolltieren war die extrazelluläre Freisetzung von HMGB1 nicht nachweisbar.

Aus der Untersuchung geht hervor, dass es im Lebergewebe der LCMV-infizierten Mäuse zu der Freisetzung von HMGB1 durch nekrotische Leberzellen kam.

3.2.25 HMGB1-Genexpression im Lebergewebe von LCMV-infizierten C57BL/6 Mäusen

HMGB1 kann von aktivierten Immunzellen aktiv sezerniert oder von nekrotischen Zellen passiv freigesetzt werden (Rovere-Querini *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 1999). Um zu untersuchen, ob es in der Leber von LCMV-infizierten Mäusen zu einer erhöhten HMGB1-RNA-Expression kommt, wurden C57BL/6 Mäuse mit $1 \cdot 10^6$ FFU LCMV WE infiziert und die HMGB1-RNA-Expression 9 Tage nach der Infektion im Lebergewebe relativ quantifiziert (siehe Abb. 3.30).

Die Expression der HMGB1-RNA konnte sowohl im Lebergewebe der LCMV-infizierten Mäuse als auch in uninfizierten Kontrollen nachgewiesen werden. Im Vergleich zu der Expression der HMGB1-RNA in uninfizierten Kontrollen war die Expression von HMGB1 in LCMV-infizierten Mäusen nicht signifikant erhöht (uninfiziert: $1,167 \pm 0,127$ vs. LCMV: $0,9634 \pm 0,091$; $p=0,2391$).

Die Untersuchung deutet darauf hin, dass es im Lebergewebe der LCMV-infizierten Mäuse nicht zu einer erhöhten HMGB1-RNA-Expression kam.

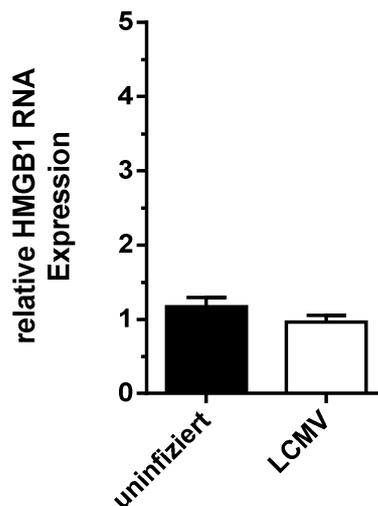


Abb. 3.30: Relative HMGB1-RNA-Expression im Lebergewebe von C57BL/6 Mäusen 9 Tage nach der Infektion mit $1 \cdot 10^6$ FFU LCMV WE und uninfizierten Kontrolltieren ($n=4$; $p=0,2391$).

3.2.26 Histologische Analyse der HMGB1- und TREM1-RNA-Expression im Lebergewebe von LCMV-infizierten C57BL/6 Mäusen

Um zu untersuchen, ob es im Lebergewebe der LCMV-infizierten Mäuse zu einer spezifischen Assoziation von HMGB1 mit TREM1+ Zellen kam, wurden Kryoschnitte aus der Leber von C57BL/6 Mäusen 9 Tage nach der Infektion mit $1 \cdot 10^6$ FFU LCMV WE angefertigt und die Verteilung von TREM1 und HMGB1 im Lebergewebe der LCMV-infizierten Mäuse immunhistologisch bestimmt (siehe Abb. 3.31 und 3.32).

Sowohl HMGB1+ Zellen als auch TREM1+ Zellen waren im Lebergewebe der LCMV-infizierten Mäuse diffus verteilt. Während die Expression von TREM1 und HMGB1 in uninfizierten Mäusen nicht nachgewiesen werden konnte, kam es in LCMV-infizierten Mäusen zu einer signifikanten Ko-Lokalisation von TREM1+ und HMGB1+ Zellen (HMGB1+: $67,9 \pm 1,59\%$ vs. HMGB1-: $32,09 \pm 1,59\%$; **** $p=0,0001$).

Genexpression 6 Stunden nach der Stimulation mit 5 MOI LCMV WE bzw. 10 µg/ml rekombinantes HMGB1 relativ quantifiziert (siehe Abb. 3.33).

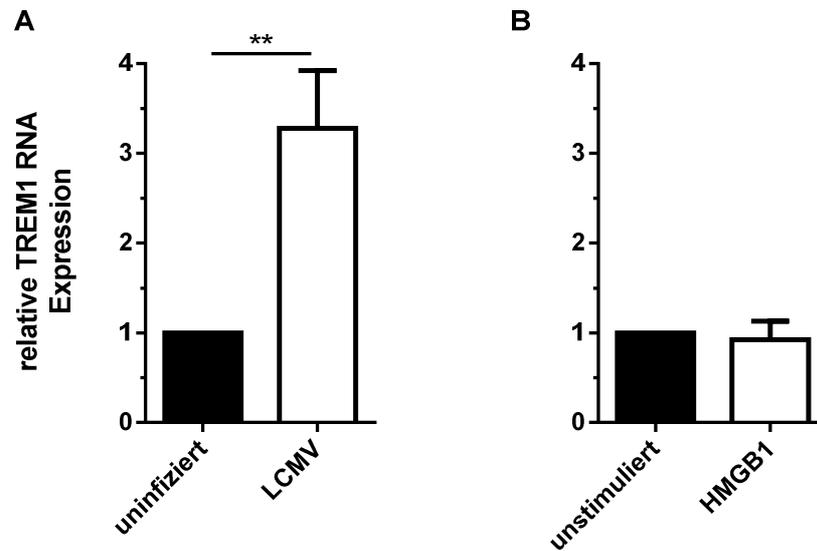


Abb. 3.33: Relative TREM1-RNA-Expression in Neutrophilen Granulozyten aus C57BL/6 Mäusen 6 Stunden nach der Infektion mit (A) LCMV WE (5 MOI) oder (B) HMGB1 (10 µg/ml) *in vitro* ((A) n=5; **p=0,0078; (B) n=5; p=0,7265).

Die Expression der TREM1-RNA war sowohl in unstimulierten Neutrophilen Granulozyten als auch in Neutrophilen Granulozyten nach der Stimulation mit LCMV oder rekombinantes HMGB1 nachweisbar. Im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen kam es in LCMV-infizierten Neutrophilen Granulozyten zu einer signifikant höheren TREM1-RNA-Expression (uninfiziert: 1 ± 0 vs. LCMV: $3,279 \pm 0,6462$; **p=0,0078). Eine Zunahme der TREM1-Expression war nach der Stimulation mit rekombinantes HMGB1 nicht feststellbar (unstimuliert: 1 ± 0 vs. HMGB1: $0,9268 \pm 0,2021$; p=0,7265).

Die Untersuchung deutet darauf hin, dass es in Neutrophilen Granulozyten nach der Stimulation mit LCMV zu einer signifikant erhöhten TREM1-RNA-Expression kam.

3.2.28 sTREM1-Freisetzung durch Leberzellen aus C57BL/6 Mäusen

Vorarbeiten deuten darauf hin, dass sTREM1 von aktivierten Phagozyten nach der Stimulation mit LPS freigesetzt wird (Gomez-Pina *et al.*, 2007). Um die sTREM1-Freisetzung durch Leberzellen zu untersuchen, wurden primäre Hepatozyten, Kupfer-Zellen, LSECs und Neutrophile Granulozyten aus C57BL/6 Mäusen isoliert und die sTREM1-Konzentration 24 Stunden nach der Stimulation mit LPS im Zellkulturüberstand analysiert (siehe Abb. 3.34).

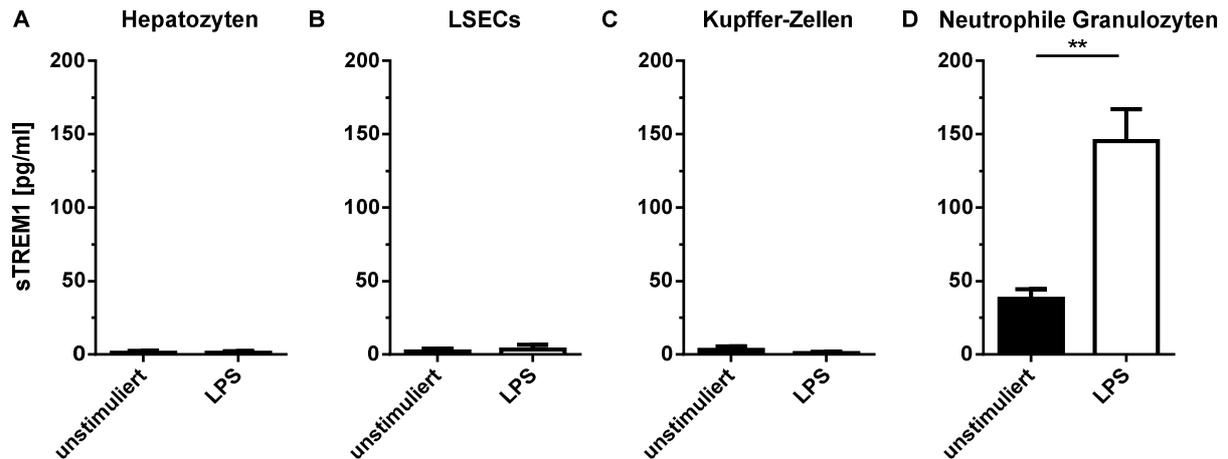


Abb. 3.34: Freisetzung von sTREM1 durch (A) primäre Hepatozyten, (B) LSECs, (C) Kupffer-Zellen und (D) Neutrophile Granulozyten aus C57BL/6 Mäusen 24 Stunden nach der Stimulation mit LPS (10 ng/ml) *in vitro* ((A) n=3-4; p=0,9835 (B) n=4; p=0,7488 (C) n=6; p=0,3661 (D) n=3-4; **p=0,0028)

Erhöhte sTREM1-Werte waren weder im Zellkulturüberstand von primären Hepatozyten (unstimuliert: 1,187 pg/ml vs. LPS: 1,152 pg/ml; p=0,9835) noch von LSECs (unstimuliert: 1,953 pg/ml vs. LPS: 3,255 pg/ml; p=0,7488) oder Kupffer-Zellen (unstimuliert: 3,209 pg/ml vs. LPS: 0,93 pg/ml; p=0,3611) nachweisbar. Jedoch konnte sowohl im Zellkulturüberstand von LCMV-stimulierten Neutrophilen Granulozyten als auch von unstimulierten Kontrollen eine deutlich erhöhte sTREM1-Konzentration nachgewiesen werden (unstimuliert: 37,75 pg/ml vs. LPS: 145,3 pg/ml; *p=0,0028). Darüber hinaus kam es im Zellkulturüberstand von LPS-stimulierten Neutrophilen Granulozyten zu einem signifikanten Anstieg der sTREM1-Konzentration.

Die Befunde zeigen, dass es zu der Freisetzung von sTREM1 durch Neutrophile Granulozyten jedoch nicht durch Hepatozyten, LSECs oder Kupffer-Zellen kam.

3.2.29 sTREM1-Freisetzung durch Neutrophile Granulozyten aus C57BL/6 Mäusen

Um zu untersuchen, ob die Freisetzung von sTREM1 in Neutrophilen Granulozyten durch LCMV oder HMGB1 induzierbar ist, wurden Neutrophile Granulozyten aus C57BL/6 Mäusen isoliert und die sTREM1-Konzentration 24 Stunden nach der Stimulation mit 5 MOI LCMV WE bzw. 10 µg/ml rekombinatem HMGB1 mittels ELISA im Zellkulturüberstand quantifiziert (siehe Abb. 3.35).

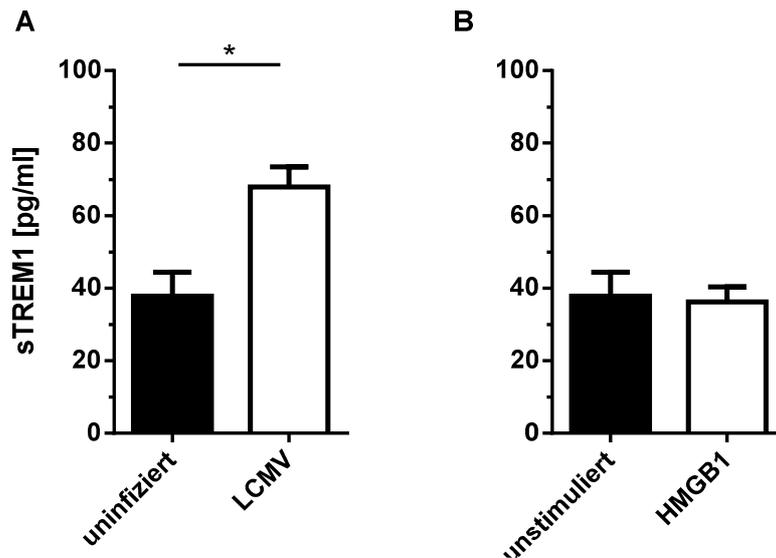


Abb. 3.35: Freisetzung von sTREM1 durch Neutrophile Granulozyten aus C57BL/6 Mäusen 24 Stunden nach der Stimulation mit (A) LCMV WE (5 MOI) oder (B) HMGB1 (10 µg/ml) *in vitro* ((A) n=3-4; *p=0,0211 (B) n=3-4; p=0,8640).

Die sTREM1-Sekretion durch Neutrophile Granulozyten war sowohl nach der Infektion mit LCMV als auch nach der Stimulation mit HMGB1 nachweisbar. In LCMV-infizierten Neutrophilen Granulozyten kam es im Vergleich zu nicht-infizierten Kontrollen zu einer signifikant erhöhten sTREM1-Sekretion (unstimuliert: 37,75 pg/ml vs. LCMV: 67,93 pg/ml; *p=0,0211). Nach der Stimulation mit HMGB1 war eine erhöhte sTREM1-Freisetzung durch Neutrophile Granulozyten nicht feststellbar (unstimuliert: 37,75 pg/ml vs. HMGB1: 36,21 pg/ml; p=0,8640).

Aus der Analyse geht hervor, dass die Freisetzung von sTREM1 in Neutrophilen Granulozyten durch LCMV jedoch nicht durch HMGB1 induziert werden konnte.

3.2.30 CCL2/MCP1- und TNFα-RNA-Expression in LCMV-infizierten und HMGB1-stimulierten TREM1 -/- und TREM1 +/+ Mäusen

Ein Ligand für die Aktivierung von TREM1 konnte bisher nicht eindeutig identifiziert werden (El Mezayen *et al.*, 2007; Gibot *et al.*, 2006b; Haselmayer *et al.*, 2007). Um zu untersuchen, ob TREM1 konstitutiv aktiviert ist oder durch LCMV, HMGB1 oder LPS aktiviert werden kann, wurden Neutrophile Granulozyten aus TREM1 -/- und TREM1 +/+ Mäusen isoliert und die Expression der proinflammatorischen Zytokine CCL2/MCP1 und TNFα 6 Stunden nach der Stimulation mit 5 MOI LCMV WE bzw. 10 µg/ml HMGB1 und 10 ng/ml LPS relativ quantifiziert (siehe Abb. 3.36).

Sowohl in unstimulierten Kontrollen als auch nach der Stimulation mit LCMV, HMGB1 oder LPS war die Expression von CCL2/MCP1 und TNFα in TREM1 -/- und TREM1 +/+ Neutrophilen Granulozyten nachweisbar. Relativ zu der Genexpression in TREM1 +/+

Neutrophilen Granulozyten konnte in TREM1 $-/-$ Neutrophilen Granulozyten weder in unstimulierten Kontrollen (CCL2/MCP1: TREM1 $+/+$ $1,257 \pm 0,464$ vs. TREM1 $-/-$ $1,454 \pm 1,143$; $p=0,862$; TNF α : TREM1 $+/+$ $1,164 \pm 0,362$ vs. TREM1 $-/-$ $0,525 \pm 0,076$; $p=0,159$) noch nach der Stimulation mit LCMV (CCL2/MCP1: TREM1 $+/+$ $1,471 \pm 0,819$ vs. TREM1 $-/-$ $1,498 \pm 0,325$; $p=0,977$; TNF α : TREM1 $+/+$ $1,134 \pm 0,652$ vs. TREM1 $-/-$ $1,063 \pm 0,238$; $p=0,924$), HMGB1 (CCL2/MCP1: TREM1 $+/+$ $0,989 \pm 0,373$ vs. TREM1 $-/-$ $1,416 \pm 0,651$; $p=0,577$; TNF α : TREM1 $+/+$ $0,973 \pm 0,524$; vs. TREM1 $-/-$ $0,878 \pm 0,289$; $p=0,883$) oder LPS (CCL2/MCP1: TREM1 $+/+$ $2,152 \pm 1,471$ vs. TREM1 $-/-$ $2,434 \pm 1,822$; $p=0,910$; TNF α : TREM1 $+/+$ $0,982 \pm 0,024$ vs. TREM1 $-/-$ $0,941 \pm 0,196$; $p=0,847$) eine signifikant erhöhte Expression der CCL2/MCP1- und TNF α -RNA ermittelt werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass es weder nach der Stimulation von Neutrophilen Granulozyten mit LCMV, HMGB1 oder LPS noch in unstimulierten Neutrophilen Granulozyten zu einer TREM1-abhängigen Expression der proinflammatorischen Zytokine TNF α und CCL2/MCP1 kam.

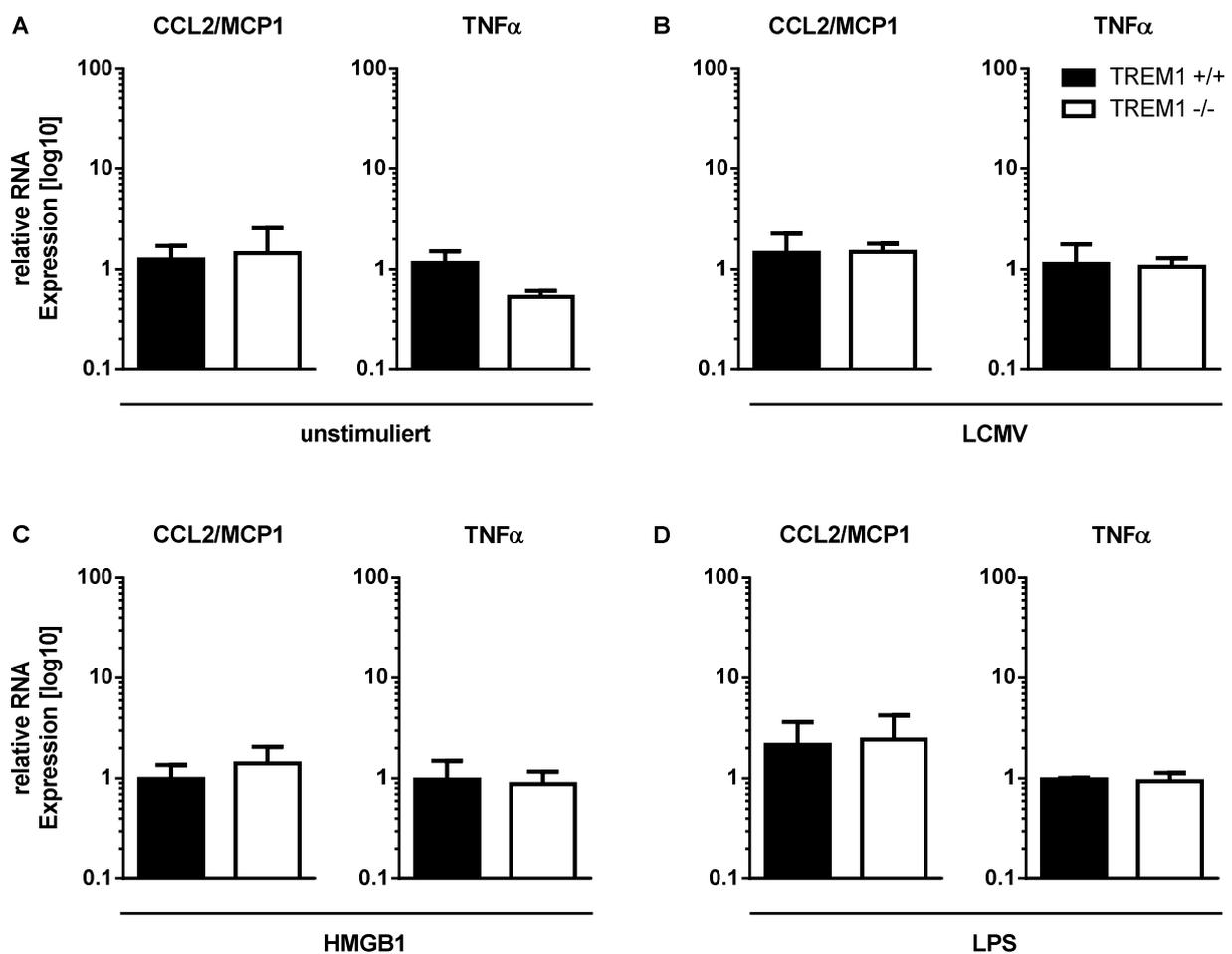


Abb. 3.36: Relative CCL2/MCP1- und TNF α -RNA-Expression in Neutrophilen Granulozyten aus TREM1 $-/-$ und TREM1 $+/+$ Mäusen 6 Stunden nach der Stimulation mit (B) LCMV (MOI 5), (C) HMGB1 (10 μ g/ml), (D) LPS (10ng/ml) und (A) unstimulierten Kontrollen *in vitro* ((A) $n=2-3$; CCL2 $p=0,862$; TNF α $p=0,159$ (B) $n=3$; CCL2 $p=0,977$; TNF α $p=0,924$ (C) $n=2-3$ CCL2 $p=0,577$; TNF α $p=0,883$ (D) $n=3$; CCL2 $p=0,910$; TNF α $p=0,847$)).

3.3 Rolle und Funktion von TREM1 in *Listeria monocytogenes*-infizierten Mäusen

Um die Rolle und Funktion von TREM1 im Verlauf einer bakteriellen Hepatitis zu untersuchen, wurden TREM1 $-/-$ und TREM1 $+/+$ Mäuse mit *Listeria monocytogenes* infiziert und die TREM1-Expression im Lebergewebe der *L. monocytogenes*-infizierten Mäuse ermittelt (siehe 3.3.1 - 3.3.2). Darüber hinaus wurde der Einfluss von TREM1 auf die Vermehrung von *L. monocytogenes* im Leberparenchym analysiert (siehe 3.3.3) und die Leberschädigung im Lebergewebe der *L. monocytogenes*-infizierten TREM1 $+/+$ und TREM1 $-/-$ Mäuse untersucht (siehe 3.3.4 - 3.3.5).

3.3.1 TREM1-RNA-Expression im Lebergewebe von *Listeria monocytogenes*-infizierten Mäusen

Um zu untersuchen, ob es im Lebergewebe von *L. monocytogenes*-infizierten Mäusen zu einer erhöhten TREM1-Expression kommt, wurden TREM1 $+/+$ Mäuse mit $2 \cdot 10^4$ *L. monocytogenes* i.v. infiziert und die TREM1-Expression 3 Tage nach der Infektion relativ quantifiziert (siehe Abb. 3.37).

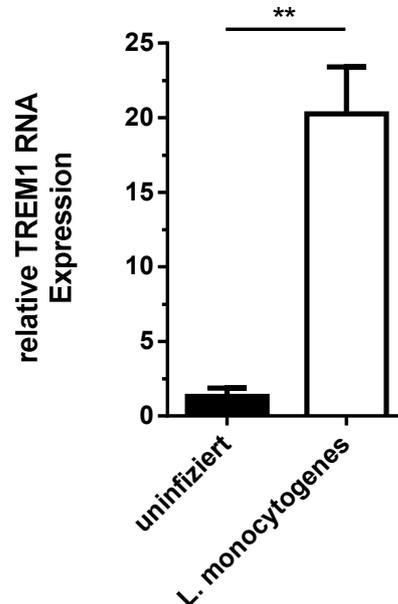


Abb. 3.37: Relative TREM1-RNA-Expression in C57BL/6 Mäusen 3 Tage nach der Infektion mit $2 \cdot 10^4$ *L. monocytogenes* *in vivo* (n=4-8; **p=0,004).

Sowohl in der Leber von *L. monocytogenes*-infizierten Mäusen als auch in uninfizierten Kontrollen konnte die Expression der TREM1-RNA festgestellt werden. Im Vergleich zu uninfizierten Kontrolltieren war die TREM1 Genexpression im Lebergewebe der

L. monocytogenes-infizierten Mäuse signifikant erhöht (uninfiziert: $1,322 \pm 0,5374$ vs. *L. monocytogenes*: $20,26 \pm 3,143$; ** $p=0,004$).

Die Ergebnisse zeigen, dass es im Verlauf der *L. monocytogenes*-Infektion zu einer signifikant erhöhten TREM1-Genexpression im Lebergewebe der *L. monocytogenes*-infizierten Mäuse kam.

3.3.2 sTREM1-Freisetzung in *Listeria monocytogenes*-infizierten C57BL/6 Mäusen

Nachdem im Lebergewebe der *L. monocytogenes*-infizierten Mäuse eine erhöhte TREM1-RNA-Expression nachgewiesen werden konnte (siehe 3.3.1), sollte die Freisetzung von sTREM1 in *L. monocytogenes*-infizierten Mäusen untersucht werden. Hierfür wurden C57BL/6 Mäuse mit $2 \cdot 10^4$ *L. monocytogenes* i.v. infiziert und die sTREM1-Konzentration 3 Tage nach der Infektion mittels ELISA im Blutplasma der infizierten Mäuse bestimmt (siehe Abb. 3.38).

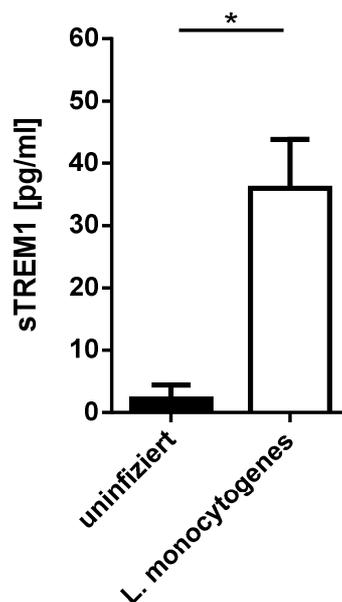


Abb. 3.38: sTREM1-Freisetzung im Blut von C57BL/6 Mäusen 3 Tage nach der Infektion mit $2 \cdot 10^4$ *L. monocytogenes* *in vivo* (n=6; * $p=0,0152$).

Sowohl in *L. monocytogenes*-infizierten Mäusen als auch in uninfizierten Kontrollen war die Freisetzung von sTREM1 im Blutplasma nachweisbar. Im Vergleich zu uninfizierten Kontrolltieren war die sTREM1-Konzentration im Blut von *L. monocytogenes*-infizierten Mäusen signifikant erhöht (uninfiziert: $2,215 \pm 2,215$ pg/ml vs. *L. monocytogenes*: $36,00 \pm 7,856$ pg/ml; * $p=0,0152$).

Aus der Untersuchung geht hervor, dass es im Verlauf der *L. monocytogenes*-Infektion zu einer signifikant erhöhten Freisetzung von sTREM1 im Blut der *L. monocytogenes*-infizierten Mäuse kam.

3.3.3 *Listeria monocytogenes*-Titer im Lebergewebe von *L. monocytogenes*-infizierten TREM1 $-/-$ und TREM1 $+/+$ Mäusen

Um zu untersuchen, ob die TREM1-Expression einen Einfluss auf den Verlauf der *L. monocytogenes*-Infektion hat, wurden TREM1 $-/-$ und TREM1 $+/+$ Mäuse mit $2 \cdot 10^4$ *L. monocytogenes* i.v. infiziert und die *L. monocytogenes*-Titer 3 Tage nach der Infektion im Lebergewebe der infizierten Mäuse quantifiziert (siehe Abb. 3.39).

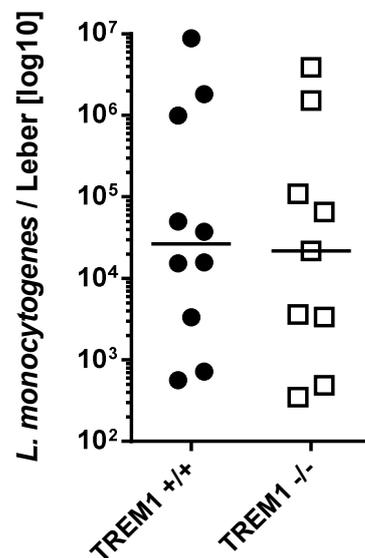


Abb. 3.39: *L. monocytogenes*-Titer im Lebergewebe von TREM1 $-/-$ und TREM1 $+/+$ Mäusen 3 Tage nach der Infektion mit $2 \cdot 10^4$ *L. monocytogenes* *in vivo* (n=9-10; p=0,8208).

Sowohl in *L. monocytogenes*-infizierten TREM1 $-/-$ Mäusen als auch in TREM1 $+/+$ Mäusen konnten Listerien im Lebergewebe nachgewiesen werden. In beiden Mausgruppen waren die *L. monocytogenes*-Titer nicht signifikant unterschiedlich (TREM1 $+/+$: $2,65 \cdot 10^4$ vs. TREM1 $-/-$: $2,17 \cdot 10^4$; p=0,8208).

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass TREM1 keinen Einfluss auf die Anzahl der vermehrungsfähigen Bakterien im Lebergewebe der *L. monocytogenes*-infizierten Mäuse hatte.

3.3.4 Histologische Analyse des Leberschadens in *Listeria monocytogenes*-infizierten TREM1 $-/-$ und TREM1 $+/+$ Mäusen

Um die Leberschädigung in *L. monocytogenes*-infizierten TREM1 $-/-$ und TREM1 $+/+$ Mäusen zu charakterisieren, wurden H&E-gefärbte Leberschnitte aus dem Lebergewebe von *L. monocytogenes*-infizierten TREM1 $-/-$ und TREM1 $+/+$ Mäusen 3 Tage nach der Infektion mit $2 \cdot 10^4$ *L. monocytogenes* angefertigt und histopathologisch untersucht (siehe Abb. 3.40).

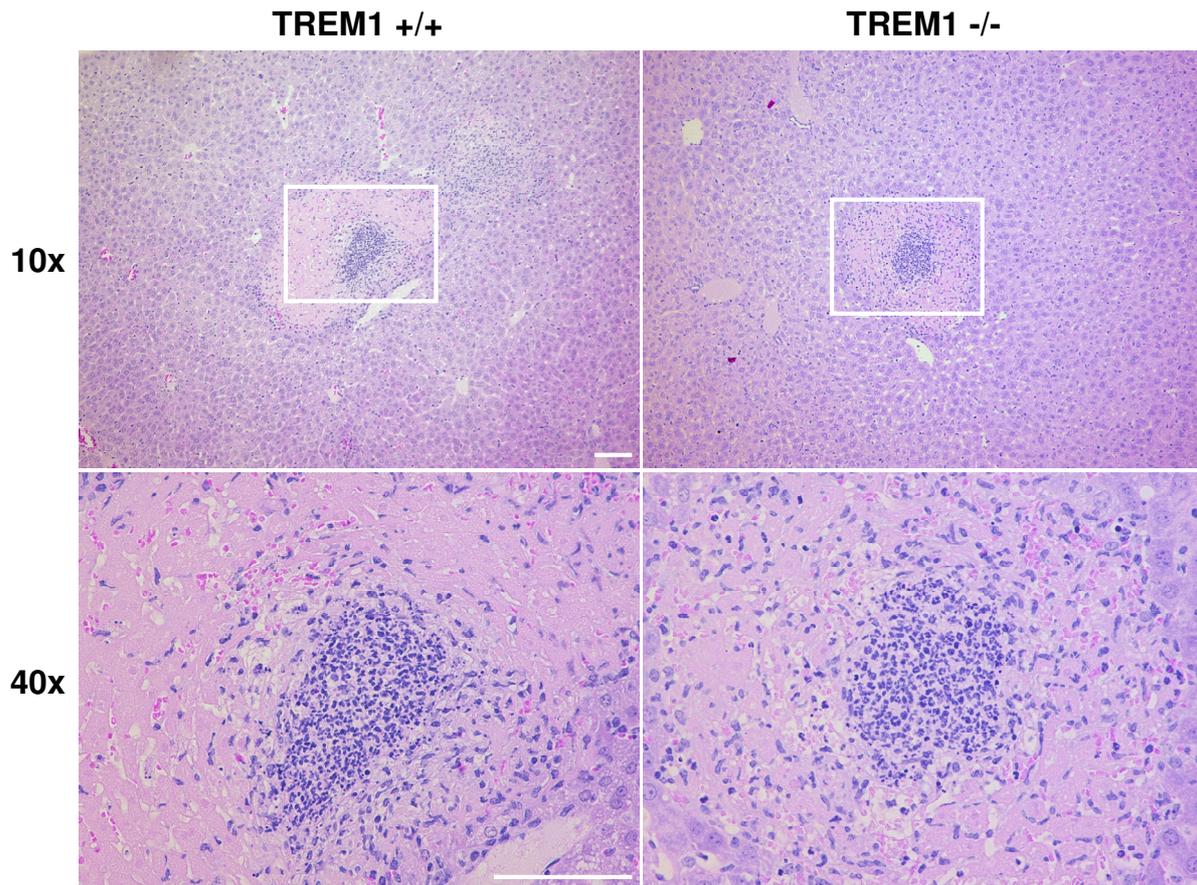


Abb. 3.40: H&E-Färbung von Lebergewebe aus TREM1 $-/-$ und TREM1 $+/+$ Mäusen 3 Tage nach der Infektion mit $2 \cdot 10^4$ *L. monocytogenes* *in vivo* (Skala = 100 μ m).

Sowohl in TREM1 $-/-$ als auch in TREM1 $+/+$ Mäusen kam es nach der *L. monocytogenes*-Infektion zu einer massiven Schädigung des Lebergewebes. In beiden Mausgruppen zeigten sich großflächige fokale Leukozytenansammlungen und vereinzelte Einzelzellnekrosen.

Die Untersuchung deutet darauf hin, dass es sowohl in *L. monocytogenes*-infizierten TREM1 $-/-$ Mäusen als auch in *L. monocytogenes*-infizierten TREM1 $+/+$ Mäusen zu einer pathologischen Schädigung des Lebergewebes kam.

3.4 sTREM1-Serumkonzentration in HBV- und HCV-Patienten

Nachdem sowohl im Serum von LCMV-infizierten Mäusen als auch von *L. monocytogenes*-infizierten Mäusen eine signifikant erhöhte Konzentration der löslichen TREM1-Rezeptorvariante sTREM1 nachgewiesen werden konnte (siehe 3.2.7 und 3.3.2), sollte die sTREM1-Konzentration im Blut von HBV- und HCV-Patienten bestimmt werden. Hierfür wurde das Serum aus dem Vollblut von HBV- und HCV-Patienten isoliert und mittels ELISA auf die sTREM1 Konzentration untersucht (siehe Abb. 3.42).

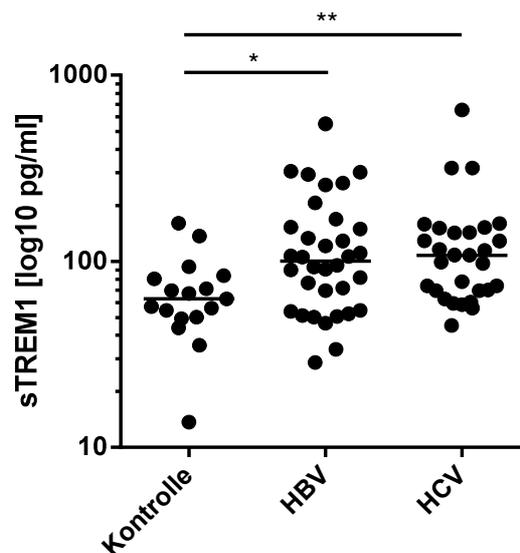


Abb. 3.42: sTREM1-Serumkonzentration in HBV- und HCV-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen (Kontrolle: n=17; HBV: n=34 *p=0,0201; HCV: n=29 *p=0,0079).

Sowohl in HBV- und HCV-Patienten als auch in gesunden Kontrollen konnte die Expression von sTREM1 nachgewiesen werden. Jedoch war im Vergleich zu gesunden Kontrollen (62,79 pg/ml) die sTREM1-Serumkonzentration in HBV- (100,4 pg/ml; *p=0,0201) und HCV-Patienten (107,6 pg/ml; *p=0,0079) signifikant erhöht.

Die Ergebnisse zeigen, dass es sowohl im Serum von HBV- als auch von HCV-Patienten zu einer signifikant erhöhten Freisetzung der löslichen TREM1 Rezeptorvariante sTREM1 kam.

4. Diskussion

4.1 Funktionelle Relevanz von TREM1 in LCMV WE-infizierten Mäusen

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle und Funktion von TREM1 im Verlauf einer viralen und einer bakteriellen Leberinfektion zu untersuchen.

TREM1 ist ein entzündungsfördernder Rezeptor, der sowohl von aktivierten Immunzellen als auch von Leberzellen exprimiert werden kann (Bouchon *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2008; Liao *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2012). Vorarbeiten deuten darauf hin, dass die Expression von TREM1 durch bakterielle TLR-Liganden induziert werden kann (Bleharski *et al.*, 2003; Bouchon *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2010).

Interessanterweise konnten im Rahmen dieser Arbeit Hinweise auf eine Induktion von TREM1 durch virale TLR-Liganden und antivirale Zytokine ermittelt werden. So konnten im Promotor des TREM1-Gens sowohl eine NF-kappaB-Bindestelle als auch mehrere konservierte Transkriptionsfaktorbindestellen für AP1 und STAT1 identifiziert werden (siehe Abb. 3.7).

Sowohl TLR3 als auch RIG-I können nach der Interaktion mit viraler ssRNA oder dsRNA die Aktivierung des NF-kappaB Signalwegs induzieren (Akira *et al.*, 2006; Kawai und Akira, 2007, 2011). Darüber hinaus führt die TLR-abhängige Aktivierung von TRAF6 zu einer Aktivierung des MAP-Kinase-Signalwegs und bewirkt die Aktivierung von AP1 (Whitmarsh und Davis, 1996). Die Aktivierung von STAT1 hingegen wird durch IFN γ induziert (Ramana *et al.*, 2002), das während einer Virusinfektion u.a. von aktivierten T_{H1} T-Zellen, Neutrophilen Granulozyten, NK-Zellen und zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen freigesetzt werden kann (Andersen *et al.*, 2006; Ethuin *et al.*, 2004; Fehniger *et al.*, 2000). Da es während einer viralen Hepatitis zu der Aktivierung von antiviralen TLR-Signalwegen und der Freisetzung von antiviralen Zytokinen kommt, lassen die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen somit eine funktionelle Relevanz von TREM1 im Verlauf einer viralen Hepatitis vermuten.

Um die funktionelle Relevanz TREM1 im Verlauf einer viralen Hepatitis zu untersuchen, wurde LCMV als Modellsystem verwendet. Die experimentelle Infektion von Mäusen mit LCMV WE ist ein etabliertes Modellsystem für eine akute nicht-zytotoxische virale Hepatitis (Herkele *et al.*, 2005; Lohse *et al.*, 2010; Zinkernagel *et al.*, 1986). So konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass es im Lebergewebe der LCMV-infizierten Mäuse sowohl zu einer akuten Infektion von parenchymatischen Leberzellen durch das Virus (siehe Abb. 3.2 und 3.3) als auch zu einer Immunzell-vermittelten Zerstörung von LCMV-infizierten Leberzellen durch das Immunsystem kam (siehe Abb. 3.4 und 3.5).

Tatsächlich konnte im Rahmen dieser Arbeit, neben einer konstitutiven TREM1-Proteinexpression im Lebergewebe von naiven C57BL/6 Mäusen (siehe Abb. 3.6), eine signifikant erhöhte TREM1-RNA-Expression in der Leber der LCMV-infizierten Mäuse nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.10). Da es im Lebergewebe der LCMV-infizierten Mäuse sowohl zu einer Assoziation der TREM1-RNA-Expression mit der Höhe der Virustiter (siehe Abb. 3.10 und 3.1) als auch mit der Schädigung des Lebergewebes kam (siehe Abb. 3.5), deuten die hier durchgeführten Analysen auf eine funktionelle Relevanz von TREM1 im Lebergewebe der LCMV-infizierten Mäuse hin.

Um den Einfluss von TREM1 auf den Infektionsverlauf in LCMV-infizierten Mäusen zu untersuchen, wurden sowohl TREM1 $-/-$ als auch TREM1 $+/+$ Mäuse mit LCMV infiziert und die Kinetik der Virusinfektion vergleichend charakterisiert. Interessanterweise kam es in den LCMV-infizierten TREM1 $-/-$ Mäusen neben einer signifikant verringerten Schädigung des Lebergewebes (siehe Abb. 3.16) auch zu einer beschleunigten Ausheilung der LCMV-Infektion (siehe Abb. 3.13). Da außerdem sowohl eine signifikant reduzierte Viruslast (siehe Abb. 3.14 und 3.15) als auch eine signifikant verringerte Freisetzung von Serumtransaminasen (siehe Abb. 3.17) im Lebergewebe der LCMV-infizierten TREM1 $-/-$ Mäuse nachgewiesen werden konnte, lassen die hier durchgeführten Analysen eine entzündungsfördernde Wirkung von TREM1 im Verlauf einer viralen Hepatitis vermuten.

CD8⁺ zytotoxische T-Zellen spielen eine Schlüsselrolle bei der Elimination von Virus-infizierten Leberzellen (Trautmann *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2012; Zinkernagel *et al.*, 1986). Um zu untersuchen, ob TREM1 einen Einfluss auf die Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen hat, wurden LCMV-spezifischen CD8⁺ zytotoxische T-Zellen aus LCMV-infizierten TREM1 $-/-$ und TREM1 $+/+$ Mäusen isoliert und auf ihren Aktivierungszustand untersucht. Jedoch konnte im Rahmen dieser Arbeit weder eine signifikant unterschiedliche Expression der proinflammatorischen Zytokine TNF α und IFN γ noch des Degranulationsmarkers CD107 in GP33 restimulierten LCMV-spezifischen TREM1 $-/-$ CD8⁺ T-Zellen nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.19). Aufgrund der hier ermittelten Ergebnisse lässt sich somit vermuten, dass TREM1 keinen direkten Einfluss auf die antivirale Aktivität von CD8⁺ T-Zellen hatte.

In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass TREM1 sowohl auf der Zelloberfläche von aktivierten Immunzellen als auch von Leberzellen exprimiert werden kann (Bouchon *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2008; Liao *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2012). Um zu untersuchen, ob TREM1 auf Leberzellen oder Immunzellen exprimiert wird, wurden das Lebergewebe von LCMV-infizierten TREM1 $+/+$ und TREM1 $-/-$ Mäusen auf die Expression von TREM1 immunhistochemisch untersucht. Jedoch konnte im Rahmen dieser Arbeit die Expression von TREM1 weder auf CD8⁺ T-Zellen noch auf Hepatozyten, LSECs oder Kupffer-Zellen nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.18 und 3.20). Stattdessen war die Expression von TREM1 im Lebergewebe der LCMV-infizierten Mäuse auf Neutrophile Granulozyten

beschränkt (siehe Abb. 3.21 und 3.22). Da in vorangegangenen Studien eine aktivierende Wirkung von TREM1 auf Immunzellen beschrieben wurde (Bouchon *et al.*, 2000), deuten die hier ermittelten Ergebnisse somit auf eine aktivierende Funktion von TREM1 auf Neutrophile Granulozyten hin.

TREM1 besitzt jedoch keine Signaldomäne und ist für die Signalweiterleitung auf die Interaktion mit dem ITAM Signal-Adapterprotein DAP12 angewiesen (Bouchon *et al.*, 2000; Colonna und Facchetti, 2003). Um zu untersuchen, ob DAP12 auf TREM1+ Neutrophilen Granulozyten exprimiert wird, wurde die DAP12 Expression sowohl auf TREM1+ Neutrophilen Granulozyten als auch im Lebergewebe von LCMV-infizierten Mäusen untersucht. Tatsächlich konnte im Lebergewebe der LCMV-infizierten Mäuse neben der Expression von TREM1 (siehe Abb. 3.21 und 3.22) auch die Expression von DAP12 auf Neutrophilen Granulozyten nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.23). Da außerdem in der Leber der LCMV-infizierten Mäuse eine Assoziation der TREM1-RNA-Expression und der DAP12-RNA-Expression festgestellt werden konnte (siehe Abb. 3.10 und 3.11), lassen die hier durchgeführten Analysen eine funktionelle Relevanz von TREM1 in Neutrophilen Granulozyten vermuten.

Neutrophile Granulozyten können Pathogene phagozytieren und sowohl die Migration als auch die Aktivierung von Immunzellen durch die Expression proinflammatorischer Zytokine verstärken (Wright *et al.*, 2010). Darüber hinaus sind Neutrophile Granulozyten dazu in der Lage, Pathogene durch die Freisetzung von NETS zu immobilisieren und durch die Degranulation von antimikrobiellen Peptiden und ROS abzutöten (Dupre-Crochet *et al.*, 2013; Fuchs *et al.*, 2007). Obwohl in vorangegangenen Studien eine entzündungsfördernde Wirkung von Neutrophilen Granulozyten bei systemischen Entzündungsreaktionen nachgewiesen werden konnte (Mócsai, 2013), ist die Funktion von Neutrophilen Granulozyten bei viralen (Leber)Infektionen nur unvollständig verstanden. Allerdings konnte im Rahmen dieser Arbeit eine signifikant erhöhte Expression der entzündungsfördernden Zytokine MCP1/CCL2 und TNF α in LCMV-stimulierten Neutrophilen Granulozyten nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.26). Aufgrund der hier durchgeführten Analysen lässt sich somit eine proinflammatorische Wirkung von TREM1 auf die Aktivierung von Neutrophilen Granulozyten vermuten.

Tatsächlich konnte im Rahmen dieser Arbeit sowohl in TREM1 $-/-$ Neutrophilen Granulozyten (siehe Abb. 3.27) als auch im Lebergewebe der LCMV-infizierten TREM1 $-/-$ Mäuse (siehe Abb. 3.28) eine verringerte Expression der proinflammatorischen Zytokine MCP1/CCL2 und TNF α nachgewiesen werden. Da MCP1/CCL2 sowie TNF α einen entzündungsfördernden Einfluss auf die Aktivierung von Immunzellen besitzen (Deshmane *et al.*, 2009; Rand *et al.*, 1996; Wajant *et al.*, 2003; Wright *et al.*, 2010) und in den LCMV-infizierten TREM1 $-/-$ Mäusen eine signifikant verringerte Schädigung des Lebergewebes festgestellt werden konnte (siehe Abb. 3.16 und 3.17), deuten die hier durchgeführten Analysen auf eine zytopathische Funktion von TREM1 bei viralen Leberinfektionen hin.

In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass die Blockierung von TREM1 mit dem rekombinanten Peptid LP17 zu einer reduzierten Freisetzung proinflammatorischer Zytokine führt (Gibot *et al.*, 2004b; Schenk *et al.*, 2007). Da das Immunsystem in Patienten mit viralen Lebererkrankungen einen entscheidenden Einfluss auf die Schädigung des Lebergewebes hat (Guidotti und Chisari, 2006) und im Rahmen dieser Arbeit eine entzündungsfördernde Wirkung von TREM1 auf die Aktivierung von Neutrophilen Granulozyten nachgewiesen werden konnte (siehe Abb. 3.27 und 3.28), lässt sich vermuten, dass die Blockierung von TREM1 einen protektiven Einfluss auf das Lebergewebe in Patienten mit viralen Lebererkrankungen haben könnte. Die Blockierung von TREM1 stellt somit einen möglichen Ansatzpunkt für die therapeutische Behandlung von Patienten mit viralen Leberinfektionen dar.

In nachfolgenden Studien sollte daher die therapeutische Relevanz von TREM1 als Ziel für die Modulation von entzündungsfördernden Prozessen bei viralen Lebererkrankungen weiter untersucht werden.

4.2 TREM1-Ligand

Trotz intensiver Forschung konnte ein Ligand für die Aktivierung von TREM1 bisher nicht eindeutig identifiziert werden. Jedoch lassen mehrere Studien eine Aktivierung von TREM1 durch HMGB1 (high-mobility group protein B1), virale Oberflächenmoleküle, einen Liganden auf Neutrophilen Granulozyten oder PGLYRP1 (peptidoglycan recognition protein 1) vermuten (Gibot *et al.*, 2006b; Mohamadzadeh *et al.*, 2006; Read *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2012).

HMGB1 ist ein endogenes Gefahrensignal, das von Immunzellen aktiv sezerniert oder von nekrotischen Zellen passiv freigesetzt werden kann (Erlandsson Harris und Andersson, 2004). In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass sowohl die Phosphorylierung als auch die Acetylierung zweier Lysin-reicher Kernlokalisationssequenzen, die im nicht-modifizierten Zustand den Import von HMGB1 in den Zellkernimport vermitteln, die Sekretion von HMGB1 induzieren (Bonaldi *et al.*, 2003; Youn und Shin, 2006).

Um zu untersuchen, ob HMGB1 in der Leber von LCMV-infizierten Mäusen von Immunzellen aktiv sezerniert oder passiv von nekrotischen Leberzellen freigesetzt wird, wurde die Expression von HMGB1 im Lebergewebe der LCMV-infizierten Mäuse sowohl molekularbiologisch als auch immunhistologisch quantifiziert. Allerdings konnte in der vorliegenden Arbeit eine signifikant erhöhte HMGB1-RNA-Expression im Lebergewebe der LCMV-infizierten Mäuse nicht nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.30). Stattdessen war die Freisetzung von HMGB1 im Lebergewebe der LCMV-infizierten Mäuse auf nekrotische Hepatozyten beschränkt (siehe Abb. 3.29 und 3.31). Aufgrund der hier ermittelten Ergebnisse lässt sich somit vermuten, dass HMGB1 in der Leber der LCMV-infizierten Mäuse nicht aktiv

von Immunzellen sezerniert wurde, sondern von nekrotischen Leberzellen passiv freigesetzt wurde.

Mehrere Studien lassen eine proinflammatorische Wirkung von HMGB1 vermuten (Chen *et al.*, 2013; Scaffidi *et al.*, 2002). Obwohl in Vorarbeiten gezeigt werden konnte, dass HMGB1 spezifisch an TREM1 bindet (Wu *et al.*, 2012) und in dieser Arbeit eine spezifische Interaktion von TREM1 ^{+/+} Neutrophilen Granulozyten mit HMGB1-exprimierenden nekrotischen Hepatozyten nachgewiesen werden konnte (siehe Abb. 3.31 und 3.32), war weder ein TREM1-abhängiger Einfluss von HMGB1 auf die Expression der proinflammatorischen Zytokine MCP1/CCL2 noch auf die Expression von TREM1 in HMGB1-stimulierten TREM1 ^{+/+} Neutrophilen Granulozyten nachweisbar (siehe Abb. 3.33 b und 3.36c). Die hier ermittelten Ergebnisse deuten somit darauf hin, dass eine Aktivierung von TREM1 durch HMGB1 unwahrscheinlich ist. Allerdings ist die proinflammatorische Wirkung von HMGB1 vom Oxidationszustand des Moleküls abhängig. So konnte in Vorarbeiten gezeigt werden, dass nur reduziertes HMGB1, das eine Thiolgruppe an Position C106 sowie eine Disulfidbrücke zwischen C23 und C45 besitzt, dazu in der Lage ist, die Aktivierung von NF-kappaB zu induzieren (Yang *et al.*, 2012). Da jedoch der Oxidationszustand des hier verwendeten rekombinant-hergestellten HMGB1 nicht bekannt ist, kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein möglicher Einfluss von HMGB1 auf die Aktivierung von TREM1 im Rahmen der hier durchgeführten Analysen unentdeckt geblieben sein könnte. Um den Einfluss von HMGB1 auf die Aktivierung von TREM1 zu untersuchen, bedarf es somit noch weiterer Forschung.

Neben einer möglichen Aktivierung von TREM1 durch mikrobielle Zellwandbestandteile, konnte in Vorarbeiten auch eine Stimulation von TREM1 durch Hüllproteine von Ebola- und Marburg-Viren nachgewiesen werden (Mohamadzadeh *et al.*, 2006). Da in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass LCMV die Genexpression der proinflammatorischen Zytokine MCP1/CCL2 und TNF α in Neutrophilen Granulozyten induziert (siehe Abb. 3.26) und nachgewiesen werden konnte, dass TREM1 auf Neutrophilen Granulozyten konstitutiv exprimiert wird (siehe Abb. 3.33), sollte untersucht werden, ob LCMV ein Ligand für TREM1 ist. Da jedoch eine TREM1-abhängige Expression der proinflammatorischen Zytokine MCP1/CCL2 und TNF α in LCMV-stimulierten Neutrophilen Granulozyten nicht nachgewiesen werden konnte (siehe Abb. 3.36b), deuten die hier ermittelten Ergebnisse darauf hin, dass ein möglicher TREM1-Ligand auf der LCMV-Virushülle nicht exprimiert wird.

Zusätzlich zu einer möglichen Aktivierung von TREM1 durch HMGB1 oder virale Oberflächenbestandteile wurde in Vorarbeiten die Aktivierung von TREM1 durch einen Liganden auf der Zelloberfläche von aktivierten Neutrophilen Granulozyten beschrieben (Gibot *et al.*, 2006b). Darüber hinaus konnten in einer erst kürzlich veröffentlichten Studie Hinweise auf die Aktivierung von TREM1 durch PGLYRP1 ermittelt werden (Read *et al.*, 2015). Da PGLYRP1 aus tertiären Granula von aktivierten Neutrophilen Granulozyten freigesetzt wird,

und LPS die Aktivierung von Neutrophilen Granulozyten induziert, wurde der Aktivierungszustand von TREM1 $-/-$ und TREM1 $+/+$ Neutrophilen Granulozyten nach der Behandlung mit LPS verglichen. Jedoch konnte im Rahmen dieser Arbeit ein aktivierender Einfluss von TREM1 auf die Aktivierung von LPS-behandelten Neutrophilen Granulozyten nicht nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.36d). Aufgrund der hier ermittelten Ergebnisse ist eine Aktivierung von TREM1 durch LPS oder PGLYRP1 daher unwahrscheinlich.

Neben einer Aktivierung durch lösliche Liganden können Rezeptoren auch konstitutiv aktiv sein (de Ligt *et al.*, 2000; Menzaghi *et al.*, 2002). Um zu untersuchen, ob TREM1 konstitutiv aktiviert vorliegt, wurde im Rahmen dieser Arbeit der Aktivierungszustand von unstimulierten TREM1 $-/-$ und TREM1 $+/+$ Neutrophile Granulozyten analysiert. Da jedoch eine signifikant unterschiedliche Expression proinflammatorischer Zytokine zwischen unstimulierten TREM1 $-/-$ und TREM1 $+/+$ Neutrophilen Granulozyten nicht nachgewiesen werden konnte (siehe Abb. 3.36a), deuten die hier ermittelten Ergebnisse darauf hin, dass TREM1 nicht konstitutiv aktiviert vorlag. Da es jedoch in LCMV-infizierten TREM1 $-/-$ Mäusen sowohl zu einer signifikant verringerte TREM1-abhängige Schädigung des Lebergewebes (siehe Abb. 3.17) als auch zu einer signifikant verringerten Expression proinflammatorischer Zytokine kam (siehe Abb. 3.28), lässt sich vermuten, dass ein möglicher TREM1-Ligand im Lebergewebe der LCMV-infizierten Mäuse exprimiert wurde.

Die Aktivierung des Immunsystems kann neben einer Elimination von Virus-infizierten Leberzellen auch zu einer Schädigung des Lebergewebes beitragen (Guidotti und Chisari, 2006). So kann es im Verlauf einer viralen Leberinfektion neben einer massiven Ausschüttung von entzündungsfördernden Zytokinen auch zu einer Freisetzung von endogenen Gefahrensignalen durch nekrotische Leberzellen kommen (Chen *et al.*, 2013). Da ein Ligand für die Aktivierung von TREM1 bisher noch nicht eindeutig identifiziert werden konnte und sowohl in Vorarbeiten als auch im Rahmen dieser Arbeit eine entzündungsfördernde Wirkung von TREM1 bei bakteriellen und viralen Infektionskrankheiten nachgewiesen werden konnte (siehe Abb. 3.17 und 3.41), lässt sich vermuten, dass die Aktivierung von TREM1 durch einen endogenen Liganden erfolgen könnte. In nachfolgenden Studien sollte daher sowohl der Einfluss von entzündungsfördernden Zytokinen wie z.B. IL6, TNF α und IL1 β als auch die Wirkung von endogenen Gefahrensignalen wie z.B. SAA (serum amyloid a), CRP und HSP70 (heat shock protein 70) auf die Aktivierung von TREM1 weiter untersucht werden.

4.3 sTREM1 in LCMV WE-infizierten Mäusen

Neben einer membranständigen TREM1 Rezeptorvariante konnte in Vorarbeiten eine lösliche TREM1-Isoform (sTREM1) identifiziert werden (Gibot *et al.*, 2004a).

sTREM1 wird von aktivierten TREM1-positiven Immunzellen freigesetzt und ist in Körperflüssigkeiten von Patienten mit bakteriellen und autoimmunen Erkrankungen erhöht nachweisbar (Bucova *et al.*, 2012; Gibot *et al.*, 2004a; Knapp *et al.*, 2004). Tatsächlich konnte die Freisetzung von sTREM1 auch in LCMV-infizierten Mäusen nachgewiesen werden. Da im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass die sTREM1-Konzentration im Blut der LCMV-infizierten Mäuse mit dem Verlauf der Leberschädigung assoziiert war (siehe Abb. 3.5 und 3.12a), lässt sich eine physiologische Relevanz von TREM1 im Verlauf einer viralen Leberinfektion vermuten.

In Vorarbeiten konnte die Sekretion von sTREM1 sowohl durch Leberzellen als auch durch LPS-stimulierte Immunzellen nachgewiesen werden (Knapp *et al.*, 2004; Liao *et al.*, 2012). Jedoch konnte in dieser Arbeit die Freisetzung von sTREM1 weder durch primäre Hepatozyten noch durch Kupfer-Zellen oder LSECs bestätigt werden (siehe Abb. 3.34a-c). Stattdessen war die Freisetzung von sTREM1 sowohl konstitutiv als auch vermehrt nach der Stimulation von Neutrophilen Granulozyten mit LPS und LCMV WE nachweisbar (siehe Abb. 3.34d). Die hier durchgeführten Analysen lassen somit vermuten, dass sTREM1 in der Leber der LCMV-infizierten Mäuse durch aktivierte Neutrophile Granulozyten freigesetzt wurde.

Ein Mechanismus für die Sekretion von sTREM1 konnte bisher nicht eindeutig identifiziert werden. Gegensätzliche Studien lassen jedoch eine Freisetzung von sTREM1 durch alternatives Spleißen oder durch die proteolytische Spaltung von TREM1 auf der Zelloberfläche von aktivierten Phagozyten vermuten (Gingras *et al.*, 2002; Gomez-Pina *et al.*, 2007). Da in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, dass sTREM1 vermehrt von Neutrophilen Granulozyten nach der Stimulation mit LCMV WE freigesetzt wurde (siehe Abb. 3.35a) und die sTREM1-Konzentration im Blut der LCMV WE-infizierten Mäuse zwei Tage versetzt zu der TREM1-Expression in der Leber ihren Höhepunkt erreichte (siehe Abb. 3.10 und 3.12a), deuten die hier durchgeführten Analysen auf eine Freisetzung von sTREM1 durch die proteolytische Spaltung von membranständigem TREM1 auf Neutrophilen Granulozyten hin.

In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass ein rekombinantes TREM1 FC-Fusionsprotein die Aktivierung von humanen Neutrophilen Granulozyten nach der Stimulation mit viralen Oberflächenbestandteilen von Ebola- und Marburg-Viren antagonistisch inhibiert (Mohamadzadeh *et al.*, 2006). Da im Rahmen dieser Arbeit eine proinflammatorische Wirkung von TREM1 auf die Aktivierung von Neutrophilen Granulozyten nachgewiesen werden konnte (siehe Abb. 3.21 und 3.22) und im Blut der LCMV-infizierten Mäuse eine signifikant erhöhte sTREM1-Plasmakonzentration festgestellt werden konnte (siehe Abb. 3.12), lässt sich eine inhibitorische Wirkung von sTREM1 auf die Aktivierung von Neutrophilen Granulozyten vermuten.

Viren sind nicht autonom vermehrungsfähig und sind für ihre Vermehrung auf eine Wirtszelle angewiesen. Während einer Virusinfektion kommt es daher zu einer Zerstörung von infizierten Körperzellen durch das Immunsystem (Guidotti und Chisari, 2006). In der Regel geht eine verringerte Aktivierung von Immunzellen mit einer verlängerten Persistenz des Erregers einher (Guidotti und Chisari, 2001). Dennoch konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass es im Lebergewebe der LCMV-infizierten TREM1^{-/-} Mäuse, neben einer verringerten Schädigung des Leberparenchyms (siehe Abb. 3.16 und 3.17), auch zu einer beschleunigten Elimination des Virus aus der Leber kam (siehe Abb. 3.13, 3.14 und 3.15). Diese zunächst widersprüchliche Aussage könnte jedoch auf die Bindung von sTREM1 an einen nicht-TREM1-spezifischen proinflammatorischen Liganden zurückzuführen sein. So konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass es im Lebergewebe der LCMV WE-infizierten Mäuse zu einer erhöhten Freisetzung von HMGB1 durch nekrotische Hepatozyten kam (siehe Abb. 3.29 und 3.31). Da in Vorarbeiten nachgewiesen wurde, dass HMGB1 spezifisch an TREM1 bindet (Wu *et al.*, 2012) und HMGB1 die Aktivierung von RAGE und TLR4 induziert (Erlandsson Harris und Andersson, 2004), könnte eine Interaktion von sTREM1 mit HMGB1 zu einer nicht-TREM1-spezifischen Inhibition HMGB1-abhängiger proinflammatorischer Signalwege führen. sTREM1 könnte somit einen antiinflammatorischen Einfluss auf die Elimination des Virus in der Leber ausüben, ohne die Bindung eines TREM1-spezifischen Liganden an TREM1 zu beeinflussen.

Zusätzlich zu einer entzündungsfördernden Funktion von TREM1 lassen die hier durchgeführten Analysen daher eine antiinflammatorische Wirkung von sTREM1 im Verlauf einer viralen Hepatitis vermuten.

Da jedoch aufgrund der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten TREM1^{-/-} Mäuse eine Unterscheidung von TREM1- und sTREM1-abhängigen Effekten nicht möglich war, bedarf es noch weiterer Forschung, um die funktionelle Relevanz von sTREM1 im Verlauf einer viralen Hepatitis zu charakterisieren.

4.4 Funktionelle Relevanz von TREM1 in *Listeria monocytogenes*-infizierten Mäusen

Listeria monocytogenes ist ein fakultativ intrazelluläres, in der Umwelt ubiquitär verbreitetes, Gram-positives Bakterium (Gray und Killinger, 1966; Vázquez-Boland *et al.*, 2001). Neben dem Darm ist die Leber das nach einer Listerien-Infektion am zweithäufigsten betroffene Organ (Ramaswamy *et al.*, 2007). *L. monocytogenes* ist außerdem ein etablierter Modellorganismus für die Untersuchung von immunregulatorischen Mechanismen im Verlauf einer bakteriellen Leberinfektion (Vázquez-Boland *et al.*, 2001).

In Vorarbeiten konnte eine aktivierende Wirkung von TREM1 auf die Funktion von NOD2 nachgewiesen werden (Bleharski *et al.*, 2003). NOD2 ist ein intrazellulärer PRR, der über die Bindung an Peptidoglykan von intrazellulären Bakterien die Aktivierung von Immunzellen induziert (Akira *et al.*, 2006). Da *L. monocytogenes* die Aktivierung von NOD2 vermittelt und TREM1 die Expression von NOD2 verstärkt (Bleharski *et al.*, 2003), lässt sich eine entzündungsfördernde Wirkung von TREM1 im Verlauf einer *L. monocytogenes* Infektion vermuten.

Nachdem im Rahmen der hier durchgeführten Analysen ein leberschädigender Einfluss von TREM1 in LCMV-infizierten Mäusen nachgewiesen werden konnte (siehe Abb. 3.13 – 3.17), sollte die Funktion von TREM1 in *L. monocytogenes*-infizierten Mäusen untersucht werden. Tatsächlich konnte im Lebergewebe der *L. monocytogenes*-infizierten Mäuse eine signifikant erhöhte TREM1-RNA-Expression nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.37). Da außerdem gezeigt werden konnte, dass es im Blut der *L. monocytogenes*-infizierten Mäuse zu einem signifikanten Anstieg der sTREM1-Konzentration kam (siehe Abb. 3.38), deuten die hier ermittelten Ergebnisse auf eine funktionelle von TREM1 und sTREM1 im Verlauf einer bakteriellen Leberinfektion hin.

Um die funktionelle Relevanz von TREM1 in *L. monocytogenes*-infizierten Mäusen zu untersuchen, wurden TREM1 $-/-$ und TREM1 $+/+$ Mäuse mit *L. monocytogenes* infiziert und der Infektionsverlauf in den TREM1 $-/-$ und TREM1 $+/+$ Mäusen vergleichend analysiert.

Jedoch konnte im Rahmen dieser Arbeit weder ein Einfluss von TREM1 auf die Anzahl der in die Leber migrierenden Immunzellen, noch auf die Erregerlast im Lebergewebe der *L. monocytogenes*-infizierten TREM1 $-/-$ Mäuse nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.39 und 3.40). Da es jedoch im Lebergewebe der *L. monocytogenes*-infizierten TREM1 $-/-$ Mäuse zu einer signifikant verringerten Schädigung des Lebergewebes kam (siehe Abb. 3.41), lassen die hier durchgeführten Analysen eine zytopathische Wirkung von TREM1 in *L. monocytogenes*-infizierten Mäusen vermuten.

Da Vorarbeiten auf eine gewebeschädigende Funktion von Neutrophilen Granulozyten in der Immunantwort auf eine Listerien-Infektion hinweisen (Conlan und North, 1994; Zenewicz und Shen, 2007) und im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass TREM1 auf Neutrophilen Granulozyten konstitutiv exprimiert wird (siehe Abb. 3.33), sollte die Anwesenheit von Neutrophilen Granulozyten im Lebergewebe der *L. monocytogenes*-infizierten Mäuse untersucht werden.

Tatsächlich waren im Lebergewebe der *L. monocytogenes*-infizierten Mäuse massive Ansammlungen von Neutrophilen Granulozyten nachweisbar (siehe Abb. 3.40). Darüber hinaus kam es in unmittelbarer Nähe der Immunzellinfiltrate zu der Entstehung fokaler Nekrosen sowie einer Schädigung des Lebergewebes (siehe Abb. 3.40 und 3.41). Da bereits in LCMV-infizierten Mäusen eine entzündungsfördernde Funktion von TREM1 auf die

Aktivierung von Neutrophile Granulozyten nachgewiesen werden konnte (siehe Abb. 3.26 - 3.28), deuten die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse darauf hin, dass es auch im Lebergewebe der *L. monocytogenes*-infizierten Mäuse zu einer TREM1-abhängigen Aktivierung von Neutrophile Granulozyten kam. Neben einer entzündungsfördernden Funktion von TREM1 bei viralen Leberinfektionen (siehe Abb. 3.13 - 3.17), lassen die hier durchgeführten Analysen somit eine proinflammatorische Wirkung von TREM1 bei bakteriellen Leberinfektionen vermuten.

In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass C57BL/6 Mäuse nach der Behandlung mit einem löslichen TREM1-FC Fusionsprotein resistent gegen eine letale Gabe von Endotoxin sind (Bouchon *et al.*, 2001a). Da außerdem nachgewiesen werden konnte, dass sTREM1 antagonistisch zu TREM1 wirkt (Mohamadzadeh *et al.*, 2006) und im Rahmen dieser Arbeit eine signifikant erhöhte Konzentration der löslichen TREM1 Rezeptorvariante sTREM1 im Blut der *L. monocytogenes*-infizierten Mäuse nachgewiesen werden konnte (siehe Abb. 3.38), lassen die hier ermittelten Ergebnisse einen schützenden Einfluss von sTREM1 im Lebergewebe der *L. monocytogenes*-infizierten Mäuse vermuten. Es kann daher spekuliert werden, dass die Blockierung von TREM1 einen schützenden Einfluss auf das Lebergewebe in Patienten mit bakteriellen Leberinfektionen haben könnte. Jedoch bedarf es für ein besseres Verständnis der funktionellen Relevanz von TREM1/sTREM1 im Menschen noch weiterer Forschung.

4.5 Funktionelle Relevanz von sTREM1 in Patienten mit viralen Lebererkrankungen

In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass erhöhte sTREM1-Werte in Patienten mit bakteriellen oder autoimmunen Infektionen mit einer verschlechterten Prognose des Erkrankungsverlaufs assoziiert sind (Bucova *et al.*, 2012; Choi *et al.*, 2012; Gibot *et al.*, 2004a). Da im Rahmen dieser Arbeit sowohl in LCMV-WE- als auch in *L. monocytogenes*-infizierten Mäusen eine entzündungsfördernde Wirkung von TREM1 festgestellt werden konnte (siehe 4.1 und 4.4) und sich aufgrund der hier durchgeführten Analysen, eine antiinflammatorische Funktion von sTREM1 im Verlauf von viralen und bakteriellen Leberinfektionen vermuten lässt (siehe 4.3 und 4.4), sollte die funktionelle Relevanz von sTREM1 in Patienten mit viralen Lebererkrankungen untersucht werden.

Hierfür wurde die sTREM1-Plasmakonzentration in HBV- und HCV- Patienten experimentell ermittelt und mit der sTREM1-Konzentration im Blut von gesunden Kontrollen verglichen. Tatsächlich konnte im Blut der HBV- und HCV-Patienten eine signifikant erhöhte sTREM1-Konzentration nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.42). Da in Vorarbeiten eine klinische Relevanz von sTREM1 als Entzündungsmarker bei bakteriellen und autoimmunen

Erkrankungen beschrieben wurde (Bucova *et al.*, 2012; Gibot *et al.*, 2005), lässt sich vermuten, dass sTREM1 ein Diagnosemarker für virale Leberentzündungen sein könnte.

Neben einer klinischen Funktion als Diagnosemarker bei bakteriellen und autoimmunen Erkrankungen deuten vorangegangene Studien außerdem auf eine immunregulatorische Funktion von sTREM1 im Menschen hin. So konnte gezeigt werden, dass sTREM1 die Aktivierung von TREM1 auf humanen Neutrophilen Granulozyten kompetitiv inhibiert (Bouchon *et al.*, 2001; Mohamadzadeh *et al.*, 2006). Da im Rahmen dieser Arbeit sowohl eine vermehrte Freisetzung von sTREM1 in LCMV-stimulierten Neutrophilen Granulozyten (siehe Abb. 3.12) als auch im Blut von HBV- und HCV-Patienten (siehe Abb. 3.42) nachgewiesen werden konnte, lässt sich vermuten, dass sTREM1 eine antiinflammatorische Wirkung in Patienten mit viralen Lebererkrankungen besitzen könnte.

Neben einer möglichen Funktion als Diagnosemarker deuten die hier durchgeführten Analysen somit auf eine therapeutische Relevanz von sTREM1 in Patienten mit viralen Leberinfektionen hin. Jedoch bedarf es für eine therapeutische Anwendung von sTREM1 im Menschen noch weiterer Forschung. In nachfolgenden Studien sollte daher die funktionelle Relevanz von sTREM1 im Hinblick auf eine mögliche Anwendung in Patienten mit viralen Lebererkrankungen untersucht werden.

5. Zusammenfassung

Immunzellen sind entscheidend an der Klärung von akuten Infektionen beteiligt, können jedoch im Verlauf von chronischen Entzündungsreaktionen eine Schädigung des Wirtsgewebes bewirken. Die Regulation von entzündungsfördernden Prozessen ist daher eine notwendige Voraussetzung, um eine übermäßige Schädigung des Wirts durch das Immunsystem zu verhindern. TREM1 (triggering receptor expressed on myeloid cells 1) ist ein proinflammatorischer Transmembranrezeptor, der die Aktivierung von Immunzellen verstärken kann. In vorangegangenen Studien konnte eine physiologische Relevanz von TREM1 sowohl bei systemischen bakteriellen Infektionen als auch bei autoimmunen Erkrankungen nachgewiesen werden. Um die funktionelle Relevanz von TREM1 im Verlauf einer viralen sowie einer bakteriellen Leberinfektion zu untersuchen, wurden TREM1 $-/-$ und TREM1 $+/+$ C57BL/6 Mäuse mit LCMV WE oder *L. monocytogenes* infiziert und der Einfluss von TREM1 auf den Infektionsverlauf und die Schädigung des Lebergewebes analysiert. So konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass sowohl die Expression von TREM1 in der Leber als auch die sTREM1 Freisetzung im Blut der LCMV-infizierten Mäuse mit der Viruslast und der Schädigung des Lebergewebes assoziiert war. Darüber hinaus wiesen LCMV WE-infizierte TREM1 $-/-$ Mäuse, im Vergleich zu LCMV WE-infizierten TREM1 $+/+$ Mäusen, eine verringerte Leberschädigung sowie eine beschleunigte Elimination des Virus auf, so dass sich eine funktionelle Relevanz von TREM1 im Verlauf einer viralen Hepatitis vermuten lässt. Im Rahmen der hier durchgeführten Studien konnte außerdem gezeigt werden, dass die Expression von TREM1 auf LY6G+ Neutrophile Granulozyten beschränkt war. Darüber hinaus konnte in Zellkulturanalysen gezeigt werden, dass sowohl die Expression von TREM1 als auch die Freisetzung von sTREM1 durch Neutrophile Granulozyten nach der Stimulation mit LCMV WE induziert werden konnte. Sowohl in LCMV WE-infizierten TREM1 $-/-$ Mäusen als auch in LCMV WE-stimulierten TREM1 $-/-$ Neutrophilen Granulozyten kam es im Vergleich zu TREM1 $+/+$ Kontrollen zu einer verringerten Expression proinflammatorischer Zytokine. Die hier ermittelten Ergebnisse lassen somit darauf schließen, dass es in TREM1 $-/-$ Mäusen zu einer verringerten Aktivierung entzündungsfördernder Signalwege kam. Ähnliche Ergebnisse konnten auch in *L. monocytogenes*-infizierten Mäusen ermittelt werden. So konnte hier gezeigt werden, dass sowohl die TREM1-RNA-Expression in der Leber als auch die sTREM1-Freisetzung im Blut von *L. monocytogenes*-infizierten Mäusen signifikant erhöht war. Darüber hinaus war in *L. monocytogenes*-infizierten TREM1 $-/-$ Mäusen eine verringerte Schädigung des Lebergewebes nachweisbar. Die hier ermittelten Ergebnisse deuten somit auf eine entzündungsfördernde Funktion von TREM1 im Verlauf einer bakteriellen Hepatitis hin. Tatsächlich konnte im Rahmen dieser Arbeit auch eine signifikant erhöhte sTREM1-Konzentration im Blut von HBV- und HCV-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen

nachgewiesen werden. Daher lässt sich vermuten, dass TREM1 nicht nur in Mäusen sondern auch im Menschen einen verstärkenden Einfluss auf die Schädigung von Lebergewebe im Verlauf einer bakteriellen oder viralen Hepatitis haben könnte. Basierend auf den hier ermittelten Ergebnissen lässt sich somit schlussfolgern, dass neben einer klinischen Relevanz von sTREM1 als Diagnosemarker in Patienten mit viralen Leberinfektionen, die Blockierung oder Antagonisierung von TREM1 einen möglichen therapeutischen Ansatz für die Behandlung von bakteriellen oder viralen Lebererkrankungen im Menschen darstellen könnte.

6. Summary

Immune cells are essential for the acute clearance of pathogens from infected tissues but may also be harmful to the host during chronic infections. Therefore, a strict regulation of immune cell activation is necessary in order to avoid excessive damage to host tissues. TREM1 (triggering receptor expressed on myeloid cells 1) is a proinflammatory amplifier of immune cell activation and has previously been shown to play an important role during systemic inflammatory processes, including bacterial infections and autoimmune diseases. In order to investigate the role of TREM1 during viral or bacterial hepatitis, C57BL/6 TREM1 $-/-$ and TREM1 $+/+$ mice were infected with either LCMV WE or *Listeria monocytogenes* and the influence of TREM1 on disease progression and liver damage was assessed. Here we show that TREM1 liver RNA expression as well as sTREM1 (soluble triggering receptor expressed on myeloid cells) plasma concentrations were associated with liver tissue damage and viral replication in the livers of LCMV WE-infected mice. Interestingly, LCMV WE-infected TREM1 $-/-$ mice showed significantly decreased liver tissue damage compared to LCMV WE-infected TREM1 $+/+$ mice. Furthermore, viral titers in the livers of LCMV WE-infected TREM1 $-/-$ mice were significantly reduced compared to LCMV WE-infected TREM1 $+/+$ mice, indicating a potential role of TREM1 during viral hepatitis. In the livers of LCMV WE-infected mice, TREM1 expression was restricted to LY6G⁺ neutrophil granulocytes. Cell culture analyses showed that stimulation of primary neutrophil granulocytes with LCMV WE led to increased expression of TREM1 as well as to secretion of sTREM1. LCMV WE-stimulated TREM1 $-/-$ neutrophil granulocytes as well as LCMV WE-infected TREM1 $-/-$ mice showed a decreased expression of proinflammatory cytokines, indicating reduced activation of proinflammatory signaling pathways in LCMV WE-infected TREM1 $-/-$ mice. Similar results could also be obtained after infection of TREM1 $-/-$ and TREM1 $+/+$ mice with *Listeria monocytogenes*. Indeed, we could show that TREM1 RNA expression as well as plasma sTREM1 concentrations were significantly increased in the liver tissue of *L. monocytogenes*-infected mice compared to uninfected controls. Furthermore, *L. monocytogenes*-infected TREM1 $-/-$ mice showed significantly reduced liver tissue damage compared to *L. monocytogenes*-infected TREM1 $+/+$ mice, indicating a proinflammatory role of TREM1 during bacterial hepatitis. Interestingly, we could also show that sTREM1 levels in the blood of HBV- and HCV-patients were significantly increased compared to healthy controls. Therefore, one might speculate that TREM1 might not only be a potential mediator of tissue damage during bacterial or viral hepatitis in mice, but also in humans. Based on these results it can be hypothesized that sTREM1 might be a clinical marker for viral hepatitis and that the modulation of TREM1 signaling could be a suitable therapeutic approach for the treatment of liver damage during bacterial or viral hepatitis in humans.

7. Literaturverzeichnis

Akira, S., and Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews Immunology* 4, 499-511.

Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124, 783-801.

Allcock, R.J., Barrow, A.D., Forbes, S., Beck, S., and Trowsdale, J. (2003). The human TREM gene cluster at 6p21.1 encodes both activating and inhibitory single IgV domain receptors and includes NKp44. *European Journal of Immunology* 33, 567-577.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215, 403-410.

Andersen, M.H., Schrama, D., Thor Straten, P., and Becker, J.C. (2006). Cytotoxic T cells. *Journal of Investigative Dermatology* 126, 32-41.

Anthony, P.P., Ishak, K.G., Nayak, N.C., Poulsen, H.E., Scheuer, P.J., and Sobin, L.H. (1978). The morphology of cirrhosis. Recommendations on definition, nomenclature, and classification by a working group sponsored by the World Health Organization. *Journal of Clinical Pathology* 31, 395-414.

Armstrong, C., and Lillie, R. (1934). Experimental lymphocytic choriomeningitis of monkeys and mice produced by a virus encountered in studies of the 1933 St. Louis encephalitis epidemic. *Public Health Reports* 49, 1019-1027.

Arts, R.J., Joosten, L.A., van der Meer, J.W., and Netea, M.G. (2013). TREM-1: intracellular signaling pathways and interaction with pattern recognition receptors. *Journal of Leukocyte Biology* 93, 209-215.

Barthold, S.W. and Smith, A.L. (2007). Lymphocytic choriomeningitis virus. In Fox, J.G., Barthold, S.W., Newcomer, C.E., Smith, A.L. and Quimby F.W. (Eds.), *The Mouse in Biomedical Research: Diseases*. Volume 2, second edition. Academic Press, New York. pp 179-213.

Battegay, M., Cooper, S., Althage, A., Banziger, J., Hengartner, H., and Zinkernagel, R.M. (1991). Quantification of lymphocytic choriomeningitis virus with an immunological focus assay in 24- or 96-well plates. *Journal of Virological Methods* 33, 191-198.

Begum, N.A., Ishii, K., Kurita-Taniguchi, M., Tanabe, M., Kobayashi, M., Moriwaki, Y., Matsumoto, M., Fukumori, Y., Azuma, I., Toyoshima, K., *et al.* (2004). Mycobacterium bovis BCG cell wall-specific differentially expressed genes identified by differential display and cDNA subtraction in human macrophages. *Infection and Immunity* 72, 937-948.

Bergthaler, A., Merkler, D., Horvath, E., Bestmann, L., and Pinschewer, D.D. (2007). Contributions of the lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein and polymerase to strain-specific differences in murine liver pathogenicity. *Journal of General Virology* 88, 592-603.

Biron, C.A., Nguyen, K.B., and Pien, G.C. (2002). Innate immune responses to LCMV infections: natural killer cells and cytokines. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 263, 7-27.

- Bleharski, J.R., Kiessler, V., Buonsanti, C., Sieling, P.A., Stenger, S., Colonna, M., and Modlin, R.L. (2003). A role for triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in host defense during the early-induced and adaptive phases of the immune response. *Journal of Immunology* 170, 3812-3818.
- Bonaldi, T., Talamo, F., Scaffidi, P., Ferrera, D., Porto, A., Bachi, A., Rubartelli, A., Agresti, A., and Bianchi, M.E. (2003). Monocytic cells hyperacetylate chromatin protein HMGB1 to redirect it towards secretion, *EMBO Journal* 22. 5551-5560.
- Bouchon, A., Dietrich, J., and Colonna, M. (2000a). Cutting edge: inflammatory responses can be triggered by TREM-1, a novel receptor expressed on neutrophils and monocytes. *Journal of Immunology* 164, 4991-4995.
- Bouchon, A., Facchetti, F., Weigand, M.A., and Colonna, M. (2001a). TREM-1 amplifies inflammation and is a crucial mediator of septic shock. *Nature* 410, 1103-1107.
- Bouchon, A., Hernandez-Munain, C., Cella, M., and Colonna, M. (2001b). A DAP12-mediated pathway regulates expression of CC chemokine receptor 7 and maturation of human dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine* 194, 1111-1122.
- Bowen, G.S., Calisher, C.H., Winkler, W.G., Kraus, A.L., Fowler, E.H., Garman, R.H., Fraser, D.W., and Hinman, A.R. (1975). Laboratory studies of a lymphocytic choriomeningitis virus outbreak in man and laboratory animals. *American Journal of Epidemiology* 102, 233-240.
- Brown, R.S. (2005). Hepatitis C and liver transplantation. *Nature* 436, 973-978.
- Buchmeier, M.J., Peters, C.J., and de la Torre, J.C. (2007). In Knipe, D. M. and Holey, P.M. (Eds.), *Arenaviridae: the viruses and their replication*. Fields Virology, volume 2, fifth edition. Lippincott Williams&Wilki, Baltimore. pp 1792-1827.
- Buckland, K.F., Ramaprakash, H., Murray, L.A., Carpenter, K.J., Choi, E.S., Kunkel, S.L., Lukacs, N.W., Xing, Z., Aoki, N., Hartl, D., *et al.* (2011). Triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (TREM-1) modulates immune responses to *Aspergillus fumigatus* during fungal asthma in mice. *Immunological Investigations* 40, 692-722.
- Bucova, M., Suchankova, M., Dzurilla, M., Vrlik, M., Novosadova, H., Tedlova, E., Urban, S., Hornakova, E., Seligova, M., Durmanova, V., *et al.* (2012). Inflammatory marker sTREM-1 reflects the clinical stage and respiratory tract obstruction in allergic *asthma bronchiale* patients and correlates with number of neutrophils. *Mediators of Inflammation* 2012, 628754.
- Burns, J.W., and Buchmeier, M.J. (1991). Protein-protein interactions in lymphocytic choriomeningitis virus. *Virology* 183, 620-629.
- Cantoni, C., Bottino, C., Vitale, M., Pessino, A., Augugliaro, R., Malaspina, A., Parolini, S., Moretta, L., Moretta, A., and Biassoni, R. (1999). NKp44, a triggering receptor involved in tumor cell lysis by activated human natural killer cells, is a novel member of the immunoglobulin superfamily. *Journal of Experimental Medicine* 189, 787-796.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2014). Lassa Fever. Fact sheet. Stand: März 2014. <http://www.cdc.gov/vhf/lassa/resources/Lassa-FactSheet.pdf>
- Charrel, R.N., de Lamballerie, X., and Emonet, S. (2008). Phylogeny of the genus arenavirus. *Current Opinion in Microbiology* 11, 362-368.
- Chen, L.C., Laskin, J.D., Gordon, M.K., and Laskin, D.L. (2008). Regulation of TREM expression in hepatic macrophages and endothelial cells during acute endotoxemia. *Experimental and Molecular Pathology* 84, 145-155.

- Chen, R., Hou, W., Zhang, Q., Kang, R., Fan, X.-G., and Tang, D. (2013). Emerging role of high-mobility group box 1 (HMGB1) in liver diseases. *Molecular Medicine* 19, 357-366.
- Chinnadurai, R., Velazquez, V., and Grakoui, A. (2012). Hepatic transplant and HCV: a new playground for an old virus. *American Journal of Transplantation* 12, 298-305.
- Choi, S.T., Kang, E.J., Ha, Y.J., and Song, J.S. (2012). Levels of plasma-soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (sTREM-1) are correlated with disease activity in rheumatoid arthritis. *Journal of Rheumatology* 39, 933-938.
- Chowdhury, D., and Lieberman, J. (2008). Death by a thousand cuts: granzyme pathways of programmed cell death. *Annual Review of Immunology* 26, 389-420.
- Chung, D.H., Seaman, W.E., and Daws, M.R. (2002). Characterization of TREM-3, an activating receptor on mouse macrophages: definition of a family of single Ig domain receptors on mouse chromosome 17. *European Journal of Immunology* 32, 59-66.
- Colonna, M. (2003). TREMs in the immune system and beyond. *Nature Reviews Immunology* 3, 445-453.
- Colonna, M., and Facchetti, F. (2003). TREM-1 (triggering receptor expressed on myeloid cells): a new player in acute inflammatory responses. *Journal of Infectious Diseases* 187, 397-401.
- Conlan, J.W., and North, R.J. (1991). Neutrophil-mediated dissolution of infected host cells as a defense strategy against a facultative intracellular bacterium. *Journal of Experimental Medicine* 174, 741-744.
- Conlan, J.W., and North, R.J. (1992). Early pathogenesis of infection in the liver with the facultative intracellular bacteria *Listeria monocytogenes*, *Francisella tularensis*, and *Salmonella typhimurium* involves lysis of infected hepatocytes by leukocytes. *Infection and Immunity* 60, 5164-5171.
- Conlan, J.W., and North, R.J. (1994). Neutrophils are essential for early anti-*Listeria* defense in the liver, but not in the spleen or peritoneal cavity, as revealed by a granulocyte-depleting monoclonal antibody. *Journal of Experimental Medicine* 179, 259-268.
- Cynthia, S.G., Thomas, G.K., Pierre, E.R., James, A.C., William, L.N., Teresa, C.T.P., Dean, D.E., William, J.B., Brian, H.H., Paul, A.R., *et al.* (2013). Cell culture and electron microscopy for identifying viruses in diseases of unknown cause. *Emerging Infectious Disease Journal* 19, 864-869.
- de Ligt, R.A.F., Kourounakis, A.P., and Ijzerman, A.P. (2000). Inverse agonism at G protein-coupled receptors: (patho)physiological relevance and implications for drug discovery. *British Journal of Pharmacology* 130, 1-12.
- Deshmane, S.L., Kremlev, S., Amini, S., and Sawaya, B.E. (2009). Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 29, 313-326.
- Di Simone, C., Zandonatti, M.A., and Buchmeier, M.J. (1994). Acidic pH triggers LCMV membrane fusion activity and conformational change in the glycoprotein spike. *Virology* 198, 455-465.
- Drevets, D.A., and Bronze, M.S. (2008). *Listeria monocytogenes*: epidemiology, human disease, and mechanisms of brain invasion. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 53, 151-165.

- Droebner, K., Klein, B., Paxian, S., Schmid, R., Stitz, L., and Planz, O. (2010). The alternative NF-kappaB signalling pathway is a prerequisite for an appropriate immune response against lymphocytic choriomeningitis virus infection. *Viral Immunology* 23, 295-308.
- Du Clos, T.W., and Mold, C. (2011). Pentraxins (CRP, SAP) in the process of complement activation and clearance of apoptotic bodies through Fc-gamma receptors. *Current Opinion in Organ Transplantation* 16, 15-20.
- Dupre-Crochet, S., Erard, M., and Nubetae, O. (2013). ROS production in phagocytes: why, when, and where? *Journal of Leukocyte Biology* 94, 657-670.
- Dutko, F.J., and Oldstone, M.B. (1983). Genomic and biological variation among commonly used lymphocytic choriomeningitis virus strains. *Journal of General Virology* 64 (pt. 8), 1689-1698.
- El Mezayen, R., El Gazzar, M., Seeds, M.C., McCall, C.E., Dreskin, S.C., and Nicolls, M.R. (2007). Endogenous signals released from necrotic cells augment inflammatory responses to bacterial endotoxin. *Immunology Letters* 111, 36-44.
- El-Serag, H.B. (2012). Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 142, 1264-1273.
- Erlandsson Harris, H., and Andersson, U. (2004). Mini-review: The nuclear protein HMGB1 as a proinflammatory mediator. *European Journal of Immunology* 34, 1503-1512.
- Ethuin, F., Gerard, B., Benna, J.E., Boutten, A., Gougereot-Pocidallo, M.A., Jacob, L., and Chollet-Martin, S. (2004). Human neutrophils produce interferon gamma upon stimulation by interleukin-12. *Laboratory Investigation* 84, 1363-1371.
- European Association for Study of the Liver (2014). EASL clinical practice guidelines: management of hepatitis C virus infection. *Journal of Hepatology* 60, 392-420.
- European Association for the Study of the Liver (2012). EASL clinical practice guidelines: management of chronic hepatitis B virus infection. *Journal of Hepatology* 57, 167-185.
- Farber, J.M., and Peterkin, P.I. (1991). *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiological Reviews* 55, 476-511.
- Farre, D., Roset, R., Huerta, M., Adsuara, J.E., Rosello, L., Alba, M.M., and Messeguer, X. (2003). Identification of patterns in biological sequences at the ALGGEN server: PROMO and MALGEN. *Nucleic Acids Research* 31, 3651-3653.
- Fehling, S.K., Lennartz, F., and Strecker, T. (2012). Multifunctional nature of the arenavirus RING finger protein Z. *Viruses* 4, 2973-3011.
- Fehniger, T.A., Yu, H., Cooper, M.A., Suzuki, K., Shah, M.H., and Caligiuri, M.A. (2000). Cutting edge: IL-15 costimulates the generalized Shwartzman reaction and innate immune IFN-gamma production *in vivo*. *Journal of Immunology* 164, 1643-1647.
- Fischer, S.A., Graham, M.B., Kuehnert, M.J., Kotton, C.N., Srinivasan, A., Marty, F.M., Comer, J.A., Guarner, J., Paddock, C.D., DeMeo, D.L., *et al.* (2006). Transmission of lymphocytic choriomeningitis virus by organ transplantation. *New England Journal of Medicine* 354, 2235-2249.
- Flicek, P., Amode, M.R., Barrell, D., Beal, K., Billis, K., Brent, S., Carvalho-Silva, D., Clapham, P., Coates, G., Fitzgerald, S., *et al.* (2014). Ensembl 2014. *Nucleic Acids Research* 42(D1), D749-D755.

- Franchi, L., Warner, N., Viani, K., and Nunez, G. (2009). Function of NOD-like receptors in microbial recognition and host defense. *Immunological Reviews* 227, 106-128.
- Freitag, N.E., Port, G.C., and Miner, M.D. (2009). *Listeria monocytogenes* - from saprophyte to intracellular pathogen. *Nature Reviews Microbiology* 7, 623-628.
- Fuchs, T.A., Abed, U., Goosmann, C., Hurwitz, R., Schulze, I., Wahn, V., Weinrauch, Y., Brinkmann, V., and Zychlinsky, A. (2007). Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *Journal of Cell Biology* 176, 231-241.
- Fuller-Pace, F.V., and Southern, P.J. (1989). Detection of virus-specific RNA-dependent RNA polymerase activity in extracts from cells infected with lymphocytic choriomeningitis virus: *in vitro* synthesis of full-length viral RNA species. *Journal of Virology* 63, 1938-1944.
- Gallegos-Orozco, J.F., and Rakela-Brodner, J. (2010). Hepatitis viruses: not always what it seems to be. *Revista Médica de Chile* 138, 1302-1311.
- Giamarellos-Bourboulis, E.J., Zakyntinos, S., Baziaka, F., Papadomichelakis, E., Vitzili, S., Koutoukas, P., Armaganidis, A., Giamarellou, H., and Roussos, C. (2006). Soluble triggering receptor expressed on myeloid cells 1 as an anti-inflammatory mediator in sepsis. *Intensive Care Medicine* 32, 237-243.
- Gibot, S., Alauzet, C., Massin, F., Sennoune, N., Faure, G.C., Bene, M.C., Lozniewski, A., Bollaert, P.E., and Levy, B. (2006a). Modulation of the triggering receptor expressed on myeloid cells-1 pathway during pneumonia in rats. *Journal of Infectious Diseases* 194, 975-983.
- Gibot, S., Buonsanti, C., Massin, F., Romano, M., Kolopp-Sarda, M.N., Benigni, F., Faure, G.C., Bene, M.C., Panina-Bordignon, P., Passini, N., *et al.* (2006b). Modulation of the triggering receptor expressed on the myeloid cell type 1 pathway in murine septic shock. *Infection and Immunity* 74, 2823-2830.
- Gibot, S., Cravoisy, A., Kolopp-Sarda, M.N., Bene, M.C., Faure, G., Bollaert, P.E., and Levy, B. (2005). Time-course of sTREM (soluble triggering receptor expressed on myeloid cells)-1, procalcitonin, and C-reactive protein plasma concentrations during sepsis. *Critical Care Medicine* 33, 792-796.
- Gibot, S., Cravoisy, A., Levy, B., Bene, M.C., Faure, G., and Bollaert, P.E. (2004a). Soluble triggering receptor expressed on myeloid cells and the diagnosis of pneumonia. *New England Journal of Medicine* 350, 451-458.
- Gibot, S., Kolopp-Sarda, M.-N., Béné, M.-C., Bollaert, P.-E., Lozniewski, A., Mory, F., Levy, B., and Faure, G.C. (2004b). A soluble form of the triggering receptor expressed on myeloid cells-1 modulates the inflammatory response in murine sepsis. *Journal of Experimental Medicine* 200, 1419-1426.
- Gibot, S., Kolopp-Sarda, M.N., Bene, M.C., Cravoisy, A., Levy, B., Faure, G.C., and Bollaert, P.E. (2004c). Plasma level of a triggering receptor expressed on myeloid cells-1: Its diagnostic accuracy in patients with suspected sepsis. *Annals of Internal Medicine* 141, 9-15.
- Gingras, M.C., Lapillonne, H., and Margolin, J.F. (2002). TREM-1, MDL-1, and DAP12 expression is associated with a mature stage of myeloid development. *Molecular Immunology* 38, 817-824.
- Gomez-Pina, V., Soares-Schanoski, A., Rodriguez-Rojas, A., Del Fresno, C., Garcia, F., Vallejo-Cremades, M.T., Fernandez-Ruiz, I., Arnalich, F., Fuentes-Prior, P., and Lopez-

- Collazo, E. (2007). Metalloproteinases shed TREM-1 ectodomain from lipopolysaccharide-stimulated human monocytes. *Journal of Immunology* 179, 4065-4073.
- Gray, M.L., and Killinger, A.H. (1966). *Listeria monocytogenes* and listeric infections. *Bacteriological Reviews* 30, 309-382.
- Guidotti, L.G., and Chisari, F.V. (2001). Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response. *Annual Review of Immunology* 19, 65-91.
- Guidotti, L.G., and Chisari, F.V. (2006). Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis. *Annual Review of Pathology: Mechanisms and Disease* 1, 23-61.
- Guidotti, L.G., Ishikawa, T., Hobbs, M.V., Matzke, B., Schreiber, R., and Chisari, F.V. (1996). Intracellular inactivation of the hepatitis B virus by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity* 4, 25-36.
- Halpert, M.M., Thomas, K.A., King, R.G., and Justement, L.B. (2011). TLT2 potentiates neutrophil antibacterial activity and chemotaxis in response to G protein-coupled receptor-mediated signaling. *Journal of Immunology* 187, 2346-2355.
- Hamon, M., Bierne, H., and Cossart, P. (2006). *Listeria monocytogenes*: a multifaceted model. *Nature Reviews Microbiology* 4, 423-434.
- Hara, H., and Saito, T. (2009). CARD9 versus CARMA1 in innate and adaptive immunity. *Trends in Immunology* 30, 234-242.
- Hara, H., Ishihara, C., Takeuchi, A., Imanishi, T., Xue, L., Morris, S.W., Inui, M., Takai, T., Shibuya, A., Saijo, S., *et al.* (2007). The adaptor protein CARD9 is essential for the activation of myeloid cells through ITAM-associated and Toll-like receptors. *Nature Immunology* 8, 619-629.
- Harnish, D.G., Dimock, K., Bishop, D.H., and Rawls, W.E. (1983). Gene mapping in Pichinde virus: assignment of viral polypeptides to genomic L and S RNAs. *Journal of Virology* 46, 638-641.
- Haselmayer, P., Grosse-Hovest, L., von Landenberg, P., Schild, H., and Radsak, M.P. (2007). TREM-1 ligand expression on platelets enhances neutrophil activation. *Blood* 110, 1029-1035.
- Herkel, J., Schuchmann, M., Tiegs, G., and Lohse, A.W. (2005). Immune-mediated liver injury. *Journal of Hepatology* 42, 920-923.
- Heydtmann, M. (2009). Macrophages in hepatitis B and hepatitis C virus infections. *Journal of Virology* 83, 2796-2802.
- Hoffmann, J.A., Kafatos, F.C., Janeway, C.A., and Ezekowitz, R.A.B. (1999). Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 284, 1313-1318.
- Hosoda, H., Tamura, H., Kida, S., and Nagaoka, I. (2011). Transcriptional regulation of mouse TREM-1 gene in RAW264.7 macrophage-like cells. *Life Sciences* 89, 115-122.
- Hotchin, J., Sikora, E., Kinch, W., Hinman, A., and Woodall, J. (1974). Lymphocytic choriomeningitis in a hamster colony causes infection of hospital personnel. *Science* 185, 1173-1174.
- Hyder, L.A., Gonzalez, J., Harden, J.L., Johnson-Huang, L.M., Zaba, L.C., Pierson, K.C., Eungdamrong, N.J., Lentini, T., Gulati, N., Fuentes-Duculan, J., *et al.* (2013). TREM-1 as a potential therapeutic target in psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology* 133, 1742-1751.

- Ishak, K., Baptista, A., Bianchi, L., Callea, F., De Groote, J., Gudat, F., Denk, H., Desmet, V., Korb, G., MacSween, R.N., *et al.* (1995). Histological grading and staging of chronic hepatitis. *Journal of Hepatology* 22, 696-699.
- Iwasaki, A., and Medzhitov, R. (2004). Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nature Immunology* 5, 987-995.
- Janeway, C.A., Jr., and Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology* 20, 197-216.
- Jounai, N., Kobiyama, K., Takeshita, F., and Ishii, K.J. (2013). Recognition of damage-associated, nucleic acid-related molecular patterns during inflammation and vaccination. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2, 168: 1-13.
- Karin, M., Lawrence, T., and Nizet, V. (2006). Innate immunity gone awry: linking microbial infections to chronic inflammation and cancer. *Cell* 124, 823-835.
- Kastenbauer, S., and Ziegler-Heitbrock, H.W.L. (1999). NF-kappa B1 (p50) is upregulated in lipopolysaccharide tolerance and can block tumor necrosis factor gene expression. *Infection and Immunity* 67, 1553-1559.
- Kawai, T., and Akira, S. (2007). Antiviral signaling through pattern recognition receptors. *Journal of Biochemistry* 141, 137-145.
- Kawai, T., and Akira, S. (2011). Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity* 34, 637-650.
- Kayal, S., and Charbit, A. (2006). Listeriolysin O: A key protein of *Listeria monocytogenes* with multiple functions. *FEMS Microbiology Reviews* 30, 514-529.
- Kelker, M.S., Foss, T.R., Peti, W., Teyton, L., Kelly, J.W., Wuthrich, K., and Wilson, I.A. (2004). Crystal structure of human triggering receptor expressed on myeloid cells 1 (TREM-1) at 1.47 angstrom. *Journal of Molecular Biology* 342, 1237-1248.
- Kelsall, B. (2005). Getting to the guts of NOD2. *Nature Medicine* 11, 383-384.
- Kerrigan, A.M., and Brown, G.D. (2009). C-type lectins and phagocytosis. *Immunobiology* 214, 562-575.
- Kim, J.V., Kang, S.S., Dustin, M.L., and McGavern, D.B. (2009). Myelomonocytic cell recruitment causes fatal CNS vascular injury during acute viral meningitis. *Nature* 457, 191-195.
- King, R.G., Herrin, B.R., and Justement, L.B. (2006). TREM-like transcript 2 is expressed on cells of the myeloid/granuloid and B lymphoid lineage and is up-regulated in response to inflammation. *Journal of Immunology* 176, 6012-6021.
- Klesney-Tait, J., Keck, K., Li, X., Gilfillan, S., Otero, K., Baruah, S., Meyerholz, D.K., Varga, S.M., Knudson, C.J., Moninger, T.O., *et al.* (2013). Transepithelial migration of neutrophils into the lung requires TREM-1. *Journal of Clinical Investigation* 123, 138-149.
- Knapp, S., Gibot, S., de Vos, A., Versteeg, H.H., Colonna, M., and van der Poll, T. (2004). Cutting edge: expression patterns of surface and soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in human endotoxemia. *Journal of Immunology* 173, 7131-7134.
- Krenkel, O., Mossanen, J.C., and Tacke, F. (2014). Immune mechanisms in acetaminophen-induced acute liver failure. *Hepatobiliary Surgery and Nutrition* 3, 331-343.

- Lambrechts, A., Gevaert, K., Cossart, P., Vandekerckhove, J., and Van Troys, M. (2008). *Listeria* comet tails: the actin-based motility machinery at work. *Trends in Cell Biology* 18, 220-227.
- Lang, K.S. (2010). Host mechanisms in viral hepatitis. *Digestive Diseases* 28, 25-30.
- Lavanchy, D. (2004). Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. *Journal of Viral Hepatitis* 11, 97-107.
- Lee, K.J., Novella, I.S., Teng, M.N., Oldstone, M.B., and de La Torre, J.C. (2000). NP and L proteins of lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) are sufficient for efficient transcription and replication of LCMV genomic RNA analogs. *Journal of Virology* 74, 3470-3477.
- Lee, K.J., Perez, M., Pinschewer, D.D., and de la Torre, J.C. (2002). Identification of the lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) proteins required to rescue LCMV RNA analogs into LCMV-like particles. *Journal of Virology* 76, 6393-6397.
- Leist, T., Althage, A., Haenseler, E., Hengartner, H., and Zinkernagel, R.M. (1989). Major histocompatibility complex-linked susceptibility or resistance to disease caused by a noncytopathic virus varies with the disease parameter evaluated. *Journal of Experimental Medicine* 170, 269-277.
- Lenz, O., ter Meulen, J., Klenk, H.D., Seidah, N.G., and Garten, W. (2001). The Lassa virus glycoprotein precursor GP-C is proteolytically processed by subtilase SKI-1/S1P. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 12701-12705.
- Liao, R., Sun, T.W., Yi, Y., Wu, H., Li, Y.W., Wang, J.X., Zhou, J., Shi, Y.H., Cheng, Y.F., Qiu, S.J., *et al.* (2012). Expression of TREM-1 in hepatic stellate cells and prognostic value in hepatitis B-related hepatocellular carcinoma. *Cancer Science* 103, 984-992.
- Lohse, A.W., Weiler-Normann, C., and Tiegs, G. (2010). Immune-mediated liver injury. *Journal of Hepatology* 52, 136-144.
- Mahdy, A.M., Lowes, D.A., Galley, H.F., Bruce, J.E., and Webster, N.R. (2006). Production of soluble triggering receptor expressed on myeloid cells by lipopolysaccharide-stimulated human neutrophils involves de novo protein synthesis. *Clinical and Vaccine Immunology* 13, 492-495.
- Marshall, O.J. (2004). PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. *Bioinformatics* 20, 2471-2472.
- McGonagle, D., Savic, S., and McDermott, M.F. (2007). The NLR network and the immunological disease continuum of adaptive and innate immune-mediated inflammation against self. *Seminars in Immunopathology* 29, 303-313.
- Medzhitov, R. (2001). Toll-like receptors and innate immunity. *Nature Reviews Immunology* 1, 135-145.
- Medzhitov, R., and Janeway, C., Jr. (2000). Innate immunity. *New England Journal of Medicine* 343, 338-344.
- Menzaghi, F., Behan, D.P., and Chalmers, D.T. (2002). Constitutively activated G protein-coupled receptors: a novel approach to CNS drug discovery. *Current Drug Targets CNS and Neurological Disorders* 1, 105-121.

- Messeguer, X., Escudero, R., Farre, D., Nunez, O., Martinez, J., and Alba, M. (2002). PROMO: detection of known transcription regulatory elements using species-tailored searches. *Bioinformatics* 18, 333-334.
- Mets, M.B., Barton, L.L., Khan, A.S., and Ksiazek, T.G. (2000). Lymphocytic choriomeningitis virus: an underdiagnosed cause of congenital chorioretinitis. *American Journal of Ophthalmology* 130, 209-215.
- Mócsai, A. (2013). Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *Journal of Experimental Medicine* 210, 1283-1299.
- Modrow, S., Falke, D., Truyen, U., and Schätzl, H. (2013). Viruses with single-stranded, segmented, negative-sense RNA genomes. In Modrow, S., Falke, D., Truyen, U., and Schätzl, H. (Eds.), *Molecular Virology. Volume 1*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp 437-520.
- Mohamadzadeh, M., Coberley, S.S., Olinger, G.G., Kalina, W.V., Ruthel, G., Fuller, C.L., Swenson, D.L., Pratt, W.D., Kuhns, D.B., and Schmaljohn, A.L. (2006). Activation of triggering receptor expressed on myeloid cells-1 on human neutrophils by marburg and ebola viruses. *Journal of Virology* 80, 7235-7244.
- Molad, Y., Pokroy-Shapira, E., Kaptzan, T., Monselise, A., Shalita-Chesner, M., and Monselise, Y. (2013). Serum soluble triggering receptor on myeloid cells-1 (sTREM-1) is elevated in systemic lupus erythematosus but does not distinguish between lupus alone and concurrent infection. *Inflammation* 36, 1519-1524.
- Nagata, S., and Golstein, P. (1995). The Fas death factor. *Science* 267, 1449-1456.
- Newton, K., and Dixit, V.M. (2012). Signaling in innate immunity and inflammation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4, 1-19.
- Oku, R., Oda, S., Nakada, T.A., Sadahiro, T., Nakamura, M., Hirayama, Y., Abe, R., Tateishi, Y., Ito, M., Iseki, T., *et al.* (2013). Differential pattern of cell-surface and soluble TREM-1 between sepsis and SIRS. *Cytokine* 61, 112-117.
- Oldstone, M.B.A., and Campbell, K.P. (2011). Decoding arenavirus pathogenesis: essential roles for alpha-dystroglycan-virus interactions and the immune response. *Virology* 411, 170-179.
- O'Neill, L.A.J., Golenbock, D., and Bowie, A.G. (2013). The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nature Reviews Immunology* 13, 453-460.
- Palumbo, R., Galvez, B.G., Pusterla, T., De Marchis, F., Cossu, G., Marcu, K.B., and Bianchi, M.E. (2007). Cells migrating to sites of tissue damage in response to the danger signal HMGB1 require NF-kappa B activation. *Journal of Cell Biology* 179, 33-40.
- Pamer, E.G. (2004). Immune responses to *Listeria monocytogenes*. *Nature Reviews Immunology* 4, 812-823.
- Perez, M., Craven, R.C., and de la Torre, J.C. (2003). The small RING finger protein Z drives arenavirus budding: implications for antiviral strategies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 12978-12983.
- Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29(9), e45.

- Pilgrim, S., Kolb-Mäurer, A., Gentschev, I., Goebel, W., and Kuhn, M. (2003). Deletion of the gene encoding p60 in *Listeria monocytogenes* leads to abnormal cell division and loss of actin-based motility. *Infection and Immunity* 71, 3473-3484.
- Pinschewer, D.D., Perez, M., and de la Torre, J.C. (2003). Role of the virus nucleoprotein in the regulation of lymphocytic choriomeningitis virus transcription and RNA replication. *Journal of Virology* 77, 3882-3887.
- Pizarro-Cerdá, J., and Cossart, P. (2006). Subversion of cellular functions by *Listeria monocytogenes*. *Journal of Pathology* 208, 215-223.
- Radaev, S., Kattah, M., Rostro, B., Colonna, M., and Sun, P.D. (2003). Crystal structure of the human myeloid cell activating receptor TREM-1. *Structure* 11, 1527-1535.
- Ramana, C.V., Gil, M.P., Schreiber, R.D., and Stark, G.R. (2002). Stat1-dependent and -independent pathways in IFN-gamma-dependent signaling. *Trends in Immunology* 23, 96-101.
- Ramanathan, B., Minton, J.E., Ross, C.R., and Blecha, F. (2004). Characterization of bovine cDNA encoding triggering receptor expressed on myeloid cells 1 (TREM-1). *Veterinary Immunology and Immunopathology* 102, 85-89.
- Ramanathan, B., Minton, J.E., Ross, C.R., and Blecha, F. (2005). Cloning of porcine triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (TREM-1) and its induction by lipopolysaccharide, peptidoglycan, and *Salmonella enterica serovar Typhimurium* infection. *Developmental and Comparative Immunology* 29, 1-7.
- Ramaswamy, V., Cresence, V.M., Rejitha, J.S., Lekshmi, M.U., Dharsana, K.S., Prasad, S.P., and Vijila, H.M. (2007). *Listeria*-review of epidemiology and pathogenesis. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* 40, 4-13.
- Rand, M.L., Warren, J.S., Mansour, M.K., Newman, W., and Ringler, D.J. (1996). Inhibition of T cell recruitment and cutaneous delayed-type hypersensitivity-induced inflammation with antibodies to monocyte chemoattractant protein-1. *American Journal of Pathology* 148, 855-864.
- Read, C.B., Kuijper, J.L., Hjorth, S.A., Heipel, M.D., Tang, X., Fleetwood, A.J., Dantzler, J.L., Grell, S.N., Kastrup, J., Wang, C., *et al.* (2015). Cutting edge: identification of neutrophil PGLYRP1 as a ligand for TREM-1. *Journal of Immunology* 194, 1417-1421.
- Riviere, Y., Ahmed, R., Southern, P.J., Buchmeier, M.J., Dutko, F.J., and Oldstone, M.B. (1985). The S RNA segment of lymphocytic choriomeningitis virus codes for the nucleoprotein and glycoproteins 1 and 2. *Journal of Virology* 53, 966-968.
- Roebroek, R.M., Postma, B.H., and Dijkstra, U.J. (1994). Aseptic meningitis caused by the lymphocytic choriomeningitis virus. *Clinical Neurology and Neurosurgery* 96, 178-180.
- Rojek, J.M., Perez, M., and Kunz, S. (2008). Cellular entry of lymphocytic choriomeningitis virus. *Journal of Virology* 82, 1505-1517.
- Rousseau, M.C., Saron, M.F., Brouqui, P., and Bourgeade, A. (1997). Lymphocytic choriomeningitis virus in southern France: four case reports and a review of the literature. *European Journal of Epidemiology* 13, 817-823.
- Rovere-Querini, P., Capobianco, A., Scaffidi, P., Valentini, B., Catalanotti, F., Giazzon, M., Dumitriu, I.E., Muller, S., Iannacone, M., Traversari, C., *et al.* (2004). HMGB1 is an endogenous immune adjuvant released by necrotic cells. *EMBO Reports* 5, 825-830.

- Sabbah, A., Chang, T.H., Harnack, R., Frohlich, V., Tominaga, K., Dube, P.H., Xiang, Y., and Bose, S. (2009). Activation of innate immune antiviral response by NOD2. *Nature Immunology* 10, 1073-1080.
- Saeed, U., Waheed, Y., and Ashraf, M. (2014). Hepatitis B and hepatitis C viruses: a review of viral genomes, viral induced host immune responses, genotypic distributions and worldwide epidemiology. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 4, 88-96.
- Salazar-Bravo, J., Ruedas, L.A., and Yates, T.L. (2002). Mammalian reservoirs of arenaviruses. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 262, 25-63.
- Scaffidi, P., Misteli, T., and Bianchi, M.E. (2002). Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* 418, 191-195.
- Schenk, M., Bouchon, A., Birrer, S., Colonna, M., and Mueller, C. (2005). Macrophages expressing triggering receptor expressed on myeloid cells-1 are underrepresented in the human intestine. *Journal of Immunology* 174, 517-524.
- Schenk, M., Bouchon, A., Seibold, F., and Mueller, C. (2007). TREM-1-expressing intestinal macrophages crucially amplify chronic inflammation in experimental colitis and inflammatory bowel diseases. *Journal of Clinical Investigation* 117, 3097-3106.
- Seveau, S., Pizarro-Cerda, J., and Cossart, P. (2007). Molecular mechanisms exploited by *Listeria monocytogenes* during host cell invasion. *Microbes and Infection* 9, 1167-1175.
- Singh, M.K., Fuller-Pace, F.V., Buchmeier, M.J., and Southern, P.J. (1987). Analysis of the genomic L RNA segment from lymphocytic choriomeningitis virus. *Virology* 161, 448-456.
- Sitia, G., Isogawa, M., Kakimi, K., Wieland, S.F., Chisari, F.V., and Guidotti, L.G. (2002). Depletion of neutrophils blocks the recruitment of antigen-nonspecific cells into the liver without affecting the antiviral activity of hepatitis B virus-specific cytotoxic T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 13717-13722.
- Tatsumi, K., Ohashi, K., Taminishi, S., Okano, T., Yoshioka, A., and Shima, M. (2008). Reference gene selection for real-time RT-PCR in regenerating mouse livers. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 374, 106-110.
- Tessarz, A.S., and Cerwenka, A. (2008). The TREM-1/DAP12 pathway. *Immunology Letters* 116, 111-116.
- Tessarz, A.S., Weiler, S., Zanzinger, K., Angelisova, P., Horejsi, V., and Cerwenka, A. (2007). Non-T cell activation linker (NTAL) negatively regulates TREM-1/DAP12-induced inflammatory cytokine production in myeloid cells. *Journal of Immunology* 178, 1991-1999.
- Tilney, L.G., and Portnoy, D.A. (1989). Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. *Journal of Cell Biology* 109, 1597-1608.
- Trautmann, T., Kozik, J.H., Carambia, A., Richter, K., Lischke, T., Schwinge, D., Mittrucker, H.W., Lohse, A.W., Oxenius, A., Wiegand, C., *et al.* (2014). CD4+ T-cell help is required for effective CD8+ T cell-mediated resolution of acute viral hepatitis in mice. *PLoS ONE* 9(1), e86348.
- Vázquez-Boland, J.A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Domínguez-Bernal, G., Goebel, W., González-Zorn, B., Wehland, J., and Kreft, J. (2001). *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical Microbiology Reviews* 14, 584-640.

- Viertlboeck, B.C., Schmitt, R., and Gobel, T.W. (2006). The chicken immunoregulatory receptor families SIRP, TREM, and CMRF35/CD300L. *Immunogenetics* 58, 180-190.
- Wajant, H., Pfizenmaier, K., and Scheurich, P. (2003). Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death & Differentiation* 10, 45-65.
- Wang, H.C., Bloom, O., Zhang, M.H., Vishnubhakat, J.M., Ombrellino, M., Che, J.T., Frazier, A., Yang, H., Ivanova, S., Borovikova, L., *et al.* (1999). HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science* 285, 248-251.
- Washington, A.V., Quigley, L., and McVicar, D.W. (2002). Initial characterization of TREM-like transcript (TLT)-1: a putative inhibitory receptor within the TREM cluster. *Blood* 100, 3822-3824.
- Wasley, A., Grytdal, S., and Gallagher, K. (2008). Surveillance for acute viral hepatitis - United States, 2006. *Morbidity and Mortality Weekly Report Surveillance Summaries* 57, 1-24.
- Weber, B., Schuster, S., Zysset, D., Rihs, S., Dickgreber, N., Schurch, C., Riether, C., Siegrist, M., Schneider, C., Pawelski, H., *et al.* (2014). TREM-1 deficiency can attenuate disease severity without affecting pathogen clearance. *PLoS Pathogens* 10(1), e1003900.
- Whitmarsh, A.J., and Davis, R.J. (1996). Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *Journal of Molecular Medicine* 74, 589-607.
- World Health Organisation (WHO) (2001d). Hepatitis Delta. WHO/CDS/CSR/NCS/2001.1. Stand: Januar 2015. <http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/whocdscsrncs20011/en/>
- World Health Organisation (WHO) (2014). What is hepatitis? Online Q&A. Stand: Juni 2014. <http://www.who.int/features/qa/76/en/>
- World Health Organisation (WHO) (2014a). Hepatitis A. Fact sheet N°328. Stand: Juni 2014. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs328/en/>
- World Health Organisation (WHO) (2014b). Hepatitis B. Fact sheet N°204. Stand: Juli 2014. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/>
- World Health Organisation (WHO) (2014c). Hepatitis C. Fact sheet N°164. Stand: April 2014. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>
- World Health Organisation (WHO) (2014e). Hepatitis E. Fact sheet N°280. Stand: Juni 2014. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs280/en/>
- Wright, H.L., Moots, R.J., Bucknall, R.C., and Edwards, S.W. (2010). Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. *Rheumatology* 49, 1618-1631.
- Wu, J., Li, J., Salcedo, R., Mivechi, N.F., Trinchieri, G., and Horuzsko, A. (2012). The proinflammatory myeloid cell receptor TREM-1 controls Kupffer cell activation and development of hepatocellular carcinoma. *Cancer Research* 72, 3977-3986.
- Wuensch, E., and Heidrich, H.G. (1963). On the quantitative determination of collagenase. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie* 333, 149-151.
- Yang, H., Lundback, P., Ottosson, L., Erlandsson-Harris, H., Venereau, E., Bianchi, M.E., Al-Abed, Y., Andersson, U., Tracey, K.J., and Antoine, D.J. (2012). Redox modification of cysteine residues regulates the cytokine activity of high mobility group box-1 (HMGB1). *Molecular Medicine* 18, 250-259.

- Yasuda, T., Takeyama, Y., Ueda, T., Shinzeki, M., Sawa, H., Takahiro, N., Kamei, K., Ku, Y., Kuroda, Y., and Ohyanagi, H. (2008). Increased levels of soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in patients with acute pancreatitis. *Critical Care Medicine* 36, 2048-2053.
- Yildiz, O., Aygen, B., Esel, D., Kayabas, U., Alp, E., Sumerkan, B., and Doganay, M. (2007). Sepsis and meningitis due to *Listeria monocytogenes*. *Yonsei Medical Journal* 48, 433-439.
- Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsukawa, T., Shinobu, N., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Akira, S., and Fujita, T. (2004). The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nature Immunology* 5, 730-737.
- Youn, J.H., and Shin, J.-S. (2006). Nucleocytoplasmic shuttling of HMGB1 is regulated by phosphorylation that redirects it toward secretion. *Journal of Immunology* 177, 7889-7897.
- Yu, Z.H., Huang, H.C., Mao, P., Liu, D.D., Mo, H.Y., He, W.Q., Liu, X.Q., and Li, Y.M. (2010). Study on the natural ligand(s) of triggering receptor expressed on myeloid cell-1 on bacteria cell wall. *Chinese Critical Care Medicine* 22, 335-339.
- Zenewicz, L.A., and Shen, H. (2007). Innate and adaptive immune responses to *Listeria monocytogenes*: a short overview. *Microbes and Infection*, 1208-1215.
- Zeromski, J., Mozer-Lisewska, I., Kaczmarek, M., Kowala-Piaskowska, A., and Sikora, J. (2011). NK cells prevalence, subsets and function in viral hepatitis C. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 59, 449-455.
- Zhou, X., Ramachandran, S., Mann, M., and Popkin, D.L. (2012). Role of lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) in understanding viral immunology: past, present and future. *Viruses* 4, 2650-2669.
- Zinkernagel, R.M. (2002). Lymphocytic choriomeningitis virus and immunology. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 263, 1-5.
- Zinkernagel, R.M., Haenseler, E., Leist, T., Cerny, A., Hengartner, H., and Althage, A. (1986). T cell-mediated hepatitis in mice infected with lymphocytic choriomeningitis virus. Liver cell destruction by H-2 class I-restricted virus-specific cytotoxic T cells as a physiological correlate of the 51Cr-release assay? *Journal of Experimental Medicine* 164, 1075-1092.

8. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erläuterung
-/-	defizient
+/+	profizient
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
Acta	actin assembly-inducing protein
<i>Ad libitum</i>	„nach Belieben“
ADV	Adenovirus
AIH	Autoimmunhepatitis
AKT	Proteinkinase B
ALT	Alanin-Aminotransferase
AP1	activator protein 1
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumpersulfat
APZ	antigenpräsentierenden Zelle
ATP	Adenosintriphosphat
BAL	bronchoalveolären Lavage
BAP	beatmungsassoziierte Pneumonie
BCL10	B-cell lymphoma/leukemia 10
BIR	baculovirus inhibitor of apoptosis repeat
bp	Basenpaar
bps	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
BTK1	Bruton's tyrosine kinase
C/EBPα	CCAAT/enhancer-binding protein alpha
CaCl ₂	Calciumchlorid
CARD	caspase recruitment domain
CARD9	caspase-associated recruitment domain 9
CD	Unterscheidungsgruppen (cluster of differentiation)
cDNA	Complementary DNA (komplementäre DNA)
CMV	Cytomegalievirus
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COOH	Carboxylgruppe
CP	crossing point
CREB	cAMP response element-binding protein
CRP	C-reaktives Protein
CXCL	CXC-Ligand
CY5	Cyanin-5
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAG	Diacylglycerol
DAMPs	Schaden-assoziierte Muster
DAP12	DNAX-activating protein of 12 kDa
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA / DNS	Deoxyribonucleic acid / Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EBV	Epstein-Barr-Virus

EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat
ELISA	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (enzyme linked immunosorbent assay)
Elk1	ETS domain-containing protein Elk-1
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK1/2	extrazellulär Signal-regulierte Kinase 1/2
FACS	Durchflusszytometrie (fluorescence activated cell sorting)
FAS-L	FAS-Ligand
FCS	Fetal calf serum (Fetales Kälberserum)
FFA	focus forming assay
FFU	focus forming units
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GP	Glykoprotein
GPC	Glykoprotein-Vorläufermolekül
GRB2	growth factor receptor-bound protein 2
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HAV	Hepatitis-A-Virus
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinoms
HCl	Salzsäure
HCV	Hepatitis-C-Virus
HDV	Hepatitis-D-Virus
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HEV	Hepatitis-E-Virus
HGFR	hepatocyte growth factor receptor
HMGB1	high-mobility group protein B1
Hoechst 33258	Pentahydrat(bis-benzimide)
HRP	Meerrettichperoxidase
HSP70	heat shock protein 70
HSV	Herpes-simplex-Virus
human	zur Art des Menschen gehörend
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IFN α	Interferon- α
IFN γ	Interferon- γ
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin G
IGR	intergenische Region
IKK	I κ B kinase
IL	Interleukin
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
<i>in silico</i>	„im Computer“
<i>in vitro</i>	„im (Reagenz)Glas“
<i>in vivo</i>	„im Lebendigen“
InIA	Internalin A
InIB	Internalin B
IP3	Inositol-3,4,5-trisphosphat
IRAK1/4	Interleukin-1 receptor-associated kinase 1/4

IRF	interferon regulatory factor
IRF3	Interferon regulatory factor 3
ITAM	immunoreceptor tyrosine based activation motif
IU	internationale Einheit
I κ B	inhibitor of kappa B
JAK2	Janus Kinase 2
K	Lysin
KC	Kupffer-Zelle
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
KHCO ₃	Kaliumhydrogencarbonat
L	Polymerase
LBP	LPS-bindendes Protein
LCMV	Lymphozytäres Choriomeningitis Virus
LLO	Listeriolysin
LPS	Lipopolysaccharide
LRR	leucine-rich repeat
LSEC	Leber Sinusoidale Endothelzelle
LTA	Lipoteichonsäuren
LY6G	lymphocyte antigen 6 complex, locus G
MACS	Magnetische Zelltrennung (magnetic cell separation)
MALT1	mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1
MAVS	mitochondrial antiviral signaling protein
MBL	Mannose-bindende Lektin
MCP1/CCL2	monocyte chemotactic protein 1 / chemokine (C-C motif) ligand 2
MD2	lymphocyte antigen 96
MDA5	melanoma differentiation-associated protein 5
MDP	Muramyldipeptid
MEK1/2	extracellular signal-regulated kinase kinase
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MHC	major histocompatibility complex
ml	Milliliter
MOI	multiplicity of infection
MPO	Myeloperoxidase
mRNA	messenger RNA
murin	zu der Familie der Nagetiere gehörend
MyD88	myeloid differentiation primary response gene 88
Na ₂ HPO ₄	Natriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid / Kochsalz
NFAT	nuclear factor of activated T-cells
NF-kappaB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NGS	Ziegen-Normalserum (normal goat serum)
NH ₂	Aminogruppe
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
NLR	NOD-like Rezeptor
NOD	nucleotide-binding oligomerization
NP	Nukleoprotein
NTAL	non-T cell activation linker

p.i.	nach Infektion (post infection)
PaCo-NHS	Pacific Orange-NHS
PAMPs	Pathogen-assoziiertes molekulares Muster
PBC	Primär biliäre Zirrhose
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PC	Personal Computer
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PDK1	phosphoinositide dependent protein kinase-1
PE	Phycoerythrin
pg	Picogramm
PGLYRP1	peptidoglykan recognition protein
PGN	Peptidoglykane
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PI-PLC	Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C
PKC	Phosphokinase C
PLC	Phospholipase C
PLC-B	Lecithinase
PML	Promyelozytenleukämie
PMN	Polymorphkernige Leukozyten (polymorphonuclear leukocytes)
Poly(I:C)	Polyinosin- <i>Polycytidin-Säure</i>
PPIA	Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase-A
PRRs	Muster-erkennende Rezeptoren
PSC	Primär sklerosierende Cholangitis
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PYD	pyrin domain
PZ-U	„Wünsch-Einheit“ (1 PZ-U/ml katalysiert die Umsetzung von 1 µmol 4-phenylazobenzoyloxycarbonyl-L-prolyl-L-leucyl-glycyl-L-prolyl-D-arginine / Minute bei 25°C, pH 7,1 (Wuensch und Heidrich, 1963))
qPCR	Quantitative Echtzeit PCR (Real-Time-quantitative-PCR)
RAF	rapidly accelerated fibrosarcoma
RAS	rat sarcoma
RIG-I	retinoic acid inducible gene I
RLR	RIG-I-like Rezeptor
RNA / RNS	Ribonucleic acid / Ribonukleinsäure
RNase A	Ribonuklease A
RNP	Ribonukleoproteinkomplex
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
s	Sekunde
S	Cystein
SAA	serum amyloid a
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
SIRS	Systemisches inflammatorisches Response-Syndrom
SOS1	son of sevenless homolog 1
SPF	spezifisch pathogenfrei
SRC	sarcoma
S-S	Disulfidbrücke
STAT3/5	signal transducer and activator of transcription 3/5
sTREM1	lösliches TREM1 (soluble TREM1)

SYK	spleen tyrosine kinase
Tab.	Tabelle
TAK1	transforming growth factor β -activated kinase-1
TBK1	TANK-binding kinase 1
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGF	transforming growth factor
TIR	Toll/interleukin-1 receptor (TIR) homology domain
TLR	Toll-like Rezeptor
TLT	TREM-like-transcript
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF α	Tumornekrosefaktor- α
TRAF6	TNF receptor-associated factor 6
TREM	triggering receptor expressed on myeloid cells
TREM1 -/-	TREM1-defizient
TREM1 +/+	TREM1-profizient
TREM2	triggering receptor expressed on myeloid cells 2
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TYROBP	TYRO protein tyrosine kinase-binding protein
U	Unit
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
UV	Ultraviolett
V	Volt
VTH	Versuchstierhaltung
Well	Vertiefung
WT	Wildtyp
Y	Tyrosin
Z	Matrixprotein
ZNS	Zentralnervensystem

9. Publikationen

Kozik, J.H., Trautmann, T., Carambia, A., Eissing, L., Lohse, A.W., Wiegard, C., Heeren, J., and Herkel, J. (2014a). P144 TREM1-deficiency accelerates viral clearance in a mouse model of LCMV-induced acute viral hepatitis. *Journal of Hepatology* 60, 113-114.

Kozik, J.H., Trautmann, T., Carambia, A., Eissing, L., Lohse, A.W., Wiegard, C., Heeren, J., and Herkel, J. (2014b). TREM1-Defizienz begünstigt die vorzeitige Klärung einer Virushepatitis im Mausmodell. *Zeitschrift für Gastroenterologie* 52, P_5_51.

Trautmann, T., Kozik, J.H., Carambia, A., Oxenius, A., Lohse, A.W., Wiegard, C., and Herkel, J. (2013). CD4+ T Zell-Hilfe ist entscheidend für die CD8+ T Zell vermittelte Klärung einer akuten Virusinfektion in der Leber. *Zeitschrift für Gastroenterologie* 51, P_5_69.

Trautmann, T., Kozik, J.H., Carambia, A., Richter, K., Lischke, T., Schwinge, D., Mittrucker, H.W., Lohse, A.W., Oxenius, A., Wiegard, C., Herkel, J. (2014). CD4+ T-cell help is required for effective CD8+ T cell-mediated resolution of acute viral hepatitis in mice. *PLoS ONE* 9(1), e86348.

10. Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Ansgar W. Lohse dafür bedanken, dass er mir ermöglicht hat, die vorliegende Dissertationsschrift in seinem Labor anzufertigen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. rer. nat. Johannes Herkel für die außerordentlich gute Betreuung dieser Arbeit, für sein Vertrauen in meine Fähigkeiten, für den Freiraum bei der Gestaltung des Projekts, für sein immer offenes Ohr sowie für die Begutachtung dieser Arbeit.

Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. rer. nat. Thorsten Burmester für die freundliche und engagierte Begutachtung dieser Arbeit.

Mein weiterer Dank gilt Dr. rer. nat. Tanja Trautmann für die Hilfe bei der Etablierung der LCMV-Infektion, der Analyse der CD8 T-Zell-Aktivierung sowie für die zahlreichen intensiven Diskussionen.

Ebenfalls möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. Jörg Heeren und Dr. rer. nat. Leah Eissing sowohl für die Bereitstellung der TREM1 ^{-/-} Mäuse als auch für die freundliche Zusammenarbeit bedanken.

Des Weiteren gilt Herrn Prof. Dr. rer. nat. Hans-Willi Mittrücker und M. Sc. Karsten Lücke mein Dank für die Unterstützung bei der Listerien-Infektion der TREM1 ^{-/-} Mäuse.

Außerdem möchte ich mich bei Marko Hilken, Christina Trabant, Birte Hanisch und Agnes Malotta für die Unterstützung bei der Anzucht der Versuchsmäuse, der Anfertigung von Gewebeschnitten und Hilfe bei technischen Fragen bedanken.

Darüber hinaus gilt Dr. med. Marc Lütgehetmann mein Dank für die Bereitstellung der HBV- und HCV-Patientenserum.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Dr. rer. nat. Antonella Carambia und Dr. rer. nat. Dorothee Schwinge für die Korrektur dieser Arbeit, die wertvollen Tipps, die Diskussionen sowie die schöne gemeinsame Zeit im Labor bedanken.

Mein Dank gebührt ebenfalls Dr. rer. nat. Tanja Schoknecht für die Korrektur dieser Arbeit sowie Dr. rer. nat. Jessica Rauch, Dipl.-Biol. Claudia Bovensiepen und Dipl.-Biol. Nina Günter für die schöne Laborzeit, die gute Zusammenarbeit und ihre Freundschaft.

Außerdem geht mein ganz besonderer Dank an meine Eltern Sabine Kozik und Günter Kozik, die immer an mich geglaubt haben, immer für mich da waren und mich bei allen meinen Entscheidungen kompromisslos unterstützt haben.

Schließlich möchte ich mich bei meiner wunderbaren Frau Ekaterina Kozik für ihre Geduld, ihr Verständnis, ihre Liebe sowie ihre tolle Unterstützung bedanken.

11. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ort/ Datum

Unterschrift