

**Vergleichende Untersuchungen
zur Pathogenese der H1N1v- und H5N1-
Influenzavirusinfektionen in Mäusen**

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Annette Vogel

aus Waiblingen

Tübingen

2011

Tag der mündlichen Qualifikation:

16.05.2012

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Oliver Planz

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	IV
TABELLENVERZEICHNIS	VI
1 ZUSAMMENFASSUNG.....	1
2 EINLEITUNG	3
2.1 ORTHOMYXOVIREN	3
2.1.1 <i>Das Influenza-A-Virus.....</i>	<i>4</i>
2.1.1.1 Aufbau und Funktion einzelner Proteine	4
2.1.1.2 Replikationszyklus.....	7
2.1.1.3 Die Klassifizierung der Influenza-A-Viren.....	10
2.1.1.3.1 Das Hämagglutinin als Klassifizierungsmarker und Ursache der Gewebespezifität.....	10
2.1.1.3.2 Influenza	11
2.1.1.3.3 Die hochpathogene aviäre Vogelgrippe H5N1	13
2.2 DAS BORNAVIRUS.....	14
2.3 DAS IMMUNSYSTEM.....	15
2.3.1 <i>Die adaptive Immunantwort</i>	<i>16</i>
2.3.1.1 T-Zellen	16
2.3.1.2 Regulatorische T-Zellen.....	17
2.3.1.2.1 Die natürlich vorkommende Regulatorische T-Zelle	20
2.3.1.2.2 Die induzierte Regulatorische T-Zelle	20
2.3.1.3 Der Thymus als Produktionsort von T-Zellen.....	21
3 ZIELSETZUNG.....	23
4 MATERIAL UND METHODEN	25
4.1 MATERIALIEN.....	25
4.1.1 <i>Chemikalien und Verbrauchsmittel.....</i>	<i>25</i>
4.1.2 <i>Zelllinien.....</i>	<i>27</i>
4.1.3 <i>Virusstämme.....</i>	<i>27</i>
4.1.4 <i>Tierstämme</i>	<i>27</i>
4.1.5 <i>Zellkulturmedien.....</i>	<i>27</i>
4.1.6 <i>Enzyme.....</i>	<i>28</i>
4.1.7 <i>Kits.....</i>	<i>28</i>
4.1.8 <i>Antikörper.....</i>	<i>28</i>
4.1.9 <i>Primer.....</i>	<i>29</i>
4.1.10 <i>Peptide.....</i>	<i>29</i>
4.1.11 <i>Puffer und Lösungen.....</i>	<i>29</i>

4.1.12	<i>Geräte</i>	31
4.2	METHODEN	32
4.2.1	<i>Infektion der Mäuse und Grundlagen der Tierversuche</i>	32
4.2.2	<i>Herstellung von Organproben</i>	32
4.2.2.1	Zellsuspension	32
4.2.2.2	Herstellung eines zehnprozentigen Organhomogenats	33
4.2.3	<i>Zellkultur</i>	33
4.2.4	<i>Virustitration</i>	34
4.2.5	<i>FACS-Analysen</i>	35
4.2.5.1	Extrazelluläre Färbung	35
4.2.5.2	Intrazelluläre Färbung Regulatorischer T-Zellen	35
4.2.5.3	Färbung apoptotischer Zellen	36
4.2.6	<i>Isolierung Dendritischer Zellen aus der Lunge</i>	36
4.2.6.1	Färbung Dendritischer Zellen für die FACS-Analyse	37
4.2.6.2	Fluoreszenzfärbung Dendritischer Zellen für die Mikroskopie	38
4.2.6.3	Adoptiver Transfer der Dendritischen Zelle	38
4.2.7	<i>RNA-Isolierung</i>	39
4.2.8	<i>Quantitative real-time PCR</i>	40
4.2.8.1	Nachweis der zellulären Genexpression	41
4.2.8.2	Nachweis der RNA-Expression viraler Matrixproteine	41
4.2.9	<i>In vitro Zytotoxizitätsassay</i>	42
4.2.10	<i>Proliferations-Inhibitionsassay</i>	44
4.2.11	<i>Zytokinnachweis in der Maus</i>	45
4.2.12	<i>Thymusverdau</i>	46
4.2.13	<i>Adoptiver Transfer von regulatorischen T-Zellen</i>	47
4.2.14	<i>Infektion der Ratten und Grundlagen der Tierversuche</i>	47
4.2.15	<i>FACS-Analysen in der Ratte</i>	48
4.2.15.1	Färbung einer Suspension ausgehend vom Organ, extrazellulär	48
4.2.15.2	Färbung einer Suspension ausgehend vom Organ, intrazellulär	49
4.2.16	<i>Zytokinnachweis in der Ratte</i>	49
4.2.17	<i>Proliferations-Inhibitionsassay mit Zellen aus BDV-infizierten Ratten</i>	50
5	ERGEBNISSE	53
5.1	DIE VERTEILUNG DER T-ZELLEN NACH EINER INFLUENZAVIRUSINFEKTION	53
5.2	DIE VERTEILUNG DER UNTERSCHIEDLICHEN INFLUENZAVIREN <i>IN VIVO</i>	55
5.3	DER THYMUS ALS ZIEL DER INFLUENZAVIRUSINFEKTION	57
5.4	DIE T-ZELLENTWICKLUNG NACH INFLUENZAVIRUSINFEKTIONEN	63
5.5	DIE <i>IN VIVO</i> INFEKTION DER DENDRITISCHEN ZELLE	70
5.6	DIE GENERIERUNG FUNKTIONELLER REGULATORISCHER T-ZELLEN	75
5.7	VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN NACH LETALER UND SUBLETALER H1N1V-INFEKTION	78
5.7.1	<i>Analysen der T-Zellantwort nach einer hohen und niedrigen H1N1v-Infektionsdosis</i>	79

5.7.2	<i>Untersuchungen von Zellen der angeborenen Immunantwort</i>	91
5.8	DAS POTENZIAL DER GENERIERTEN TREGS <i>IN VIVO</i>	94
5.9	DER EINFLUSS REGULATORISCHER T-ZELLEN AUF DIE BORNA DISEASE VIRUS-INDUZIERTE IMMUNPATHOGENESE.....	99
6	DISKUSSION	105
7	LITERATURVERZEICHNIS	119
8	DANKSAGUNG	133
9	PUBLIKATIONSLISTE	135
10	LEBENS LAUF	137

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
µl	Mikroliter
³ H	Tritium
A (Aminosäure)	Alanin
AF	Alexa Fluor
AIDS	Erworbenes Immundefektsyndrom (Acquired immunodeficiency syndrome)
AIV	Aviäres Influenzavirus
APC	Antigenpräsentierende Zelle
BDV	Bornavirus (Borna Disease Virus)
C (Aminosäure)	Cystein
CCL	Liganden der CC-Motivfamilie
CD	Cluster of differentiation
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
ConA	Concavalin A
Cr	Chrom
cRNA	Anti-genomische RNA
Ct	Fluoreszenz-Schwellenwert
CTLA-4	Zytotoxisches T-Lymphozyten Antigen 4
CXCL	Liganden der CXC-Motivfamilie
CXCR	Rezeptoren der CXC-Motivfamilie
Cy	Cyanin-Fluoreszenzfarbstoff
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DC	Dendritische Zelle
DC-SIGN (CD209)	Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DP-Zelle	Doppelt-positiver CD4 ⁺ CD8 ⁺ Thymozyt
E (Aminosäure)	Glutamat
EBV	Epstein-Barr-Virus
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Foxp3	Forkhead box protein 3
g (Gewicht)	Gramm
g (Zentrifugation)	Erdschwerebeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
h	Stunde(n)
H1N1v	Pandemische Schweinegrippe des Jahres 2009
HA	Hämagglutinin
HCl	Chlorwasserstoff
HCMV	Humanes Zytomegalovirus
HCV	Hepatitis-C-Virus
HIV	Humanes Immunodefizienz-Virus
HPAIV	Hochpathogenes aviäres Influenzavirus
HSV	Herpes-Simplex-Virus
HxNy	Influenzaviren mit dem Hämagglutinin-Subtyp x und dem Neuraminidase-Subtyp y
I (Aminosäure)	Isoleucin
i.c.	Intracranial
i.n.	Intranasal
i.p.	Intraperitoneal
IAV	Influenza-A-Virus

Abkürzung	Bedeutung
ICAM	Inter-Cellular Adhesion Molecule
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IL	Interleukin
IFN	Interferon
JEV	Japanisches Enzephalitis-Virus
K (Aminosäure)	Lysin
Kt	Kontrolle
LN	Lymphknoten
M (Aminosäure)	Methionin
M (Einheit)	Molare Masse
M (Influenzprotein)	Matrixprotein
MACS	Magnetic activated cell sorting
mCi	Microcurie
mg	Milligramm
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute
ml	Milliliter
MLD ₅₀	Mausletaldosis 50% (bei der 100% der Tiere erkranken und 50% versterben)
mRNA	Messenger RNA
Mx	<i>Myxovirus resistance</i> Gen
N (Aminosäure)	Asparagin
N (Einheit)	Äquivalentkonzentration (Normalität)
NA	Neuraminidase
Na ₂ CrO ₄	Natriumchromat
NaOAc	Natriumacetat
NEP	Nukleexportprotein
NFκB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
ng	Nanogramm
NKG2D (CD314)	Natural Killer Group 2 Member D
NKT-Zelle	Natürliche Killer-T-Zellen
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
Nm	Nanometer
NP	Nukleoprotein
NS	Nichtstrukturprotein
PA	<i>polymerase acid</i>
PB	<i>polymerase basic</i>
PB1-F2	PB1-frame-2-Protein
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
pg	Picogramm
PHA-M	Phytohemagglutinin-M
PKR	Proteinkinase
qRT-PCR	Quantitative real-time PCR
R (Aminosäure)	Arginin
RDC	Respiratorische Dendritische Zelle
RNA	Ribonukleinsäure
RNP	Ribonukleinprotein-Komplex
RT	Raumtemperatur
S (Aminosäure)	Serin
sec	Sekunden
SEM	Standardabweichung (Standard Error of the Mean)
SIV	Simianes Immundefizienz-Virus
SLAM (CD150)	<i>Signaling Lymphocytic Activation Molecule</i>
SYBR	2-{2-[(3-Dimethylamino-propyl)-propylamino]-1-phenyl-1H-chinolin-4-

Abkürzung	Bedeutung
	ylidenmethyl}- 3-methyl-benzothiazol-3-ium-Kation
TCR	T-Zellrezeptor
TLR	Toll like Rezeptor
Treg	Regulatorische T-Zelle
Upm	Umdrehungen pro Minute
V (Aminosäure)	Valin
VCAM	<i>Vascular cell adhesion protein</i>
vRNA	Virale RNA
X (Aminosäure)	Beliebige Aminosäure
MEM	Minimum Essential Medium
DEPC	Diethylpyrocarbonat

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.I Darstellung eines Influenzaviruspartikels.....	5
Abbildung 2.II Der Replikationszyklus der Influenzaviren	8
Abbildung 2.III Der Replikationszyklus der Influenzaviren.....	9
Abbildung 2.IV Genetische Zusammensetzung des H1N1v.....	12
Abbildung 2.V Unterschiedlichen Gruppen an CD4 ⁺ T-Zellen	17
Abbildung 2.VI Schematische Darstellung der Funktionsweise von Tregs.....	19
Abbildung 5.I Die Verteilung der unterschiedlichen CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellpopulationen nach einer Influenzavirusinfektion.....	54
Abbildung 5.II mRNA-Nachweise des viralen M-Proteins	56
Abbildung 5.III Fotografische Darstellung der Thymi nach Influenzavirusinfektionen.....	58
Abbildung 5.IV Die Leukozytenzahl innerhalb des Thymus nach Influenzavirusinfektionen	59
Abbildung 5.V Die Untersuchung unterschiedlicher Thymozytenpopulationen	60
Abbildung 5.VI Untersuchung der unterschiedlichen Thymusfraktionen auf virale M-Protein-mRNA	62
Abbildung 5.VII Die mRNA-Expressionen unterschiedlicher Chemokine nach Influenzavirusinfektionen.....	63
Abbildung 5.VIII Apoptotische Zellen im Thymus nach Influenzavirusinfektionen	65
Abbildung 5.IX <i>Fortsetzung</i> Aktivitätsprofil der T-Zellen im Thymus nach einer Influenzavirusinfektion.	67
Abbildung 5.X Ein <i>in vitro</i> Zytotoxizitätstest mit Lymphozyten.....	69
Abbildung 5.XI Nachweis IAV-infizierter DCs der Maus nach Influenzavirusinfektion ...	71
Abbildung 5.XII Schema des adoptiven Transfer der GFP ⁺ -Donor-DCs	72
Abbildung 5.XIII Der Nachweis migrierender DCs nach adoptivem Transfer.....	73
Abbildung 5.XIV Überleben, Gewichts- und Krankheitsverlauf nach H1N1v-Infektion ..	74
Abbildung 5.XV Leukozyten im Thymus nach H1N1v-Infektionsdosis.....	75

Abbildung 5.XVI Quantifizierung der Tregs nach Influenzavirusinfektion	76
Abbildung 5.XVII Proliferations-Inhibitionsassay nach Influenzavirusinfektion	77
Abbildung 5.XVIII Frequenz der unterschiedlichen T-Zellpopulationen nach H1N1v- Infektion.	80
Abbildung 5.XIX Zytokinnachweis der T-zellspezifischen Immunantwort in der Lunge nach H1N1v-Infektion.....	83
Abbildung 5.XX Zytokinnachweis der T-zellspezifischen Immunantwort im Serum nach H1N1v-Infektion	85
Abbildung 5.XXI Zytokinnachweis der T-zellspezifischen Immunantwort im Thymus nach H1N1v-Infektion	88
Abbildung 5.XXII Influenzavirus-spezifische CD8 ⁺ T-Zellen in der Lunge nach H1N1v- Infektion	90
Abbildung 5.XXIII <i>In vitro</i> Zytotoxizitätstest mit Lymphozyten nach H1N1v-Infektion ..	91
Abbildung 5.XXIV Anteil unterschiedlicher Zellpopulationen der angeborenen Immunantwort nach H1N1v-Infektion	93
Abbildung 5.XXV Schema des adoptiven Treg-Transfers	95
Abbildung 5.XXVI Ergebnisse des adoptiven Transfers von Treg	97
Abbildung 5.XXVII Quantitative Bestimmung unterschiedlicher Zytokinkonzentrationen im Gehirn von Ratten nach BDV-Infektion.....	100
Abbildung 5.XXVIII Der Nachweis von T-Zellen in Gehirnen BDV-infizierter Ratten ..	102
Abbildung 5.XXIX Der Nachweis von T-Zellen in zervikalen Lymphknoten BDV- infizierter Ratten	103
Abbildung 5.XXX Inhibitions-Proliferationsassay durch BDV-induzierte Tregs.....	104
Abbildung 6.I Möglicher Mechanismus, wie HPAIV und H1N1v den Thymus ohne systemische Verbreitung infizierten.....	112
Abbildung 6.II Unterschiedliche Faktoren, die für die Treg-Expansion in Thymus und Peripherie während der IAV-Infektion verantwortlich sind.....	117

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.i Die Systematik der Orthomyxoviren.....	3
Tabelle 2.ii Darstellung der genomischen Segmente der Influnza-A-Viren.....	7
Tabelle 5.i Virusverteilung in der Maus sechs Tage nach Infektion.....	55
Tabelle 5.ii H1N1v-Virusverteilung nach Infektion mit der hohen Virusdosis.....	78
Tabelle 5.iii H1N1v-Virusverteilung nach niedriger Virusdosis.	78
Tabelle 5.iv Auflistung der beobachteten Zytokin-Konzentrationen	89

1 Zusammenfassung

Humane Influenzavirusinfektionen spielen eine bedeutende Rolle im Gesundheitswesen. Die Influenza-A-Virusausbrüche des hochpathogenen aviären H5N1-Virus und die schnelle Verbreitung des 2009 aufgetretenen pandemischen H1N1v-Schweinegrippevirus zeigten jedoch deutlich, wie limitierend die medizinischen Mittel gegen schwerverlaufende Infektionen sind und wie wenig die biologischen Ursachen der Erkrankung verstanden werden.

Da von einer schwerverlaufenden Influenza-A-Virusinfektion meist junge Menschen betroffen sind und die Pathogenese eine Lymphopenie und Hyperzytokinämie hervorruft, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Beeinflussung der Influenza-A-Viren auf das Immunsystem postuliert und im Besonderen auf die T-Zellantwort fokussiert. Die Untersuchungen zeigten, dass durch HPAIV- und H1N1v-Viren neben der Lunge meist nur mediastinale Lymphknoten und der Thymus infiziert wurden, eine systemische Infektion blieb hingegen aus. Eine Atrophie des Thymus konnte dabei beobachtet werden, insbesondere die doppelpositive $CD4^+CD8^+$ -Thymozyten nahmen stark ab, und der Thymus verlor Teile seiner Funktionen. Es konnte nachgewiesen werden, dass in der Lunge Dendritische Zellen (DCs) infiziert wurden und in den Thymus einwanderten, sodass die Influenza-A-Viren DCs offensichtlich als Transportzellen in die lymphoiden Organe nutzt. Die Infektion des Thymus führte zu einer gestörten T-Zellentwicklung und zu einer starken und schnellen Expansion von funktionellen Regulatorischen T-Zellen (Treg). Diese Treg-Expansion konnte bei einer fatalen H1N1v-Infektion vor der Effektor-T-Zellantwort dokumentiert werden und obwohl eine Influenza-spezifische T-Zellpopulation vorhanden war, besaßen Lymphozyten von Tieren mit einem fatalen Krankheitsverlauf eine geringere T-Zellzytotoxizität als Lymphozyten von Mäusen, die mit einer subletalen Dosis infiziert wurden. Da ab Untersuchungstag 3 und bei gleichzeitig einsetzendem Krankheitsbeginn keine Unterschiede in der Virusmenge und Virusverteilung beobachtet werden konnten, wurden die Frequenzen einzelner Zellpopulationen, die der angeborenen Immunantwort angehören, bestimmt. Entsprechenden Untersuchungen zur Klärung dieser Beobachtung konnten frühe Unterschiede insbesondere in der Frequenz von NK- und NKT-Zellen aufzeigen.

Zusammenfassend konnten im Rahmen dieser Arbeit unterschiedliche Faktoren nachgewiesen werden, die für die frühe Treg-Expansion und daraus resultierenden schwachen T-Zellantwort nach Influenza-A-Virusinfektionen verantwortlich waren und die Pathogenese im Sinne eines schweren Krankheitsverlaufs beeinflussten.

2 Einleitung

Viren sind infektiöse Erreger, die durch Rezeptor-vermitteltes Eindringen in Körperzellen den zellulären Stoffwechsel zu ihrer Replikation nutzen und auf diese Weise die physiologischen Funktionen von Zellen und daraus folgend Organen verändern können. Diese Veränderungen haben unterschiedliche Auswirkungen, abhängig von den Eigenschaften der verschiedenen Viren. Daher werden Viren in zytopathogen und nicht-zytopathogen unterteilt, wobei erstere einen direkten pathologischen Effekt auf Zellen haben. Aufgrund der geringen Größe und der obligaten intrazellulären Lebensweise wurde das erste tierpathogene Virus, das Maul-und-Klauenseuchenvirus, erst 1898 von Friedrich Loeffler und Paul Frosch nachgewiesen. Heute spielen Viren eine zentrale Rolle in der modernen und interdisziplinären Forschung. Beispielsweise gehen einige molekularbiologischen Beobachtungen, wie das Spleißen von RNA, auf die Virusforschung zurück (Berget et al., 1977). Virale Vektoren spielen eine zunehmend bedeutende Rolle für den Transfer von genetischem Material, welches gentherapeutisches Potenzial besitzt; in der Krebsforschung konnte gezeigt werden, dass Gebärmutterhalskrebs kausal mit einer Papillomavirusinfektion zusammenhängen kann (zur Hausen, 2009) und Untersuchungen zur Pathogenese viraler Infektionen geben die Möglichkeit, antivirale Therapieansätze entwickeln zu können.

2.1 Orthomyxoviren

Das Influenzavirus gehört zu der Familie der *Orthomyxoviridae* (Tabelle 2.i). Diese Viren weisen ein segmentiertes RNA-Genom auf, wobei alle Segmente eine Negativstrangorientierung aufweisen. Durch die hohe Fehlerquote der RNA-Replikation und Segmentierung des Genoms besitzen Orthomyxoviren eine hohe genetische Flexibilität und der Austausch von RNA-Segmenten zwischen Viren (*reassortment*) kann neue Subtypen hervorbringen.

Tabelle 2.i Die Systematik der Orthomyxoviren (nach Modrow, Falke, Truyen, Schätzl (2010): Molekulare Virologie. 3. Aufl., Spektrum Verlag, Heidelberg).

Familie	Genus	Spezies
Orthomyxoviridae	Influenzavirus A	Influenza-A-Virus
	Influenzavirus B	Influenza-B-Virus
	Influenzavirus C	Influenza-C-Virus
	Thogotovirus	Thogotovirus, Dhorovirus
	Isavirus	Virus der infektiösen Lachsankämie

Thogotoviren werden durch Zecken übertragen und können über diesen Vektor Menschen infizieren. Sie führen zu fiebrigen Erkrankungen. Unter dem Genus Isavirus ist bis heute nur das Virus der infektiösen Lachsanämie bekannt, das in den Fischen eine ansteckende Blutarmut verursacht. Inflenzaviren, die grippale Infekte verursachen, können in drei Virusgenera klassifiziert werden. Der Genus der Influenza-A-Viren ist der am weitesten verbreitete Erregerstamm und infiziert nicht nur Menschen, sondern auch Schweine, Pferde und anderen Säugetiere. Das Hauptreservoir der Influenza-A-Viren ist in Vögeln. Influenza-B-Viren konnten bis heute nur in Menschen und Robben nachgewiesen werden. Influenza-C-Viren kommen in Menschen und Schweinen vor, spielen allerdings eine geringe Rolle hinsichtlich der von ihnen verursachten Erkrankung. Während Influenza-A- und -B-Viren acht Genomsegmente besitzen, wovon zwei für Oberflächenproteine kodieren, besitzt das Influenza-C-Virus lediglich sieben Segmente mit einem Oberflächenprotein.

2.1.1 Das Influenza-A-Virus

Influenza-A-Viren (IAV) sind die Hauptursache viraler Erkrankungen durch Orthomyxoviren im Menschen und spielen auch in der Tiermedizin eine große Rolle.

2.1.1.1 Aufbau und Funktion einzelner Proteine

Der Viruspartikel von IAV ist sphärisch, hat eine durchschnittliche Größe von 120nm und ist umhüllt. Abbildung 2.1 gibt einen schematischen Überblick über den Aufbau des Virus. Das Hämagglutinin (HA) wird posttranslational modifiziert und ist für die Bindung an Wirtszellen verantwortlich. Es erkennt *n*-Acetyl-Neuraminsäuren (Sialinsäuren) auf Membranen. Zusätzlich vermittelt das HA die Fusion zwischen der Virushülle und der Endosomenmembran. Durch dieses Fusionsereignis gelangt das virale Genom in das Zytoplasma der Zelle. Die Neuraminidase (NA) ist für die Freisetzung neugebildeter Viruspartikel verantwortlich, da es Sialinsäuren abspaltet und so die Ablösung der Nachkommenviren von der Zellmembran ermöglicht. Die Abspaltung der Sialinsäuren verringert zudem die Wahrscheinlichkeit der Reinfektion von Zellen, da die Sialinsäuren danach nicht mehr als Virusrezeptor zur Verfügung stehen. Ebenfalls in die Virushülle eingelagert ist das Matrixprotein 2 (M2), welches als Tetramer vorliegt und einen Protonenkanal bildet. Nach erfolgter Infektion gelangen Protonen vom Endosom in das Innere des

Virus. Hierdurch wird der Ribonukleoproteinkomplex (RNP-Komplex) frei und das Genom freigesetzt. Die Innenseite der Virushülle ist mit dem Matrixprotein 1 (M1) assoziiert, welches das Virion stabilisiert. Neben Virushülle bindet das M1 auch an RNP-Komplexe, in denen sich die acht Nukleokapsidsegmente befinden. Diese bestehen aus den RNA-Genomsegmenten, welche wiederum mit den Nukleoproteinen (NP) verbunden sind. Neben dem M1 bindet das NP auch zelluläre Polypeptide wie Komponenten, die den Kernimport und -export bewerkstelligen und so auch für die Translokation der viralen RNA in den Zellkern verantwortlich ist. An der RNA befinden sich Polymerasekomplexe, die aus den basischen Polymeraseproteinen PB1, PB2 und dem sauren Polymeraseprotein PA bestehen. PB1, PB2 und PA funktionieren als RNA-abhängige RNA-Polymerase. Für die Transkription beziehungsweise Replikation der viralen RNA (vRNA) in mRNA und antigenomische RNA (cRNA) ist dieser Komplex essenziell. PB2 interagiert mit dem NP-Protein und einigen zellulären Proteinen. Für die virale Replikation ist die Aminosäure an Position 627 entscheidend. Während das Genom aviärer Viren an dieser Stelle für ein Glutamin kodiert, haben humane Virusstämme wie das humane H1N1-Pandemievirus von 1918 meist ein Lysin (Neumann et al., 2009). PB2 fungiert als Endonuklease und ist für das *cap-snatching* verantwortlich, das sich über 5'-Capstrukturen an zelluläre mRNA bindet und diese abschneidet (Shi et al., 1995). PB2 initiiert somit die Transkription, um die Expression der eigenen Proteine zu gewährleisten. PB1 besitzt Polymeraseaktivität und bindet an die terminalen Enden der RNA. Es ist für die Anlagerung neuer Nukleotide verantwortlich. PA wirkt zusätzlich noch als Serinprotease und induziert die Proteolyse zellulärer und viraler Proteine. Zudem ist PA für die Generierung der vRNA aus cRNA verantwortlich.

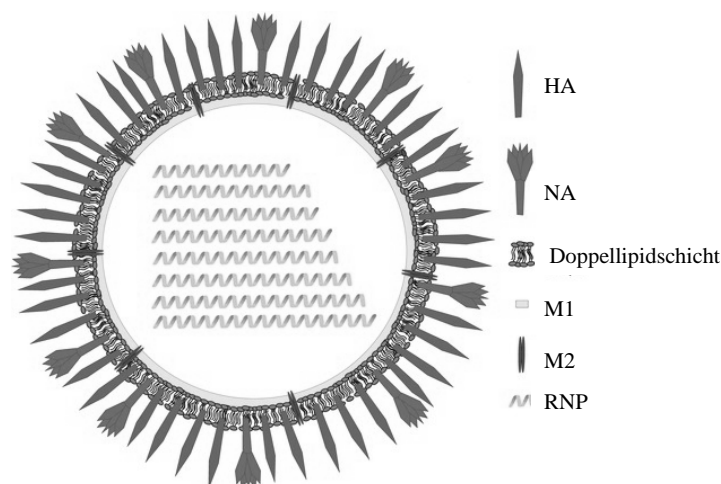


Abbildung 2.1 Darstellung eines Influenzaviruspartikels [modifiziert nach (Amorij et al., 2008)].

Zusätzlich kodiert das Virus für Nichtsstrukturproteine (NS). Das NS1 interagiert auf unterschiedliche Weise mit dem Immunsystem. Nach Infektion baut die Zelle schnell einen antiviralen Status auf. Dies beinhaltet die Expression von Interferonen des Typs I (IFN- α - β), wodurch unter anderem die Proteinkinase R (PKR) und die 2'-5'-Oligoadenylatsynthetase aktiviert werden. Erstere inhibiert die RNA-Polymerase-Aktivität, zweite führt zu einem Abbau von RNA. Zudem stimuliert IFN Typ I die Expression des Mx-Proteins, das wiederum die Transkription der viralen mRNA hemmt. NS1 bindet doppelsträngige RNA und verhindert somit die Erkennung durch die 2'-5'-Oligoadenylatsynthetase. Die Degradierung der RNA und der Translationsstopp können hierdurch verhindert werden. Die Blockierung der Interferonsystem-Signalkaskade wird auch von anderen Virenfamilien, wie den *Flaviviridae* genutzt, um die Immunantwort des Wirts zu manipulieren (Munoz-Jordan et al., 2005). Das NS1-Protein der Influenzaviren kann mit der PKR Komplexe bilden und somit die Proteinkinaseaktivität verhindern. Zusätzlich bindet NS1 den Transkriptionsfaktor NF κ B und inhibiert dessen Funktion. Der Transkriptionsfaktor NF κ B ist wichtig für die schnelle Einleitung der Immunantwort. Ein weiteres Nichtstrukturprotein, das jedoch nicht durch alle Viren exprimiert wird und daher für die Replikation nicht essenziell ist, ist das kurze PB1-F2-Protein. Es befindet sich auf einem alternativen Leserahmen des PB1-Segments und wurde 2001 zum ersten Mal beschrieben (Chen et al., 2001). In Zellen ist es in Mitochondrien und dem Zellkern lokalisiert. Es trägt zu einer erhöhten Virulenz und Pathogenese in Mäusen bei, wobei die Pathogenität höher scheint, wenn das PB1-Segment einen aviären Ursprung hat (McAuley et al., 2010). Die acht RNA-Segmente des Virus weisen unterschiedliche Längen auf und kodieren für die besprochenen viralen Proteine. Eine schematische Einteilung der Segmente gibt die Tabelle 2.ii wieder.

Tabelle 2.ii Darstellung der genomischen Segmente, deren Längen und Proteinprodukten der Influenza-A-Viren.*

Segment	Länge (in Basen)	Protein	Größe des Proteins (in kD)	Bekannte Funktionen des Proteins für Virusreplikation
1	2.341	PB2	80	Anteil des Polymerasekomplex, 5'-Cap-Bindung
2	2.341	PB1	90	Anteil des Polymerasekomplex, RNA-abhängige RNA-Polymerase
		PB1-F2	10	Virulenzfaktor, induziert Apoptose
3	2.233	PA	83	Anteil des Polymerasekomplex, Serinprotease
4	1.778	HA	77	Adsorption an Zellmembran und Membranfusion
5	1.564	NP	55	RNA-Bindung und vRNA-Transport in Zellkern
6	1.413	NA	56	Freisetzung durch Abspaltung Neuraminsäurereste
7	1.027	M1	28	Zusammensetzung
		M2	15	Protein des Ionenkanal, Entlassung der RNPs
8	890	NS1	26	Hemmfaktor des RNA-Splicing, interagiert mit Komponenten des Immunsystems
		NEP	11	Protein des Kernexports der vRNA

*Die Längenangaben basieren auf dem H1N1-Virus des Stammes A/PR/8/34 (nach Modrow, Falke, Truyen, Schätzl (2010): *Molekulare Virologie*. 3. Aufl., Spektrum Verlag, Heidelberg).

2.1.1.2 Replikationszyklus

In Säugetieren lösen IAV respiratorische Erkrankungen aus und sind aerosolisch übertragbar. Im Respirationstrakt erkennt das Oberflächenprotein HA Sialinsäuren, welche entweder durch eine α 2,3- oder α 2,6-Verbindung an die Galaktose gekoppelt sind. Menschen verfügen im Respirationstrakt vornehmlich über eine α 2,6-N-Acetylsialinsäureverbindung, die von humanen Influenzaviren erkannt werden, während aviäre Viren eine α 2,3-N-Acetylsialinsäureverbindung als Rezeptor benötigen. Das Schwein spielt als Träger beider Rezeptoren eine kritische Rolle, sodass sowohl humane als auch aviäre IAV den Respirationstrakt infizieren können. Bindet das Virus an seinen Rezeptor, erfolgt die Aufnahme des Virus endozytotisch und das Virus gelangt in Endosome. Der pH-Wert im Endosom sinkt, wodurch eine Konformationsänderung des HA herbeigeführt wird, durch welche die Virus-hülle und die Endosomenmembran fusionieren. Zudem dringen über den M2-Ionenkanal Protonen in das Innere, wodurch der RNP seine Bindung an die Matrixproteine verliert und ins Zytoplasma freigelassen wird. Mittels der Kernlokalisationssequenzen der NP-Proteine werden die RNPs weiter in den Zellkern transportiert. Hier erfolgt die Transkription in mRNA und später in cRNA (Abbildung 2.II). Letztere dient als Matrix für nachfolgende neue vRNAs.

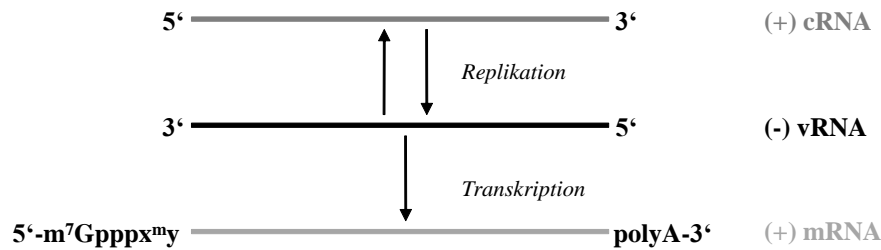


Abbildung 2.II Der Replikationszyklus der Influenzaviren erfordert unterschiedliche RNA-Typen. Die mRNA verfügt am 5'-Ende über eine zelluläre Cap-Struktur und am 3'-Ende über eine polyA-Sequenz [Abbildung nach (Lamb and Choppin, 1983)].

Die mRNAs werden durch zelluläre Proteine in das Zytoplasma transportiert, wo die Translation der jeweiligen Proteine erfolgt. M2, HA und NA werden nachfolgend an die Zellmembran transportiert und alle anderen viralen Proteine wandern zurück in den Zellkern, wo sie sich an neu gebildete vRNAs binden und somit neue RNPs entstehen. Bei dem Export der RNPs und der Anlagerung an die Zellmembran spielt das M1 eine entscheidende Rolle. Die Abschnürung der neuen Viren wird möglicherweise durch die M1-Anreicherung gesteuert. Neue Viren können jedoch erst dann freigesetzt werden, wenn NA sowohl auf zellulärer als auch auf viraler Membranseite endständige Sialinsäuren entfernen. Ist dies nicht der Fall, kann das neugebildete Virus nicht freigesetzt werden. Abbildung 2.III gibt eine grafische Übersicht über die virale Replikation.

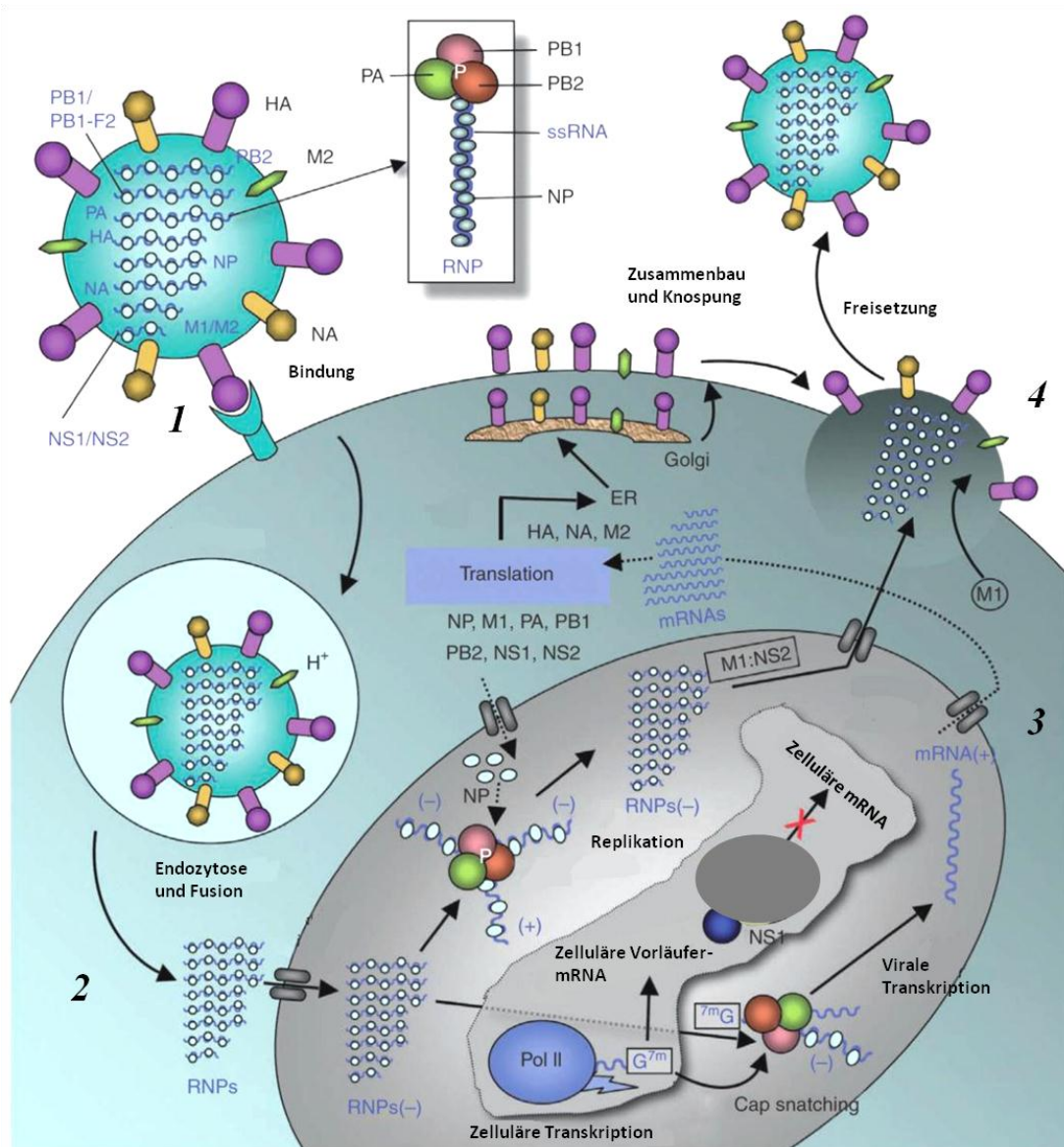


Abbildung 2.III Der Replikationszyklus der IAV. Das Virus hat eine von der Wirtszelle abstammende Doppelmembran, in die virale Proteine (HA, NA und M2) eingelagert sind. HA erkennt Sialinsäuren, bindet an diese und leitet die endozytotische Aufnahme ein (1). Durch den geringen pH-Wert innerhalb des Vesikels kommt es zu einer Konformationsänderung des M2-Proteins, wodurch sich der Ionenkanal öffnet und H^+ in das Virus diffundiert. Dies hat zur Folge, dass die vRNP vom M1 abgelöst werden und das Zytoplasma erreichen (2). Im Zytoplasma werden die vRNP in den Zellkern transportiert und die mRNA-Synthese gestartet. Hierbei erkennt die virale Polymerase Cap-Strukturen der zellulären mRNAs und schneidet diese mittels der Endonukleaseaktivität ab, um sie wiederum der viralen mRNAs anzufügen (*Cap-Snatching*). Fertige mRNA wird ins Zytoplasma transportiert und virale Proteine werden synthetisiert (3). Während HA, NA und M2 weiter prozessiert werden und zur Zytoplasmamembran gelangen, werden alle anderen viralen Proteine (PB1-F2 stellt eine Ausnahme dar) in den Zellkern eingeschleust. Da parallel genomische vRNAs produziert wurden, werden neue RNP(-) gebildet. Das NS1 verhindert im Zellkern die zelluläre mRNA-Synthese, indem es die 3'-Endprozessierung inhibiert, eine Prozessierung, die die virale mRNA nicht benötigt. Die neu gebildeten vRNPs werden aus dem Zellkern durch die M1-NS2-Bindung ausgeschleust und lagern sich an der Innenseite der Zytoplasmamembran an, wobei das M1-Protein sowohl die vRNPs als auch die Membran bindet. Die Freisetzung neuer Viruspartikel wird durch das NA initiiert (4) [Abbildung übernommen und modifiziert nach (Das et al., 2010)].

2.1.1.3 Die Klassifizierung der Influenza-A-Viren

Vögel stellen das eigentliche Reservoir der IAV dar und in diesen gibt es alle bekannten Subtypen des Virus. Die Einteilung der Subtypen basiert auf den unterschiedlichen Varianten des HA. Seit 2005 sind im Vogel und Geflügel 16 unterschiedliche HA-Varianten bekannt, die sich unter anderem in ihrer Aminosäuresequenz und ihrer Spaltbarkeit durch Proteasen unterscheiden (Fouchier et al., 2005). Im Menschen kommen die HA-Subtypen 1, 2 und 3 vor. Innerhalb der einzelnen HA-Subtypen kann noch zwischen unterschiedlichen Serotypen unterschieden werden. So beinhaltet das H1 der humanen Influenzaviren 1.802 bekannte Serotypen (Gatherer, 2009). Neben dem HA kann auch NA in unterschiedliche Varianten gegliedert werden, sodass ein Influenza-A-Virus die Subtypbezeichnung HxNy enthält, wobei x die Variante 1-16 und y 1-9 erhalten kann.

2.1.1.3.1 Das Hämagglutinin als Klassifizierungsmarker und Ursache der Gewebespezifität

Der Subtyp des HA gibt neben der Aminosäuresequenz auch die Spaltbarkeit durch Proteasen wieder. Das Proteinprodukt HA des viralen vierten Segments ist *per se* noch nicht aktiv und besitzt in seiner kompletten, nicht-gespaltenen Länge keine Fusionsfähigkeit mit der Zellmembran. Dieses Vorläuferprotein HA₀ muss zuvor durch Proteasen in HA₁ und HA₂ gespalten werden. Alle Subtypen mit Ausnahme der H5-, H7- und H9-Subtypen besitzen eine monobasische Spaltstelle. Dies bedeutet, dass das HA₀ nur durch Trypsin-ähnliche Proteasen wie etwa Plasmin oder die Protease Clara im Lungenkapillarnetz gespalten werden können. Es wird generell angenommen, dass die Spaltung erst außerhalb der Zelle stattfinden kann und dass daher bei Freisetzung des neuen Viruspartikels dieses noch nicht infektiös ist (Steinhauer, 1999). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass auch das NA des pandemischen Virus von 1918 die Spaltung unterstützt, indem es Plasmin bindet und so die Spaltungsfrequenz des HA erhöht (Goto and Kawaoka, 1998). H5, H7 und H9 besitzen polybasische Schnittstellen, welche die Aminosäuresequenz R-X-K/R-R aufweisen (Zhironov et al., 2002). Dieses Motiv wird durch intrazelluläre Proteasen wie der Furin-Protease des Golgi-Vesikels erkannt. Dies bedeutet, dass das HA₀ schon während der intrazellulären Prozessierung gespalten wird und frei werdende Viruspartikel infektiös sind.

2.1.1.3.2 Influenza

Die Influenza ist beim Menschen eine Erkrankung des Respirationstrakts, die Infektion erfolgt aerosolisch und ist in aller Regel selbst-limitierend. Die Erkrankung tritt nach einer kurzen Inkubationszeit plötzlich auf und zeichnet sich durch hohes Fieber, Müdigkeit, Kopf- und Gliederschmerzen aus. In manchen Fällen kann es zu schwerwiegenden Komplikationen wie einer bakteriellen Sekundärinfektion oder aber auch einer Influenzavirusbedingten Lungenentzündung kommen. Jährlich treten Epidemien auf und fordern weltweit über 300.000 Menschenleben, wobei meist ältere Menschen betroffen sind (Maines et al., 2008; Poland et al., 2001). Jährliche Influenzaepidemien beruhen auf dem *antigen drift* der Oberflächenproteine HA und NA, wobei sich die viralen Proteine, insbesondere das HA, in ihrer Aminosäuresequenz leicht verändern.

Im letzten Jahrhundert traten mehrfache Influenzapandemien auf. Das Auftreten dieser pandemischen Viren basiert nicht auf einem *antigen drift*, sondern war durch das Einführen komplett neuer Gensegmente in die Viren gekennzeichnet. Durch eine Mischinfektion zweier unterschiedlicher Subtypen in einer Zelle können neue Virussubtypen entstehen, die die unterschiedlichen viralen Gensegmente zu neuen Tochterviren reassortieren. Man spricht hier von einem *antigen shift*. Das Auftreten der sogenannten Schweinegrippe beim Menschen im Jahr 2009 stellt einen solchen Fall der Reassortierung von Virusgenen mit neuen Eigenschaften dar (Abbildung 2.IV). Da das größte antigene Reservoir im Vogel zu finden ist, ist diese Spezies meist der Donor neuer viraler Gensegmente, die zu neuen Reassortanten führen. Ein solches Beispiel stellt die Spanische Grippe (1918-1920) dar, an der bis zu 40 Millionen Menschen starben (Gatherer, 2009). Dieses H1N1-Virus stammte möglicherweise komplett aus dem Geflügel. Durch einen späteren Austausch von drei Segmenten dieses Virus mit einem aviären H2N2-Virus ergab sich 1957 das Virus, welches die Asiatische Grippe auslöste. Die Hongkong-Grippe war 1968 schließlich die dritte Influenzaviruspandemie des 20. Jahrhunderts. Aber auch in den Jahrhunderten davor, traten im Menschen vermutlich mehrfach Influenzaviruspandemien auf (Taubenberger et al., 2001; Hampson and Mackenzie, 2006).

2.1.1.3.2.1 Das pandemische Schweine-Influenzavirus H1N1v

Im Jahre 2009 trat ein weiteres pandemisches IAV auf. Bereits 1995 wurde diskutiert, ob ein Schweineinfluenzavirus die Ursache für eine nächste Pandemie im Menschen sein könnte (Ludwig et al., 1995). Untersuchungen ergaben, dass es sich bei diesem neuen Virus um eine komplexe Reassortante handelte, dessen Segmente von einem aviären H1N1, von H1N1-Schweineviren und einem humanem H3N2-Virus abstammten (Garten et al., 2009; Smith et al., 2009). Da dieser Subtyp dementsprechend nicht über humane HA und NA verfügt, wurde es innerhalb dieser Arbeit als H1N1-Variante bezeichnet (H1N1v; Abbildung 2.IV).

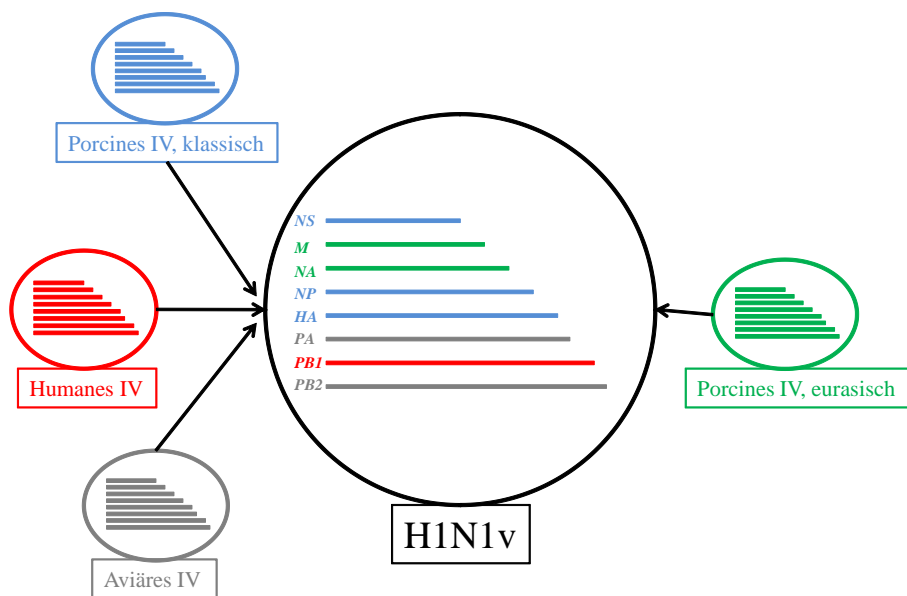


Abbildung 2.IV Genetische Zusammensetzung des H1N1v von 2009. In einem ersten Schritt bildete sich eine Dreifach-Reassortante aus einem klassischen Schweineinfluenzavirus (H1N1), einem nordamerikanischen Vogelinfluenzavirus (H1N1) und einem humanen Influenzavirus (H3N2). Diese Dreifach-Reassortante tauschte anschließend mit einem eurasischem Influenzavirus (H1N1) zwei weitere Gensegmente aus und bildete das heute zirkulierende H1N1v Schweinegrippe-Virus [nach (Schnitzler and Schnitzler, 2009)].

Die weltweite Verbreitung des H1N1v verlief schnell. Retrospektiv traten die ersten Fälle humaner H1N1v-Infektionen 2009 in Mexiko auf, wobei der erste Nachweis im April 2009 in Kalifornien gelang (Peiris et al., 2009). Bereits Ende April 2009 erhöhte die Weltgesundheitsorganisation WHO die Sicherheitsstufe auf Phase 5, was eine nachgewiesene Mensch-zu-Mensch-Übertragung in mindestens zwei Ländern der WHO voraussetzte. Bis Mai 2009 waren 41 Länder weltweit von der nun pandemischen Neuen Grippe betroffen und es wurden 85 Todesfälle dokumentiert. Bis zum September stiegen diese Zahlen an und 160 Länder berichteten von H1N1v-Infektionen mit über 3.000 Todesfällen (Neumann

et al., 2009; Schnitzler and Schnitzler, 2009). Der meist milde Krankheitsverlauf hatte seine Ursache unter anderem darin, dass an den Aminosäure-Positionen bekannter Pathogenitätsfaktoren solche Aminosäuren nachgewiesen wurden, die für Viren mit einer niedrigen Pathogenität stehen. So hat H1N1v beispielsweise an der Position 627 der PB2 ein Glutamin (Neumann et al., 2009). Viren mit einer hohen Pathogenität wie das aviäre H5N1 können hier ein Lysin enthalten (Hatta et al., 2001). Zudem besitzt H1N1v kein PB1-F2-Protein (Schnitzler and Schnitzler, 2009).

2.1.1.3.3 Die hochpathogene aviäre Vogelgrippe H5N1

Das H5N1-Virus ist ein epidemisches Virus der Vögel. Es ist hochpathogen und besitzt Pathogenitätsfaktoren wie eine polybasische Schnittstelle im HA, das PB1-F2-Protein aber auch ein Glutamin an der Position 627 des PB2 (McAuley et al., 2010; Neumann et al., 2010). Seit Ende der 90er des letzten Jahrtausends sind auch humane Infektionsfälle mit dem hochpathogenen aviären Influenzavirus des Subtyp H5N1 bekannt. Die ersten Fälle wurden in Hongkong dokumentiert (Chan, 2002). Durch diese Infektionen wurde klar, dass auch Menschen im Respirationstrakt über α 2,3-*N*-Acetylsialinsäure verfügen, wobei eine Mensch-zu-Mensch-Übertragung bis heute ausblieb. Dies liegt unter anderem daran, dass die Replikation des Virus im unteren Bereich des respiratorischen Trakts des Menschen lokalisiert ist und Viruspartikel meist schon im oberen Bereich abgefangen werden können. Jedoch wurde eine virale Mutation, die einen Aminosäureaustausch beinhaltet und eine Bindung von H5 an α 2,6-*N*-Acetylsialinsäuren fördert, bereits nachgewiesen (Gambaryan et al., 2006). Während das Geflügel hochgradig mit H5N1 belastet ist, sind humane Infektionen mit H5N1 selten. Die Lethalitätsrate von fast 60% ist jedoch besorgniserregend (Van Kerkhove et al., 2011). Interessanterweise ist das Durchschnittsalter der H5N1-Patienten niedrig und es sind keine Risikofaktoren außer dem engen Kontakt mit infiziertem Geflügel bekannt (Tran et al., 2004; Kandun et al., 2006; Van Kerkhove et al., 2011). Dies legt die Überlegung nahe, dass das menschliche Alter ein Risikofaktor ist. Junge Menschen haben ein hochaktives Immunsystem. In diesem Bezug verursacht die H5N1-Infektion, aber auch die Infektion mit dem H1N1v eine Lymphopenie, also eine Reduktion der Lymphozyten (Bautista et al., 2010). Eine hohe Ausschüttung von Zytokinen ist zusätzlich zu finden (Maines et al., 2008).

2.2 Das Bornavirus

Das Bornavirus (BDV, *Borna Disease Virus*) ist ein behülltes Virus mit einem nicht-segmentiertem RNA-Genom in Negativstrangorientierung. Es infiziert unterschiedliche Warmblütler, darunter Pferde und Schafe, aber auch im menschlichen Genom wurden Teile des viralen Genoms gefunden (Feschotte, 2010). Das Virus ist neurotrop und es treten Schädigungen im Gehirn auf, die immunpathologische Ursachen haben. Daher ist die intrazerebrale Infektion von Ratten mit BDV ein gutes Modell, um solch immunpathologischen Mechanismen genauer zu untersuchen. Werden Ratten infiziert, sind Störungen des Bewegungsapparats und Lähmungen die Folge (Bilzer and Stitz, 1993). Das Virus infiziert unter anderem Neuronen und Astrozyten. Jedoch weist das Virus keine direkten zytolytischen Effekte auf, und immuninkompetente Ratten entwickeln eine persistente Infektion ohne klinische Symptome (Pletnikov et al., 2001). Immunkompetente Ratten weisen jedoch eine Einwanderung von Makrophagen, T- und B-Zellen in das Gehirn auf, die zu schweren Entzündungen und Gehirnschädigungen führen (Richt et al., 1994). CD8⁺ T-Zellen sind für diese Immunpathologie von entscheidender Bedeutung (Planz et al., 1993). Sie infiltrieren das Gehirn und erreichen innerhalb von 21 Tagen ein Maximum (Batra et al., 2003). Anschließend geht die T-Zellzahl im Gehirn wieder zurück und nach fünf Wochen können keine Entzündungszellen mehr nachgewiesen werden, obwohl das Virus persistiert (Planz et al., 1993). Patho-morphologisch auffällig ist eine bis zu 40%ige Reduktion der Gehirnrinde als Folge der entzündlich-degenerativen Reaktion (Stitz et al., 1993).

2.3 Das Immunsystem

Das Immunsystem kann in zwei große Komponenten unterteilt werden: die angeborene und adaptive Immunantwort. Das angeborene Immunsystem erkennt hochkonservierte häufig vorkommende Strukturen, sogenannte pathogenassoziierte molekulare Muster. Im Falle einer Infektion ist das angeborene Immunsystem sofort verfügbar und muss nicht zuerst aktiviert oder selektiv stimuliert werden. Es handelt sich hierbei um Zellen wie Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, Natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen) und Dendritische Zellen (DCs). Zwar werden Natürliche Killer-T-Zellen (NKT-Zellen) im Thymus gebildet, jedoch wird ihr T-Zellrezeptor nicht negativ selektioniert und erkennt kein Haupthistokompatibilitätsantigenkomplex (MHC), sondern als Rezeptor das CD1d-Molekül. Das angeborene Immunsystem verfügt zudem über lösliche Faktoren wie Komponenten des Komplementsystems und Zytokine wie IFN des Typ I (IFN- α - β), welches durch infizierte Zellen sezerniert wird. Handelte es sich um eine intrazelluläre Infektion werden Peptide über MHC-I präsentiert. Wurde das Pathogen extrazellulär durch Phagozytose aufgenommen, werden Peptide in der Regel über MHC-II präsentiert. Beide Wege der Peptidpräsentation werden durch T-Zellen erkannt. Einmal aktiviert, ist neben der Limitierung der Pathogene auch die Aktivierung der adaptiven Immunantwort das Ziel, die schließlich zu einer Eliminierung des Pathogens führen soll. Bei diesem gesamten Prozess der Antigenpräsentation bis Pathogeneliminierung spielen DCs eine entscheidende Rolle.

Die DC-Vorläuferzelle wandert aus dem Knochenmark in das Blut und anschließend in das Gewebe aus. Hier liegt dann eine unreife, mit Ausläufern versehene DC vor. Durch die Aufnahme und Prozessierung von Antigenen werden DCs aktiviert, dies geschieht auch bei Gewebeschädigungen. Die reife DC wandert als antigenpräsentierende Zelle (APC) in einen nahe gelegenen Lymphknoten. Die Wanderung wird unter anderem durch die Erhöhung spezifischer Adhäsionsmoleküle und Homing-Rezeptoren wie CD54 (ICAM-1) gewährleistet. Durch die Erhöhung der MHC-Expression sowie kostimulativen Molekülen wie CD80 können DCs effektiv Zellen des adaptiven Immunsystems aktivieren. Dort können verhältnismäßig wenige DCs eine starke T-Zellexpansion und eine damit verbundene potente Immunantwort auslösen (Banchereau and Steinman, 1998).

DCs sind auch in der Lage, Antigene in der Peripherie aufzunehmen, in den Thymus zu wandern und dort diese aufgenommenen Antigene für die T-Zellselektion zu präsentieren und spielen so auch eine wichtige Rolle für die Induktion von Toleranz und die Generierung regulatorischer T-Zellen (Bonasio et al., 2006; Proietto et al., 2009).

2.3.1 Die adaptive Immunantwort

Das adaptive Immunsystem kann in zwei Wirkmechanismen unterteilt werden: eine von B-Zellen und eine von T-Zellen getragen. B-Zellen haben ihren Ursprung im Knochenmark, wo sie einen funktionellen B-Zellrezeptor entwickeln, der im späteren Verlauf ein spezifisches Antigen in der Peripherie erkennen soll. Bindet ein Antigen, wird dieses aufgenommen und prozessiert, sodass B-Zellen auch als APC fungieren können. Nach der Bindung eines spezifischen Antigens entwickelt sich die B-Zelle zur Plasmazelle und produziert Antikörper. An Antigen-gebundene Antikörper können die Opsonierung mittels Phagozytose oder auch die Komplementaktivierung hervorrufen. Sofern Antigene von infektiösen Partikeln wie Viren stammen, können Antikörper gebildet werden, welche die Infektion neutralisieren, indem sie die Bindung des Virus an den Rezeptor auf den Zielzellen verhindern.

2.3.1.1 T-Zellen

T-Zellen können unterteilt werden in $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen. Sowohl das $CD4^-$ als auch $CD8^-$ Molekül sind Korezeptoren des eigentlichen T-Zellrezeptors. Während der $CD4^-$ Rezeptor die Erkennung auf einem MHC-II-präsentierten Peptid unterstützt, spielt der $CD8^-$ Rezeptor für die MHC-I-Antigenerkennung eine tragende Rolle. $CD4^+$ T-Zellen können in mehrere Gruppen unterteilt werden, wobei die Entwicklung von der naiven T-Zelle zur spezifischen Effektor-T-Zelle auch vom Zytokinmilieu abhängt (Abbildung 2.V).

T-Helferzellen des Typ I (T_H1) unterstützen in erster Linie die zytotoxische T-Zellantwort, während T_H2 -Zellen die humorale Immunantwort unterstützen. $CD8^+$ T-Zellen erkennen Antigene auf infizierte Zellen und spielen somit bei viralen Infektionen eine bedeutende Rolle, da sie infizierte Zellen eliminieren können.

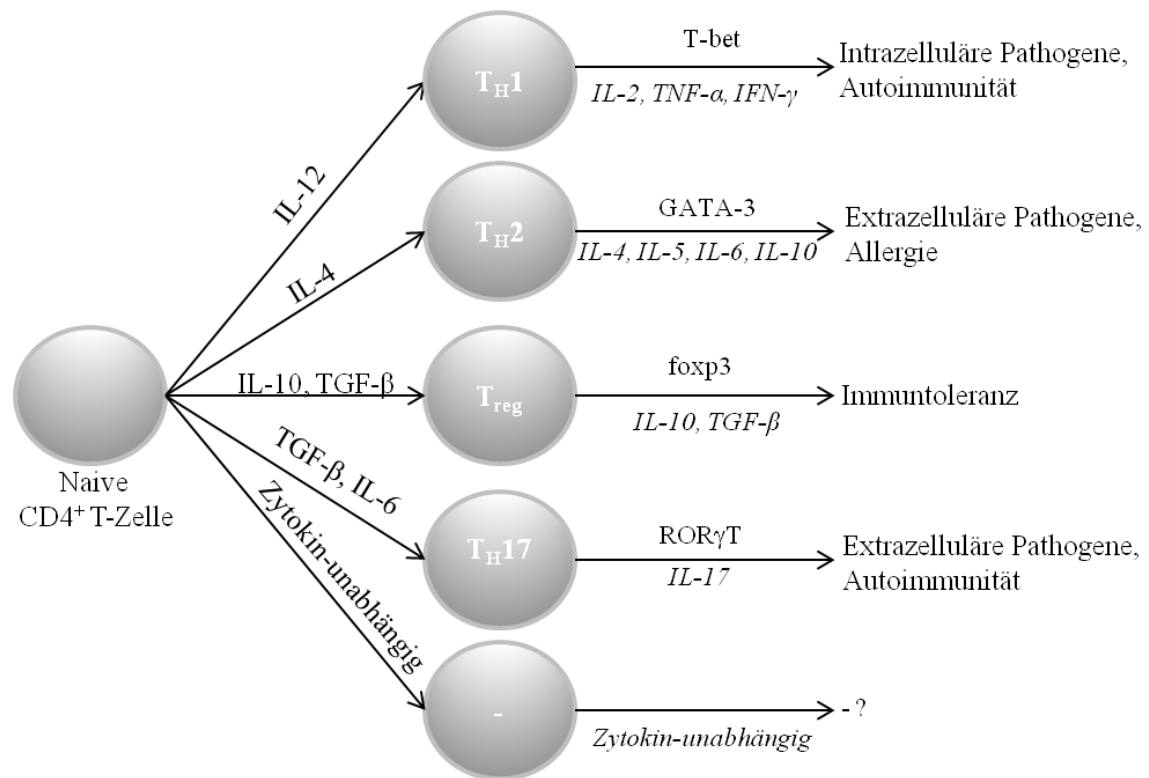


Abbildung 2.V Unterschiedliche Gruppen an CD4⁺ T-Zellen nach Aktivierung. Aus einer naiven CD4⁺ T-Zelle können sich abhängig vom Zytokinmilieu unterschiedliche Phänotypen bilden. Deren Funktion ist abhängig von dem aktivierten Transkriptionsfaktor (wie T-bet), der wiederum mit einer unterschiedlichen Zytokinausschüttung (wie IL-2, TNF- α , IFN- γ) verbunden ist. Die Zytokin-unabhängige „- T-Zelle“ steht für eine Zelle in Anergie [modifiziert nach (Harber et al., 2000)].

2.3.1.2 Regulatorische T-Zellen

Erst 1995 konnten T-Lymphozyten nachgewiesen werden, die autoreaktive Zellen inhibieren (Sakaguchi et al., 1995). Diese regulatorischen T-Zellen (Tregs) wurden im Weiteren intensiv untersucht, jedoch konnte ein eindeutiger Marker erst später identifiziert werden. Der Transkriptionsfaktor foxp3 konnte 2003 als Kontrollelement zur Entwicklung zur Treg hin identifiziert werden (Hori et al., 2003). Dieser Zelltyp macht in etwa zwei bis zehn Prozent der CD4⁺ T-Zellen aus (Cabarocas et al., 2006). Tregs inhibieren aktivierte T-Effektorzellen, um eine Toleranz gegenüber Eigen- aber auch Fremdpeptiden zu erhalten. Prinzipiell sind T-Zellen aufgrund der Selektion im Thymus (siehe 2.3.1.3) nicht gegen Eigenpeptide gerichtet. Jedoch kommt es vor, dass der Selektionsprozess fehlerhaft war, und eine T-Zelle in der Peripherie durch ein Eigenpeptid aktiviert wird, wodurch eine Autoimmunerkrankung entstehen kann. Tregs können dies verhindern. Genetische Erkrankungen, in denen foxp3 nicht funktionell ist, sind sowohl in der Maus als auch im Menschen bekannt. *Scurfy*-Mäuse besitzen keine Tregs und weisen Entzündungen in vielen

Organen auf (Sharma and Ju, 2010). Im Menschen steht das IPEX-Syndrom (*Immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome*) mit einem Defekt am FOXP3 Genlokus für eine Erkrankung mit massiven Autoimmunerscheinungen und Nahrungsmittelintoleranzen. Patienten sterben meist innerhalb der ersten zwei Lebensjahre (van der Vliet and Nieuwenhuis, 2007).

Es gibt verschiedene T-Zellen, die regulierenden Charakter haben, am besten ist jedoch die $CD4^+CD25^+foxp3^+$ Treg beschrieben. CD25 selbst, das auf Tregs stärker vorhanden ist als auf Effektor-T-Zellen, ist der Rezeptor, der IL-2 bindet. IL-2 ist das Proliferationssignal für T-Zellen, das von Tregs nicht produziert werden kann. Sie sind daher von einer exogenen IL-2-Quelle hochgradig abhängig (Li et al., 2008a). Für die Funktion der Tregs ist weiterhin der CTLA-4-Rezeptor wichtig (*Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*). Dieser Rezeptor erkennt CD80 und CD86 auf APCs. Die Bindung kann die Aktivierung des Enzyms Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) zur Folge haben, welches Tryptophan metabolisiert, was zu einem Verlust der Effektor-T-Zelle führt. In Krebspatienten ist IDO oft chronisch aktiviert (Munn and Mellor, 2007). Des Weiteren kann in der APC der Transkriptionsfaktor foxo aktiviert werden, der unter anderem die Expression proinflammatorischer Zytokine verhindert (Wing and Sakaguchi, 2010). Ein anderer Rezeptor, den Tregs aber auch Gedächtniszellen aufweisen, ist GITR (*glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor*). Dieser Rezeptor gehört zu den Tumornekrosefaktor-Rezeptoren, allerdings besitzt er intrazellulär keine „Todesdomäne“ und kann daher ein apoptotisches Signal nicht weiterleiten. Möglicherweise ist dieser Rezeptor für die Treg-Entwicklung im Thymus verantwortlich (Yi et al., 2006). Auch TLR sind auf Tregs zu finden, die eine Auswirkung auf die Treg-Expansion haben (Liu and Zhao, 2007). Die Aktivierung des TLR4 oder TLR9 hat eine negative Wirkung auf Tregs, welche auch durch IL-6-Gabe erreicht werden kann (O'Garra and Vieira, 2004). Die Erkennung durch TLR7 hingegen hat die Expansion von Tregs über DC in Mäusen und Ratten zur Folge (Kubota et al., 2010; Ouabed et al., 2008).

Tregs inhibieren Effektor-T-Zellen auf unterschiedliche Weisen (Abbildung 2.VI). DCs können sowohl Treg als auch Effektor-T-Zelle binden. Durch die Bindung mittels CTLA-4 kann die Treg inhibierende Faktoren in der DC wie TGF- β -Ausschüttung aktivieren. Aber auch der Tryptophanabbau hat apoptotische Konsequenzen für die Effektor-T-Zelle. Zudem kann die Treg supprimierende Faktoren wie IL-10 oder TGF- β ausschütten. Hierfür benötigt die Treg keinen direkten Zellkontakt, die Inhibierung erfolgt dementsprechend auf die Effektor-T-Zellen Antigen-unspezifisch. Ein anderer Weg, aktive T-Zellen zu inhibie-

ren, ist die Konkurrenz der Tregs mit den Effektor-T-Zellen um den Wachstumsfaktor IL-2 (Sojka et al., 2008; Wing et al., 2008; Scheffold et al., 2007).

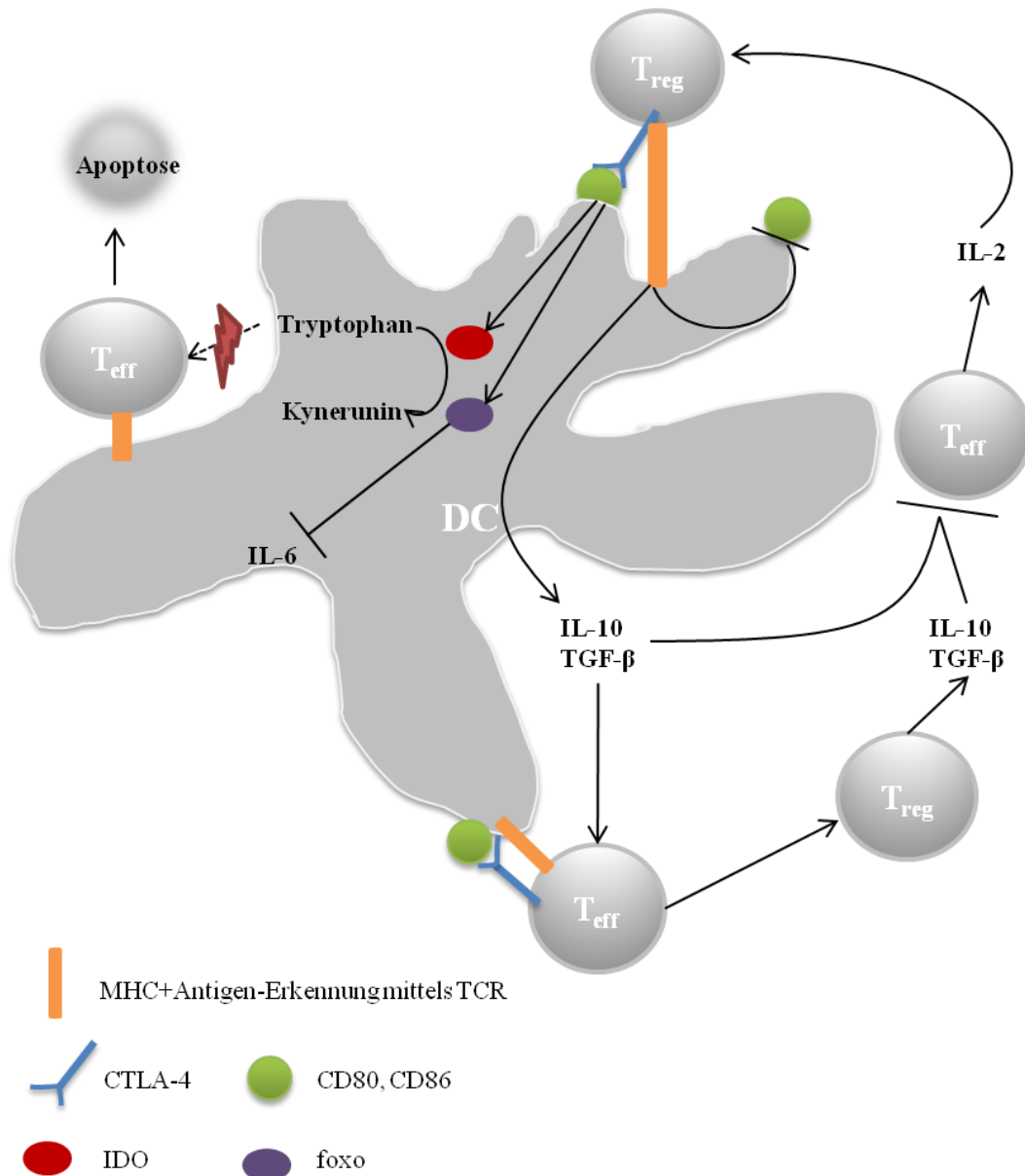


Abbildung 2.VI Schematische Darstellung der Funktionsweise von Tregs [nach (Wing and Sakaguchi, 2010)].

Aufgrund ihres hohen therapeutischen Potenzials sind Tregs im Fokus der modernen Forschung. Es gibt Ansatzpunkte, das Verhältnis Treg zu Effektor-T-Zelle zu manipulieren. Eine gezielte Expansion der Tregs kann bei Autoimmunerkrankungen oder auch Allergien nützlich sein. Solch eine Expansion kann beispielsweise durch Rapamycin-Gabe eingeleitet werden (Wing and Sakaguchi, 2010). Rapamycin ist ein Produkt des Bakteriums *Streptomyces hygroscopicus* und wird in der Medizin gegen eine Transplantat-Abstoßung einge-

setzt. Auch hier spielt die Expansion der Tregs eine wichtige Rolle (Muller et al., 2010). In den unterschiedlichsten Tumoren bei Mäusen und Menschen konnte bereits ein überdurchschnittliches Auftreten von Tregs nachgewiesen werden und auch die gezielte Therapie gegen das Treg-Vorkommen zeigt Wirkung (Colombo and Piconese, 2007).

2.3.1.2.1 Die natürlich vorkommende Regulatorische T-Zelle

Natürlich vorkommende Tregs (nTreg) werden im Thymus gebildet. Durch Epithelzellen oder DCs werden in der Medulla des Thymus Selbstpeptide präsentiert. Erkennt ein Thymozyt dieses Selbstpeptid, kann er sich hier zur nTreg entwickeln (Sakaguchi, 2005). Die Mechanismen, unter welchen Bedingungen ein Thymozyt aufgrund der Peptiderkennung in Apoptose geht oder sich zur nTreg entwickelt, konnte bis heute noch nicht vollständig geklärt werden. Eine Möglichkeit ist, dass eine erhöhte Affinität des TCR zum MHC-präsentierten Antigen die Differenzierung zur Treg zur Folge hat (Josefowicz and Rudensky, 2009). Die Maus besitzt eine 90 prozentige T-Zellrezeptorüberschneidung zwischen Treg und naiver T-Zelle, was darauf schließend lässt, dass der Großteil der Tregs seinen Ursprung im Thymus hat (Hsieh et al., 2006). Da nTregs auf Eigenpeptide reagieren, haben sie in der Peripherie die Hauptaufgabe, die Reaktion von Effektor-T-Zellen gegen Autoreaktivität zu inhibieren.

2.3.1.2.2 Die induzierte Regulatorische T-Zelle

Induzierte Tregs (iTregs) werden, anders als nTregs, in der Peripherie gebildet und stammen direkt von naiven $CD4^+$ T-Zellen ab (Piccirillo, 2008). Die Entwicklung zur iTreg ist abhängig von dem die Tregs umgebenden Milieu (Abbildung 2.V). Durch eine erhöhte Konzentration der Zytokine IL-10 oder TGF- β , also unter subimmunogen Antigenpräsentationen, kann bei der Erkennung des Antigens die Differenzierung zur iTreg stattfinden. Die Entwicklung zur iTreg spielt eine wichtige Rolle im Darm, aber auch während chronischen Entzündungen (Curotto de Lafaille and Lafaille, 2009). Diese iTreg ist anschließend aktiv und inhibiert die Umgebung meist unspezifisch, indem sie zellkontaktunabhängig ihrerseits inhibierende Zytokine ausschüttet.

2.3.1.3 Der Thymus als Produktionsort von T-Zellen

Verschiedene T-Zelltypen werden im Thymus gebildet: $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen, Tregs, NKT-Zellen, und intraepithale Lymphozyten-Vorläuferzellen, die gereift im Magen-Darm-Bereich vorliegen. NKT-Zellen besitzen keinen Antigen-spezifischen T-Zellrezeptor, sondern erkennen beispielsweise über den NK-Zell-spezifischen NKG2D-Rezeptor infizierte Zellen und können diese lysieren. Während reife NKT-Zellen, die aufgrund ihrer heterogenen Ausschüttung von Zytokinen auch regulatorische Funktionen besitzen, über ein Jahr im Thymus verbleiben können, dauert die Selektion der naiven T-Zelle bis zur Auswanderung nur vier Tage (Weinreich and Hogquist, 2008). Der Thymus selbst kann in eine Rinde (Cortex) und eine Markregion (Medulla) unterteilt werden. Thymozyten wandern aus dem Knochenmark in den Thymus ein. Im Cortex beginnt die positive Selektion auf die Erkennung des MHC-Rezeptors. Abhängig davon, ob die Erkennung mit Hilfe von $CD4$ oder $CD8$ stattgefunden hat, entwickelt sich der Thymozyt zu einer Zelle, die nur noch für eines der beiden Moleküle positiv ist. Diese $CD4^+$ - oder $CD8^+$ -Zelle wandert in die Medulla des Thymus, wo Selbstpeptide präsentiert werden und die negative Selektion stattfindet (Blackburn and Manley, 2004). Zellen mit einem funktionellen TCR, die ein Selbstpeptid erkennen, werden eliminiert. Wohl abhängig von der Bindungseffizienz des T-Zellrezeptors kann sich der Thymozyt auch in eine Treg entwickeln (Josefowicz and Rudensky, 2009).

Für die T-Zellreifung und T-Zellwanderung werden unterschiedliche Signalstoffe wie Chemokine und Zelladhäsionsmoleküle benötigt. Das Chemokin CXCL12 ist für eine funktionelle Wanderung der Thymozyten essenziell, wird sowohl von corticalen als auch medullären Epithelzellen produziert und wird durch den CXCR4-Rezeptor erkannt (Savino et al., 2002). Ein weiteres Chemokin, CCL25, wird durch Epithelzellen des Thymus exprimiert und mittels des Rezeptors CCR9 auf doppelt-positiven Thymozyten erkannt. Auch dieser Signalweg ist für die Wanderung und der damit verbundenen Aktivierung der Thymozyten wichtig (Parmo-Cabanas et al., 2007). Das Zelladhäsionsmoleküle ICAM-1 wird von Epithelzellen des Thymus zur T-Zelldifferenzierung exprimiert, während VCAM-1 im murinen Thymus von corticalen APC exprimiert wird. Beide unterstützen *in vitro* die positive Selektion der Thymozyten (Singer, 1990; Paessens et al., 2008).

Der Thymus ist das ganze Leben funktionell, jedoch verliert er im Laufe des Lebens massiv an Größe und damit auch an Aktivität. Die Phase mit seiner höchsten Aktivität ist im Menschen während dessen Kindheit, ein starker Aktivitätsabfall kann ab dem Alter von 39 Jahren beobachtet werden (Geenen et al., 2003; Hale et al., 2006). Pro Tag kann die Pro-

duktionsrate an naiven T-Zellen im Menschen bis zu $1,8 \times 10^{10}$ betragen (Hollander and Peterson, 2009). Zellen, die für die Selektionsprozesse wichtig sind, sind neben den Epithelzellen des Thymus Makrophagen und Dendritische Zellen. In der Regel stammen auch diese antigenpräsentierenden Zellen direkt von Vorläuferzellen aus dem Knochenmark ab. Jedoch gibt es auch Wanderungen Dendritischer Zellen aus der Peripherie in den Thymus (Li et al., 2009).

3 Zielsetzung

Im Verlauf von Influenza-A-Virusinfektionen können H5N1-Infektionen in Mäusen starke Lungenschädigungen auslösen und gleichzeitig ist eine deutliche Reduktion der Lymphozyten einhergehend mit einer verminderten Aktivität der Influenzavirus-spezifischen zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen zu beobachten (Maines et al., 2008; Harari et al., 2009). Auch die H1N1v-Pathogenese ist mit einer Lymphopenie verbunden (Kuo et al., 2010; Chen et al., 2011). Da Dendritische Zellen (DCs) entscheidend an der Induktion einer spezifischen antiviralen T-Zellantwort beteiligt sind und andererseits regulatorische T-Zellen (Tregs) Virus-spezifische Effektor-T-Zellen inhibieren können, bieten sowohl DCs als auch Tregs interessante Ansatzpunkte, um die Lymphopenie und damit deren Bedeutung bei der Pathogenese der Influenzavirusinfektion zu untersuchen.

Um die Frage zu beantworten, welcher Mechanismus hinter der verminderten T-Zellantwort während einer Influenza-A-Virusinfektion steht, sollten in der folgenden Arbeit durch *in vivo*-Versuche in Mäusen vergleichende Experimente der T-Zellen und T-Zellaktivität nach unterschiedlichen Influenza-A-Virusinfektionen durchgeführt werden. Zum einen sollte die Frequenz der T-Zellen in unterschiedlichen Organen nach Influenza-A-Virusinfektion bestimmt werden, zum anderen sollten mittels T-Zellanalysen das antivirale Potenzial der zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen charakterisiert werden. Gleichzeitiges Ziel war es, bei diesen Analysen die Rolle der DCs und Regulatorischen T-Zellen während einer Influenza-A-Virusinfektion besser zu charakterisieren.

4 Material und Methoden

4.1 Materialien

4.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmittel

Bezeichnung	Firma, Ort
1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octane (DAPCO)	Sigma-Aldrich, Hamburg
10x Minimum Essential Medium (10x MEM)	Life Technologies, Darmstadt (Gibco)
12 ml PS- Röhrchen	Greiner bio-one, Frickenhausen
³ H (3H-Methyl-Thymidine)	MP Biomedical, Heidelberg
4',6-Diamidino-2-phenyl-indole-dihydrochloride (DAPI)	Sigma-Aldrich, Hamburg
Annexin V	BD Bioscience, Heidelberg
Annexin-Bindepuffer 10%	BD Bioscience, Heidelberg
Avicel microcrystalline cellulose Typ: RC-581	FMC BioPolymer, Brüssel (Belgien)
BD Cell Strainer, 70µm	BD Bioscience, Heidelberg
Bovine Albumin 35%	MP Biomedical, Heidelberg
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck, Darmstadt
Cell Strainer 70µm Nylon	BD Bioscience, Heidelberg
Cellstar®96 well Platten (Flachboden)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Cellstar®96 well Platten (Rundboden)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Cellstar®96 well Platten (V-Boden)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Cellstar® 24 well Platten	Greiner bio-one, Frickenhausen
Cellstar® 6 well Platten	Greiner bio-one, Frickenhausen
Cellstar® Cryo.s	Greiner bio-one, Frickenhausen
Cellstar® Gewebekulturflaschen 50ml, 250ml, 550ml	Greiner bio-one, Frickenhausen
Chloroform	Carl Roth, Karlsruhe
Chlorwasserstoff	Carl Roth, Karlsruhe
Chromium-51 Radionuclide (⁵¹ Cr)	Perkin Elmer, Rodgau
Concavalin A	Biochrom AG, Berlin
DEAE-Dextranhydrochlorid	Sigma-Aldrich, Hamburg
Deckgläser	Menzel-Gläser, Braunschweig
Diethylether	Carl Roth, Karlsruhe
Diethylpyrocarbonat	Carl Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid	Serva, Heidelberg
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O)	Merck, Darmstadt
EDTA-Disodium	Serva, Heidelberg
EDTA-Probengefäß 1,3ml K3E	Sarstedt, Nümbrecht
Einmalspritzen Norm-ject 1 ml	Henke Sass Wolf
Entellan®Neu	Merck, Darmstadt
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol vergällt und absolut	Carl Roth, Karlsruhe
FACS™ Lysing Solution (10%)	BD Bioscience, Heidelberg
Feinstaubmasken FFP3	Carl Roth, Karlsruhe
Filtermatten (Printed Filtermat A) Typ 1450-421	LKB Wallac, Turku (Finnland)
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories
Gentamycinsulfat	Serva, Heidelberg
Glutamin	Serva, Heidelberg
Glycerin	Merck, Darmstadt
Hydrochlorid acid	Riedel-de Haan
Immersol™ 518F	Carl Zeiss, Göttingen
Injektionsnadeln 26 G ½ Sterican®	B.Braun, Melsungen

Bezeichnung	Firma, Ort
Injektionsnadeln Microlance™ 24 G 1	BD Medical Systems, Heidelberg
Injektionsnadeln Microlance™ 26 G 1	BD Medical Systems, Heidelberg
Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM/F12)	Life Technologies, Darmstadt (Gibco)
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Kaninchenserum	Vector Laboratories (Linaris), Wertheim
Ketamin® 10%	Wirtschaftsgenossenschaft deutscher Tierärzte, Garbsen
Lanzetten	Marienfeld, Lauda
L-Glutamin	Merck, Darmstadt
Lympholyte-M Cell Separation Media	Biozol, Eching
Lysing Matrix D Röhrchen (FastPrep-Röhrchen)	MP Biomedical, Heidelberg
Magnesiumchlorid (MgCl)	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid-Hexahydrat (MgCl*6H ₂ O)	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Merck, Darmstadt
Minimum Essential Medium (MEM)	Life Technologies, Darmstadt (Gibco)
Mowiol® 4-88 Reagent	Calbiochem®
Natriumacetat	Serva, Heidelberg
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumbicarbonat (NaHCO ₃)	Sigma-Aldrich, Hamburg
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat-Monohydrat	Merck, Darmstadt
Neubauer Zählkammer	Brand, Wertheim
Non Essential Amino Acid (MEM-NEAA)	Life Technologies, Darmstadt (Gibco)
Objektträger, Superfrost® Plus	Menzel-Gläser, Braunschweig
Paraformaldehyd	Carl Roth, Karlsruhe
Penicillin	Serva, Heidelberg
Phytohämagglutinin PHA-M	Sigma-Aldrich, Hamburg
Plastikpipetten 10ml	Greiner bio-one, Frickenhausen
Polystyrene-Röhrchen 5ml	BD Bioscience, Heidelberg
ProLong Gold Antifade Medium	Life Technologies, Darmstadt (Invitrogen)
PS-Röhrchen 5ml	Greiner bio-one, Frickenhausen
Rapamycin	Merck, Darmstadt
Reaktionsgefäße 2,0ml, 1,5ml, 0,5ml	Eppendorf, Hamburg
RNase Zap	Applied Biosystems, Darmstadt
Rompun® 2%	Bayer HealthCare, Leverkusen
Roti® Histo Fix 10%	Carl Roth, Karlsruhe
RPMI 1640	Life Technologies, Darmstadt (Gibco)
Serumprobengefäß 1,1ml Z-Gel	Sarstedt, Nümbrecht
SmartCycler® Tube-25µl	PeqLab, Erlangen
Sodium Bicarbonat 7,5%	Life Technologies, Darmstadt (Gibco)
Sterilfilter FP 30/0,2 CA-S 0,2µm	Schleicher und Schuell, Kassel
Streptavidin	Serva, Heidelberg
Streptomycin Sulfat	Serva, Heidelberg
Szintillationswachs (MeltiLex™ A) Typ 1205-441	LKB Wallac, Turku (Finnland)
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Tris	Life Technologies, Darmstadt (Gibco)
Triton X-100	Serva, Heidelberg
TRIzol® Reagent	Life Technologies, Darmstadt (Invitrogen)
TrueBlue Peroxidase Substrate	KPL, Wedel
Trypanblau	Serva, Heidelberg

Bezeichnung	Firma, Ort
Tween®20	Serva, Heidelberg
Versen	Life Technologies, Darmstadt (Gibco)
Xylencyanol	Carl Roth, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt

4.1.2 Zelllinien

Bezeichnung	Beschreibung
MC 57	Murine Fibrosarkom-Zelllinie, H-2b (aus einer C57BL/6-Maus)
MDCK II	Madin-Darby canine kidney (Hundnierenzellen)
NMI	Stabile CD4 ⁺ T-Zelllinie aus Lewis-Ratte
P205	Stabile CD4 ⁺ T-Zelllinie aus Lewis-Ratte

4.1.3 Virusstämme

Bezeichnung	Genauere Beschreibung
BDV	Borna Disease Virus Gießen He/80
H1N1v	A/Regensburg/D6/09 (Influenza-A-Virus)
H5N1	A/mallard/Bavaria/1/2006 (Influenza-A-Virus)
H5N2	A/mallard/Bavaria/1/2005 (Influenza-A-Virus)
H7N7	A/Bratislava/79 (Influenza-A-Virus)

4.1.4 Tierstämme

Bezeichnung	Beschreibung
C57BL/6	Wildtypmaus, hausinterne Zucht des Friedrich-Loeffler-Instituts, Tübingen
GFP ⁺ -Maus	C57BL/6-Tg (ACTB-EGFP)10sb/J / erworben von The Jackson Laboratory, Maine (USA) und hausintern am Friedrich-Loeffler-Institut gezüchtet
Lewis	Ratten (Stamm „Lewis“), hausinterne Zucht des Friedrich-Loeffler-Instituts, Tübingen

4.1.5 Zellkulturmedien

Bezeichnung	Zusammensetzung
Infektionsmedium	178ml ddH ₂ O 50ml 10xMEM 14ml Natriumbicarbonat (NaHCO ₃) 5ml 1% DEAE-Dextran 3ml 35% Bovines Albumin 50µg/ml Penicillin/Streptavidin
MEM-Medium	9,6g MEM-NEAA (Life Technologies) ad 1000ml ddH ₂ O 10% FCS (für MDCK; für MC57; 20% FCS) 50µg/ml Penicillin/Streptavidin 2mM Glutamin
Overlay-Medium	1:1 Infektionsmedium + 2,5% Avicel-Lösung
P-Medium, Medium für Primärzellen	IMDM/F12 10% autologes Mausserum

Bezeichnung	Zusammensetzung
	50µg/ml Gentamycin 50ng/ml β-Mercaptoethanol
T-Zellmedium	MEM-Medium 10% FCS 50µg/ml Penicillin/Streptavidin 50ng/ml β-Mercaptoethanol 2mM Glutamin

4.1.6 Enzyme

Bezeichnung	Firma, Ort
Collagenase D (Clostridium histolyticum)	Roche, Mannheim
DNase	Roche, Mannheim
Trypsin 250	Difco Laboratories, Augsburg
Trypsin-EDTA (1x), 0,25%	Life Technologies, Darmstadt (Gibco)

4.1.7 Kits

Bezeichnung	Firma, Ort
Anti-PE MultiSort Kit	Miltenyi, Bergisch Gladbach
Bio-Plex mouse cytokine Th1/Th2 Panel	Bio-Rad, München
Bio-Plex Rat cytokine 9-Plex A Panel	Bio-Rad, München
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Regulatory T Cell Isolation Kit	Miltenyi, Bergisch Gladbach
Mouse Regulatory T Cell Staining Kit #3	eBioscience, Frankfurt
Neural Tissue Dissociation Kit (Papain)	Miltenyi, Bergisch Gladbach
QuantiTect SYBR Green PCR Kit	Qiagen, Hilden

4.1.8 Antikörper

Bezeichnung	Firma, Ort
Anti-mouse CD 3e (CD3e chain)	BD Bioscience, Heidelberg
Anti-mouse CD 4 (L3T3)	BD Bioscience, Heidelberg
Anti-mouse CD 69 (H1.2F3)	BD Bioscience, Heidelberg
Anti-mouse CD103 (M290)	BD Bioscience, Heidelberg
Anti-mouse CD11b (M1/70)	BD Bioscience, Heidelberg
Anti-mouse CD11c (HL3)	BD Bioscience, Heidelberg
Anti-mouse CD11c MicroBeads	Miltenyi, Bergisch Gladbach
Anti-mouse CD16/ CD 32 (2.462)	BD Bioscience, Heidelberg
Anti-mouse CD25 (PC61)	BD Bioscience, Heidelberg
Anti-mouse CD45 Microbead	Miltenyi, Bergisch Gladbach
Anti-mouse CD49 (Ha1/29)	BD Bioscience, Heidelberg
Anti-mouse CD8a (Ly-2, 53-6.7)	BD Bioscience, Heidelberg
Anti-mouse Ly6G (RB6-8C5)	eBioscience, Frankfurt
Anti-mouse NK1.1 (PK136)	eBioscience, Frankfurt
Anti-mouse SiglecF (E50-2440)	BD Bioscience, Heidelberg
anti-mouse/rat Foxp3 (FJK-16s-clone)	eBioscience, Frankfurt
Anti-rat CD32 8 (D34-485)	BD Bioscience, Heidelberg
Anti-rat CD4 Microbead	Miltenyi, Bergisch Gladbach

Bezeichnung	Firma, Ort
Anti-rat OX 35 (CD4)	BD Bioscience, Heidelberg
Anti-rat OX 39 (CD25)	BD Bioscience, Heidelberg
Anti-rat OX 8 (CD8a)	BD Bioscience, Heidelberg
donkey anti-goat Alexa Fluor 647	Life Technologies, Darmstadt (Invitrogen)
goat anti mouse IgG (H&L) peroxidase conjugated	Dianova, Hamburg
goat anti-Influenza-A-polyclonal	AbD Serotec, Düsseldorf
mouse anti-Influenza-A-Nucleoprotein	AbD Serotec, Düsseldorf
T-Zellaktivator CD3/CD28 Dynabeads	Life Technologies, Darmstadt (Invitrogen)

4.1.9 Primer

Bezeichnung	Firma, Ort
5'-AGATGA GTC TTC TAA CCG AGG TCG-3' Forward M-Protein-Nachweis	Metabion International, Martinsried
5'-Tet-TCA CCC CTC AAA GCC GA-BHQ- 1-3' Sonde M-Protein-Nachweis	Metabion International, Martinsried
5'-TGC AAA AAC ATC TTC AAG TYT CTG-3' Reverse M-Protein-Nachweis	Metabion International, Martinsried
Mm_Ccl25_1_SG QuantiTect Primer Assay	Qiagen, Hilden
Mm_Cxcl12_1_SG QuantiTect Primer Assay	Qiagen, Hilden
Mm_Gapd_2_SG QuantiTect Primer Assay	Qiagen, Hilden
Mm_Icam1_1_SG QuantiTect Primer Assay	Qiagen, Hilden
Mm_Vcam1_1_SG QuantiTect Primer Assay	Qiagen, Hilden

4.1.10 Peptide

Bezeichnung	Firma, Ort
Pentamer ASNENVEIM-PE	ProImmune, Oxford (England)
Tetramer ASENMEAM	Labor von S. Stevanovic, Universität Tübingen
Tetramer ASNENVEIM	Labor von S. Stevanovic, Universität Tübingen

4.1.11 Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Rezept
2,5% Avicel-Lösung	2,5g Avicel 100ml aqua bidest 1h bei 25°C rühren autoklavieren bei 121°C für 20min
Annexin-Bindepuffer	10ml Annexin-Bindepuffer 10% 90ml ddH ₂ O
Betäubungsmittel	500µl Ketamin 500µl Rompun 9ml PBS
BSS (Balanced Salt Solution), pH 7.2	0,01g Phenolrot 135mM NaCl 5mM KCl 1mM CaCl ₂ 1mM MgSO ₄ 0,5mM MgCl 1,3mM Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O 0,5mM KH ₂ PO ₄

Bezeichnung	Rezept
	ad 1000 ml ddH ₂ O
DAPI, 10 mg/ml	5mg DAPI 450µl ddH ₂ O
DEPC-H ₂ O	1ml Diethylpyrocarbonate (DEPC) 1000 ml ddH ₂ O über Nacht bei RT rühren autoklavieren bei 121°C für 20 min
FACS-Erythrozytenlysegebrauchslösung	10ml FACS™ Lysing Solution (10%) 90ml ddH ₂ O
FACS-Puffer	980ml PBS-A 20ml FCS 2,9225 g EDTA pH 7,5
Fixation/Permeabilization Arbeitslösung	Aus dem Treg-Kit (eBioscience): Konzentrat : Verdünnungslösung wurden in einem Verhältnis von 1:4 frisch gemischt
HistoRotiFix, 4%	400ml 10% HistoRotiFix 100ml 10xPBS 500ml ddH ₂ O
Infektions-PBS	1000ml PBS-A 1ml Penicillin/Streptavidin 7ml Bovines Albumin (35%)
MACS-Puffer	1000ml PBS-A 5g BSA 0,75g EDTA ; pH 7,2 und entgasen
Mowiol Mounting Medium	2,4g Mowiol 6g Glycerol 12ml ddH ₂ O 12ml 0,2 M Tris (pH 8,5) 0,72g DABCO
Paraformaldehyde (PFA), 4%	1ml NaOH 40g PFA 1000ml PBS-A
PBS (Phosphate Buffered Saline), pH 7.2	135mM NaCl 2,5mM KCl 6mM Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O 1,5mM KH ₂ PO ₄ 1mM CaCl ₂ 0,5mM MgCl*6H ₂ O ad 1000 ml ddH ₂ O
PBS-A (Phosphate Buffered Saline), pH 7.2	135mM NaCl 2,5mM KCl 6mM Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O 1,5mM KH ₂ PO ₄ ad 1000 ml ddH ₂ O
Permeabilisationspuffer, 1%	100ml 10x Permeabilisations Buffer (eBioscience, aus dem Treg-Kit) 900ml ddH ₂ O
Trypanblau	0,2g Trypanblau ad 100ml PBS
Versentrypsin (VT-Lösung)	135mM NaCl 2,5mM KCl 6,0mM Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O 1,5mM KH ₂ PO ₄ 1,25g Trypsin (1:250) 2,5mM Versen ad 1000 ml ddH ₂ O

4.1.12 Geräte

Gerät	Firma, Ort
Animal Monitoring System (VitalView)	Respironics, Besozzo (Italien)
ApoTome (Axiovert 200M-Zusatzgerät)	Carl Zeiss, Jena
AutoMACS	Miltenyi, Bergisch Gladbach
Axiovert 200M	Carl Zeiss, Jena
Bio Photometer 613100458	Eppendorf, Hamburg
Cell Harvester	LKB Wallac, Turku (Finnland)
Centrifuge 5417 R-Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Centrifuge 5810 R-Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg
CO ₂ -auto-zero	Heraeus, Ulm
Einbettautomat TP1020	Leica, Wetzlar
FACSCalibur, E1681	Becton Dickinson, Heidelberg
FastPrep FP 120	MP Biomedical, Heidelberg
HBO 100 Elektronisches Vorschaltgerät (Axiovert 200M-Zusatzgerät)	Leistungselektronik Jena GmbH, Jena
HBO 100 Mikroskop Beleuchtungseinrichtung (Axiovert 200M-Zusatzgerät)	Carl Zeiss, Jena
IVC (Individually Ventilated Cages) Slimline System	Techniplast, Hohenpreißenberg
Megafuge 1. OR-Zentrifuge	Heraeus, Ulm
MicroBeta Counter 1750	LKB Wallac, Turku (Finnland)
Mikrotom RM 2145	Leica, Wetzlar
Omnifuge 2.ORS-Zentrifuge	Heraeus, Ulm
pH Meter Orion Star3	Thermo Scientific, Ulm
Scanner Perfection 1640SU	Epson
SmartCycler I-care Technologie	Cepheid, Erlangen
Sterilbank LaminAir	Heraeus, Ulm
UNIBLITZ® Model VCM-D1 Shutter driver (Axiovert 200M-Zusatzgerät)	Vincent Associates®, Frankfurt
DynaMag™-15	Life Technologies, Darmstadt (Invitrogen)
Bio-Plex 200	Bio-Rad, München
Wasserbad	Köttermann, Uetze
Tempcontrol 37-2 digital (Axiovert 200M-Zusatzgerät)	Carl Zeiss, Jena
2-16 K-Zentrifuge	Sigma-Aldrich, Hamburg
Thermomixer comfort (1,5 ml) 5436	Eppendorf, Hamburg
Pipetten 2, 10, 20, 200 und 1000 µl Pipetman	Gilson, Limburg

4.2 Methoden

4.2.1 Infektion der Mäuse und Grundlagen der Tierversuche

Für die durchgeführten Tierexperimente wurden etwa zehn Wochen alte C57BL/6-Mäuse verwendet, die aus der hausinternen Zucht des Friedrich-Loeffler-Instituts, Tübingen stammten. Vor der Infektion wurden den Tieren je Gramm 10µl des Ketamin-Rompun-Betäubungsmittels i.p. injiziert. Erst nach einsetzender Wirkung wurde das Tier mittels 25µl-Applikation der verdünnten Viruslösung je Nasenloch infiziert. Die spezifischen MLD₅₀-Infektionsdosen in der C57BL/6-Maus betragen:

Virus	MLD ₅₀ / C57BL/6-Maus
A/Bratislava/79 (H7N7)	2x10 ² pfu/50µl
A/mallard/Bavaria/1/2006 (H5N1)	2x10 ³ pfu/50µl
A/mallard/Bavaria/1/2005 (H5N2)	< 1x10 ⁵ pfu/50µl
A/Regensburg/D6/09 (H1N1v)	3x10 ⁴ pfu/50µl

Bei täglicher Aufzeichnung des Gewichts und Gesundheitszustands wurden diejenigen Tiere aus den Versuchen entnommen, die über 25% ihres Ursprungsgewichts verloren hatten. Die Aufzeichnung des Gesundheitszustandes basierte auf einer Beobachtung und war in fünf Kategorien aufgeteilt, die spezifische Merkmale beinhalteten:

Kategorie	Anzeichen
0	Gesundes Tier
1	Gesträubtes Fell
2	Gesträubtes Fell, Atemgeräusche, Körper beim Laufen nicht mehr langgestreckt
3	Gesträubtes Fell, Atemgeräusche, Körper wölbt sich beim Laufen, Lethargie
4	Totes Tier

4.2.2 Herstellung von Organproben

Tiere wurden mittels Genickbruch getötet. Wurde aus dem Tier auch das Blut benötigt, erfolgte die Tötung mittels Diethylether. Das Blut wurde daraufhin aus dem Herzen entnommen und in EDTA-Röhrchen (Sarstedt) gesammelt.

4.2.2.1 Zellsuspension

Für die Herstellung einer Zellsuspension wurden Organe der getöteten Versuchstiere entnommen und in kaltem BSS aufbewahrt. Im Anschluss wurden die Organe mittels eines Zellsiebes (BD Bioscience) zerdrückt und in eine Zellsuspension überführt. Die so entstan-

dene Suspension wurde bei 1.500Upm, 10min bei 4°C zentrifugiert (5810 R-Zentrifuge, Eppendorf). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in frischem BSS resuspendiert. Eventuell noch vorhandene Organtrümmer wurden vor dem Zählen der Zellen mittels kurzer Zentrifugation auf über 1.200Upm abzentrifugiert. Die lebenden Suspensionszellen unter Ausschluss der Erythrozyten wurden gezählt. Hierfür wurden 10µl der Zellsuspension mit 10µl Trypanblau (Serva) gemischt, die Lösung in eine Neubauer-Zählkammer gegeben und 25 kleine Quadrate ausgewertet. Die Zellzahl/ml wurden nach folgender Formel ermittelt:

$$\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} = \frac{\text{gezählte Zellen aus 25 Kleinquadraten}}{5} * 10^5$$

4.2.2.2 Herstellung eines zehnpromzentigen Organhomogenats

Die Durchführung der Virustitration benötigte ein zehnpromzentiges Organhomogenat. Hierfür wurden Organe der infizierten Mäuse entnommen und deren Gewicht bestimmt. Im Anschluss wurden die Organe in Lysing Matrix D Röhrchen (MP Biomedical) überführt und in zehnfachem Volumen BSS-Puffer aufgenommen. Eine zweimalige Homogenisierung für 20sec im FastPrep FP 120 (MP Biomedical) folgte. Danach mussten die Zellsedimente entfernt werden, aus diesem Grund wurden die hergestellten Organhomogenate bei 2.000Upm, 10min, 4°C zentrifugiert (5810 R-Zentrifuge, Eppendorf). Der Überstand, in dem sich freie Viruspartikel befanden, wurde geerntet und bis zur weiteren Verwendung in kleinen Aliquots bei -70°C gelagert.

4.2.3 Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten erfolgten unter einer Sterilbank und sterilen Bedingungen (Heraeus). Zellen wurden in Gewebekulturflaschen in einem CO₂-Begasungsbrutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% kultiviert (Heraeus). Die adhärenen Zelllinien, MDCK II und MC57, wurden in MEM-Medium kultiviert. Bei Umsetzung der Zellen wurden die Zellen mit der im Materialteil aufgeführten VT-Lösung abtrypsinisiert und anschließend in neuem Kulturmedium zur weiteren Kultivierung aufgenommen. Bei den in den Versuchen verwendeten T-Zelllinien handelte es sich um Suspensionszellen. Daher wurde regelmäßig die Zelldichte kontrolliert und wenn nötig Medium erneuert.

4.2.4 Virustitration

Einen Tag vor der Virustitration wurden MDCK II Zellen in 96well Flachbodenplatten (greiner bio-one) bei 8×10^4 Zellen je Well ausgesät. War am nächsten Tag ein konfluenter Zellrasen vorhanden, konnten diese Zellkulturplatten für die Virustitration mittels Avicel-Overlaymedium eingesetzt werden (Matrosovich et al., 2006). Bei der Durchführung dieser Methode werden zuletzt keine Plaques, sondern infizierte Zellen mittels immunhistologischer Methode nachgewiesen. Infizierte Zellen bildeten einen Focus. Der in dieser Arbeit verwendete Begriff *Plaque* bezeichnete dementsprechend immer einen Focus. Als Nachweis diente das Anfärben von Nukleoproteinen der Influenzaviren.

Die Durchführung einer Verdünnung der zu untersuchenden Proben erfolgte in 96well Rundbodenplatten (Greiner bio-one). Nachdem sich 100µl Infektions-PBS in jedem Well der Rundbodenplatten befanden, wurde im Anschluss 50µl der zu untersuchenden Probe in das erste Well der Reihe pipettiert. Die Titration der Probe erfolgte, indem 50µl des ersten Wells in das zweite überführt wurden. In einem nächsten Schritt wurden dem zweiten Well 50µl entnommen und die in das dritte überführt und so weiter. Aus dem letzten Well wurden 50µl verworfen. Nach dreimaligem Waschen der Zellen mit 100µl Infektions-PBS/Well und anschließender Absaugung des Überstands, wurden 50µl der hergestellten Probenverdünnungen auf die Zellen gegeben. Diese Platte inkubierte 1h bei 37°C, 5% CO₂. Im Anschluss erhielt jedes Well 100µl Avicel-enthaltendes Overlay-Medium (FMC BioPolymer). Handelte es sich bei dem nachzuweisenden Virus um ein Virus mit einer monobasischen Spaltstelle im HA, mussten zudem noch 1,2µl/ml 0,25% Trypsin-EDTA (Gibco) in das Overlay-Medium pipettiert werden. Die darauf anschließende Inkubationszeit richtete sich nach der Replikationsgeschwindigkeit des Virus. So inkubierten die probenenthaltenden Zellkulturplatten für den H7N7-Nachweis 18-20h, H5N1 20-21h, H5N2 35-40h und H1N1v 24-30h. Die während der Inkubation entstehenden Foci, also innerhalb des Zellrasens infizierten Zellen, konnten im Anschluss immunhistologisch gefärbt werden.

Daher wurde nach der Inkubationsperiode das Overlay-Medium durch vorsichtiges Ausschlagen entfernt, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und danach erfolgte die Fixierung der Zellen mittels 4% RotiHistofix (Carl Roth) für 30min bei 4°C. Nach zweimaligem Waschen der Zellen wurden diese anschließend bei Raumtemperatur mittels 0,3% Triton X-100 in PBS (Serva) 10min permeabilisiert. Dem schloss sich eine zehnmütig Blockierung mit 100µl von PBS und 10% FCS an, bevor die 60min Inkubation mit 50µl des Pri-

märikörpers anti-Influenza-A-Nukleoprotein folgte (1:10.000 in Blockierlösung [PBS mit 10% FCS und 0,1% Tween 20]). Nach der Inkubation wurden die Zellen mit 0,1% Tween 20 in PBS (Serva) gewaschen. Die 30min Inkubation mit dem Sekundärantikörper anti-mouse POD erfolgte mit 50 μ l bei einer Verdünnung von 1:1.000 in Blockierlösung. Die Zellen wurden im Anschluss dreimal mit 0,1% Tween in PBS für 5min gewaschen. Jedes Well erhielt nun 50 μ l des TrueBlue Peroxidase Substrates (KPL) bis eine klare Blaufärbung infizierter Zellen zu erkennen war, maximal jedoch 10min. Im Anschluss wurde das Substrat mittels H₂O entfernt und die Platten getrocknet.

Die Auswertung des Virustiters erfolgte am Computerbildschirm mittels Einscannen der Platten (Epson). Da es sich bei diesem Versuch um eine 1:3-Verdünnungsreihe handelte, wurden die gezählten Foci mit 60 multipliziert (Verdünnungsfaktor [x3]; eingesetztes Volumen 50 μ l [x20]), um auf die virale Last/ml zu gelangen.

4.2.5 FACS-Analysen

4.2.5.1 Extrazelluläre Färbung

Die Leukozytenzahl, bei Organproben nach 4.2.2.1 erstellt, wurde ermittelt und auf 1×10^6 Leukozyten je Probe eingestellt. Die Proben wurden in 5ml Polystyrene-Röhrchen (BD Bioscience) überführt, mit FACS-Puffer aufgefüllt und bei 1.200Upm, 10min und 4°C zentrifugiert (5810 R-Zentrifuge, Eppendorf). Nach Verwerfen des Überstandes erfolgte eine 30min Antikörperinkubation. Hierbei wurden alle Antikörper von BD Bioscience, wenn nicht anders aufgeführt, 1:100, alle anderen Antikörper nach Herstellerangaben verdünnt. Ein Gesamtvolumen je Probe von 100 μ l wurde eingesetzt. Nach der Antikörperinkubation wusch das Hinzupipettieren von FACS-Puffer mit einem anschließenden Zentrifugationsschritt (1.200Upm, 10min und 4°C) nicht-gebundene Antikörper heraus. Durch Aufnahme des Zellpellets in 1ml der FACS-Erythrozytenlysegebrauchslösung (BD Bioscience) lysierten Erythrozyten und Zellkern-enthaltende Zellen fixierten. Die Untersuchung der Proben erfolgte am FACSCalibur (BD Bioscience).

4.2.5.2 Intrazelluläre Färbung Regulatorischer T-Zellen

Diese Färbung schloss sich an die in 4.2.5.1 durchgeführte extrazelluläre CD4⁺CD25⁺-Färbung an. Um ein spezifisches intrazelluläres Färben zu ermöglichen, wurden die Zellen nicht mit der FACS-Erythrozytenlysegebrauchslösung lysiert/fixiert, sondern Zell-

schonend in 1ml einer Fixation/Permeabilization Arbeitslösung (eBioscience) bei 4°C zwischen 90min und 18h inkubiert. Ein zweimaliger Waschschrift mit dem Permeabilisationspuffer (eBioscience) bei 1.000Upm, 4°C und 10min (5810 R-Zentrifuge, Eppendorf) folgte. Vor der Antikörperzugabe wurden zuvor freie Bindungsstellen mittels einer 15min Inkubation von 3µl des anti-Maus CD16/CD32-Fc-Block (BD Bioscience) bei 4°C in 100µl Permeabilisationspuffer blockiert. Anschließend wurde der anti-Maus foxp3-Antikörper (eBioscience) hinzupipettiert, je Probe erfolgte die Zugabe von 2,5µl für 45min bei 4°C. Nach der Inkubation wurden die Proben wieder zweimal gewaschen, zentrifugiert und im Anschluss in 1ml FACS-Puffer aufgenommen. Danach konnten die Proben im FACSCalibur (BD Bioscience) ausgewertet werden.

4.2.5.3 Färbung apoptotischer Zellen

Diese Färbung schloss sich ebenfalls an die Methode 4.2.5.1 an. Die Zellen wurden jedoch nicht in 1ml FACS-Erythrozytenlysegebrauchslösung aufgenommen, sondern in 1ml des Annexin-Bindepuffers (BD Bioscience). 100µl der so entstandenen Probe wurden in ein neues Röhrchen überführt und 5µl des Annexin V (BD Bioscience) hinzupipettiert. Es erfolgte eine 10min Inkubation bei Raumtemperatur. Nach Inkubation erhielt jede Probe weitere 400µl Annexin-Bindepuffer und 100µl Erylyse-Puffer. Die Untersuchung der Probe erfolgte im FACSCalibur (BD Bioscience).

4.2.6 Isolierung Dendritischer Zellen aus der Lunge

Aus der Maus entnommene Lungen wurden auf Eis in Gewebekulturschalen (greiner bio-one) in RPMI-Medium mechanisch zerkleinert. Eine anschließende enzymatische Verdauung der Lungenstücke pro Lunge folgte in 5ml RPMI, welches zu 0,125% Collagenase D (Roche) enthielt, bei 37°C für 30min. Alle 5min wurden die Proben leicht geschwenkt und anschließend die Fragmente mittels Zellsieb in eine Suspension überführt. Um die Proben zu waschen, erfolgte die Zugabe von BBS und ein fünfminütiger Zentrifugationsschritt bei 540g, 4°C (5810 R-Zentrifuge, Eppendorf). Beide Schritte wurden zweimal wiederholt und die Gesamtzellzahl bestimmt. Der Selektionsschritt nach SiglecF folgte. Hierfür wurden die Zellen auf 1×10^7 (= eine Einheit) eingestellt und bei 1.200Upm, 10min und 4°C zentrifugiert. Es erfolgte eine anti-Maus SiglecF-PE-Antikörperinkubation für 30min (bei 2µl anti-Maus SiglecF-PE [BD Bioscience] in 100µl FACS-Puffer je 1×10^7 Zellen). Nach der

Inkubation wurden die Proben mittels 4ml FACS-Puffer zweimal gewaschen, zentrifugiert und der Überstand anschließend komplett abgesaugt. Den 1×10^7 Zellen wurden nun 80 μ l MACS-Puffer und 20 μ l anti-PE MultiSort MicroBead hinzupipettiert und 15min bei 4°C inkubiert. Dem schloss sich ein Waschschrift mit MACS-Puffer (1.200U μ m, 10min und 4°C Zentrifugation) an. Nachdem der Überstand erneut komplett abgenommen wurde, erhielten bis zu 10^8 Zellen 500 μ l MACS-Puffer. Die Separierung der Proben erfolgte mittels AutoMACS (Miltenyi) unter Verwendung des Programmes „Depletes“. Hierbei handelte es sich um eine sensitive Depletion der SiglecF⁺-Zellen und die SiglecF⁻-Probe zur Weiterverarbeitung war dementsprechende in der anti-PE-Bead-negativen Fraktion. Dennoch wurde der negativen Fraktion, um mögliche Unreinheiten zu vermeiden, 20 μ l/ml MultiSort Release Reagent (Miltenyi) hinzupipettiert, um mögliche vorhandene magnetische Beads von Zellen zu entfernen. Nach 10min Inkubation wurden die Proben mit MACS-Puffer gewaschen, zentrifugiert und der Überstand komplett abgesaugt. Im Anschluss mussten je 1×10^7 Zellen 25 μ l MACS-Puffer und 15 μ l Stopreagent des MultiSort Kits (Miltenyi) hinzupipettiert werden. Nach 5min Inkubation wurde die Probe auf 400 μ l MACS-Puffer aufgefüllt und 100 μ l des CD11c MicroBead (Miltenyi) dazupipettiert. Ein Inkubationsschritt folgte (15min, 4°C). Im Anschluss wurde die Probe mit MACS-Puffer gewaschen (Zugabe von 4ml MACS-Puffer), abzentrifugiert (1.200U μ m, 10min und 4°C) und das Pellet in 500 μ l MACS-Puffer aufgenommen. Ein weiterer Separationsschritt mittels AutoMACS folgte unter Verwendung des Programmes „PosselD“. Die zu untersuchenden anti-CD11c-bindenden dendritischen Zellen waren nun in der positiven Fraktion.

4.2.6.1 Färbung Dendritischer Zellen für die FACS-Analyse

Der Überführung von 5×10^5 SiglecF⁻CD11c⁺-Zellen in 5ml Polystyrene-Röhrchen (BD Bioscience) und Zugabe von FACS-Puffer folgte ein Zentrifugationsschritt bei 1.200U μ m, 10min, 4°C (5810 R-Zentrifuge, Eppendorf). Der Antikörpercocktail, der in 100 μ l FACS-Puffer je 2 μ l des anti-Maus CD11c-Cy7 und anti-Maus CD103-FITC (beide BD Bioscience) beinhaltetete, wurde hinzupipettiert. Die Zugabe des anti-Maus SiglecF-PE erfolgte bereits unter 4.2.6, da dieser der Separierung diene. Nach 30min Inkubation bei 4°C wurden die Proben mit je 4ml FACS-Puffer gewaschen, abzentrifugiert (1.200U μ m, 10min, 4°C) und mit 1ml der Fixation/Permeabilization Arbeitslösung (eBioscience) für 90min bis 18h inkubiert. Durch zwei sich anschließende Waschschriffe mit je 1ml des Permeabilisationspuffers und Zentrifugation bei 1.000U μ m, 10min, 4°C (Eppendorf) wurde die Fixati-

on/Permeabilization Arbeitslösung ausgewaschen. Um eine unspezifische Bindung während des intrazellulären Stainings zu minimieren, wurden freie Bindungsstellen mittels 100µl eines 10%igen Kaninchenserums (Vector Laboratories) in PBS-A, der Blockierlösung, bei Raumtemperatur blockiert, des Weiteren sollte die Zugabe von 3µl des anti-Maus CD16/CD32-Fc-Block (BD Bioscience) für 15min die Blockierung verbessern. Nach dem Blockierungsschritt folgte die Inkubation der Probe mit 100µl einer 1:500-Verdünnung des goat anti-Influenza-A-Antikörpers (AbD Serotec) in Blockierlösung für 1h bei 4°C. Nach der Inkubation des Primärantikörpers wurden die Proben wieder zweimal mit PBS-A gewaschen und zentrifugiert (1.000Upm, 10min, 4°C). Die Inkubation mit einer Verdünnung des sekundären Detektionsantikörpers, 100µl je Probe einer 1:2000-Verdünnung donkey anti-goat AF 647 (Invitrogen) in Blockierlösung erfolgte für 1h bei 4°C. Um ungebundene Detektionsantikörper aus der Messung ausschließend zu können, wurden die Proben zum Schluss zweimal gewaschen, zentrifugiert (1.000Upm, 10min, 4°C), in 500µl FACS-Puffer aufgenommen und danach im FACSCalibur (BD Bioscience) analysiert.

4.2.6.2 Fluoreszenzfärbung Dendritischer Zellen für die Mikroskopie

Direkt nach Isolierung und Überprüfung auf Quantität und Reinheit der SiglecF⁻CD11c⁺-Zellen wie unter 4.2.6 beschrieben, erfolgte ein Zentrifugationsschritt der Zellen bei 1.200Upm, 10min, 4°C (5810 R-Zentrifuge, Eppendorf). Die so erhaltenen Zellen des Pellets wurden in 300µl 4% PFA (Carl Roth) für 20min bei RT fixiert. Dem schloss sich eine zweimalige die Auswaschung des Fixativs mittels 4ml PBS und Zentrifugation (1.000Upm, 10min, 4°C) an. Eine 30min Inkubation bei 4°C mit einer 1:3.000 in PBS-verdünnten DAPI-Lösung (Sigma-Aldrich) folgte. Die Proben wurden wieder mit 4ml PBS gewaschen, dieses Mal um ungebundenes DAPI aus der Probe zu entfernen und so die Hintergrundstrahlung zu minimieren, zentrifugiert (1.000Upm, 10min, 4°C) und mittels 30µl ProLong Gold Antifade Medium (Invitrogen) eingedeckelt. Bis zur Analyse am nächsten Tag am Fluoreszenzmikroskop (Carl Zeiss) wurden die Proben dunkel bei 4°C getrocknet.

4.2.6.3 Adoptiver Transfer der Dendritischen Zelle

Die in 4.2.6 isolierten Zellen stammten für die Durchführung des adoptiven Transfers aus GFP⁺-Donormäusen. Damit war gegeben, dass die transferierten Zellen fluoreszierten und sich so von allen Zellen der C57BL/6-Akzeptormaus unterschieden.

C57BL/6-Donor- und GFP⁺-Akzeptormäuse wurden mit 2×10^3 Viruspartikeln/50 μ l des H7N7-Virus i.n. infiziert. Nach drei Tage erfolgte die Isolierung der SiglecF⁻CD11c⁺-Zellen aus den Lungen (siehe hierzu 4.2.6) der GFP⁺-Mäuse. Von den so fraktionierten SiglecF⁻CD11c⁺-Zellen wurden 5×10^6 Zellen i.n. bereits infizierten C57BL/6-Akzeptormäusen appliziert. Zwei Tage nach Transfer wurden auch die Akzeptormäuse getötet und wiederum SiglecF⁻CD11c⁺-Zellen aus Lunge und Thymus isoliert (beide Isolierungen erfolgten nach der in 4.2.6 beschriebenen Methode). Die isolierten Zellen wurden am Mikroskop ausgewertet (4.2.6.2). Einen schematischen Überblick des Ablaufes dieses Transfersversuches gibt die Abbildung 5.XII des Ergebnisteils.

4.2.7 RNA-Isolierung

Die Methode der Gesamt-RNA-Isolierung aus Organen erfolgte mittels phenolhaltigem TriZol® Reagent (Invitrogen). Die von Versuchstieren stammenden Organe wurden in Lysing Matrix D Röhrchen (MP Biomedical) Schock-gefrosten, anschließend mit maximal 1ml TriZol® Reagent in das FastPrep FP 120-Gerät (MP Biomedical) platziert und hierin zweimal für 20sec homogenisiert. Ein Überpipettieren des TriZol-haltigen Homogenats in 2ml Eppendorf-Reaktionsgefäße war daraufhin nötig mit anschließender Inkubation über Nacht bei 4°C. Am nächsten Morgen folgte ein weiterer Inkubationsschritt für 10min bei 30°C im Thermomixer (Eppendorf). 1/10 an Volumen von 3M NaOAc (pH 5,0) wurde danach hinzupipettiert und die Proben für weitere 5min bei RT stehen gelassen bevor weitere 200 μ l Chloroform hinzupipettiert und die Probe 3min gevortext wurde. Ein weiteres Mal inkubierte die Probe für 5min bei 30°C, bevor eine Zentrifugation bei 10.000Upm, 4°C für 30min (Sigma) folgte. Die obere wässrige Phase enthielt nun neben DNA auch die Gesamt-RNA und wurde daher in eine neues 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Das Volumen wurde dabei abgemessen, je 100 μ l Probe 75 μ l Iso-Propanol dazupipettiert und gevortext. Unter ständigem Schütteln im Thermomixer erfolgte eine 10min Inkubationsphase bei 30°C. Ein Zentrifugationsschritt über 15min bei 10.000Upm, 4°C schloss sich dieser Inkubation an. Der Überstand wurde verworfen, dem Pellet 1ml Ethanol hinzupipettiert und die Probe gevortext. Danach erfolgte eine 10min Zentrifugation bei 8.400Upm und 4°C (Sigma). Das Ethanol wurde entfernt, das Pellet bei 56°C getrocknet und in 50 μ l DEPC-H₂O gelöst. Die RNA-Konzentration war bestimmbar durch Messung im Biophotometer (Eppendorf) bei 260nm. Anschließend wurde die RNA auf 50ng/ μ l eingestellt und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

4.2.8 Quantitative real-time PCR

Das Expressionslevel von Chemokinen und Zytokinen wurde mittels quantitativer real-time PCR (qRT-PCR) ermittelt. Zusätzlich diente diese Methode dem Nachweis der viralen Last eines Organs. Die Durchführung basierte auf einem Ein-Schritt-Verfahren, bei dem reverse Transkriptase und DNA-Polymerase kombiniert waren. Die reverse Transkriptase transkribierte in einem ersten Schritt die vorhandene mRNA in cDNA. Hierbei war die DNA-Polymerase inaktiviert, da mittels Antikörper ihr katalytisches Zentrum blockiert war. Diese Inhibition der DNA-Polymeraseaktivität wurde durch einen hohen Temperaturschritt bei 95°C denaturiert und die DNA-Polymerase aktiviert. Durch denselben Schritt wurde zudem die reverse Transkriptase inaktiv. Dem folgte eine Polymerasekettenreaktion (PCR), wodurch spezifische cDNA-Segmente mittels zugefügten Primer (Qiagen) über mehrere Zyklen amplifiziert wurden. Das hier eingesetzte Quantitect SYBR Green RT-PCR Kit (Qiagen) enthielt zudem ein Fluorophor (SYBR-Green), das mit doppelsträngiger DNA interkalierte, wodurch die Amplifikation der neu gebildeten Segmente mittels Lichtimpuls sichtbar gemacht werden konnte. Der Durchführung der Amplifikation und Auswertung diente der SmartCycler I-care und dessen Software 2.0b (Cepheid).

Die PCR-Produkte konnten quantifiziert werden. Hierfür diente der Fluoreszenz-Schwellenwert Ct. Dieser Ct-Wert, der durch die eingesetzte Software ermittelt wurde, gab den Zyklus der PCR an, bei dem die Fluoreszenz der Probe die Hintergrundfluoreszenz erstmalig überschritt. Dies bedeutete, dass ein früheres Eintreten des Schwellenwerts mit einer höheren Genexpression korrelierbar war. Zusätzlich wurde jede zu untersuchende Probe normalisiert, wobei gemessene Expression der zu untersuchenden mRNAs zu einem Verhältnis auf die mRNA von Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), einem konstitutiv exprimierten Gen in jeder Zelle, gesetzt wurde. Die Differenz zwischen Zielgen und GAPDH ergab den ΔCt -Wert:

$$\Delta Ct = Ct(\text{Zielgen}) - Ct(\text{GAPDH})$$

Je niedriger dieser Wert ausfiel, desto höher war die Expression des Zielgens. Die Differenz der zu vergleichenden Proben (zwischen Untersuchungstag und Kontrolltag) ergab den $\Delta\Delta Ct$ -Wert, der die relative Veränderung der zu untersuchenden Genexpression widerspiegelte (Pfaffl et al., 2004):

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{Versuchstag}) - \Delta Ct(\text{Kontrolltag})$$

Handelte es sich demnach um eine Differenz über „0“, fand eine Reduktion der Genexpression am Versuchstag statt. Aus Gründen des schnellen Überblicks wurde ein negativer $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert gebildet, wodurch eine geringere Expression des Zielgens am zu untersuchenden Tag auch einen negativen Wert in der Darstellung fand.

4.2.8.1 Nachweis der zellulären Genexpression

Die eingesetzte RNA stammte aus Organen von infizierten und nicht-infizierten Mäusen. Nach Isolierung und Einstellung der Konzentration auf 50ng/ μl RNA (siehe hierzu 4.2.7) wurden qRT-PCR-Ansätze der nachzuweisenden zellulären Produkte hergestellt, die folgendes enthielten:

Volumen	Bestandteil
12,5 μl	SYBR-Green-Mix
2,5 μl	Primer-Mix
0,25 μl	Reverse Transkriptase
8,75 μl	H ₂ O (auch im QuantiTect SYBR Green PCR Kit enthalten)

Die Firma Qiagen (Hilden) lieferte alle Primer, wobei sense- und anti-sense-Primer in einem Verhältnis von 1:2 vermischt werden mussten (Primer-Mix).

Den insgesamt 24 μl wurde 1 μl Probe (50ng RNA) der bereits unter 4.2.8 hergestellten RNA hinzupipettiert. Im SmartCycler wurden folgende Zyklen durchgeführt und im Anschluss die Probe verworfen:

Dauer	Temperatur
10min	50°C
3min	95°C
10sec	95°C
30sec	60°C
0,2°C /sec	Von 40°C auf 90°C

} 40 Zyklen

4.2.8.2 Nachweis der RNA-Expression viraler Matrixproteine

Die in den Experimenten eingesetzte RNA stammte aus infizierten und nicht-infizierten Mäusen isoliert nach in 4.2.7 aufgeführter Methode. Da der Nachweis der Matrixprotein-RNA von Inflenzaviren mit der Viruslast in Organen korrelierte, konnte auch über diese Methode eine Aussage über die virale Last getroffen werden (Spackman et al., 2002).

Der IVA-Primer-Mix enthielt neben den Primern für das Matrixprotein (Metabion) zudem die Detektionssonde (Metabion):

Volumen	Bestandteil des IVA-Primer-Mix
20µl	Influenza-A-forward (100pmol/µl)
30µl	Influenza-A-reverse (100pmol/µl)
2,5µl	Sonde (100pmol/µl)
147,5µl	DEPC-H ₂ O

Die Vorbereitung der Proben erfolgte wie folgt:

Volumen	Bestandteil
12,5µl	SYBR-Green-Mix
2,5µl	Primer-Mix
0,25µl	Reverse Transkriptase
8,75µl	H ₂ O (auch im QuantiTect SYBR Green PCR Kit enthalten)

Diesen 24µl wurde 1µl (50ng RNA) der bereits unter 4.2.8 hergestellten RNA hinzupipetiert, im SmartCycler folgende Zyklen durchgeführt und im Anschluss die Proben verworfen:

Dauer	Temperatur
10min	50°C
5min	95°C
15sec	95°C
30sec	57°C
30sec	60°C
0,2°C /sec	Von 40°C auf 90°C

} 40 Zyklen

4.2.9 *In vitro* Zytotoxizitätsassay

Diese Methode diente dem Nachweis zytotoxischer Zellen in der Maus, den Effektorzellen. Zielzellen, die radioaktiv markiert waren, wurden mit einem spezifischen Influenzaviruspeptid beladen. Eine durch die Effektorzell-verursachte spezifische Lyse der Zielzellen und die dadurch freigesetzten radioaktiven Mengen konnten gemessen werden.

Infizierte Mäuse wurden getötet und die Organe, deren zytotoxische Zellen untersucht werden sollten, entnommen. Nach der Herstellung einer Zellsuspension (siehe auch 4.2.2) wurden die Suspensionszellen gezählt und auf 10^7 Leukozyten/ml BSS eingestellt. Die Isolierung der Lymphozytenfraktion erfolgte mittels eines Dichtegradienten (Lympholyte-M Cell Separation Media, Biozol). Die Interphase, welche die Lymphozyten beinhaltet, wurde geerntet und dreimal mit BSS bei 1.200Upm für 10min und 4°C (5810 R-Zentrifuge, Eppendorf) gewaschen. Die Zellen wurden gezählt und im Anschluss auf 1×10^7 Lymphozyten/ml mit MEM-Medium eingestellt. Als Zielzellen dienen MHC-I-Typ H-2D exprimierende MC57-Zellen, die auf 5×10^6 Zellen/ml eingestellt waren. Für die radioaktive

Markierung dieser Zellen diente Chromium-51 (Perkin Elmer). 40µl der 5mCi/ml Chromium-51-Lösung (0,2mCi ^{51}Cr) wurde hinzupipettiert und 60min bei 37°C inkubiert, während zeitgleich die Beladung der Zellen mit 10µg/ml des immunodominanten Influenzapeptids NP₃₆₆₋₃₇₄ (Labor von S. Stevanovic, Universität Tübingen) stattfand. Die Aminosäuresequenz des Peptids richtete sich dabei nach dem Subtyp des Influenzavirus. So lautete die Sequenz für die aviären IAV H7N7, H5N1 und H5N2 ASENMEAM und für das humane H1N1v ASNENVEIM. Nach ^{51}Cr -Aufnahme und Peptidbeladung wurden die Zielzellen dreimalig mit BSS gewaschen (1.200Upm für 10min und 4°C) und auf 1×10^5 /ml mit MEM-Medium eingestellt.

Der Zytotoxizitätstest erfolgte im Doppelansatz in einer 96well Rundbodenplatte (Greiner bio-one). 150µl der Effektorzellen wurden in Well A1+B1 pipettiert und in die Wells 2-4/5 dieser Reihe 100µl Medium. Eine Titration erfolgte, indem 50µl von A1 bis A4 oder A5 titriert wurden. Durch Verwerfen von 50µl aus der letzten Titrationsstufe handelte es sich um eine Effektorzelltitration bei der das Well 1 10^6 Zellen beinhaltete und jedes weitere Well ein Drittel dieser Zellzahl. Die Zugabe von 100µl der Zielzellen erfolgte. Somit belief sich das erste Verhältnis von Effektor- zu Zielzelle auf 100:1 (10^6 Effektor- und 1×10^4 Zielzellen). Zusätzlich mussten noch Kontrollen angesetzt werden. Vier Wells wurden mit Zielzellen beladen, um die spontane Lyse messen zu können. In vier weitere Wells wurden Zielzellen und 100µl 1N HCl pipettiert, um die maximale Zielzelllyse und damit verbundene ^{51}Cr -Freisetzung messen zu können. Ein kurzes Abzentrifugieren der Platten für 3min bei 1.200Upm folgte, bevor sie 6h bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert wurden (Heraeus). Im Anschluss wurden 25µl Überstand in 96well Luma-Messplatten überpipettiert und diese über Nacht getrocknet. Die Messung der Platten erfolgte am nächsten Tag in einem Szintillationszähler, dem MicroBeta Counter 1750 (LKB Wallac).

Die Berechnung der spezifischen Lyse einer Probe folgte der Formel:

$$\% \text{ spezifische Lyse} = \frac{\text{cpm}[\text{Effektor}] - \text{cpm}[\text{Medium}]}{\text{cpm}[\text{Maximal}] - \text{cpm}[\text{Medium}]} * 100$$

Wobei:

cpm	=	Anzahl der Counts im Szintillationszähler/Minute (<i>Counts per minute</i>)
cpm[Effektor]	=	Anzahl der Counts in dem auszuwertenden Wells
cpm[Medium]	=	Anzahl der Counts durch spontane ^{51}Cr -Freisetzung
cpm[Maximal]	=	Anzahl der Counts in den HCl-beihaltenden Wells (maximale ^{51}Cr -Freisetzung)

4.2.10 Proliferations-Inhibitionsassay

Fünf Tage nach Infektion von Mäusen mit entweder der zehnfachen MLD_{50} der HAPIV (siehe hierzu 4.2.1) oder einer hohen (3×10^5 pfu/50 μ l) beziehungsweise niedrigen (3×10^3 pfu/50 μ l) H1N1v-Infektionsdosis wurden die Tiere getötet, Milz und Thymus entnommen und in eine Zellsuspension überführt (siehe 4.2.2.1). Aufgrund der limitierten Zellzahl mussten gleiche Organe desselben Infektionsversuchs gepoolt werden. Nach der Zellzahlbestimmung wurden die Milzen aufgeteilt. Ein Teil der Milz wurde auf 10^7 Leukozyten/ml in BSS eingestellt und ein Lympholyte-M Ficoll durchgeführt (siehe 4.2.9). Die isolierten Lymphozyten wurden gezählt und im Anschluss auf 1×10^7 Lymphozyten/ml mit P-Medium eingestellt. Der andere Teil der Milzprobe und die Thymusprobe dienten der Isolierung von Regulatorischen T-Zellen mittels $CD4^+CD25^+$ Regulatory T Cell Isolation Kit (Miltenyi). Alle Inkubationszeiten (und Zentrifugationen) verliefen ab hier bei 4°C (und 1.200U μ m, 10min). 10^7 Lymphozyten wurden zentrifugiert und im Anschluss dem Pellet 40 μ l MACS-Puffer und 10 μ l Biotin-Antikörper-Cocktail hinzupipettiert. Nach kurzer Resuspension und 10min Inkubation erfolgte die Zugabe von 30 μ l MACS-Puffer, 20 μ l anti-Biotin MicroBeads und 10 μ l anti-mouse CD25-PE (Miltenyi). Die Probe wurde kurz gevortext und für weitere 15min inkubiert. Das Waschen mit MACS-Puffer folgte, eine Zentrifugation und die Zugabe von 500 μ l MACS-Puffer. In dem AutoMACS-Gerät wurde das Programm „Depl025“ eingestellt und die daraus resultierende negative Fraktion für die Weiterverarbeitung verwendet. Die Probe wurde abzentrifugiert. Je Einheit gab man nun 90 μ l MACS-Puffer und 10 μ l anti-PE Microbeads dazu. Nach 15min Inkubation wurde die Probe wieder gewaschen und zentrifugiert. Die Zugabe von 500 μ l MACS-Puffer auf das Pellet erfolgte und die Probe nach Resuspension in das AutoMACS-Gerät platziert. Das Programm „Possel“ wurde gewählt. Bei der positiven Fraktion handelte es sich um die $CD4^+CD25^{\text{high}}$ Treg-Fraktion, deren Reinheit mittels eines kleinen Aliquots in der FACS-Analyse überprüft und Zellen gezählt wurden. Die übrigen Zellen wurden zentrifugiert und mit P-Medium auf 4×10^5 Zellen/ml eingestellt. Die Vorbereitung des T-Zellaktivator CD3/CD28 Dynabead (Invitrogen) folgte, wobei je Well $2,5 \times 10^5$ Dynabeads zum Einsatz kamen. Das erforderliche Volumen wurde in IMDM-Medium durch Magnetische Bindung mittels DynaMag (Invitrogen) gewaschen. Die Flüssigkeit wurde entfernt und die Beads auf 1×10^7 /ml mit P-Medium eingestellt.

Das Ansetzen einer 96well Flachbodenplatten für den Inhibitions-Proliferationstest folgte. Für jede zu untersuchende Proliferations-Inhibitionspopulation gab es vier benötigte Ansätze:

Ansatz	Inhalt
1	5×10^5 Lymphozyten
2	5×10^5 Lymphozyten + $2,5 \times 10^5$ Dynabeads
3	5×10^5 Lymphozyten + $2,5 \times 10^5$ Dynabeads + 1×10^4 Tregs aus der Milz
4	5×10^5 Lymphozyten + $2,5 \times 10^5$ Dynabeads + 1×10^4 Tregs aus dem Thymus

Zusätzlich gab es Wells, die nur Medium oder Tregs enthielten. Das Endvolumen jedes Wells betrug 100 μ l. Eine 60h Inkubation bei 37°C, 5% CO₂ folgte. Danach wurde jedem Well 0,5 μ Ci ³H-methyl-Thymidin (MP Biomedical) in 50 μ l frischem P-Medium dazugegeben und für weitere 18h inkubiert. Für das darauffolgende Ernten der Platten wurde ein Cell Harvester (LKB Wallac) verwendet, wobei die Platten in das Gerät platziert und die Zellen durch mehrmaliges Aufziehen und waschen auf eine Filtermatte (LKB Wallac) überführt wurden. Diese Matte trocknete im Anschluss 10min bei 100°C, bevor ein Szintillationswachs (LKB Wallac) 2min lang bei 100°C auf die Membran platziert wurde und schmolz. Nach anschließender Aushärtung wurde die mit dem Szintillationswachs beschichtete Filtermatte zum Auszählen in den MicroBeta Counter platziert. Für die Auswertung wurde die gemessene cpm-Wert nach der Überprüfung angegeben, dass ein erhöhter ³H-Einbau des Ansatzes 2 gegenüber Ansatz 1 gegeben war.

4.2.11 Zytokinnachweis in der Maus

Für den Zytokinnachweis wurde das Multiplex Suspensions-System von Bio-Rad verwendet. Infizierte Tiere wurden getötet und die zu untersuchenden Organe entnommen. Zusätzlich wurde das Serum der Mäuse gewonnen, indem Vollblut in Serumprobengefäße (Sarstedt) überführt und 5min bei 13.000g (Sigma) zentrifugiert wurden. Für den Nachweis von Zytokine in den Organen erfolgte ein zweimaliger Homogenisierungsschritt der Organe mittels Lysepuffer (Bio-Rad) im FastPrep (MP Biomedicals) für je 20sec. Danach wurden die Organproben bei 14.000g für 10min, 4°C (Sigma) zentrifugiert, der Überstand geerntet und in den Versuch eingesetzt. Proben wurden in unterschiedlichen Verdünnungen in die Platte des Bio-plex mouse cytokine Th1/Th2 Kits (Bio-Rad) pipettiert und nach Herstellerprotokoll auf die Zytokinexpression untersucht. Die zu messenden Platten wurden in das Bio-Plex 200 (Bio-Rad) platziert und jede gemessene Zytokinkonzentration anschließend durch die geräteeigene Software in pg/ml angegeben.

4.2.12 Thymusverdau

Thymi mussten enzymatisch verdaut werden, um Epithelzellen zu gewinnen. Hierfür wurden bis zu drei Thymi leicht angeschnitten und in 50ml RPMI-Medium (Gibco) 30min bei 4°C auf einem Magnetrührer platziert. Auf diese Weise konnte ein Großteil der im Thymus vorhandenen Thymozyten mechanisch aus dem Organ gewaschen werden (Suspensionszellen). Im Anschluss wurden die Thymusfragmente mittels einer 10ml Glaspipette in neuem RPMI-Medium mehrfach pipettiert, um weitere Suspensionszellen zu verlieren. Darauf folgte der enzymatische Verdau der Fragmente in 5ml RPMI-Medium, dem 0,1% DNase (Roche) und 0,125% Collagenase (Roche) zugefügt waren, bei 15min und 37°C im Wasserbad (Köttermann). Alle 5min wurden die Stücke mittels Glaspipette pipettiert. Zuerst erfolgte dieser Schritt mit einer 10ml Glaspipette, danach unter Verwendung einer 5ml Glaspipette. Anschließend wurde das Verdaumedium erneuert und die übrigen Zellaggregate unter Verwendung einer 26G-Kanüle (BD Medical Systems) aufgebrochen. Diese Probe wurde nun bei 1.200rpm, 10min, 4°C (5810 R-Zentrifuge, Eppendorf) zentrifugiert, in 10ml FACS-Puffer aufgenommen und noch mögliche vorhandene Trümmer entfernt (Originalfraktion, Ori). Die Gesamtzellen der Proben wurden ermittelt, auf 10^7 pro Probe eingestellt und nach CD45 magnetisch isoliert. CD45 ist ein Leukozytenmarker, der auf Epithelzellen nicht vorkommt und Epithelzellen konnten so innerhalb der gewonnenen Suspension von Leukozyten getrennt werden. Die Probe wurde 10min bei 1.200 Upm, 4°C zentrifugiert und der komplette Überstand verworfen. Die Zugabe von 90µl MACS-Puffer und 10µl CD45-MicroBeads (Miltenyi) erfolgte mit daran anschließender Inkubation für 15min, 4°C. Danach wurde die Probe gewaschen, zentrifugiert und in frischen 500µl MACS-Puffer aufgenommen. Die Zellseparation im AutoMACS (Miltenyi) mittels des Programms „Pessel“ folgte und die hieraus gewonnenen Fraktionen, nicht-magnetisch markierte CD45⁻-Zellen und die magnetisch markierte CD45⁺-Zellfraktion, wurde mittels FACS-Analyse auf ihre Reinheit überprüft. Alle vier zu untersuchenden Fraktionen (Suspensionszellen, Originalfraktion, CD45⁺- und CD45⁻-Zellfraktion) wurden abzentrifugiert und in Trizol für die anschließende RNA-Isolierung (4.2.7) und Nachweis auf virale M-Protein-RNA (4.2.8.2) aufgenommen.

4.2.13 Adoptiver Transfer von regulatorischen T-Zellen

Die Wirksamkeit Regulatorischer T-Zellen nach Influenzavirusinfektion sollte untersucht werden. Hierfür wurde Treg adoptiv transferiert und Abbildung 5.XXV stellt den schematischen Aufbau des Versuches dar. Zehn Donormäuse wurden mit je 3×10^5 pfu/50 μ l H1N1v infiziert und vier Tage später getötet. Die regulatorischen T-Zellen der Milz wurden isoliert (siehe hierzu 4.2.10), die Reinheit der Treg-Fraktion überprüft und die isolierten Zellen auf 5×10^6 Zellen/ml eingestellt. Die isolierte Treg-Fraktion wurde im Anschluss drei Akzeptormäusen appliziert, die vier Tage zuvor und damit zeitgleich wie die Donormäuse mit einer subletalen (3×10^3 pfu/50 μ l) H1N1v-Infektionsdosis infiziert wurden. Die i.v.-Applikation belief sich auf 1×10^6 Zellen in 200 μ l PBS. Parallel wurden weitere sechs Mäuse mit 3×10^3 pfu/50 μ l H1N1v infiziert, wovon bei dreien eine Rapamycin-Behandlung durchgeführt wurde (Zhang et al., 2010). Diese Mäuse erhielten an Tag 4, 5 und 6 nach Infektion i.p. je 0,6mg/kg Rapamycin (Merck) in PBS. Die übrigen drei Mäuse dienten unbehandelt als Kontrolle.

Ab dem Tag der Infektion wurden alle Mäuse, die mit 3×10^3 pfu/50 μ l H1N1v infiziert wurden, gewogen und der Gesundheitszustand bestimmt (4.2.1). Zusätzlich kam das Animal Monitoring System (Respironics) zum Einsatz. Daher musste diesen Mäusen bereits 14 Tage vor Infektion ein Sender i.p. implantiert werden. Die Mäuse wurden hierfür anästhesiert und der Sender in die Bauchhöhle platziert. Nach erfolgter Implantation wurde der Gesundheitszustand kontrolliert. Gesunde Sender-tragende Mäuse konnten nun infiziert und in den Versuch mit einbezogen werden. Der Sender lieferte alle 5min eine Signal an einen Empfänger, aus dem Temperatur und Bewegungsaktivität des Tieres hervorging.

4.2.14 Infektion der Ratten und Grundlagen der Tierversuche

Zehn Wochen alte Lewis-Ratten wurden mittels Diethylether (Carl Roth) betäubt und unter Verwendung einer 26G-Injektionsnadel (BD Medical Biosystems) mit 50 μ l eines zehnpromzentigen Borna Disease Virus-positiven Gehirnhomogenats i.c. infiziert:

Virus	Infektion
BDV Gießen He/80	Zehnprozentiges Gehirnhomogenat, 50 μ l/Ratte i.c.

Aufgrund der Einschränkung ihrer motorischen Fähigkeiten wurden die Versuchstiere ab dem 14. Tag nach Infektion mit Flüssigkeit versorgt und für die darauffolgenden Experi-

mente durch Diethylether getötet. Ratten wurde mit 50ml BSS perfundiert und die zu untersuchenden Organe entnommen.

4.2.15 FACS-Analysen in der Ratte

4.2.15.1 Färbung einer Suspension ausgehend vom Organ, extrazellulär

Nach der Perfusion der Ratten wurden die zu untersuchenden Organe entnommen. Während aus den Lymphknoten mithilfe von BSS und Zellsieb (BD Bioscience) eine Zellsuspension identisch zu der in 4.2.2.1 beschriebenen Methode hergestellt werden konnte, mussten die Gehirne zur Herstellung einer Einzelzellsuspension enzymatisch verdaut werden. Das Gewicht der einzelnen Gehirne wurde ermittelt und die Gehirne unter Verwendung eines Skalpell geschnitten. Die Fragmente wurden mit BSS gewaschen und kurz bei 300g für 2min (5810 R-Zentrifuge, Eppendorf) abzentrifugiert. Zur Herstellung der Zellsuspension kam das Neronal Tissue Dissociation Kit (Miltenyi) zum Einsatz. Je 400mg Gehirn wurden 1950µl eines ersten Enzymmixes dazupipettiert und die Proben 15min bei 37°C enzymatisch verdaut. Während dieses Schritts mussten die Proben alle 5min invertiert werden. Danach erfolgte die Zugabe von 30µl/Einheit eines zweiten Enzymmixes. Die Proben wurden wieder invertiert und anschließend mit einer 10ml Glaspipette langsam mehrmals pipettiert. Weitere 10min wurden die Proben im 37°C Wasserbad inkubiert, bevor sie durch ein Zellsieb in eine Zellsuspension überführt werden konnten. Ein Zentrifugationsschritt für 10min bei 300g, RT (Eppendorf) folgte. Anschließend wurden die Proben mit BSS gewaschen und letztlich in 10ml BSS aufgenommen. Durch einen Inkubationsschritt für 30min auf Eis konnten sich Fragmente absetzen. Die für die FACS-Analyse einzusetzenden Zellen befanden sich in der oberen, flüssigen Phase.

Je FACS-Probe wurden nach Zellzahlermittlung 1×10^6 Leukozyten überführt und mit FACS-Puffer bei 1.200Upm, 4°C, 10min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und dem Zellpellet die erforderlichen Fluoreszenz-markierten Antikörper in 100µl FACS-Puffer bei einer 1:100 Verdünnung je Antikörper hinzupipettiert. Nach einer 30minütigen Inkubation und darauffolgendem Waschschrift (1.200Upm, 4°C, 10min) wurden die Zellen in 1ml FACS-Erythrozytenlysegebrauchslösung (BD Bioscience) aufgenommen und im FACSCalibur ausgewertet.

4.2.15.2 Färbung einer Suspension ausgehend vom Organ, intrazellulär

Nach der in 4.2.15.1 beschriebenen Anfärbung extrazellulärer Antigene wurden die Proben statt in FACS-Erythrozytenlysegebrauchslösung in 1ml einer Fixation/Permeabilization Arbeitslösung (eBioscience) aufgenommen. Die Proben wurden über Nacht inkubiert und am nächsten Morgen das Fixativ mittels Zugabe von 3ml Permeabilisationspuffer (eBioscience) bei 1.000Upm, 4°C, 10min entfernt. Im Anschluss mussten freie Bindungsstellen blockiert werden. Hierfür wurden 3µl eines anti-rat CD32-Fc-Blocks (BD Bioscience) für 15min bei 4°C in 100µl Permeabilisationspuffer verwendet. Danach erfolgte die Zugabe von 2,5µl des anti-Ratte foxp3-Antikörper für 45min bei 4°C. Nach der Inkubation wurden die Proben zweimal mit Permeabilisationspuffer gewaschen, zentrifugiert und in 1ml FACS-Puffer aufgenommen. Die Probe konnten im Anschluss im FACSCalibur gemessen und ausgewertet werden.

4.2.16 Zytokinnachweis in der Ratte

Identisch zu 4.2.11 wurde für den Zytokinnachweis in der Ratte ebenfalls das Multiplex Suspensions-System von Bio-Rad verwendet. Gehirne von BDV-infizierten Ratten (Tag 14, 21, 28 und 35 nach Infektion) dienten dem Nachweis von Zytokinen. Nach Entnahme der Gehirne wurden diese gewogen. Aufgrund der großen Massen wurden den Gehirnen vom Herstellerprotokoll (Bio-Rad) abweichend, 1,2ml Lysepuffer hinzupipettiert und im FastPrep lysiert. Zusätzlich wurden sie daraufhin eingefroren und wieder aufgetaut, um die Lyse von Zellen zu unterstützen. Danach erfolgte eine zehnmünütige Zentrifugation bei 19.000g und 4°C (Sigma). Die obere flüssige Phase diente dem Nachweis von Zytokinen. Parallel wurde den Ratten Serum entnommen (Aufarbeitung siehe 4.2.11)

Alle zu untersuchenden Proben wurden mit Assay-Puffer (Bio-Rad) in unterschiedlichen Konzentrationen in einer 96well V-Boden-Platte (Greiner bio-one) verdünnt und danach nach Herstellerprotokoll in den Bio-Plex Rat Cytokine 9-Plex A Panel (Bio-Rad) eingesetzt. Das Bio-Plex 200 (Bio-Rad) lieferte nach Messung die exakten Konzentrationen (pg/ml) der untersuchten Zytokine mittels geräteeigener Software.

4.2.17 Proliferations-Inhibitionsassay mit Zellen aus BDV-infizierten Ratten

Das inhibitorische Potenzial der in das Gehirn infizierter Ratten einwandernden regulatorischen T-Zellen sollte untersucht werden. Daher wurden Ratten 28 Tage nach Infektion getötet und Gehirne ebenso wie Milzen entnommen. Parallel wurden auch Milz nicht-infizierter Kontrolltiere entnommen. Die Gehirne wurden gewogen und nach beschriebenen Protokoll aufgetrennt (4.2.15.1). Die durch diese Methode gewonnene Zellfraktion konnte eingesetzt werden, um Tregs anzureichern. Von der Milz wurde eine Zellsuspension hergestellt (4.2.2.1) und nach der Zellzahlbestimmung sowohl von Milz als auch Gehirn 3×10^7 Leukozyten für die Treg-Isolierung überführt. Die Proben wurden 10min bei 1.200Upm, 4°C zentrifugiert und im Anschluss 15µl des anti-Ratte CD25-PE-Antikörpers (BD Bioscience) in 500µl FACS-Puffer hinzupipettiert. Ein Inkubationsschritt für 30min, 4°C folgte bevor die Proben mit FACS-Puffer gewaschen und dem Zellpellet 100µl einer 1:10-Verdünnung in MACS-Puffer des anti-PE-MultiSort MicroBead (Miltenyi) für 15min, 4°C inkubiert wurden. Anschließend wurden die Proben 10min bei 1.200Upm, 4°C mit MACS-Puffer gewaschen, das Zellpellet in 500µl MACS-Puffer aufgenommen und im AutoMACS (Miltenyi) mit dem Programm „Possel“ separiert. Die magnetisch-positive Fraktion enthielt CD25⁺ Zellen. Um den gebundenen magnetischen Bead an den anti-Ratte CD25-PE-Antikörpern zu entfernen, wurde den Proben 20µl des MultiSort Release Reagent (Miltenyi) pro 1ml Zellsuspension hinzugegeben. Nach kurzem Vortexen erfolgte eine zehnmünütige Inkubation bei 4°C und anschließender Zentrifugation (10min, 1.200Upm, 4°C). Der Überstand wurde abgenommen und 150µl MACS-Puffer und 90µl MultiSort Stop Reagent (Miltenyi) auf die Probe pipettiert. Die Proben wurden gut gemischt und für 2min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 60µl des anti-Ratte CD4 MicroBead (Miltenyi) je Probe und 15minütiger Inkubation bei 4°C. Die Proben wurden anschließend wieder gewaschen und in 500µl MACS-Puffer resuspendiert. Durch das Einsetzen der Probe in den AutoMACS unter Verwendung des Programms „Possel“ konnten magnetisch-positive CD4⁺-Zellen separiert werden. Eine Anreicherung von Tregs lag vor. Diese Fraktion wurde zentrifugiert und anschließend mit P-Medium auf 1×10^4 Zellen/20µl eingestellt.

Parallel konnten die Zielzellen vorbereitet werden. Hierfür wurde die ursprüngliche Milzzellsuspension eingesetzt. Die Lymphozyten wurden isoliert (siehe hierfür 4.2.9), anschließend auf 5×10^5 Lymphozyten/50µl in P-Medium eingestellt und hiervon 50µl/well in

eine 96well-Platte eingesetzt. Die Proliferation der Milz-Lymphozyten konnte erreicht werden, indem den Zielzellen 20 μ l eines Überstandes von Zellen hinzugegeben wurde, die mit Concavalin-A (Biochrom AG) zur IL-2-Produktion angeregt wurden, und 10 μ l einer 3mg/ml PHA-M-Lösung (Sigma-Aldrich). Das Endvolumen jedes Wells betrug 100 μ l:

Ansatz	Inhalt
1	5x10 ⁵ Lymphozyten
2	5x10 ⁵ Lymphozyten + ConA-Überstand + PHA-M
3	5x10 ⁵ Lymphozyten + ConA-Überstand + PHA-M + 1x10 ⁴ Tregs aus der Milz
4	5x10 ⁵ Lymphozyten + ConA-Überstand + PHA-M + 1x10 ⁴ Tregs aus dem Gehirn

Die Zellen wurden für 60h bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe des radioaktiven ³H-methyl-Thymidin (0,5 μ Ci in 50 μ l P-Medium) und ein weiterer Inkubationsschritt für 18h, 37°C, 5% CO₂. Die Ernte und Messung des radioaktiven Einbaus der Zielzellen erfolgte identisch zu 4.2.10.

5 Ergebnisse

Infektionen mit hochpathogenen Influenzaviren verursachen häufig schwere und fatal verlaufende Erkrankungen. Die Ursachen für die hohe Virulenz dieser Influenza-A-Viren (IAV) sind noch nicht vollständig bekannt und sollten im Rahmen dieser Arbeit im Mausmodell näher untersucht werden. Da fatale Fälle einer Influenzavirusinfektion durch hochpathogene Influenza-A-Viren (HPAIV) und das 2009 aufgetretene pandemische H1N1-Influenzavirus (H1N1v) meist mit einer Lymphopenie einhergehen (Maines et al., 2008; Wen et al., 2011), lag der Fokus der vorliegenden Arbeit auf der T-Zellantwort nach Influenzavirusinfektionen *in vivo*. Um eine möglichst generelle Aussage machen zu können, wurden verschiedene Virusstämme verwendet, von denen erwartet werden konnte, dass sie unterschiedliche Auswirkungen auf den Wirtsorganismus mit sich bringen.

5.1 Die Verteilung der T-Zellen nach einer Influenzavirusinfektion

Um zu zeigen, dass die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten HPAI-Viren eine Lymphopenie in der Maus verursachten, sollten zunächst die unterschiedlichen T-Zellpopulationen nach Influenzavirusinfektionen quantifiziert werden. Mäuse wurden intranasal mit einem HPAIV infiziert, entweder mit dem H7N7-Stamm (A/Bratislava/79) oder einem H5N1-Wildisolat (A/mallard/Bavaria/1/2006). Von beiden Viren war die intranasale, C57BL/6-Maus spezifische letale-Dosis-50 (MLD₅₀) vorher bestimmt worden. Da diese HPAIV eine MLD₅₀ von 2×10^2 pfu/50µl (H7N7) beziehungsweise 2×10^3 pfu/50µl (H5N1) hatten, wurden die Mäuse entweder mit 2×10^3 pfu/50µl (H7N7) oder 2×10^4 pfu/50µl (H5N1) infiziert, was einer zehnfachen MLD₅₀-Dosis entsprach. Zusätzlich wurden das niedrigpathogene aviäre H5N2-Influenzavirus (A/mallard/Bavaria/1/2005) und das pandemische humane H1N1v-Influenzavirus (A/Regensburg/D6/09) in den Versuchen eingesetzt. Für das H1N1v wurde eine MLD₅₀ von 3×10^4 pfu/50µl bestimmt. Für das H5N2-Virus konnte bis zu einer Infektionsdosis von 1×10^5 pfu/50µl keine Erkrankung der Mäuse beobachtet werden. Daher wurden die Infektionsdosen von H5N2 und H1N1v an die Infektionsdosis des H5N1-Wildisolats angepasst und Mäuse, wenn nicht anders erwähnt, mit 1×10^4 pfu/50µl H5N2 oder H1N1v intranasal infiziert.

Sechs Tage nach der Infektion wurden die Mäuse getötet und in unterschiedlichen Organen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen mittels Analyse in der Durchflusszytometrie nachgewiesen

(Abbildung 5.I). Zu diesem Zeitpunkt war im mediastinalen Lymphknoten (mLN) eine durch HPAIV-induzierte Lymphopenie zu erkennen (Abbildung 5.IA).

Die Zahl der CD4⁺ T-Zellen ging am Tag 6 nach H7N7-Infektion um 55%, nach H5N1-Infektion auf 12% zurück, was einer Reduktion von 52% entsprach. Durch die H5N2-Infektion konnte keine Reduktion der CD4⁺ T-Zellfrequenz beobachtet werden, während auch durch H1N1v-Infektion die Population leicht um 16% zurückging.

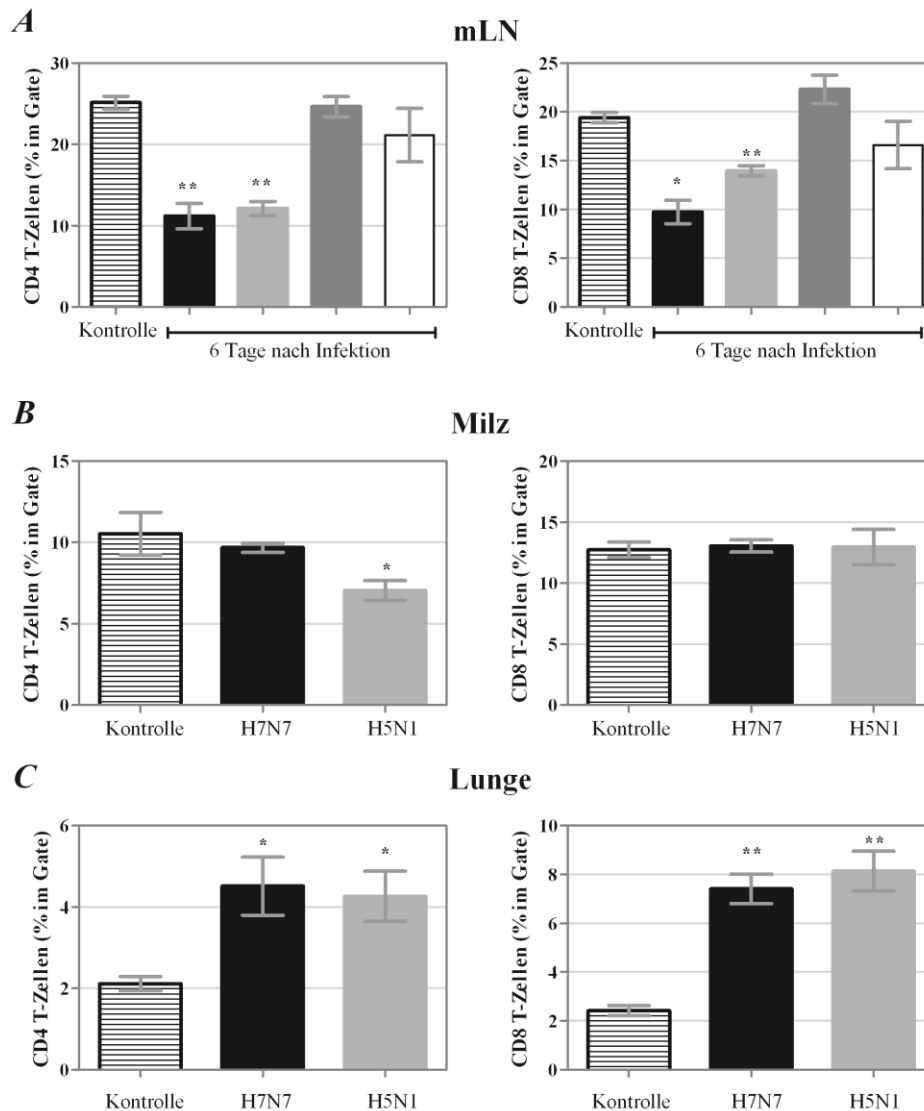


Abbildung 5.I Die Verteilung der unterschiedlichen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellpopulationen nach einer Influenzavirusinfektion. Links sind die nachgewiesenen CD4⁺ T-Zellen und in der rechten Spalte die CD8⁺ T-Zellen aufgeführt. (A) zeigt die beiden T-Zellpopulationen nach einer H7N7- (schwarz), H5N1- (hellgrau), H5N2- (dunkelgrau) und H1N1v- Infektion (weiß) im mediastinalen Lymphknoten sechs Tage nach Infektion im Vergleich zur Kontrolle auf. In (B) sind die zwei T-Zellpopulationen sechs Tage nach Infektion mit H7N7 (schwarz) und H5N1 (grau) in der Milz dargestellt. (C) weist die T-Zellpopulation innerhalb der Lunge nach sechstägiger H7N7- (schwarz) oder H5N1-Infektion (grau) auf (n = 3 bis 7 Tiere). Die Standardabweichung ist als SEM angegeben. Der T-Test gibt die Signifikanzen an, wobei * für ein p-Wert < 0,05 und ** p < 0,01 steht.

Die Entwicklung der CD8⁺ T-Zellpopulation war nach den unterschiedlichen IAV-Infektionen ähnlich. Während sich durch eine H7N7-Infektion die zytotoxische T-Zellpopulation um 49%, durch H5N1 um 28% und H1N1v um 14% reduzierte, nahm der Anteil an CD8⁺ T-Zellen nach H5N2-Infektion leicht zu. Da durch HPAIV-Infektionen die höchste Reduktion der T-Zellen nachweisbar war, wurden zusätzlich noch Milz und Lunge auf die T-Zellpopulationen hin untersucht. In der Milz konnte ein signifikanter Rückgang der CD4⁺ T-Zellen nach H5N1-Infektion gemessen werden (Abbildung 5.1B). Zusätzlich wurde noch die T-Zellzahl nach HPAIV-Infektion in der Lunge bestimmt. Vor einer Infektion waren wenige T-Zellen in der Lunge vorhanden, durch die Infektion der Lunge stieg die Zahl der T-Zellen sechs Tage nach Infektion an (Abbildung 5.1C).

Diese ersten Versuche zeigten, dass die eingesetzten HPAIV einen signifikanten Rückgang der T-Zellen innerhalb des lymphoiden Systems verursachten. Weitere Versuche folgten, um die virale Präsenz in verschiedenen Organen der Maus und den Einfluss der Infektion auf die T-Zellpopulationen besser zu charakterisieren.

5.2 Die Verteilung der unterschiedlichen Infuenzaviren *in vivo*

Um die Verteilung der Viren nach Infektion aufzuzeigen, wurden C57BL/6-Mäuse mit 2×10^3 pfu/50 μ l (H7N7), 2×10^4 pfu/50 μ l (H5N1), 1×10^4 pfu/50 μ l (H5N2 oder H1N1v) infiziert und sechs Tage nach Infektion getötet. Organe wurden entnommen, in ein zehnpromzentiges Organhomogenat überführt und in der Virustitration eingesetzt (Tabelle 2.i).

Tabelle 5.i Virusverteilung in der Maus sechs Tage nach Infektion*.

	Lunge	mLN	Thymus	Milz	Niere	Gehirn
H7N7	5,24 \pm 0,19	3,71 \pm 0,24	3,85 \pm 0,23	3,61 \pm 0,22	< 1,7	< 1,7
H5N1	5,29 \pm 0,06	3,80 \pm 0,35	2,84 \pm 0,21	< 1,7	< 1,7	< 1,7
H5N2	2,91 \pm 0,52	2,05 \pm 0,31 [#]	< 1,7	< 1,7	< 1,7	< 1,7
H1N1v	5,65 \pm 0,49	2,22 \pm 0,77	1,82 \pm 0,10*	3,27 \pm 0,28	< 1,7	< 1,7

*Der Virustiter ist angegeben als der Logarithmus in Foci-bildenden Einheiten je 1ml eines zehnpromzentigen Organhomogenats (n = 4 Mäuse). Die Standardabweichung ist als SEM angegeben und die Detektionsgrenze des Test beläuft sich auf log 1,7. # Eine geringe virale Last konnte in einem von vier Proben nachgewiesen werden.

Nach H7N7, H5N1 aber auch H1N1v war ein hoher Titer an infektiösem Virus im Vergleich zu dem Titer nach H5N2-Infektion in der Lunge nachweisbar. Zudem konnten infektiöse Viruspartikel aller getesteten Viren im mediastinalen Lymphknoten nachgewiesen werden, wobei die höchste virale Last durch die HPAIV gezeigt werden konnte. Während

bei allen H1N1v-infizierten Mäusen infektiöses Virus im Lymphknoten auftrat, konnte nur bei einem von vier Lymphknoten nach H5N2-Infektion infektiöses Virus nachgewiesen werden. H5N2 infizierte den Thymus nicht, während H1N1v in dem Thymus einer Maus zu finden war. Sowohl H7N7 als auch H5N1 infizierten den Thymus in allen Versuchstieren. Des Weiteren konnten infektiöse Viruspartikel nach H7N7 und H1N1v, aber nicht nach H5N1 und H5N2 in der Milz nachgewiesen werden. In Niere, Gehirn und Leber konnte kein infektiöses Virus detektiert werden. Zusammenfassend waren speziell lymphoide Organe von einer Influenzavirusinfektion betroffen. Um diese Daten zu verifizieren und zu untersuchen, ob die Viren schon früh in die lymphoiden Organe wanderten, wurden für H7N7 und H5N1 quantitative real-time Analysen (qRT-PCR) durchgeführt (Abbildung 5.II). Mäuse wurden mit 2×10^3 pfu/50 μ l (H7N7) beziehungsweise 2×10^4 pfu/50 μ l (H5N1) infiziert und je vier Tiere von Tag 1 bis Tag 6 nach Infektionen getötet. Von diesen Mäusen wurde die RNA der Lungen, der mediastinalen LNs und der Thymi isoliert. In der qRT-PCR wurde anschließend die Menge an viraler M-Protein-RNA detektiert.

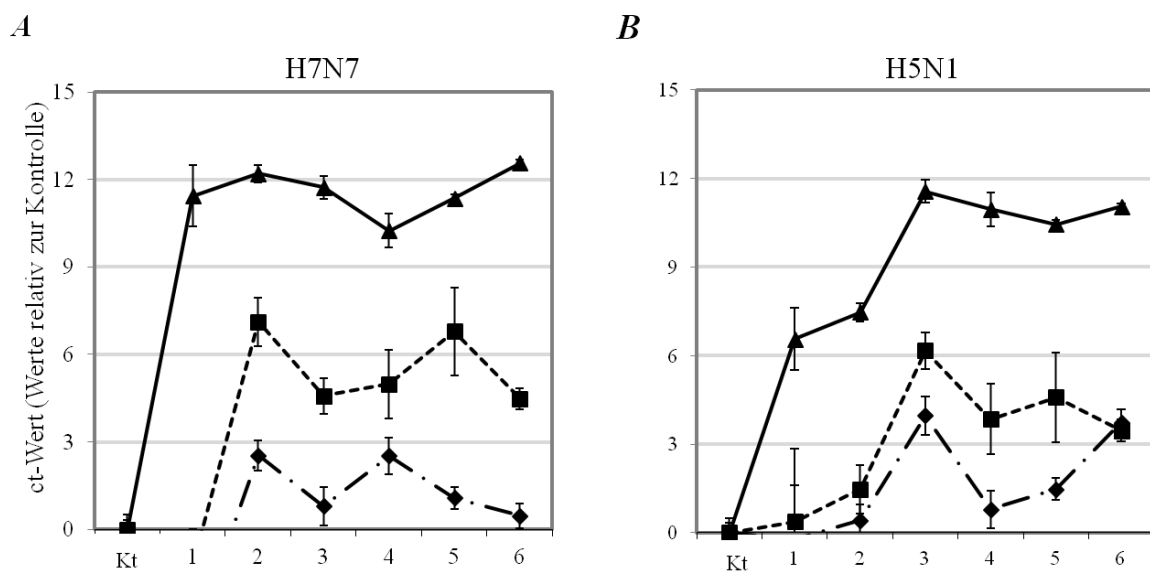


Abbildung 5.II mRNA-Nachweise des viralen M-Proteins nach (A) H7N7- beziehungsweise (B) H5N1-Infektion bis zu sechs Tage nach Infektion ($n = 4$ Mäuse). Kt steht für Proben uninfizierter Mäuse. Für jede Virusinfektion wurden Lunge (▲), mLN (■) und Thymus (◆) auf virale M-Protein-mRNA getestet.

Während ein Tag nach Infektion in der Lunge virale RNA beider HPAIV nachgewiesen wurde, konnte nach H7N7-Infektion erst ab Tag 2 nach Infektion M-Protein-RNA sowohl in mLN als auch in Thymus nachgewiesen werden. Für alle drei getesteten Organe erreichte die virale Last schon ab Tag 1 (Lunge) beziehungsweise Tag 2 (mLN, Thymus) ein Pla-

teau. In keinem der Organe wurde das Virus eliminiert (Abbildung 5.IIA). Während die H5N1-Infektion das Maximum an M-Protein-RNA für alle drei Organe erst an Tag 3 nach Infektion erreichte, war der mLN schon ein Tag nach Infektion zum Teil infiziert. Ab dem zweiten Tag nach Infektion war auch der Thymus M-Protein-RNA-positiv. Auch hier erfolgte keine Eliminierung des Virus (Abbildung 5.IIB).

Die Infektion des mediastinalen Lymphknoten und des Thymus konnte auch durch diese Methode bestätigt werden. Zudem zeigte dieser Nachweis, dass bereits sehr früh virale RNA in den lymphoiden Organen zu finden war, der Maus-adaptierte H7N7-Virusstamm verbreitete sich hierbei schneller als das H5N1-Wildtypisolat. Die Ergebnisse der Virus-titrationen und qRT-PCRs ließen die Vermutung zu, dass HPAI-Viren gezielt Organe des lymphoiden Systems infizierten.

5.3 Der Thymus als Ziel der Influenzavirusinfektion

Die Infektion des Thymus durch Influenzaviren ohne gleichzeitig auftretende systemische Infektion wurde bisher in der Literatur noch nicht beschrieben. Aus diesem Grund wurde der Thymus sechs Tage nach i.n. IAV-Infektion (2×10^3 pfu/50 μ l [H7N7], 2×10^4 pfu/50 μ l [H5N1], 1×10^4 pfu/50 μ l [H5N2 beziehungsweise H1N1v]) morphologisch untersucht und fotografiert (Abbildung 5.III). Wie zu sehen war, verlor der Thymus während der Infektion mit den hochpathogenen aviären Influenzaviren an Größe (Abbildung 5.IIIA und **B**). Diese Atrophie konnte weder nach Infektion mit dem niedrigpathogenen H5N2-Virus noch nach der subletalen Infektion mit dem humanen H1N1v-Virus nachgewiesen werden (Abbildung 5.IIIC und **D**).

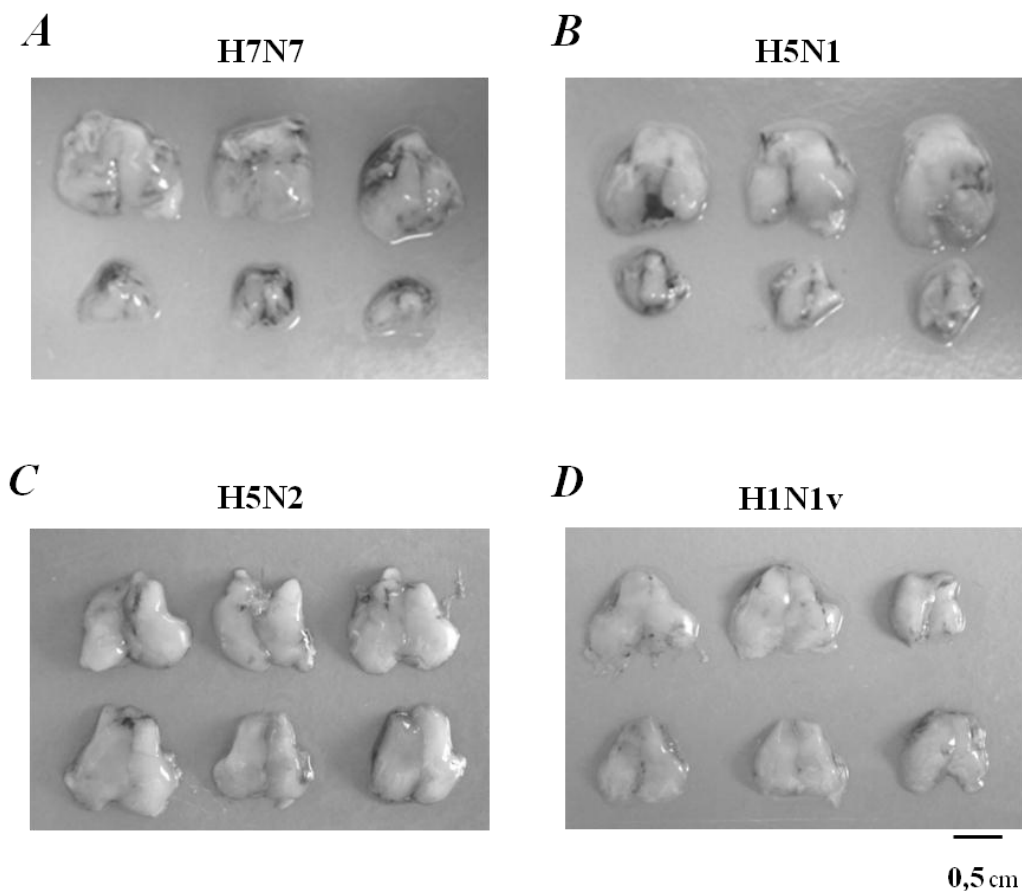


Abbildung 5.III Fotografische Darstellung der Thymi nach Influenzavirusinfektionen. In der oberen Reihe eines Bildes sind Thymi nicht-infizierter Kontrollmäuse, in der unteren Reihe die Thymi der infizierten Tiere. Nach (A) H7N7- aber auch (B) H5N1-Infektionen konnte eine Reduktion der Thymusgröße sechs Tage nach Infektion beobachtet werden. (C) H5N2- und (D) H1N1v-Infektionen wiesen zum gleichen Zeitpunkt keine sichtbare Atrophie des Thymus auf.

Das Ergebnis wies daraufhin, dass nach HPAIV-Infektion Gewebsschädigungen oder ein massiver Verlust an Thymozyten stattfand. Daher wurde in einem nächsten Schritt die Leukozytenzahl der Thymi nach Infektion ermittelt (Abbildung 5.IV). Im Vergleich zur Kontrolle verloren die Thymi der H7N7-infizierten Mäuse bereits bis Tag 3 nach Infektion 79% der Leukozyten, während bis Tag 6 ein Verlust von durchschnittlich 85% auftrat (Abbildung 5.IVA). Thymi der H5N1-infizierten Mäuse verloren bis Tag 6 im Durchschnitt 96% der Leukozyten (Abbildung 5.IVB). Weder nach H5N2- oder H1N1v-Infektion konnte eine signifikante Reduktion der Leukozyten im Thymus nachgewiesen werden (Abbildung 5.IVC und D).

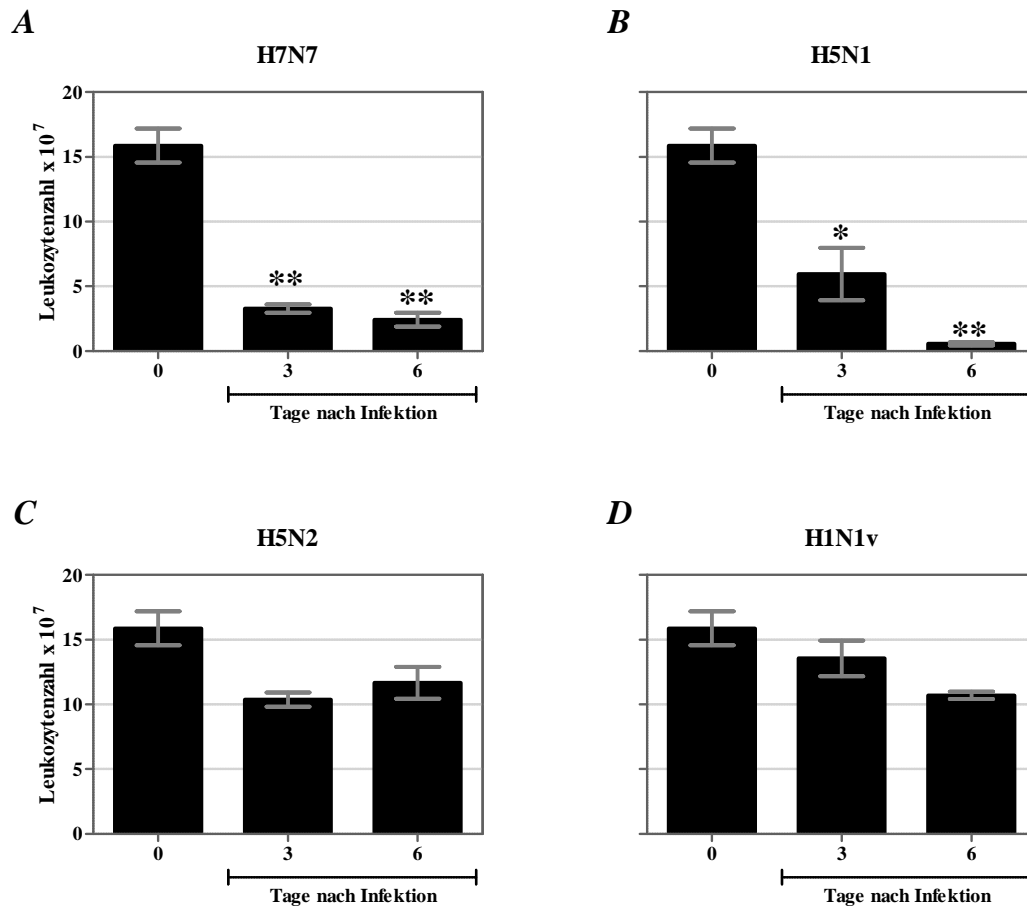


Abbildung 5.IV Die Leukozytenzahl innerhalb des Thymus drei und sechs Tage nach (A) H7N7-, (B) H5N1-, (C) H5N2- oder (D) H1N1v-Infektion (n = 3 bis 4 Tiere). Dem Mittelwert ist die Standardabweichung in SEM hinzugefügt. Der T-Test gibt die Signifikanzen an, wobei * für ein p-Wert < 0,05 und ** p < 0,01 steht.

Ein signifikanter Verlust an Leukozyten nach HPAIV-Infektion konnte nachgewiesen werden. Dieser Verlust war eine Ursache der Thymusatrophie nach HPAIV-Infektion. Weitere Untersuchungen sollten nun zeigen, welche Populationen der Leukozyten reduziert waren, und mittels Durchflusszytometrie wurden die unterschiedlichen T-Zell- und Thymozyten-Populationen analysiert. Hierfür wurden sechs Tage nach Infektion (2×10^3 pfu/50 μ l [H7N7], 2×10^4 pfu/50 μ l [H5N1], 1×10^4 pfu/50 μ l [H5N2 beziehungsweise H1N1v]) die Thymi entnommen, eine Zellsuspension hergestellt und die Proben auf CD4⁺ und CD8⁺ hin untersucht (Abbildung 5.V). Die durchflusszytometrische Analyse zeigte, dass der Anteil der doppelpositiven CD4⁺CD8⁺-Thymozyten von 88% eines Thymus einer nicht-infizierten Kontrollmaus auf unter 7% nach Infektion mit einem HPAIV zurückging (Abbildung 5.VA).

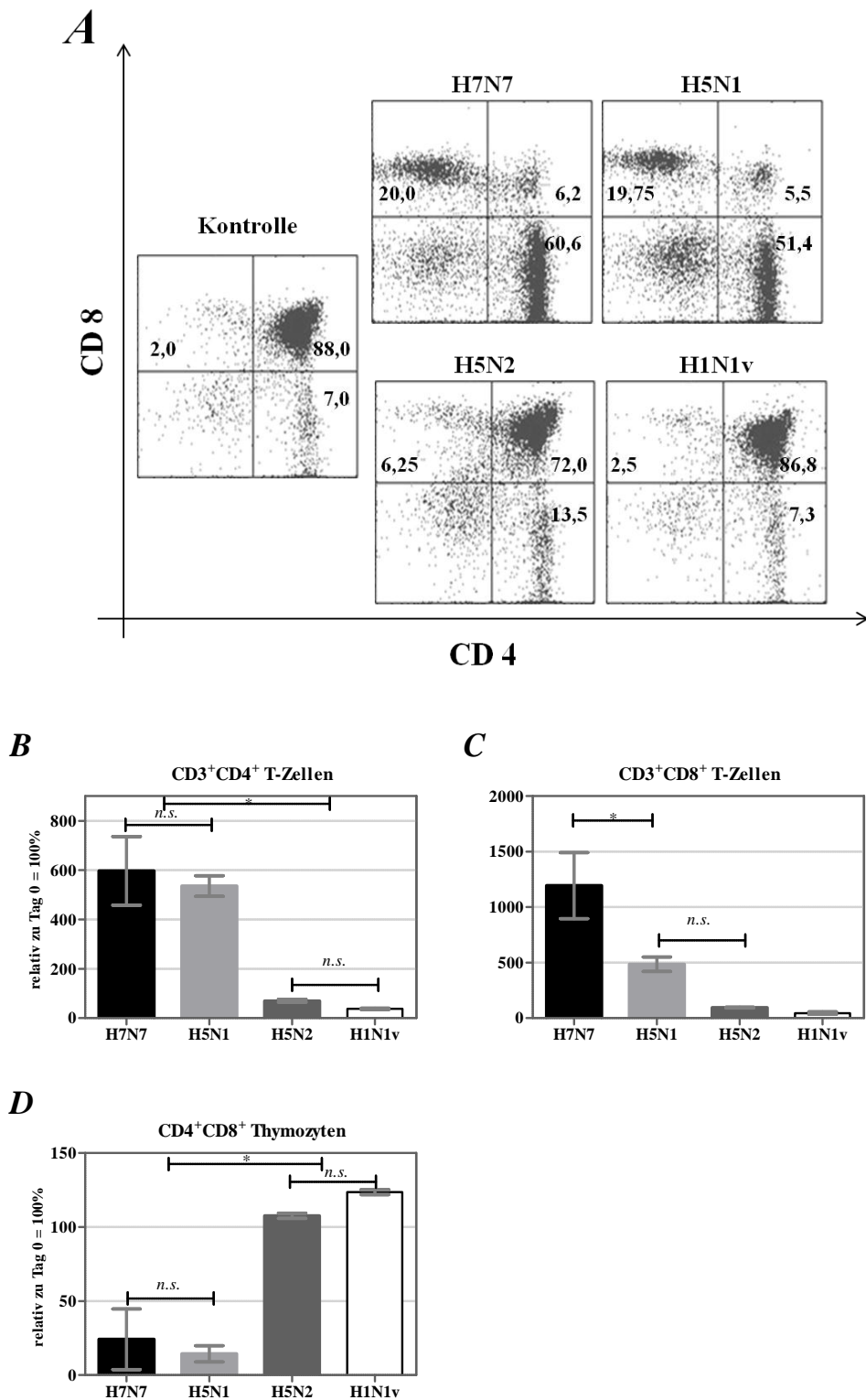


Abbildung 5.V Die Untersuchung unterschiedlicher Thymozytenpopulationen. (A) Verteilung der einfach- und doppelt-positiven Thymozyten sechs Tage nach einer Influenzavirusinfektion. Das Auftreten im Thymus an Tag 6 nach verschiedenen Influenzavirusinfektionen von CD4⁺ T-Zellen (B), CD8⁺ T-Zellen (C) und Thymozyten (D) im Mittelwert ist relativ zu Tag 0 dargestellt (n = 4 Tiere). Dem Mittelwert ist die Standardabweichung in SEM hinzugefügt. Der Tukey-Test gibt die Signifikanzen der Virusinfektionen untereinander an, wobei * für ein p-Wert < 0,05 steht und n.s. für eine nicht-vorhandene Signifikanz.

Zusätzlich wurden die Zellsuspensionen der Thymi auf CD3⁺, CD4⁺ und CD8⁺ exprimierende Zellen untersucht. Nach beiden HPAIV-Infektionen trat im Thymus eine Expansion der CD4⁺ T-Zellen auf. Nach H5N2- und H1N1v-Infektion reduzierte sich die CD4⁺ T-Zellfraktion leicht (Abbildung 5.VB). Die CD8⁺ T-Zellpopulation entwickelte sich ähnlich. Durch eine HPAIV-Infektion stieg der Anteil der CD8⁺ T-Zellen signifikant an. Sowohl die H5N2- als auch H1N1v-Infektion wiesen keinen Anstieg der CD8⁺ T-Zellen auf (Abbildung 5.VC). Während CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen nach einer HPAIV-Infektion im Thymus anstiegen, verringerte sich die Population der CD4⁺CD8⁺-Thymozyten. Nach der H7N7-Infektion waren im Thymus nur noch 24% im Vergleich zu Kontrollthymi nicht-infizierter Mäuse doppelt-positive Thymozyten vorhanden, nach H5N1-Infektion verringerte sich dieser Wert auf 14%. H5N2 wies mit einem Wert von 108% erneut kaum Veränderungen auf. Nach H1N1v-Infektion konnte ein leichter Anstieg der CD4⁺CD8⁺ Thymozyten-Population gemessen werden (Abbildung 5.VD).

Da ständig neue T-Zellvorläuferzellen aus dem Knochenmark in den Thymus einwandern, bestand die Möglichkeit, dass einwandernde Thymozyten aus dem Knochenmark bereits infiziert waren. Aus diesem Grund wurden Mäuse mit 2×10^3 pfu/50 μ l H7N7 und 2×10^4 pfu/50 μ l H5N1 infiziert und drei beziehungsweise sechs Tage nach Infektion das Knochenmark isoliert. Die RNA des Knochenmarks wurde mithilfe der qRT-PCR auf virale M-Protein-RNA untersucht. Im Knochenmark konnte durch diese sensitive Methode jedoch keine virale mRNA nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Daher wurde ausgeschlossen, dass Influenzaviren den Thymus über das Knochenmark erreichten. Immunhistologische Untersuchungen wurden durchgeführt. Diese sollten zeigen, wo sich Virus innerhalb des Thymusgewebes befand. Mittels Immunhistologie konnten virale Proteine im Thymus nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Jedoch konnte keine spezifische Lokalisierung gezeigt werden und in einem weiteren Schritt wurde der Thymus mittels magnetischer Zellsortierung in Suspensions-, Epithel- (CD45⁻) und Nichtepithelzellen (CD45⁺) aufgetrennt. Aus infizierten Mäusen wurde die RNA der so aufgereinigten Fraktionen isoliert. Eine qRT-PCR sollte zeigen, in welcher Fraktion des Thymus sich virale RNA befand (Abbildung 5.VI).

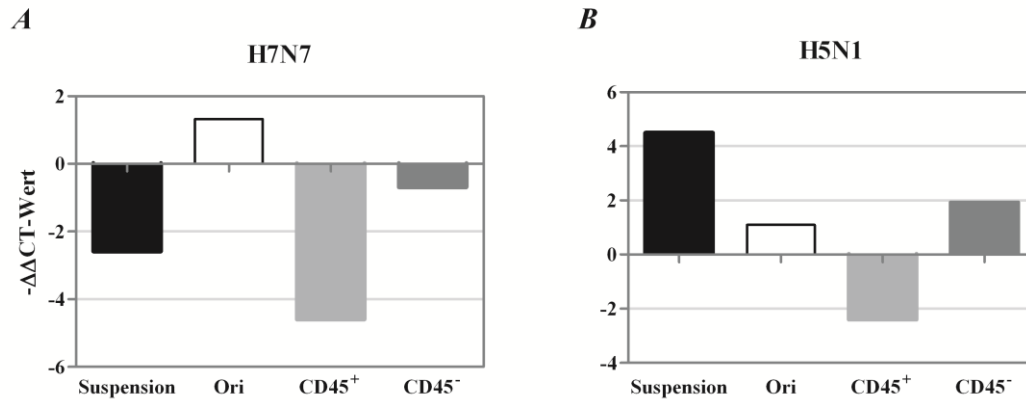


Abbildung 5.VI Untersuchung der unterschiedlichen Thymusfraktionen auf virale M-Protein-mRNA vier (**A**, H7N7) beziehungsweise sechs Tage (**B**, H5N1) nach Influenzavirusinfektion. Für die Fraktionierung wurde ein Pool aus je drei Thymi hergestellt. Nach der Aufreinigung der unterschiedlichen Fraktionen wurde die RNA isoliert und zweimal unabhängig voneinander auf virale M-Protein-mRNA quantifiziert. Ori bezeichnet die Fraktion nach Entfernen von Suspensionszellen und vor der CD45-Selektion.

Die hieraus resultierenden Ergebnisse waren nicht eindeutig. Nach viertägiger H7N7-Infektion war lediglich die Ori-Fraktion, die das noch Thymozyten-enthaltende Gewebe vor der CD45-Selektion darstellt, gering Virus-positiv. Virale RNA war innerhalb der Suspensionszellen jedoch nicht nachweisbar, was vermuten ließ, dass Thymozyten nicht Ziel der Infektion waren. Da virale M-Protein-RNA jedoch nur in der Ori-Fraktion nachweisbar war und dies auch nur zu einer sehr geringen Konzentration, wurden zusätzlich Mäuse mit 2×10^4 pfu/50 μ l des H5N1-Virus infiziert und sechs Tage später die Thymi entnommen. Nach Auftrennung der unterschiedlichen Populationen, RNA-Isolierung und qRT-PCR wurde im Gegensatz zu der vorausgegangenen Untersuchung nach H7N7-Infektion innerhalb der Suspensionszellen virale M-Protein-RNA detektiert (Abbildung 5.VI**B**). Auch die Ori-Fraktion wies wieder virale M-Protein-RNA auf. Zudem war die CD45⁻-Fraktion positiv, was auf eine Infektion des Epithelgewebes schließen ließ.

Zusammengefasst konnte mittels dieser Methode zwar virale M-Protein-RNA in den unterschiedlichen Fraktionen nachgewiesen werden, eine selektive Infektion einzelner Fraktionen konnte jedoch nicht bestimmt werden. Erst *in situ*-Untersuchungen, die am Institut für Pathologie, Universität Tübingen durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Karin Klingel durchgeführt wurden, zeigten, dass sich virale mRNA in der Nähe der corticomedullären Verbindung konzentrierte [Daten nicht gezeigt, jedoch in (Vogel et al., 2010) zu sehen]. Die corticomedulläre Verbindung im Thymus ist die Stelle im Thymus, an welcher der zeldichte Cortex und die weniger dichte Medulla ineinander übergehen.

5.4 Die T-Zellentwicklung nach Influenzavirusinfektionen

In einem weiteren Schritt wurde die Auswirkung der Influenzavirusinfektion des Thymus auf die T-Zellentwicklung untersucht. Im Thymus, sowohl im Cortex als auch in Medulla, findet die T-Zellreifung statt. Hierfür werden unterschiedliche Signalstoffe benötigt, die sowohl die Wanderung der Thymozyten als auch die Differenzierung unterstützen. Mäuse wurden mit den unterschiedlichen Influenzaviren infiziert (2×10^3 pfu/50 μ l [H7N7], 2×10^4 pfu/50 μ l [H5N1], 1×10^4 pfu/50 μ l [H5N2 beziehungsweise H1N1v]) und nach drei oder sechs Tagen getötet. Der Thymus wurde entnommen und dessen RNA isoliert. Im Anschluss wurden qRT-PCRs auf die Expression unterschiedlicher Chemokine und Zelladhäsionsmoleküle durchgeführt.

Die Untersuchungen zeigten, dass die H7N7-Infektion die stärkste Expressionsveränderungen der untersuchten Chemokine und Zelladhäsionsmoleküle aufwies (Abbildung 5.VII).

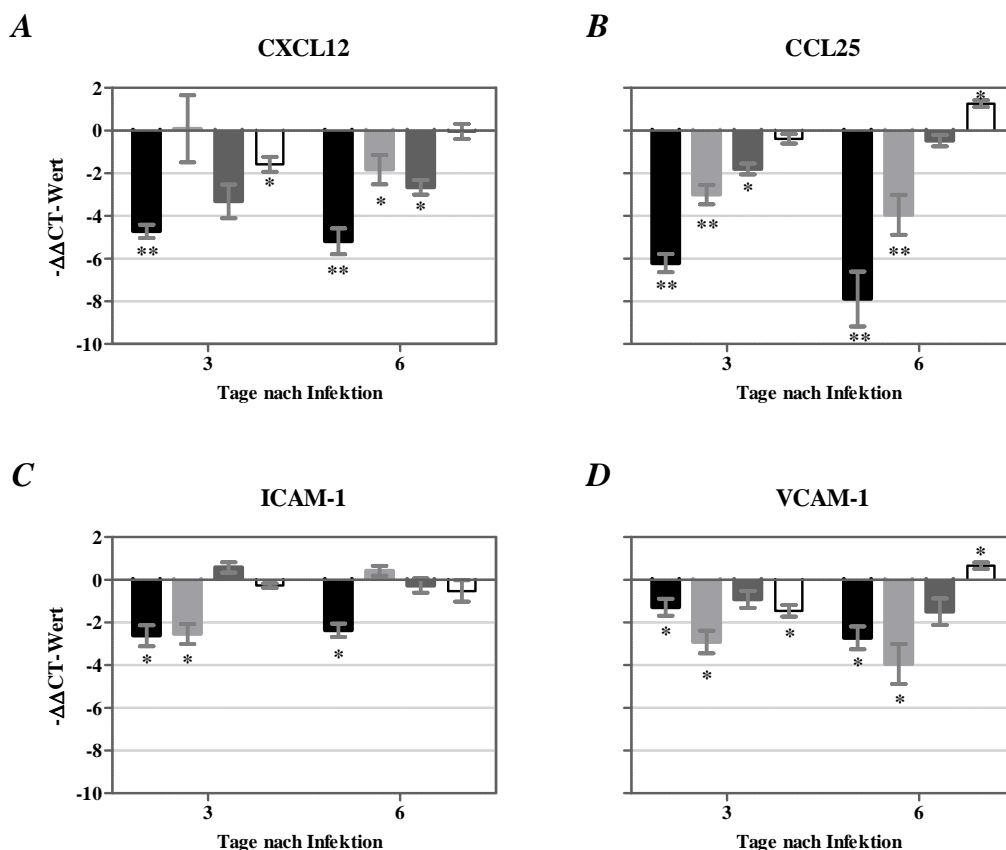


Abbildung 5.VII Die mRNA-Expressionen unterschiedlicher Chemokine (**A,B**) und Zelladhäsionsmoleküle (**C,D**) im Thymus nach H7N7- (*schwarz*), H5N1- (*hellgrau*), H5N2- (*dunkelgrau*) und H1N1v-Infektion (*weiß*). Jedem Ansatz dienen drei bis vier Thymi. Dem Mittelwert ist die Standardabweichung in SEM hinzugefügt. Der T-Test gibt die Signifikanzen zur Kontrolle an, wobei * für ein p-Wert < 0,05 und ** p < 0,01 steht.

Sowohl an Tag 3 als auch an Tag 6 nach H7N7-Infektion waren die CXCL12- und CCL25-mRNA-Expressionen stark verringert. Auch die ICAM-1- und VCAM-1-mRNAs wurden geringer exprimiert. Nach einer H5N1-Infektion konnten keine gleichstarken Veränderungen der Expressionsmuster dokumentiert werden, wobei meist eine signifikante Reduktion der mRNA-Expressionen nachgewiesen werden konnte. In beiden Fällen hatten die Epithelzellen an Funktionalität verloren und eine Beeinträchtigung der T-Zellwanderung war wahrscheinlich. Sowohl nach H5N2- als auch H1N1v-Infektion konnte kein stark verändertes Expressionsmuster beobachtet werden und es war anzunehmen, dass hier die T-Zellreifung noch funktionell war.

In einem nächsten Schritt wurde untersucht, ob die mögliche, zusätzliche Präsentation viraler Antigene durch HPAIV und die Veränderungen der Chemokinexpression Auswirkungen auf die Depletion der Thymozyten hatte (Abbildung 5.VIII). Daher wurden Mäuse infiziert und die Zellen des Thymus auf apoptotische Signale untersucht. Durch eine HPAIV-Infektion waren weniger Lymphozyten im Thymus apoptotisch (Abbildung 5.VIIIA). Der Anteil apoptotischer $CD4^+CD8^+$ -Thymozyten aus einer nicht-infizierten Maus lag bei 58%. Dieser Anteil verringerte sich nach H7N7-Infektion auf 40% beziehungsweise nach H5N1-Infektion auf signifikante 33% (Abbildung 5.VIIIB). Auch die einfach-positiven Zellen wiesen einen Rückgang der Annexinbindung auf. Untersuchungen der $CD4^+CD8^-$ -Population zeigten, dass 63% der Zellen innerhalb dieser Population im Thymus nicht-infizierter Mäuse apoptotisch waren. Die HPAIV-Infektionen reduzierten diesen Anteil signifikant, wobei nach H7N7-Infektion noch 30% apoptotisch waren, nach H5N1 noch 32% (Abbildung 5.VIIIC). Der Anteil apoptotischer $CD4^-CD8^+$ -Zellen des Thymus einer nicht-infizierten Maus war 26%. Nach H7N7 verringerte sich dieser Wert auf 12%, nach H5N1 wurde keine Reduktion beobachtet (Abbildung 5.VIIID).

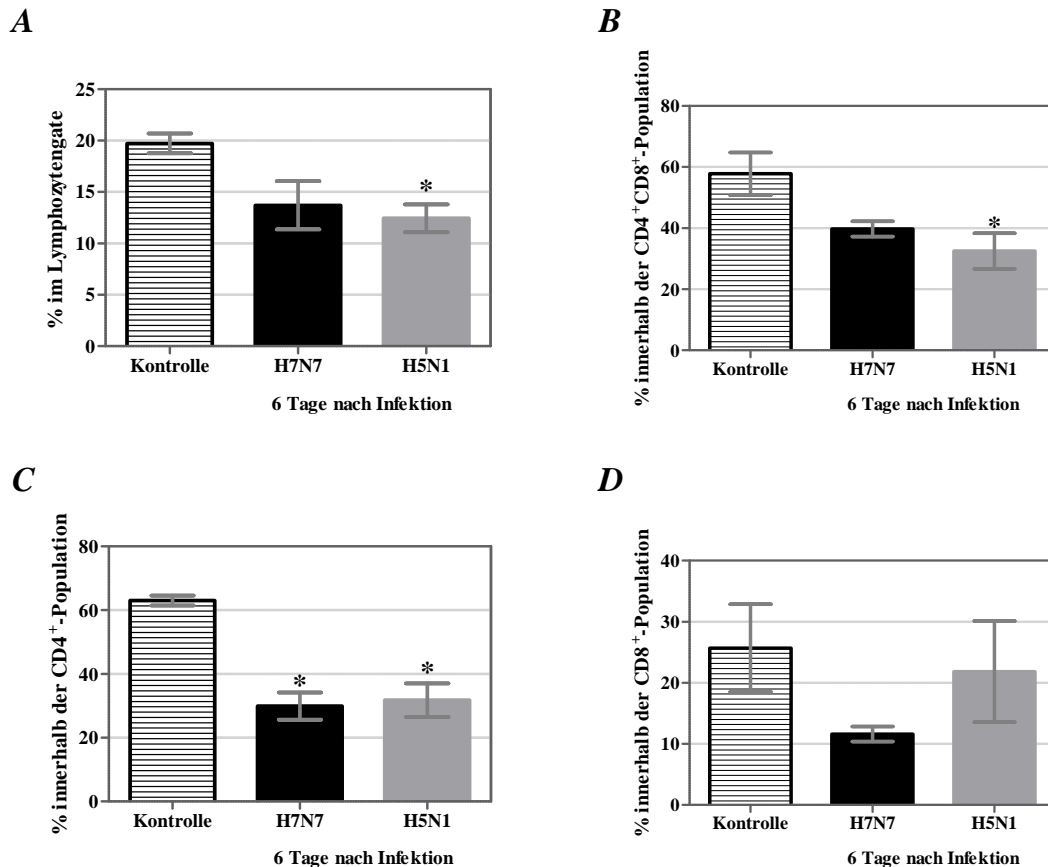


Abbildung 5.VIII Apoptotische Zellen im Thymus sechs Tage nach Infektion mit 2×10^3 pfu/50 μ l H7N7 beziehungsweise 2×10^4 pfu/50 μ l H5N1 (n = 3 bis 6 Tiere). In einem ersten Schritt wurde die Gesamtmenge an Annexin-positiven Zellen gemessen (A). Des Weiteren wurden die Thymozytenpopulationen untersucht und die apoptotische Fraktion innerhalb der CD4⁺CD8⁻ (B), CD4⁺CD8⁻ (C) und CD4⁺CD8⁺-Populationen (D) bestimmt. Dem Mittelwert ist die Standardabweichung in SEM hinzugefügt. Der T-Test gibt die Signifikanzen an, wobei * für ein p-Wert < 0,05 steht.

Die HPAIV-Infektionen beeinträchtigten die Selektion der Thymozyten. In einem nächsten Schritt wurden die T-Zell- und Thymozyten-Populationen weiter charakterisiert und deren Aktivität bestimmt. Hierfür wurden die Zellen auf das Vorhandensein des frühen T-Aktivierungsmarkers CD69 untersucht (Abbildung 5.IX). Drei und sechs Tage nach HPAIV-Infektion (2×10^3 pfu/50 μ l H7N7 beziehungsweise 2×10^4 pfu/50 μ l H5N1) wurden die Versuchstiere getötet, die Thymi entnommen und eine Zellsuspension für die Analyse am Durchflusszytometer hergestellt. Zellen konnten unterteilt werden in die CD4⁺CD8⁻ (Abbildung 5.IXA-D), CD4⁻CD8⁺ (Abbildung 5.IXE-H) und CD4⁺CD8⁺-Subtypen (Abbildung 5.IXI-L). Durch die Infektion des Thymus veränderte sich das Aktivierungsmuster der unterschiedlichen Populationen. Sowohl nach H7N7- als auch nach H5N1-Infektion wies die CD4⁺-Population einen Anstieg des CD69⁺-Anteils auf (Abbildung

5.IXA). Dieser Anstieg war nach H5N1-Infektion größer und betrug 29% (Abbildung 5.IXB). Da der Anteil der $CD4^+CD8^-$ -Zellen im Thymus wie in Abbildung 5.VB gezeigt durch HPAIV-Infektion wuchs, wurde in einem zweiten Schritt die $CD69^+$ -Fraktion innerhalb der $CD4^+CD8^-$ -Zellen berechnet. Nach sechstägiger H7N7-Infektion erfolgte ein Abfall der aktivierten Zellen auf 41% von ursprünglich 56% (Abbildung 5.IXC). Nach H5N1-Infektion konnten keine starken Aktivierungsunterschiede innerhalb der $CD4^+CD8^-$ -Population beobachtet werden (Abbildung 5.IXD).

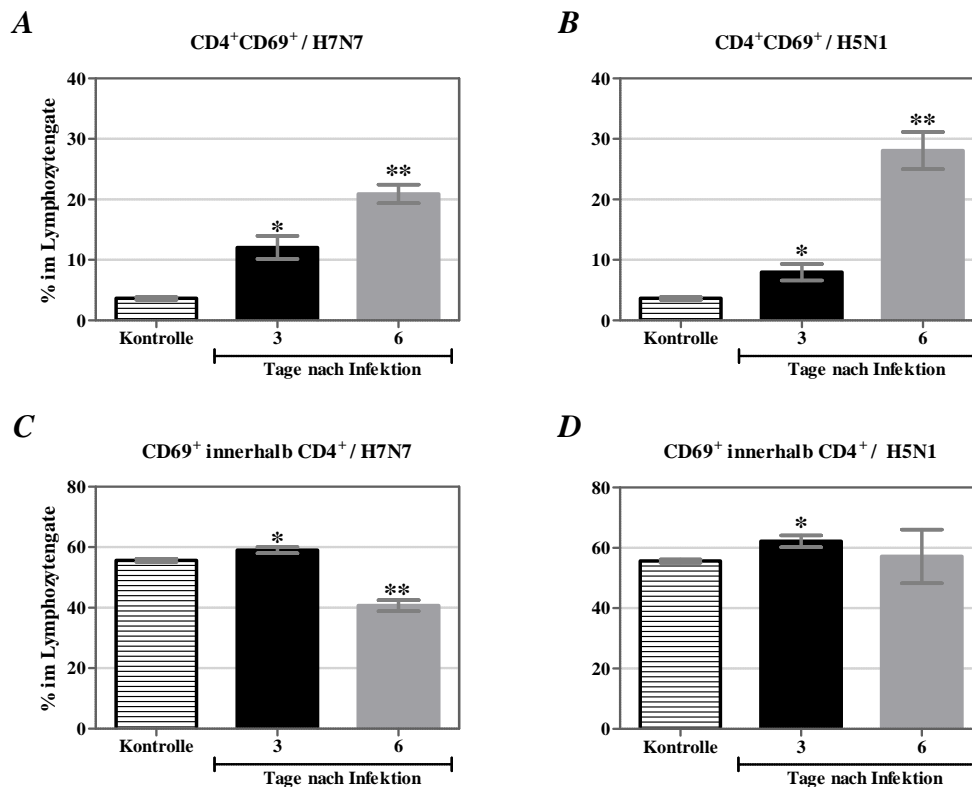


Abbildung 5.IX Teil 1 Aktivitätsprofil der T-Zellen im Thymus nach Influenzavirusinfektion. Aktivierte $CD4^+$ -Zellen wurden nachgewiesen drei und sechs Tage nach H7N7- (A) oder H5N1-Infektion (B). Im Anschluss wurde der Anteil $CD69^+$ -Zellen innerhalb der $CD4^+$ -Fraktion gemessen nach H7N7- (C) beziehungsweise H5N1-Infektion (D). Nach gleicher Aufteilung wurden $CD8^+$ -Zellen untersucht (E-H, siehe nächste Seite). Dreifachpositive $CD4^+CD8^+CD69^+$ -Zellen an Tag 3 und 6 wurden nach H7N7- (I) und H5N1-Infektion (J) ebenfalls nachgewiesen. Auch hier wurde der Anteil der $CD69^+$ -Zellen innerhalb der doppelt-positiven $CD4^+CD8^+$ -Zellen nach H7N7- (K) und H5N1-Infektion (L) berechnet. Die Gruppengröße der unterschiedlichen Zeit- und Infektionswerte belief sich auf drei bis vier Tiere. Zusätzlich zu dem abgebildeten Mittelwert ist die Standardabweichung in SEM hinzugefügt. Der T-Test gibt die Signifikanzen an, wobei * für ein p-Wert $< 0,05$ und ** für einen p-Wert $< 0,001$ steht.

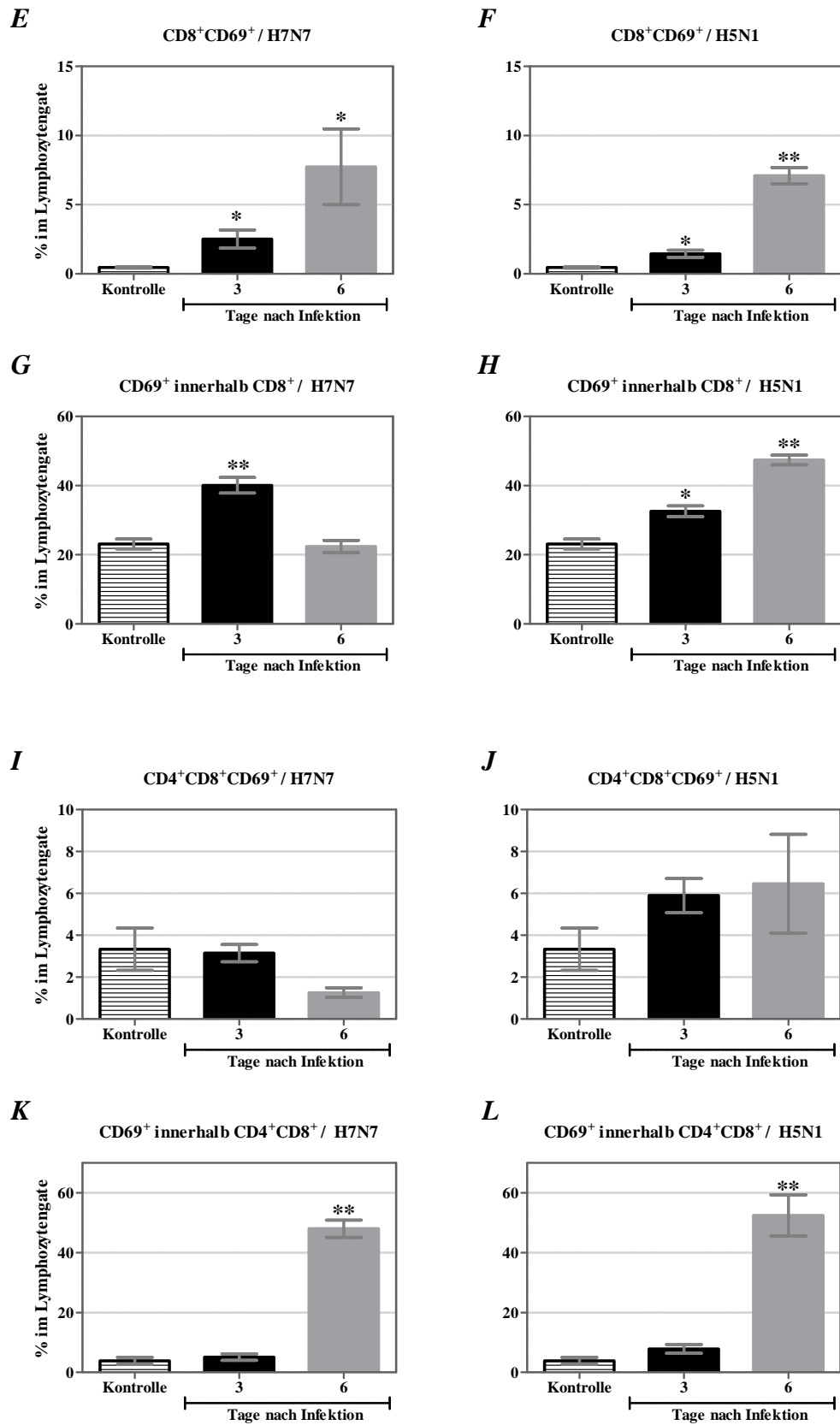


Abbildung 5.IX Fortsetzung Aktivitätsprofil der T-Zellen im Thymus nach einer Influenzavirusinfektion.

Sowohl an Tag 3 als auch an Tag 6 nach H7N7-Infektion stieg die Population der aktivierten $CD4^+CD8^+$ -Zellen von 0,5% auf 8% an (Abbildung 5.IXE). Ähnliches konnte nach H5N1-Infektion beobachtet werden, nach welcher der Anteil der aktivierten Zellen auf 7% stieg (Abbildung 5.IXF). Innerhalb der $CD4^+CD8^+$ -Zellpopulation verursachte die H7N7-Infektion keine Aktivierungsveränderung an Tag 6, jedoch war der Anstieg auf 40% an Tag 3 signifikant (Abbildung 5.IXG). Der Anteil aktivierter $CD4^+CD8^+$ -T-Zellen nach H5N1-Infektion stieg an und erreicht an Tag 6 nach Infektion einen Wert von 47% (Abbildung 5.IXH). Die Häufigkeit aktivierter $CD4^+CD8^+$ -Thymozyten nach HPAIV-Infektion wies keine signifikanten Veränderungen auf (Abbildung 5.IXI,J). Jedoch verloren diese Thymus massiv an doppelt-positiven Zellen (siehe hierzu Abbildung 5.V), weswegen hier die Fraktionierung aktivierter Zellen innerhalb der $CD4^+CD8^+$ -Population große Unterschiede aufwies. So veränderte sich der Anteil aktivierter Zellen nach H7N7-Infektion von 4% des Thymus einer nicht-infizierten Maus auf 48% an Tag 6 nach Infektion (Abbildung 5.IXK). Auch eine H5N1-Infektion wies einen vermehrten Anteil aktivierter $CD4^+CD8^+$ -Thymozyten von 52% auf (Abbildung 5.IXL).

Die Anzahl aktivierter Thymozyten und T-Zellen stieg nach HPAIV-Infektionen an. Um zu untersuchen, ob es sich bei den nachgewiesenen $CD8^+$ T-Zellen tatsächlich um funktionelle T-Zellen handelte, die aufgrund der viralen Infektion des Thymus vorhanden waren, wurde ein *in vitro* Zytotoxizitätstest durchgeführt. Hierfür wurden Mäuse mit einem der vier Influenzaviren infiziert (2×10^3 pfu/50 μ l [H7N7], 2×10^4 pfu/50 μ l [H5N1], 1×10^4 pfu/50 μ l [H5N2 beziehungsweise H1N1v]) und sechs Tage später die Lymphozytenfraktionen aus Lunge und Thymus isoliert. Den Zielzellen wurden die aufgereinigten Lymphozyten als Effektorzellen hinzugegeben und die spezifische Lyse mittels ^{51}Cr -Freisetzung gemessen (Abbildung 5.X).

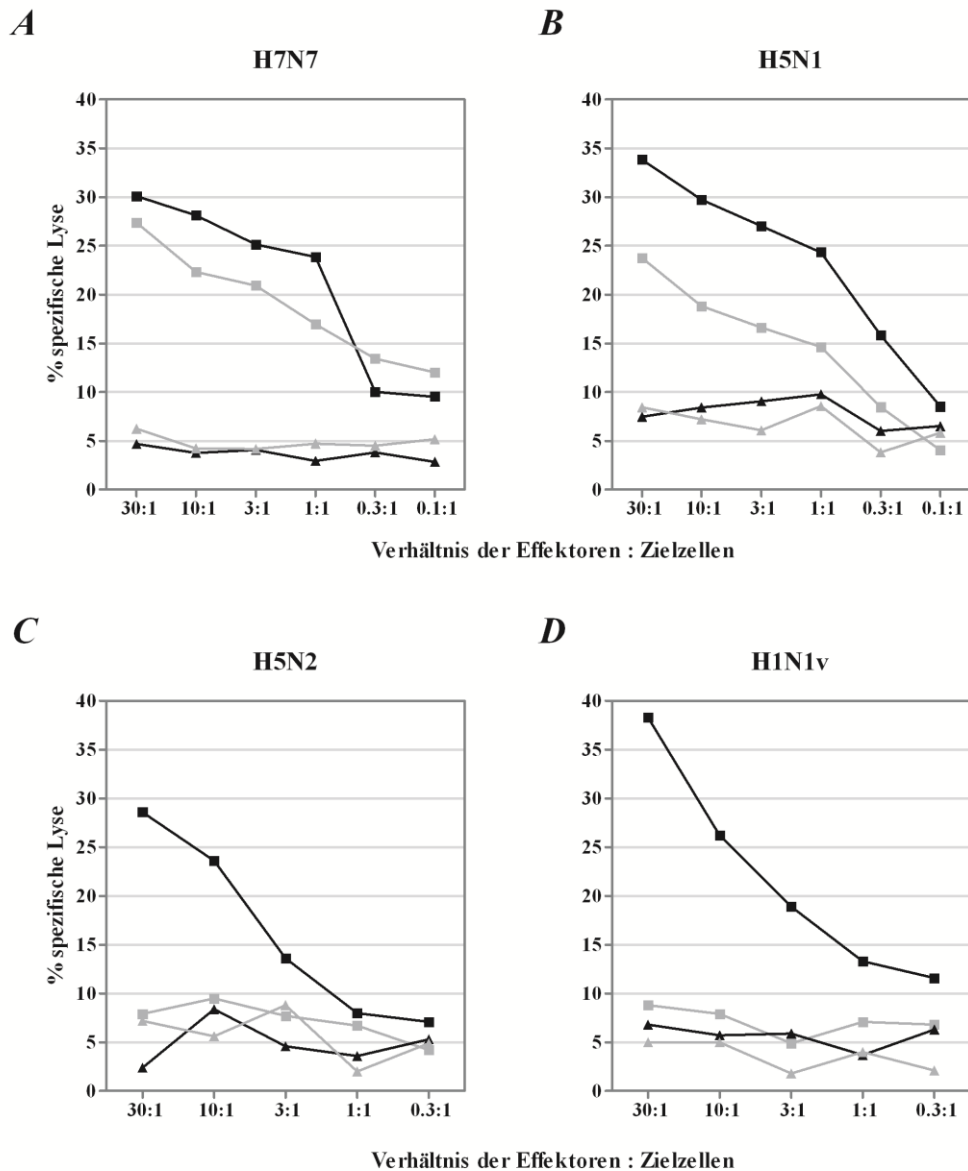


Abbildung 5.X Ein *in vitro* Zytotoxizitätstest mit Lymphozyten aus der Lunge (*schwarz*) beziehungsweise dem Thymus (*grau*) bewies, dass sich nach H7N7 (**A**), aber auch nach H5N1-Infektion (**B**) zytotoxische T-Zellen im Thymus befanden. Weder nach H5N2- (**C**) noch nach H1N1v-Infektion (**D**) konnten zytotoxische T-Zellen im Thymus nachgewiesen werden. Dreiecke spiegeln die Proben wieder, in denen unbeladene MC57-Zellen eingesetzt wurden, Quadrate spiegeln die Proben wieder, in denen die MC57-Zielzellen mit dem immundominanten Influenzapeptid NP₃₆₆₋₃₇₇ beladen wurden. Werte sind Mittelwerte von drei Messwerten aus einem Zellpool von je drei Tieren.

Nach jeder IAV-Infektion konnten in der Lunge zytotoxische T-Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 5.XA-D *schwarze Quadrate*). Sowohl nach H7N7- als auch nach H5N1-Infektion konnten zytotoxische T-Zellen im Thymus gegen das immundominante NP₃₆₆₋₃₇₇ nachgewiesen werden (Abbildung 5.XA,B *graue Quadrate*). Neben dem funktionellen Verlust des Thymus aufgrund der direkten Infektion, fand zudem eine influenzavirusge-

richtete Immunantwort statt. In den anderen beiden Infektionsversuchen waren die CD8⁺ T-Zellen der Thymi nicht in der Lage, Zielzellen zu lysieren (Abbildung 5.XC,D graue Quadrate). Die fehlende Lyse bestätigt die vorherigen Ergebnisse und zeigt, dass sowohl die 1×10^4 pfu/50 μ l dosierte H5N2- als auch H1N1v-Infektion keinen Einfluss auf die T-Zellreifung hatten.

Aufgrund der HPAIV-Infektion des Thymus und der starken Beeinträchtigung der T-Zellreifung stellte sich nun die Frage, wie das Virus den Thymus erreichen konnte und welche Zellen Einfluss auf die Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen haben.

5.5 Die *in vivo* Infektion der Dendritischen Zelle

Da die HPAI-Viren in der Maus nach i.n. Infektion nicht systemisch auftraten, sondern die Replikation auf die Eintrittspforte des Virus und lymphoide Organe beschränkt war, wurde die Hypothese aufgestellt, dass IAV in der Lunge migrierende Zellen infiziert. Bereits vorangegangene Studien zeigten, dass IAV *in vitro* Dendritische Zellen, aber auch Makrophagen infizieren konnten (Hao et al., 2008; Gabriel et al., 2009).

Daher wurde in einem nächsten Schritt nach IAV-Infektion untersucht, ob in DCs der Lunge virale Proteine vorhanden waren. Hierfür wurden Mäuse mit den unterschiedlichen Influenzavirusstämmen infiziert (2×10^3 pfu/50 μ l [H7N7], 2×10^4 pfu/50 μ l [H5N1], 1×10^4 pfu/50 μ l [H5N2 beziehungsweise H1N1v]) und drei Tage nach Infektion getötet. Die respiratorischen Dendritischen Zellen der Lunge (RDCs) wurden isoliert und auf das Vorhandensein viraler Proteine untersucht (Abbildung 5.XI).

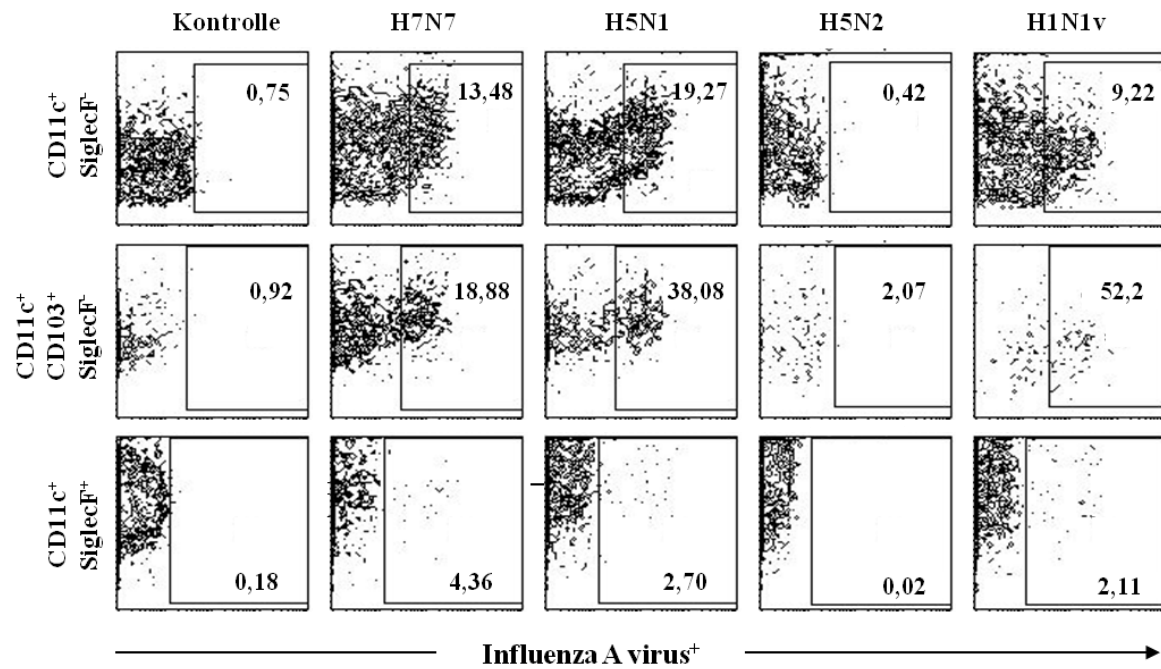


Abbildung 5.XI Nachweis IAV-infizierter DCs der Maus nach Influenzavirusinfektion. Primäre DCs wurden drei Tage nach Infektion der Tiere isoliert und charakterisiert. Parallel wurden Kontrolltiere getötet und deren DCs isoliert und charakterisiert, um mögliche unspezifische Bindungen auszuschließen. Die obere Reihe weist die Infektionsrate der Gesamt-DC-Population auf (CD11c⁺SiglecF⁻), während in der mittleren Reihe eine DC-Subpopulation (CD11c⁺CD103⁺SiglecF⁻) untersucht wurde. Des Weiteren konnten Makrophagen untersucht werden (CD11c⁺SiglecF⁺). Die einzelnen Gruppen bestanden aus einem Pool von je vier Mäusen. Das Experiment wurde zweimal durchgeführt.

Dendritische Zellen wurden als CD11c⁺SiglecF⁻ charakterisiert, eine weitere Charakterisierung einer DC-Subpopulation war zusätzlich durch CD103⁺ möglich. Des Weiteren konnten durch diesen Nachweis Makrophagen (CD11c⁺SiglecF⁺-Zellen) untersucht werden. Die Analyse der Durchflusszytometrie ergab, dass Dendritische Zellen *in vivo* Influenzavirusproteine beinhalten und sowohl H7N7- als auch H5N1-Proteine in der CD11c⁺SiglecF⁻-Population vorkamen. Während H7N7-Proteine zu über 13% in diesen Zellen nachweisbar waren, konnten nach H5N1-Infektion 19% als Virus-positiv charakterisiert werden. Die CD11c⁺SiglecF⁻CD103⁺-Zellen wiesen mit 19% für H7N7 beziehungsweise 38% für H5N1 eine höhere virale Last auf. H5N2-Proteine konnten in keiner Zellfraktion nachgewiesen werden. Die H1N1v-Infektion verursachte ebenfalls das Auftreten viraler Proteine in den DCs zu 9% bei CD11c⁺SiglecF⁻-Zellen. In Makrophagen konnten keine viralen Proteine nachgewiesen werden.

Prinzipiell stellt das Vorhandensein von viralen Proteinen in DCs noch keinen Infektionsnachweis dar. Jedoch ließ die Frequenz der Influenzavirusprotein-positiven Zellen und die

Tatsache, dass zur Phagozytose ebenfalls fähige Makrophagen keine viralen Antigene enthielten, darauf schließen, dass HPAIV und H1N1v DCs ebenfalls *in vivo* infizieren können. Es stellte sich nun die Frage, ob die DCs nach Influenzavirusinfektion mit HPAIV fähig waren, in den Thymus zu wandern und somit für die Ausbreitung des Virus verantwortlich sein könnten. Aus diesem Grund wurden GFP⁺-Mäuse mit H7N7 infiziert und ein adoptiver Transfer der DCs durchgeführt. Eine schematische Durchführung des Versuches ist in Abbildung 5.XII dargestellt.

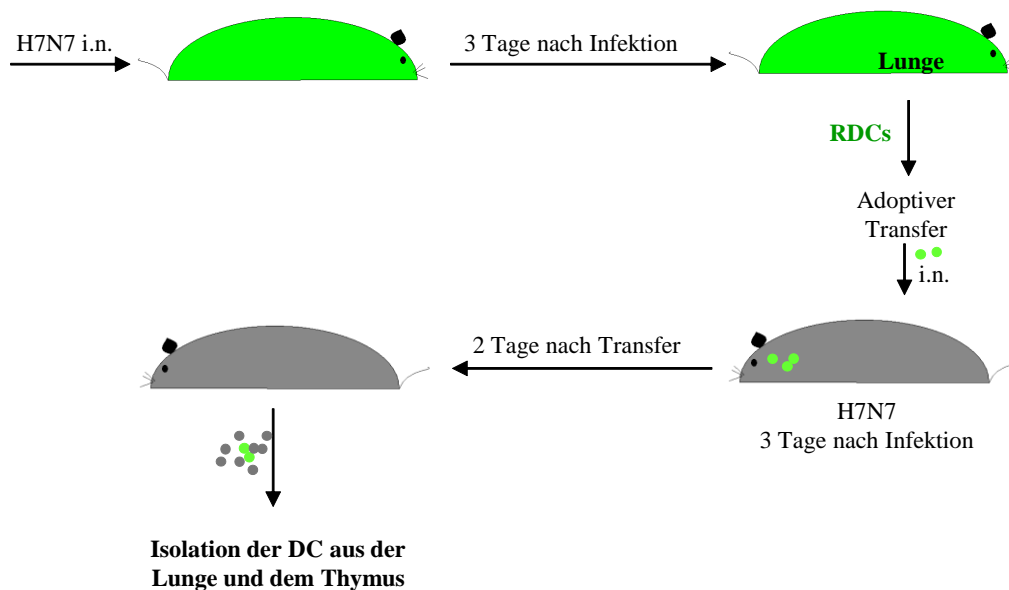


Abbildung 5.XII Schema des adoptiven Transfer der GFP⁺-Donor-DCs in C57BL/6-Akzeptormäuse.

GFP⁺-Mäuse, deren genetischer Hintergrund in einer C57BL/6-Maus zu finden war, und C57BL/6-Wildtypmäuse wurden mit der zehnfachen MLD₅₀, also 2x10³ pfu/50µl, von H7N7 intranasal infiziert. Nach drei Tagen wurden die GFP⁺-Mäuse getötet und deren RDCs magnetisch isoliert. Die RDC-Fraktion wurde C57BL/6-Mäusen intranasal transferiert. Zwei Tage nach dem Transfer von GFP⁺-DCs in GFP⁻-Empfängermause wurden diese getötet und Lunge sowie Thymus mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie auf transferierten GFP⁺-Zellen hin untersucht (Abbildung 5.XIII).

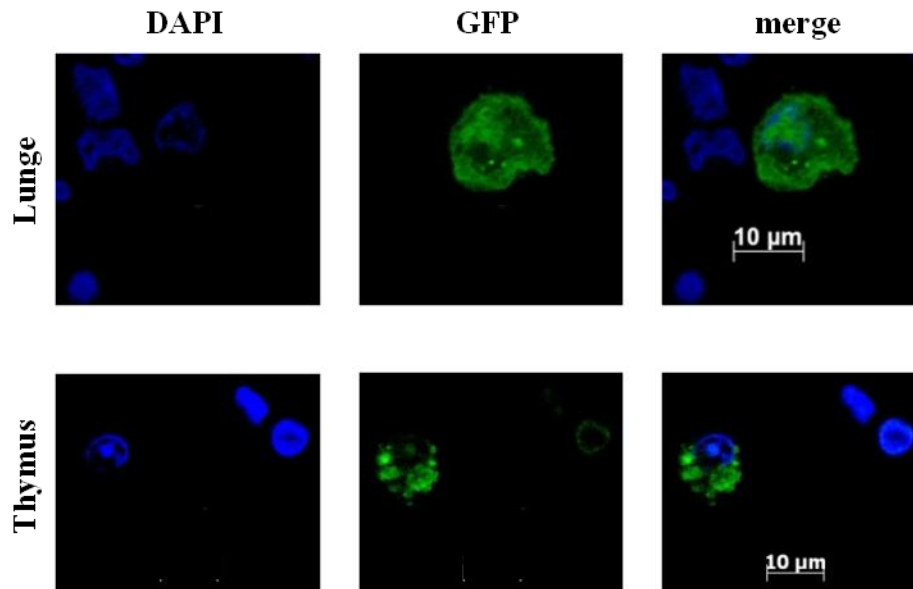


Abbildung 5.XIII Der Nachweis migrierender DCs von der Lunge in den Thymus nach adoptivem Transfer.

In der Lunge, aber ebenfalls im Thymus, konnten zwei Tage nach Transfer Spender-DCs nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis zeigte, dass DCs aus der Lunge in den Thymus während einer Influenzavirusinfektion wandern konnten. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass Influenzaviren DCs als Transportzelle nutzen, um in weitere Organe der infizierten Tiere zu gelangen. Da DCs an der T-Zellselektion im Thymus beteiligt sind, war die Möglichkeit gegeben, dass hier die Selektionsprozesse beeinflusst werden konnten.

Da auch nach pandemischer H1N1v-Infektion virale Proteine in DCs nachweisbar waren, wurde in den sich anschließenden Versuchen die zehnfache MLD_{50} (3×10^5 pfu/50µl [hohe Infektionsdosis]) herangezogen und vergleichend hierzu eine subletale Infektion, nämlich die 0,1fache MLD_{50} (3×10^3 pfu/50µl [niedrige Infektionsdosis]). Mäuse wurden mit entweder 3×10^5 pfu/50µl oder 3×10^3 pfu/50µl H1N1v infiziert und der Krankheitsverlauf festgehalten (Abbildung 5.XIV).

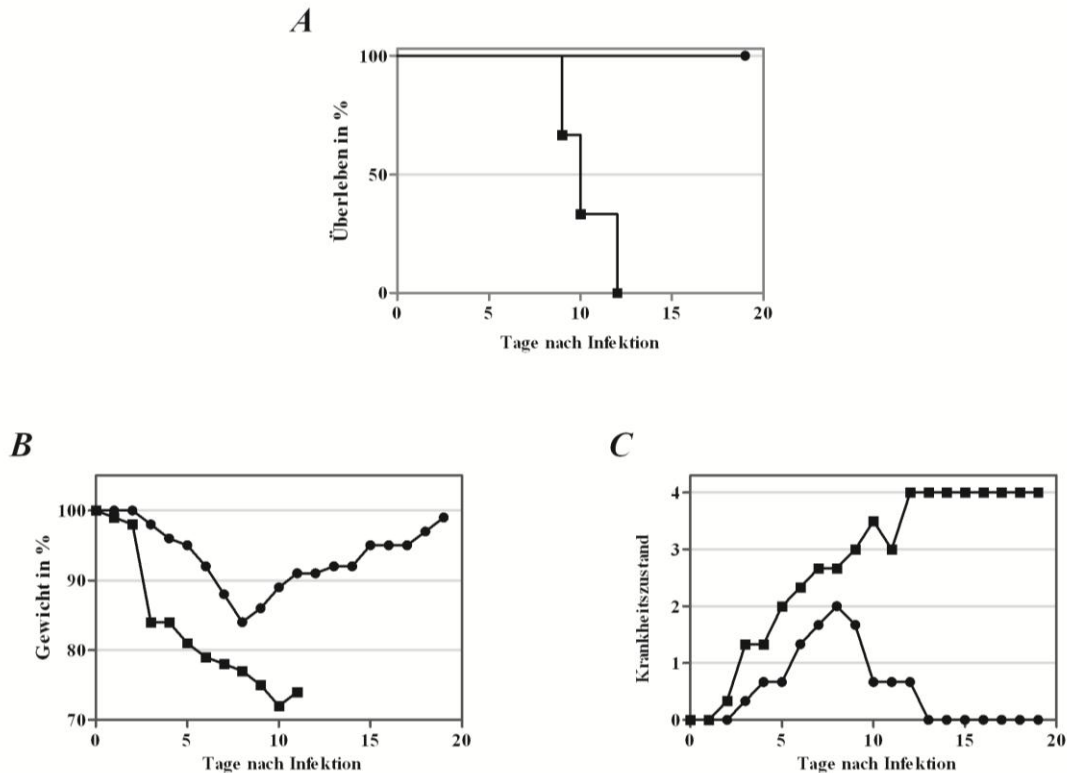


Abbildung 5.XIV Überleben (A), Gewichts- (B) und Krankheitsverlauf (C) C57BL/6-Mäuse nach H1N1v-Infektion. Mäuse wurden entweder mit der hohen, zehnfachen (*Quadrate*) oder niedrigen, 0,1fachen MLD₅₀ (*Kreise*) infiziert und 19 Tage lang beobachtet. Beide Gruppen bestanden aus je drei Mäusen. Der Gewichtsverlauf wurde aufgetragen beginnend mit Tag 0 = 100%. Der Krankheitszustand wurde beobachtet. Ein gesundes Tier erhielt den Wert „0“ während ein totes Tier den Maximalwert „4“ erhielt.

Nach der hohen H1N1v-Infektionsdosis starben die ersten Mäuse an Tag 9. Bis Tag 12 waren alle Tiere tot. Kein Tier der subletal infizierten Gruppe starb (Abbildung 5.XIVA). Jedoch wurden auch diese Mäuse krank. Sie verloren an Gewicht und zeigten Krankheitssymptome (Abbildung 5.XIVB,C). Beides war an Tag 9 nach Infektion am stärksten ausgeprägt und verbesserte sich anschließend.

Zudem wurden Mäuse mit entweder 3×10^5 pfu/50 μ l oder 3×10^3 pfu/50 μ l infiziert, um die Leukozyten im Thymus nach H1N1v-Infektion nachzuweisen (Abbildung 5.XV).

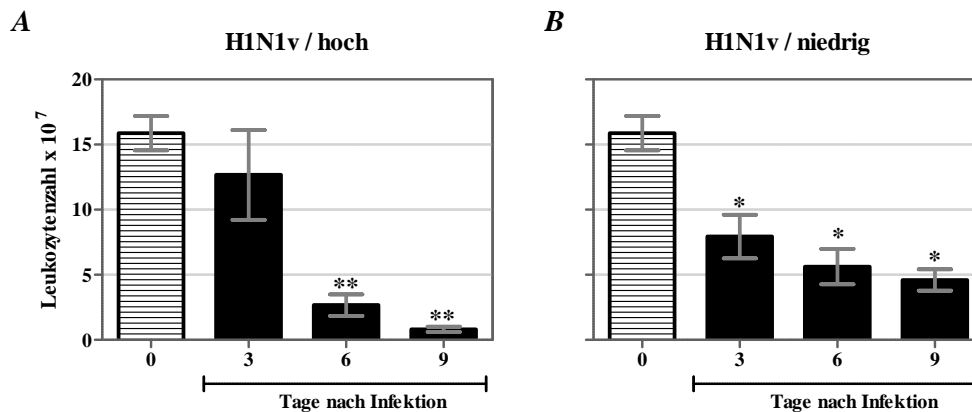


Abbildung 5.XV Leukozyten im Thymus nach hoher (A) beziehungsweise niedriger H1N1v-Infektionsdosis (B). Die Anzahl der ausgewerteten Organe variiert zwischen $n = 3$ bis 4. Den abgebildeten Mittelwerten sind die Standardabweichungen in SEM beigegefügt. Der T-Test gibt die Signifikanz an, wobei * für ein p-Wert $< 0,05$ und ** für einen p-Wert $< 0,001$ steht.

Insbesondere nach hoher H1N1v-Infektionsdosis konnte eine klare Reduktion der Leukozyten von 16 auf 1×10^7 Leukozyten an Tag 9 im Thymus gezeigt werden. Jedoch verlor auch der Thymus nach niedriger Infektionsdosis an Leukozyten (Abbildung 5.XVB). Während nach hoher Infektionsdosis die Mäuse krank wurden und starben, erkrankten die Tiere nach einer niedrigen Infektionsdosis zwar ebenfalls, erholten sich aber wieder.

Beide Infektionsdosen waren daher geeignet weitere Untersuchungen durchzuführen, um mögliche immunologische Unterschiede zwischen letaler und subletaler Infektion aufzuführen.

5.6 Die Generierung funktioneller Regulatorischer T-Zellen

In einem nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob die Infektion des Thymus und das Eingreifen des HPAIV auf die Immunantwort eine Expansion Regulatorischer T-Zellen (Tregs) zur Folge hatte. Hierfür wurden Mäuse mit den unterschiedlichen Influenzavirustämmen infiziert (2×10^3 pfu/50 μ l [H7N7], 2×10^4 pfu/50 μ l [H5N1], 3×10^5 pfu/50 μ l [H1N1v-hoch], 3×10^3 pfu/50 μ l [H1N1v-niedrig]) und sechs Tage später wurde die Frequenz der Tregs in Lunge und Thymus bestimmt (Abbildung 5.XVI). Da durch eine H5N2-Infektion keinerlei Veränderungen und Erkrankung der Mäuse innerhalb der bis hierhin untersuchten Parameter nachgewiesen werden konnte, wurde diese Infektion durch die niedrige H1N1v-Infektion ersetzt.

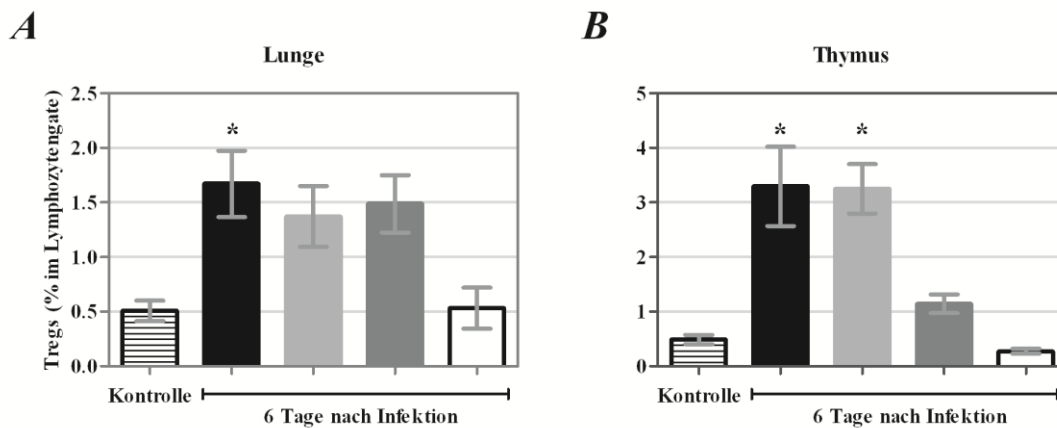


Abbildung 5.XVI Quantifizierung der Tregs in Lunge (**A**) und Thymus (**B**) sechs Tage nach Influenzavirusinfektion (n = 3 oder 4 Tiere). Eine H7N7- (*schwarz*) und H5N1-Infektion (*hellgrau*) verursachten in beiden Organen eine Treg-Expansion. Eine hohe H1N1v-Infektion (*dunkelgrau*) verursachte eine Treg-Expansion in der Lunge. Die niedrige H1N1v-Infektion (*weiß*) verursachte keine Frequenzänderungen der Tregs. Die Standardabweichung ist als SEM angegeben. Der Dunnett-Test gibt die Signifikanzen an, wobei * für ein p-Wert < 0,05 steht.

In sowohl Lunge als auch Thymus eines nicht-infizierten Tieres war ein geringer Anteil Tregs. In der Lunge betrug der Anteil 0,5% des untersuchten Bereichs. Durch eine letale Influenzavirusinfektion fand eine Expansion dieser Zellpopulation statt. Nach H7N7-Infektion erhöhte sich der Treg-Anteil auf 1,7%, nach H5N1 auf 1,4% und nach der hohen H1N1v-Infektion auf 1,5%. Die niedrige H1N1v-Infektion hatte keine Auswirkung auf die Quantität der Treg-Fraktion in der Lunge (Abbildung 5.XVIA). Auch im Thymus konnte durch die niedrige H1N1v-Infektion keine Auswirkungen auf die Treg-Population beobachtet werden, die Quantität der Tregs nach hoher H1N1v-Infektion stieg von 0,5% an Tag 0 auf 1,1% an Tag 6. Beide HPAIV-Infektionen verursachten einen starken Anstieg an Tregs auf 3,3% (Abbildung 5.XVIB). Eine Expansion der Tregs war gegeben und in einem nächsten Schritt sollte die Funktionalität dieser Tregs untersucht werden. Hierfür wurden Tiere infiziert und nach fünf Tagen die Tregs aus Milz und Thymus magnetisch isoliert. Aufgrund der geringen Konzentration der Tregs in der Lunge war eine Isolierung aus diesem Organ nicht möglich. Anschließend wurden die Tregs in einem Proliferations-Inhibitionsassay eingesetzt, wobei Milz-Lymphozyten der gleichen Maus verwendet und mit einem T-zellspezifischen Proliferationsignal behandelt wurden (Abbildung 5.XVII).

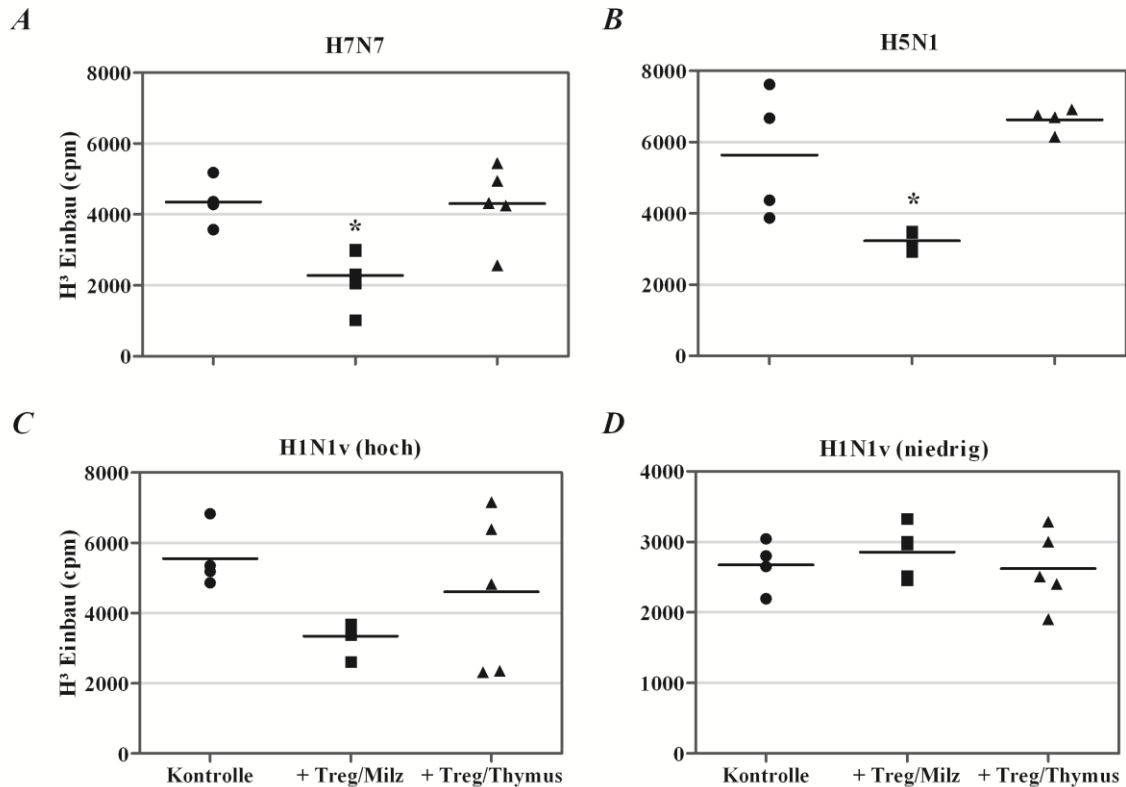


Abbildung 5.XVII Proliferations-Inhibitionsassay nach Influenzavirusinfektion. Mäuse wurden mit 2×10^3 pfu/50 μ l H7N7 (A), 2×10^4 pfu/50 μ l H5N1 (B), 3×10^5 pfu/50 μ l H1N1v (C) oder 3×10^3 pfu/50 μ l H1N1v (D) infiziert und fünf Tage später getötet. Nach Separierung der Lymphozyten aus der Milz wurden 5×10^5 Zellen der Lymphozytenfraktion zur Proliferation mittels CD3/CD28 Dynabeads stimuliert (Kreis). Diesem Ansatz wurden nun zusätzlich 1×10^4 isolierte Tregs aus Milz (Quadrat) oder Thymus (Dreieck) hinzugegeben. Jeder Assay wurde zweimal durchgeführt mit drei bis fünf Replikaten. Die Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle wurde mittels Tukey-Test ermittelt (* $p < 0,05$).

Durch die H7N7-Infektion entwickelten sich Tregs in der Milz, welche die Antigen-unabhängige Proliferation der Lymphozyten signifikant um 48% reduzieren konnten. Die Zugabe der Tregs aus dem Thymus hatte keinen inhibitorischen Effekt auf die Proliferation der Zellen (Abbildung 5.XVIIA). Nach H5N1-Infektion konnte der gleiche inhibitorische Effekt der Tregs aus der Milz beobachtet werden, die die Proliferation der Lymphozyten signifikant um 43% reduzierte (Abbildung 5.XVII B). Nach der hohen H1N1v-Infektion konnten Tregs in der Milz nachgewiesen werden, welche die T-Zellproliferation um 40% reduzierten. Auch hier hatten die Tregs des Thymus im Durchschnitt keinen Effekt auf die Antigen-unspezifische Proliferation (Abbildung 5.XVII C). Die isolierten Tregs der Milz und des Thymus nach der niedrigen H1N1v-Infektion hatten keinen Einfluss auf die Proliferation der T-Zellen (Abbildung 5.XVII D).

Die letalen Influenzavirusinfektionen führten zu einem Anstieg an funktionellen Tregs in der Peripherie. Die Bildung inhibitorischer Tregs in der Peripherie war jedoch nicht nur vom Influenzavirustamm abhängig, sondern auch von der Infektionsdosis. Aus diesem Grund wurden in weiteren Schritten vergleichende Versuche durchgeführt mit der hohen und niedrigen H1N1v-Infektionsdosis.

5.7 Vergleichende Untersuchungen nach letaler und suble-taler H1N1v-Infektion

Bereits in Abbildung 5.XIV konnte gezeigt werden, dass Tiere nach einer hohen Infektionsdosis ab Tag 9 starben. Mäuse, die mit der niedrigen Infektionsdosis infiziert wurden, erkrankten und erholten sich wieder. Bis Tag 8 verloren Tiere an Gewicht, an Tag 9 begann die Rekonvaleszenz. Um die virale Verteilung innerhalb der infizierten Tiere zu untersuchen, wurden C57BL/6-Mäuse infiziert und nach drei, sechs und neun Tagen die virale Last in unterschiedlichen Organen detektiert nach hoher (Tabelle 5.ii) oder nach niedriger H1N1v-Infektion (Tabelle 5.iii).

Tabelle 5.ii H1N1v-Virusverteilung in der Maus nach drei, sechs und neun Tage Infektion mit der hohen Virusdosis*.

H1N1v-hoch	Lunge	mLN	Thymus	Milz	Blut
Tag 3	6,47 ± 0,18	3,68 ± 0,20	1,81 ± 0,08	< 1,7	2,42 ± 0,62
Tag 6	6,73 ± 0,17	5,49 ± 0,17	2,73 ± 0,23	< 1,7	2,90 ± 1,24
Tag 9	4,13 ± 0,10	< 1,7	< 1,7	< 1,7	< 1,7

Tabelle 5.iii H1N1v-Virusverteilung in der Maus nach drei, sechs und neun Tage Infektion mit der niedrigen Virusdosis*.

H1N1v-niedrig	Lunge	mLN	Thymus	Milz	Blut
Tag 3	6,55 ± 0,35	4,41 ± 0,38	2,45 ± 0,38	2,11 ± 0,22	3,18 ± 0,75
Tag 6	6,15 ± 0,18	2,64 ± 0,45	2,46 ± 0,22	< 1,7	1,92 ± 0,88
Tag 9	4,09 ± 0,35	< 1,7	< 1,7	< 1,7	< 1,7

*In Leber, Niere, Herz und Gehirn konnten keine infektiösen Viruspartikel detektiert werden und die Organe sind daher in der Tabelle nicht aufgeführt. Der Virustiter ist angegeben als der Logarithmus in Foci-bildenden Einheiten je 1ml eines zehnprozentigen Organhomogenats (n = 4 Tiere). Die Standardabweichung ist als SEM angegeben und die Detektionsgrenze des Tests beläuft sich auf den Wert von log 1,7.

Virus konnte nach beiden Infektionsdosen in Lunge, mLN, Thymus und Blut nachgewiesen werden. Auch die Eliminierung des Virus aus den einzelnen Organen verlief ähnlich. So konnte an Tag 9 nur noch in der Lunge die Präsenz infektiöser Viruspartikel dokumentiert werden. Zudem war die virale Last zwischen beiden Infektionsdosen ähnlich.

Da zwischen viraler Last und der Virusverteilung innerhalb der infizierten Tiere keine Unterschiede dargelegt werden konnten, schien der Verlauf der Erkrankung nicht direkt von diesen Faktoren abhängig zu sein. Andere Faktoren als die virale Präsenz innerhalb der während der Influenzavirus-bedingten Pathogenese mussten ausschlaggebend sein und daher wurde in den weiteren Untersuchungen zuerst auf die T-Zellantwort fokussiert.

5.7.1 Analysen der T-Zellantwort nach einer hohen und niedrigen H1N1v-Infektionsdosis

In einem ersten Schritt wurden die Frequenzen der CD4⁺, CD8⁺ T-Zellen und Tregs in Lunge und Thymus ermittelt (Abbildung 5.XVIII). Es zeigte sich, dass in der Lunge sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen erst zu einem späten Zeitpunkt, nämlich im Rahmen der ausgewählten Untersuchungstage an Tag 9 signifikant expandierten. In der Lunge von Kontrolltieren waren 3% CD4⁺ T-Zellen vorhanden. Durch die hohe Infektionsdosis konnten an Tag 9 26% CD4⁺ T-Zellen nachgewiesen werden, während sich die Expansion der CD4⁺ T-Zellen nach niedriger H1N1v-Infektionsdosis auf 14% steigerte (Abbildung 5.XVIII A). Im Thymus konnte über die Dauer des Beobachtungszeitraums keine signifikante Expansion der CD4⁺ T-Zellen beobachtet werden. Jedoch stieg der Anteil an CD4⁺ T-Zellen nach hoher H1N1v-Infektionsdosis kontinuierlich an (Abbildung 5.XVIII B). Die Frequenz der CD8⁺ T-Zellen wies in Lunge und Thymus ein ähnliches Bild auf. In der Lunge expandierte diese Zellpopulation für beide Infektionsdosen erst an Tag 9 von 3% auf 26% nach hoher und 13% nach niedriger Infektionsdosis. Der Unterschied innerhalb der beiden Gruppen war signifikant (Abbildung 5.XVIII C). Im Thymus konnte für die CD8⁺ T-Zellen für keinen der gemessenen Zeitpunkte oder Infektionsdosen eine deutliche Expansion beobachtet werden (Abbildung 5.XVIII D). Im Gegensatz zu den CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen war die Treg-Fraktion in der Lunge schon an Tag 6 nach hoher H1N1v-Dosis expandiert und wies eine hohe Frequenz von 1,5% im Vergleich zur Kontrolle mit 0,5% auf. Diese Treg-Expansion blieb auch an Tag 9 mit 2% hoch, wobei hier die niedrige Infektionsdosis eine ähnliche Treg-Expansion verursachte (Abbildung 5.XVIII E).

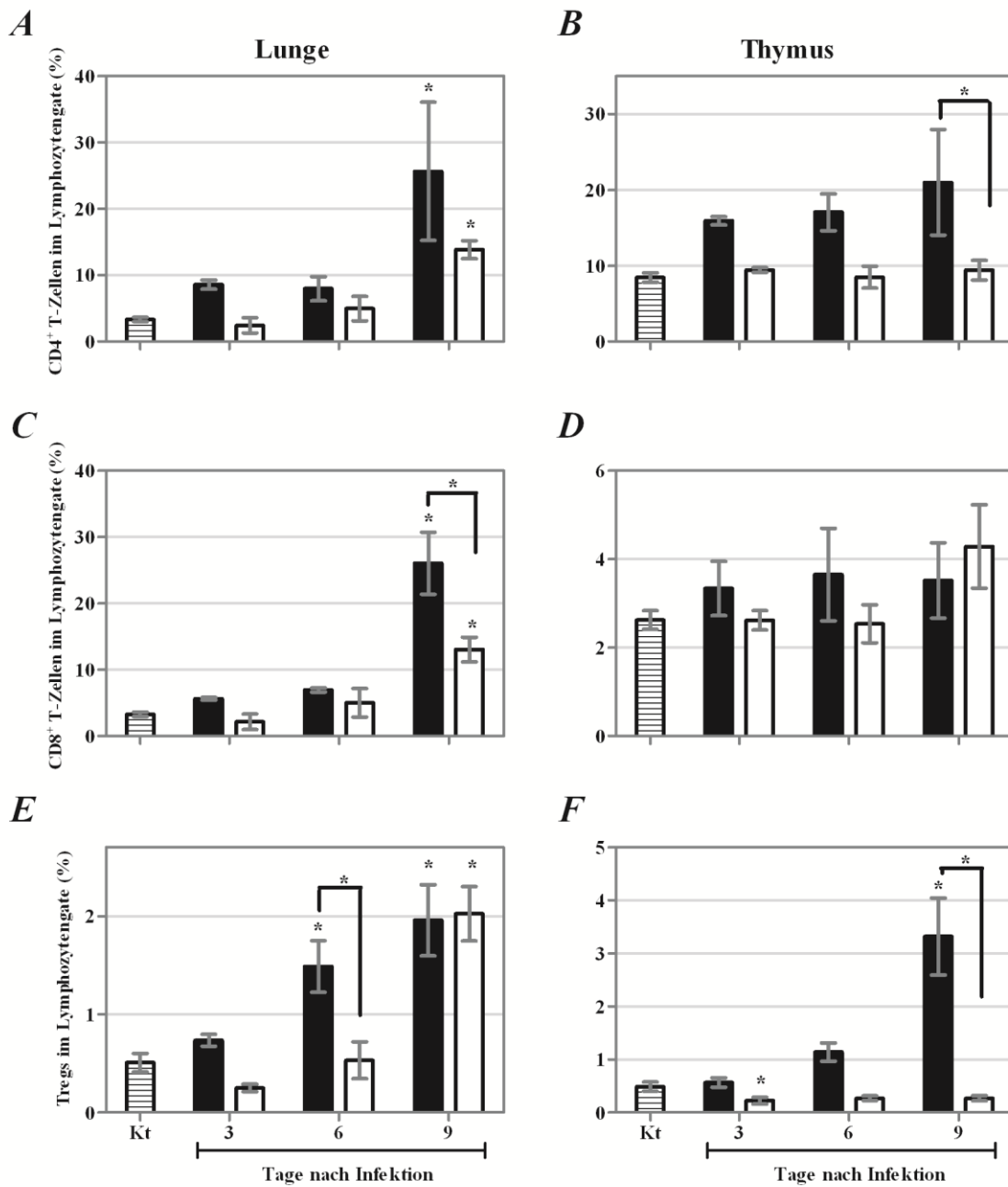


Abbildung 5.XVIII Frequenz der unterschiedlichen T-Zellpopulationen an Tag 3, 6 und 9 nach hoher (*schwarz*) und niedriger (*weiß*) H1N1v-Infektion. Gemessen wurden in der Durchflusszytometrie die Frequenz der CD4⁺ T-Zellen in Lunge (**A**) und Thymus (**B**), der CD8⁺ T-Zellen in Lunge (**C**) und Thymus (**D**) und der Tregs in Lunge (**E**) und Thymus (**F**). Jeder Zeitwert besteht aus Proben von vier Tieren. Dem Mittelwert ist die SEM hinzugefügt. Der Dunnett-Test gibt die Signifikanz zwischen Kontrolle und den gemessenen Versuchswerten an, der Bonferroni-Test die Signifikanzen der beiden Infektionsdosen innerhalb des gleichen Zeitwerts ($p < 0,05$).

Im Thymus konnte ein signifikanter Anstieg der Tregs nach hoher H1N1v-Infektion von 0,5% auf 3,3% an Tag 9 beobachtet werden. Durch die niedrige Infektionsdosis konnten keine Unterschiede beobachtet werden (Abbildung 5.XVIII*F*).

Die Tregs expandierten nach einer hohen H1N1v-Infektion vor den Effektor-T-Zellen. Da Tregs in erster Linie auf T-Zellen und deren Immunantwort einen Einfluss haben, wurde angenommen, dass nach hoher Infektionsdosis ab Eintreten der Treg-Funktion die T-Zellen eine verminderte Funktionalität aufwiesen. Aus diesem Grund wurde das T_H1- und T_H2-spezifische Zytokinprofil in einem nächsten Schritt an Tag 6 und Tag 9 nach Infektion untersucht.

In der Lunge verursachte die hohe H1N1v-Infektionsdosis an Tag 6 einen signifikanten Anstieg der T_H2-spezifischen Zytokine IL-4, IL-5 und IL-10. An Tag 9 waren alle drei Zytokinexpressionslevel ähnlich der ursprünglichen Konzentration nicht-infizierter Kontrolltiere (Abbildung 5.XIX*A-C*). Auch die Infektion mit einer niedrigen H1N1v-Dosis verursachte einen signifikanten Anstieg von IL-4 und IL-5 an Tag 6. Tag 9 wies immer noch eine höhere Konzentration der Zytokine auf im Vergleich zu Kontrolltieren. Wurde IL-10 betrachtet, konnten keine signifikanten Unterschiede an den beobachteten Zeitwerten nachgewiesen werden (Abbildung 5.XIX*D-F*). Für die T_H1-spezifischen Zytokine IFN- γ und TNF- α konnte ein ähnliches Auftreten gezeigt werden. An Tag 6 verursachte die hohe H1N1v-Infektion einen Anstieg von IFN- γ , der an Tag 9 jedoch nicht mehr zu messen und die Konzentration ähnlich der Kontrollorgane war (Abbildung 5.XIX*G*). Die Expression von TNF- α ging über die Dauer des Versuchs signifikant zurück (Abbildung 5.XIX*H*). Auch die niedrige H1N1v-Infektionsdosis verursachte lediglich an Tag 6 einen Anstieg an IFN- γ (Abbildung 5.XIX*I*). TNF- α verhielt sich ähnlich der hohen Infektionsdosis und verlor an Konzentration (Abbildung 5.XIX*J*). Die Reduktion Zytokinkonzentration nach hoher H1N1v-Infektionsdosis von Tag 6 auf Tag 9 bestätigte die Vermutung, dass zu letzterem Zeitwert keine aktive T-Zellantwort mehr stattfand. Es war zudem möglich über den Quotienten von IFN- γ /IL-4 eine Aussage zu treffen, ob die Immunantwort humoral oder zellulär gerichtet war. Lag dieser Wert über „1“, handelt es sich um ein T_H1- und unter „1“ um ein T_H2-Immunantwort-favorisierendes Milieu (Rasche et al., 2007). Der berechnete Quotient in der Lunge an Tag 6 nach hoher beziehungsweise niedriger Infektionsdosis ergab, dass basierend auf der Kontrolle die hohe Infektionsdosis keine T-Helferzellimmunantwort favorisierte, während die niedrige Infektionsdosis eine verstärkte

T_H2 -Immunantwort in der Lunge aufwies (Abbildung 5.XIXK). Daher war anzunehmen, dass an Tag 6 nach hoher Infektionsdosis keine gerichtete Immunantwort stattfand.

Jedoch waren auch nach niedriger Infektionsdosis von Tag 6 auf Tag 9 die Expressionslevel rückgängig, weswegen im Folgenden noch die Zytokinkonzentrationen in Serum und Thymus untersucht wurden.

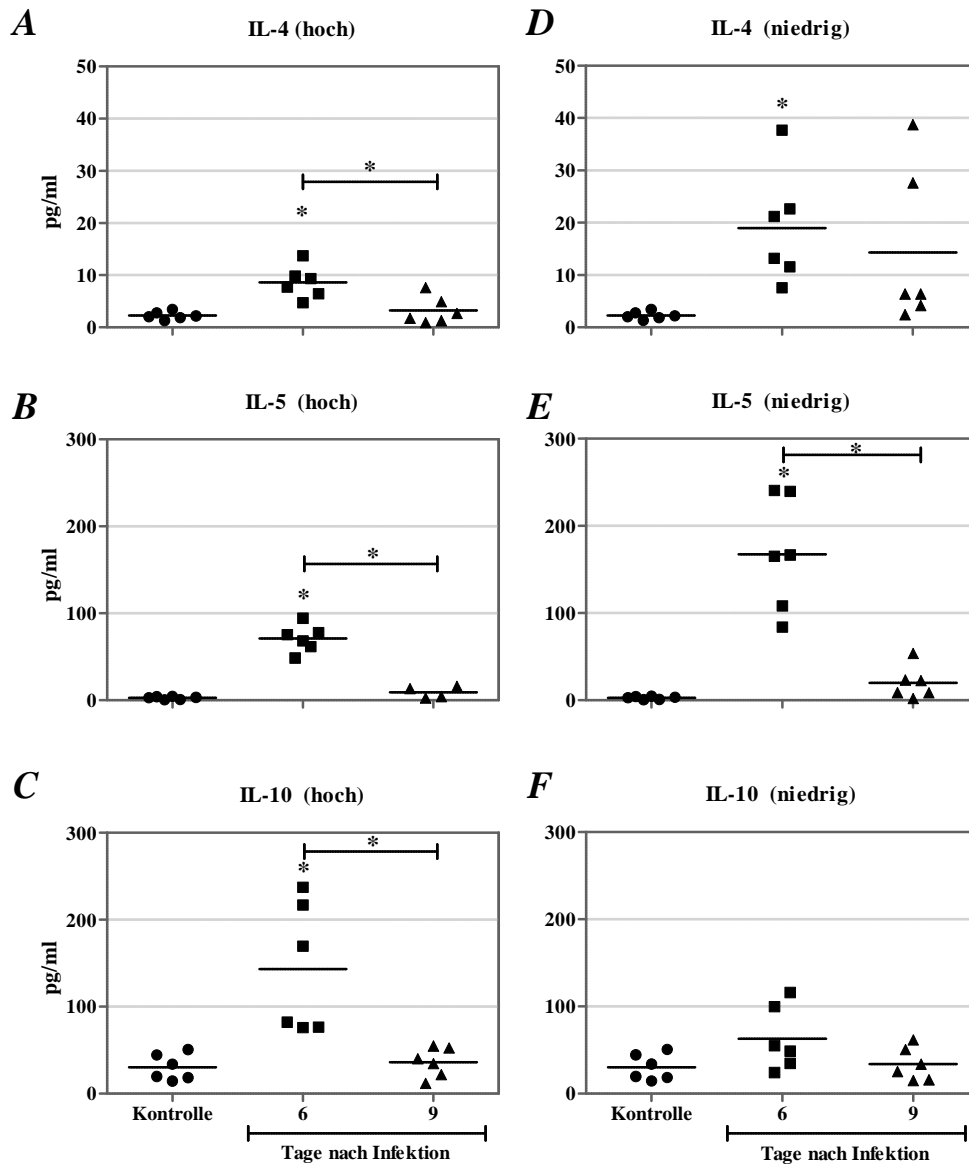


Abbildung 5.XIX Teil 1 Zytokinnachweis der T-zellspezifischen Immunantwort in der Lunge sechs und neun Tage nach H1N1v-Infektion.

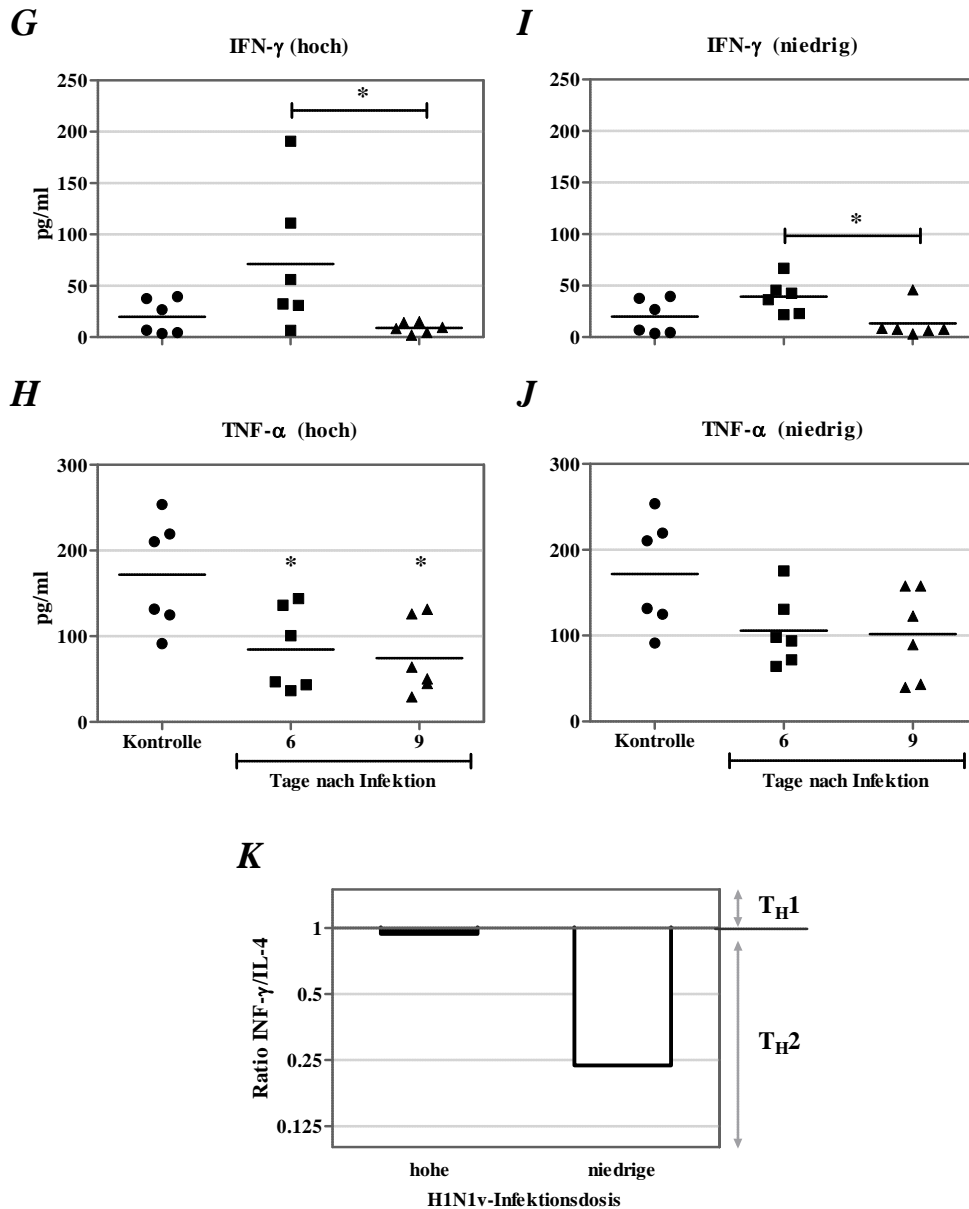


Abbildung 5.XIX *Fortsetzung* Zytokinnachweis der T-zellspezifischen Immunantwort in der Lunge sechs und neun Tage nach H1N1v-Infektion. Gemessen wurden die Konzentrationen von IL-4 (A), IL-5 (B), IL-10 (C) nach hoher H1N1v-Infektionsdosis und IL-4 (D), IL-5 (E), IL-10 (F) nach niedriger H1N1v-Infektionsdosis. Zudem wurde die Konzentration von IFN- γ (G) und TNF- α (H) nach hoher H1N1v-Infektionsdosis und IFN- γ (I) und TNF- α (J) nach niedriger H1N1v-Infektionsdosis bestimmt. Jeder aufgezeigte Messwert ist ein Einzelwert. Zusätzlich wurde für den Tag 6 nach Infektion der Quotient der T_H1/T_H2 -Antwort bestimmt (K), der Quotient der Kontrolle diente als „1“. Gruppen bestanden aus drei Mäusen, deren Proben zweimal voneinander unabhängig gemessen wurde. Der Tukey-Test gibt die Signifikanzen entweder zur Kontrolle oder wie angezeigt wieder ($p < 0,05$).

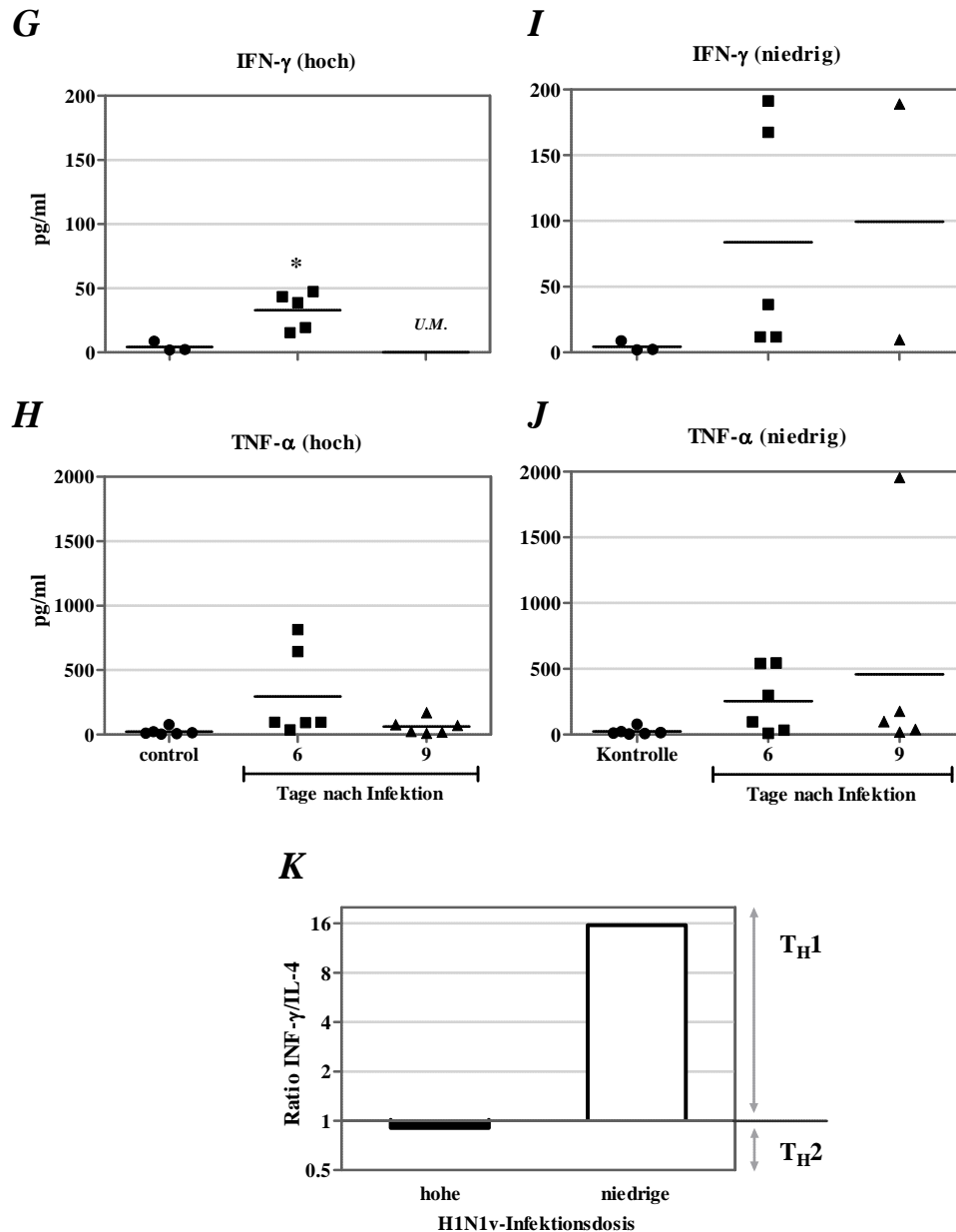


Abbildung 5.22 Fortsetzung Zytokinnachweis der T-zellspezifischen Immunantwort im Serum sechs und neun Tage nach H1N1v-Infektion. Gemessen wurden die Konzentrationen von IL-4 (A), IL-5 (B), IL-10 (C) nach hoher H1N1v-Infektionsdosis und IL-4 (D), IL-5 (E), IL-10 (F) nach niedriger H1N1v-Infektionsdosis. Zudem wurde die Konzentration von IFN- γ (G) und TNF- α (H) nach hoher H1N1v-Infektionsdosis und IFN- γ (I) und TNF- α (J) nach niedriger H1N1v-Infektionsdosis bestimmt. Jeder aufgezeigte Messwert ist ein Einzelwert. Zusätzlich wurde für den Tag 6 nach Infektion der Quotient der T_H1/T_H2-Antwort bestimmt (K), der Quotient der Kontrolle diente als „1“. Die Gruppen bestanden aus drei Mäusen, deren Proben zweimal voneinander unabhängig gemessen wurde. Der Tukey-Test gibt die Signifikanzen entweder zur Kontrolle oder wie angezeigt wieder ($p < 0,05$). Die Abkürzung „U.M.“ steht für Werte unterhalb der Messgrenze.

Im Serum nach einer hohen Infektionsdosis konnten für die Konzentrationen von IL-4 und IL-5 wiederum nur an Tag 6 ein Anstieg der Zytokinkonzentration beobachtet werden (Abbildung 5.XXA,B). IL-10 war sowohl an Tag 6 als auch Tag 9 erhöht (Abbildung 5.XXC). Nach der niedrigen Infektionsdosis konnte ein leichter Anstieg an IL-4 gemessen werden, IL-5 war erhöht (Abbildung 5.XXD-F). Für die Konzentration von IFN- γ konnte an Tag 6 ein Anstieg gemessen werden, während an Tag 9 alle Messwerte unterhalb der Detektionsgrenze lagen. Auch TNF- α wies an Tag 6 einen Konzentrationsanstieg auf (Abbildung 5.XXG,H). Wurden die IFN- γ -Konzentration im Serum der Versuchstiere betrachtet, die mit einer niedrigen Infektionsdosis infiziert wurden, konnte an Tag 6 eine erhöhte Konzentration mit einer hohen Standardabweichung gemessen werden. Die Tag 9-Werte mussten von der Auswertung ausgenommen werden, da von sechs Messwerten nur zwei mit weit auseinanderliegenden Konzentrationen ausgewertet werden konnten (Abbildung 5.XXI). TNF- α wies für Tag 6 ebenfalls einen Konzentrationsanstieg auf. Auch an Tag 9 konnte ein hoher Messwert berechnet werden, der den Durchschnitt der TNF- α -Konzentration erhöhte (Abbildung 5.XXJ). Betrachtete man den Quotienten an Tag 6 zwischen IFN- γ und IL-4 konnte wie in der Lunge zuvor für die hohe Infektionsdosis kein favorisierendes Milieu erkannt werden, während die niedrige Infektionsdosis im Serum infizierter Tiere eine verstärkte T_H1-Immunantwort auslöste (Abbildung 5.XXK).

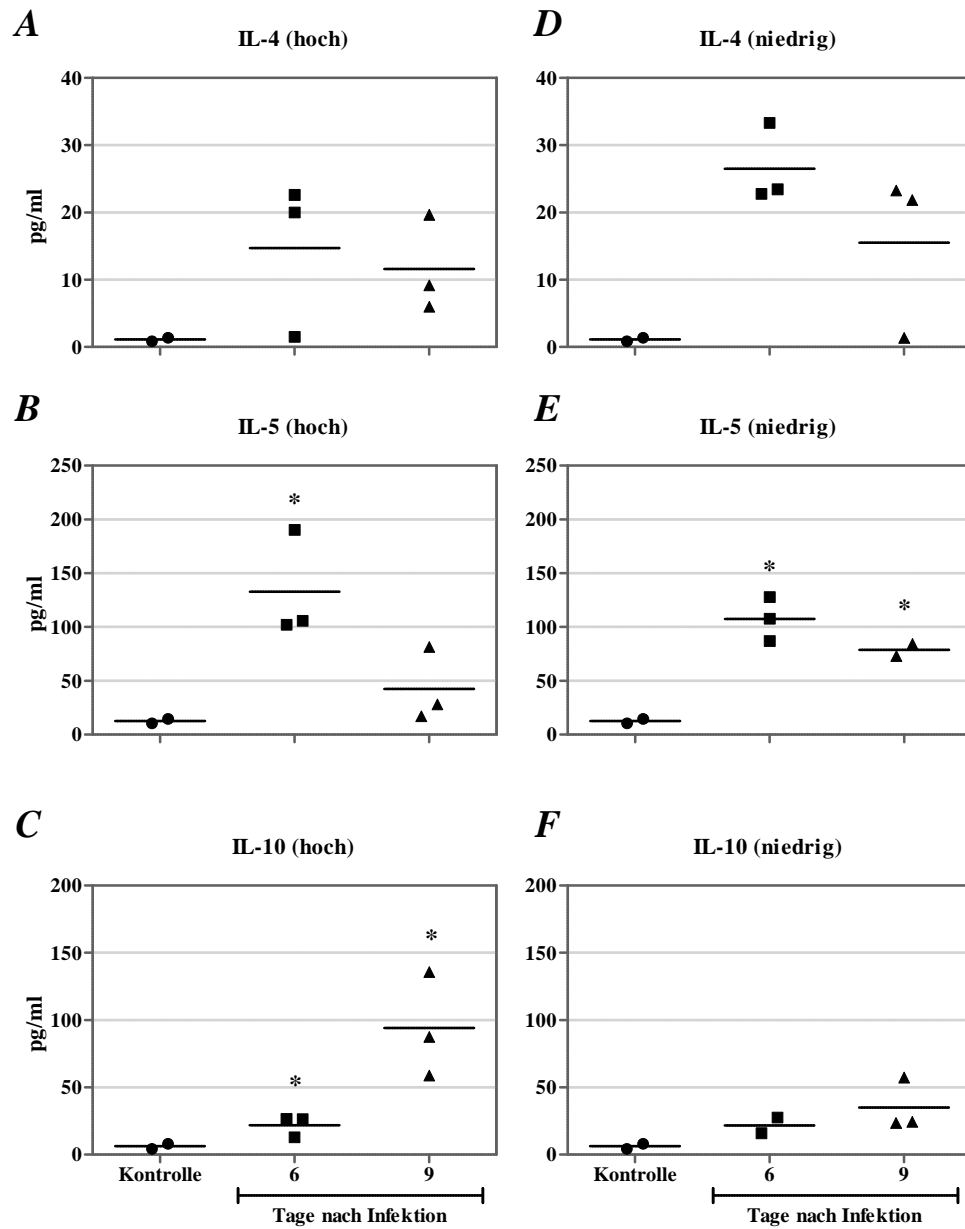


Abbildung 5.XXI Teil 1 Zytokinnachweis der T-zellspezifischen Immunantwort im Thymus sechs und neun Tage nach H1N1v-Infektion.

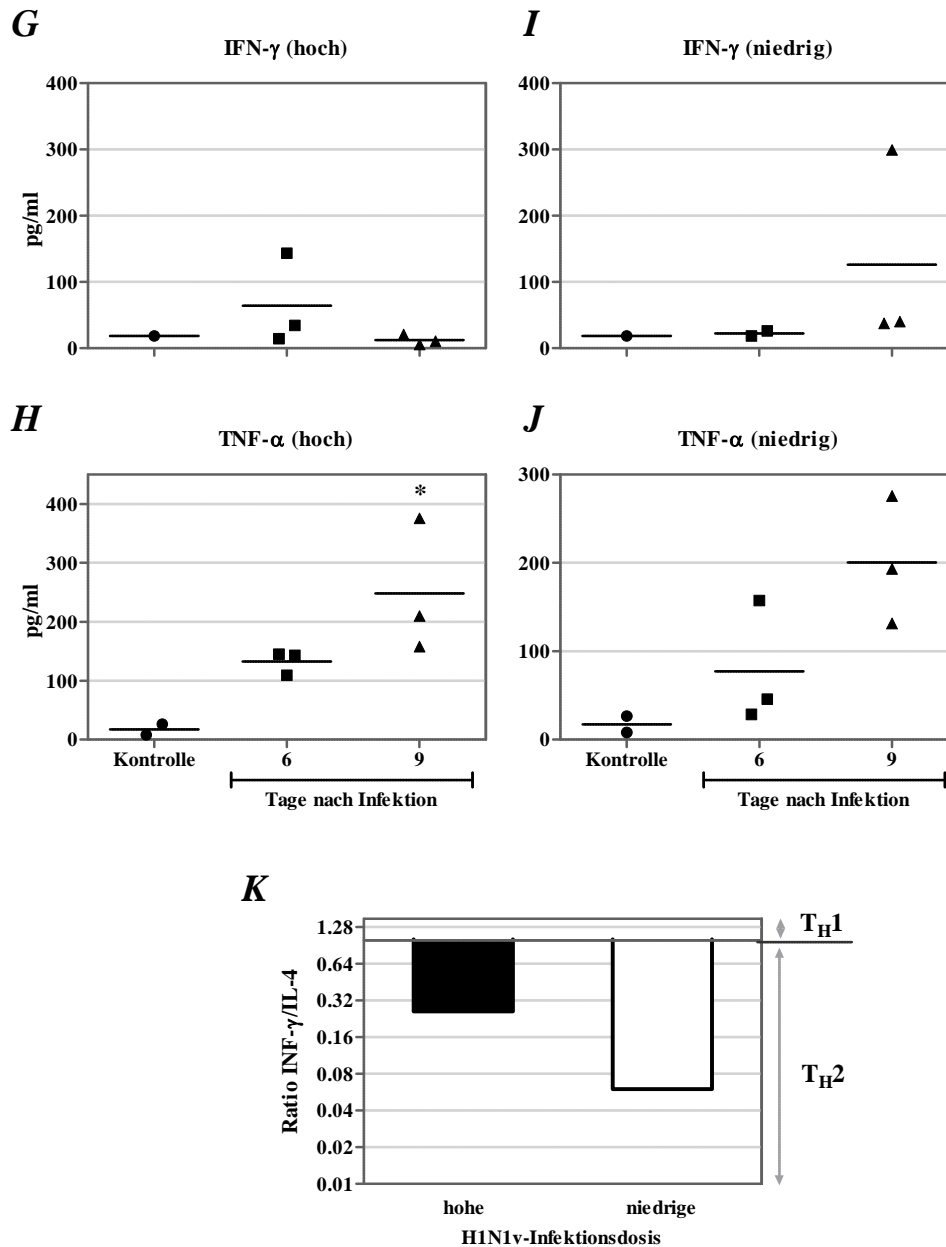


Abbildung 5.XXI *Fortsetzung* Zytokinnachweis der T-zellspezifischen Immunantwort im Thymus sechs und neun Tage nach H1N1v-Infektion. Gemessen wurden die Konzentrationen von IL-4 (A), IL-5 (B), IL-10 (C) nach hoher H1N1v-Infektionsdosis und IL-4 (D), IL-5 (E), IL-10 (F) nach niedriger H1N1v-Infektionsdosis. Zudem wurde die Konzentration von IFN- γ (G) und TNF- α (H) nach hoher H1N1v-Infektionsdosis und IFN- γ (I) und TNF- α (J) nach niedriger H1N1v-Infektionsdosis bestimmt. Jeder aufgezeigte Messwert ist ein Einzelwert. Zusätzlich wurde für den Tag 6 nach Infektion der Quotient der T_H1/T_H2 -Antwort bestimmt (K), der Quotient der Kontrolle diene als „1“. Gruppen bestanden aus drei Mäusen, Proben wurden einmalig gemessen. Der Tukey-Test gibt die Signifikanzen entweder zur Kontrolle oder wie angezeigt wieder ($p < 0,05$). Für die IFN- γ -Werte konnten aufgrund fehlender Messwerte keine Signifikanzen berechnet werden.

Auch die T-Zellantwort-spezifischen Zytokine des Thymus wurden untersucht. Nach hoher Infektionsdosis konnte sowohl für IL-4- als auch für IL-5-Konzentration ein Anstieg während der Infektionsdauer beobachtet werden. IL-10 wies ebenfalls einen Anstieg über die Dauer des Experiments auf (Abbildung 5.XXIA-C). Die niedrige Infektionsdosis erhöhte die Konzentrationen ebenfalls (Abbildung 5.XXID-F). Nach hoher Infektionsdosis war die IFN- γ -Konzentration an Tag 6 am höchsten, während TNF- α erst an Tag 9 ein Konzentrationsmaximum aufwies (Abbildung 5.XXIG,H). Während der Infektion mit der niedrigen H1N1v-Dosis waren sowohl IFN- γ als auch TNF- α erst an Tag 9 am höchsten exprimiert (Abbildung 5.XXII,J). Bei Betrachtung des Quotienten an Tag 6 wiesen beide Infektionsdosen eine Veränderung des Zytokinmilieus hin zur T_H2-Antwort auf (Abbildung 5.XXIK). Tabelle 5.iv gibt einen Überblick der Konzentrationen an Tag 6.

Tabelle 5.iv Auflistung der beobachteten Konzentrationen aus Abbildung 5.XIX bis Abbildung 5.XXI und der Expressionsvergleich zwischen hoher und niedriger Infektionsdosis an Tag 6 nach Infektion*.

	Lunge			Serum			Thymus		
	Hoch (pg/ml)	Niedrig (pg/ml)	Ratio	Hoch (pg/ml)	Niedrig (pg/ml)	Ratio	Hoch (pg/ml)	Niedrig (pg/ml)	Ratio
IL-4	8,5	19,0	0,45	6,4	1,4	4,57	14,7	26,5	0,55
IL-5	71,1	167,3	0,43	34,4	90,2	0,38	132,7	107,5	1,23
IL-10	143,1	62,9	2,28	21,4	17,7	1,21	22,0	21,8	1,01
IFN-γ	71,3	39,3	1,81	32,9	83,8	0,39	64,2	22,4	2,87
TNF-α	84,6	105,7	0,80	296,6	253,4	1,17	132,5	77,3	1,71

*Gegeben sind die Mittelwerte. Die Ratio berechnet sich durch den Mittelwert des Expressionswerts der hohen Infektionsdosis geteilt durch den Mittelwert des Expressionswerts der niedrigen Infektionsdosis. Dementsprechend bedeutet ein Wert über „1“ (Werte sind hervorgehoben) eine höhere Konzentration des Zytokins durch die höhere Infektionsdosis, ein Wert unter „1“ eine höhere Konzentration des Zytokins durch die niedrige Infektionsdosis.

Zwar verhielten sich die Expressionsmuster der Zytokine zwischen Infektionsdosen und Organen unterschiedlich, jedoch konnte kein eindeutiges zusammenfassendes Ergebnis ermittelt werden. Auffällig an Tag 6 war jedoch, dass in der Lunge nur IFN- γ und IL-10 nach hoher Infektionsdosis höher exprimiert wurde als nach niedriger Infektionsdosis. Auch im Thymus war IFN- γ nach hoher Infektionsdosis an Tag 6 höher exprimiert als nach der vergleichenden niedrigen Infektionsdosis. Während IL-10 durch T_H2-Helferzellen und vorhandenen Tregs exprimiert werden konnte, ist IFN- γ das Effektorzytokin zytotoxischer T-Zellen und kann zudem durch NK-Zellen exprimiert werden.

Daher wurden in einem nächsten Schritt zytotoxische T-Zellen genauer untersucht und der Anteil Influenzavirus-spezifischer CD8⁺ T-Zellen quantifiziert. Mäuse wurden entweder mit der hohen oder niedrigen H1N1v-Infektionsdosis infiziert und nach sechs Tagen getötet. Die Zellen der Lunge wurden in Suspension aufgenommen und auf die Spezifität des immundominanten Influenzapeptid NP₃₆₆₋₃₇₄ fluoreszenzmethodisch hin untersucht (Abbildung 5.XXII).

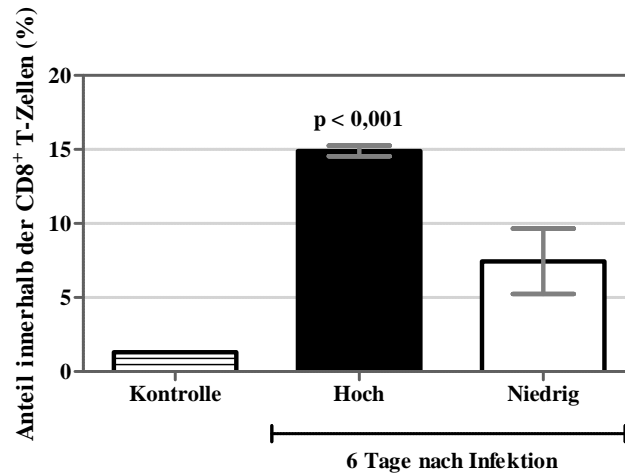


Abbildung 5.XXII Influenzavirus-spezifische CD8⁺ T-Zellen in der Lunge sechs Tage nach H1N1v-Infektion mit einer hohen (*schwarz*) oder niedrigen (*weiß*) Infektionsdosis. Ermittelt wurde der Anteil mittels fluoreszierendem Pentamer innerhalb der CD8⁺ T-Zellen. Die Kontrollgruppe bestand aus zwei Tieren, für beide infizierten Werte bestanden die Gruppen aus n = 3 Tieren. Die Standardabweichung ist als SEM angegeben. Der T-Test gibt die Signifikanzen an.

An Tag 6 nach Infektion war die Frequenz der CD8⁺ T-Zellen zwischen hoher und niedriger Infektionsdosis ähnlich (siehe hierzu Abbildung 5.XVIII). Innerhalb dieser Populationen konnten 15% beziehungsweise 7% als Pentamer-positiv identifiziert werden (Abbildung 5.XXII). Dies bedeutete, dass in der Gesamtmenge zwar eine gleiche Anzahl an zytotoxischen T-Zellen gefunden werden konnten, die Spezifität durch eine hohe H1N1v-Infektion jedoch höher war. Es stellte sich nun die Frage, ob die CD8⁺ T-zellbedingte Zytotoxizität dementsprechend nach hoher Infektionsdosis auch höher war.

Aus diesem Grund wurde ein *in vitro* Zytotoxizitätsassay durchgeführt. Hierfür wurden Mäuse mit 3×10^5 pfu/50 μ l beziehungsweise 3×10^3 pfu/50 μ l H1N1v infiziert und ebenfalls an Tag 6 getötet (Abbildung 5.XXIII).

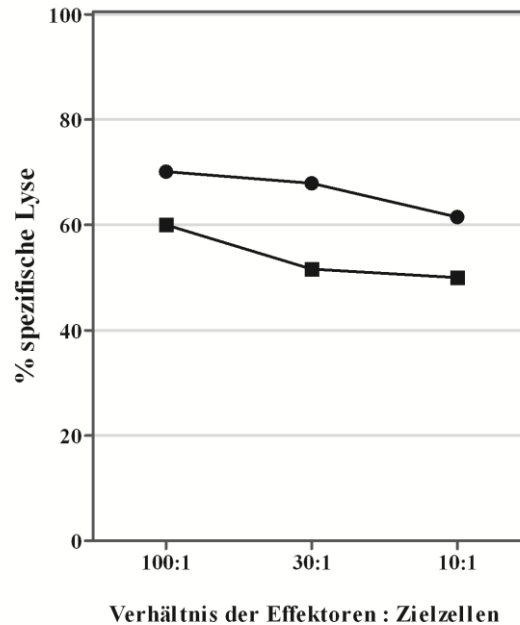


Abbildung 5.XXIII *In vitro* Zytotoxizitätstest mit Lymphozyten aus der Lunge sechs Tage nach hoher H1N1v-(*Quadrat*) beziehungsweise nach niedriger H1N1v-Infektion (*Kreis*). Werte spiegeln den Mittelwert von zwei Messwerten aus einem Zellpool von je zwei Tieren wieder.

Nach Infektion mit einer niedrigen H1N1v-Infektionsdosis konnte eine höhere spezifische Lyse im Vergleich zur hohen Infektionsdosis beobachtet werden. Eine hohe Infektionsdosis verursachte bei einem Verhältnis der Effektoren zu Zielzellen 100:1 eine Lyse von 60%. Ein Wert von 62% durch die niedrige Infektionsdosis wurde bei einem Verhältnis von 10:1 erreicht. Aus diesem Grund war die Lyse-Aktivität durch die niedrige Infektionsdosis etwa zehnfach höher. Die CD8⁺ T-Zellantwort durch die hohe Infektionsdosis war dementsprechend trotz höherer Spezifität reduziert, dennoch fand eine hohe IFN- γ -Ausschüttung in der Lunge und eine Eliminierung des Virus statt (Abbildung 5.XIX und Tabelle 5.ii). Durch die bisherigen Ergebnisse konnte daher davon ausgegangen werden, dass nicht nur T-Zellen für die Eliminierung des Virus verantwortlich waren.

5.7.2 Untersuchungen von Zellen der angeborenen Immunantwort

In einem nächsten Schritt sollte die Frequenz unterschiedlicher Zellpopulationen der angeborenen Immunantwort bestimmt werden, um mögliche Unterschiede zwischen hoher und niedriger Infektionsdosis nachzuweisen, die eine Viruseliminierung mitbegründen könnten (Abbildung 5.XXIV). Hierfür wurden Mäuse mit einer hohen beziehungsweise niedrigen H1N1v-Dosis infiziert und ein, drei oder sechs Tage nach Infektion getötet. Die Lunge

wurde auf das Vorkommen von CD11c⁺ DCs, CD11b⁺CD11c⁻ Makrophagen, Ly6G⁺ Neutrophile, NK1.1⁺CD3⁻ NK- und NK1.1⁺CD3⁺ NKT-Zellen im Durchflusszytometer untersucht. DCs wanderten sowohl nach hoher als auch niedriger Infektionsdosis vermehrt in die Lunge ein und erreichten bereits an Tag 1 einen Anteil von 10% nach hoher beziehungsweise niedriger H1N1v-Infektion. Anschließend reduzierte sich der Anteil, wobei die hohe Infektionsdosis auch eine vermehrte Reduktion verursachte und an Tag 6 DCs noch zu 1% zu finden waren bei einem ursprünglichen Kontrollwert von 5% (Abbildung 5.XXIVA). Makrophagen machten anfangs 2% der Zellen aus. Durch die hohe Infektionsdosis stieg der Anteil an Tag 1 auf 9% an. Der Anteil der Makrophagen während einer niedrigen Infektionsdosis betrug hier 5%. An Tag 3 nach Infektion war der Anteil mit etwa 6% vergleichbar zwischen den zwei Infektionsdosen und an Tag 6 ging der Anteil weiter zurück (Abbildung 5.XXIVB). Neutrophile wanderten erst an Tag 3 in die Lunge ein. Zu Beginn waren 10% Neutrophile nachweisbar. An Tag 3 wuchs dieser Anteil auf 39% nach hoher und 28% nach niedriger Infektionsdosis stark an. Auch an Tag 6 nach Infektion war die Zellzahl immer noch sehr hoch und wuchs auf 50% beziehungsweise 39% weiter an (Abbildung 5.XXIVC). NK-Zellen sind neben CD8⁺ T-Zellen für die Lyse infizierter Zellen wichtig. In der Lunge nicht-infizierter Kontrolltiere betrug der Anteil dieser Zellen 4%. Nach hoher H1N1v-Infektion betrug dieser Anteil bereits drei Tage nach Infektion 21%. Auch durch die niedrige H1N1v-Infektion konnte ein Anstieg der Population beobachtet werden, jedoch war dieser mit 13% an Tag 3 und 15% an Tag 6 geringer (Abbildung 5.XXIVD). NKT-Zellen sind eine T-Zellpopulation und besitzen ähnlich Tregs immunregulatorische Funktion. Während in Lungen nicht-infizierter Mäuse lediglich 0,14% als NKT-Zellen charakterisiert wurden, waren an Tag 3 nach hoher Infektionsdosis bereits 0,5% dieser Ereignisse NKT-Zellen. Dies war im Verhältnis zu der Kontrolle eine Steigerung von 378%. Auch an Tag 9 konnte mit 0,9% eine Expansion der NKT-Zellen ermittelt werden. Durch die niedrige Infektionsdosis konnte eine Expansion der NKT-Zellen in der Lunge beobachtet werden, diese setzte jedoch erst an Tag 6 nach Infektion ein und betrug 0,7% (Abbildung 5.XXIVE).

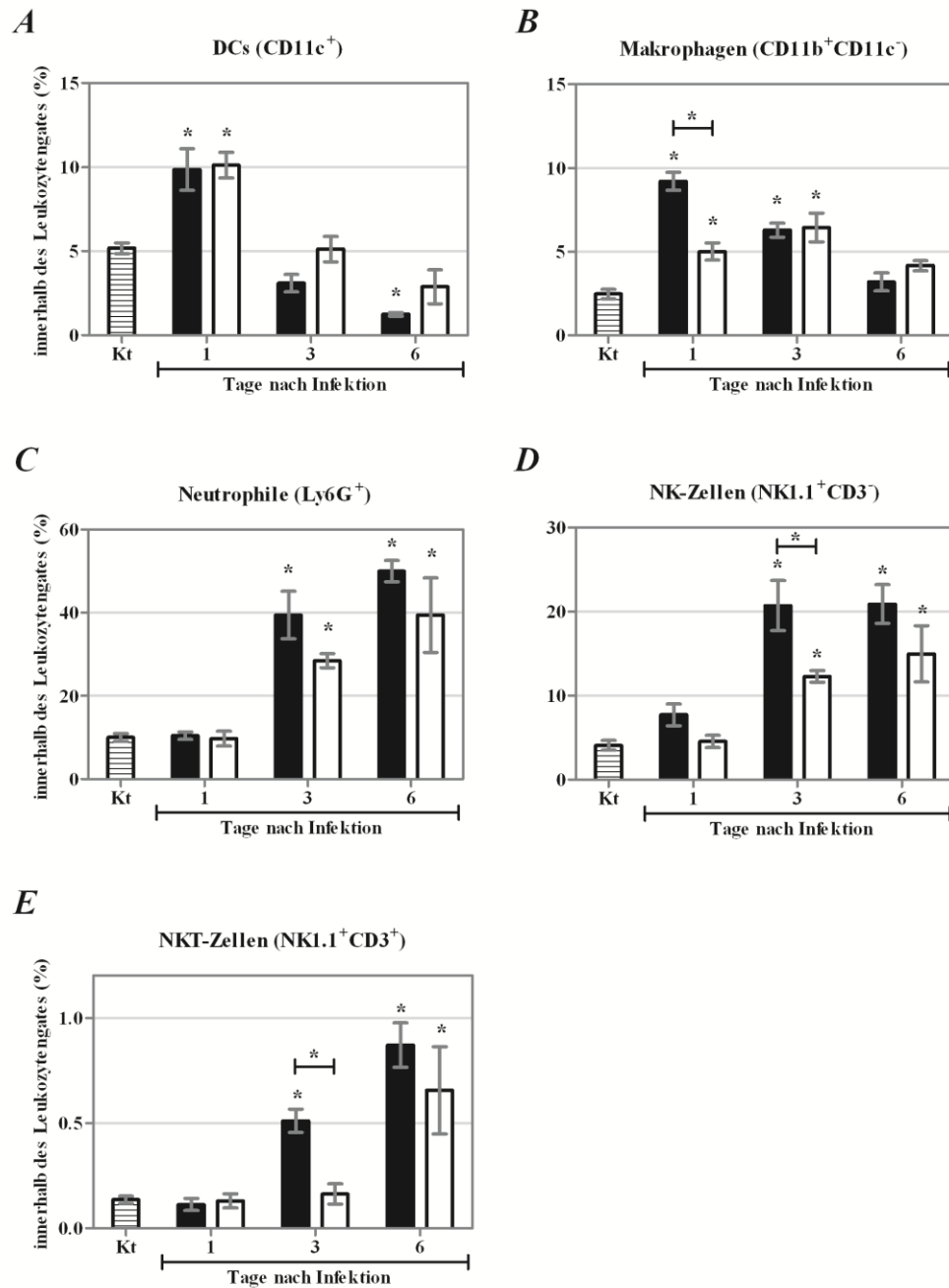


Abbildung 5.XXIV Anteil unterschiedlicher Zellpopulationen der angeborenen Immunantwort nach hoher (*schwarze Balken*) beziehungsweise niedriger H1N1v-Infektion (*weiße Balken*). Gemessen wurde zu den Zeitpunkten ein, drei und sechs Tage nach Infektion, wobei jede Gruppe $n = 4$ Tiere beinhaltete. Untersucht wurden DCs (**A**), Makrophagen (**B**), Neutrophile (**C**), NK-Zellen (**D**) und NKT-Zellen (**E**). Dem Mittelwert ist die Standardabweichung in SEM hinzugefügt. Der Dunnett-Test gibt die Signifikanzen zur Kontrolle an und der Bonferroni-Test die Signifikanzen der beiden Infektionsgruppen eines Zeitwertes zueinander (* p -Wert $< 0,05$).

Dieser Versuch zeigte, dass neben frühen quantitativen Unterschieden der Treg-Populationen in der Lunge zudem auch Zellen der angeborenen Immunantwort Frequenzunterschiede zwischen den beiden H1N1v-Infektionsdosen aufwiesen. Speziell der hohe und rasche Anstieg der NK-Zellen erklärte die frühe Viruseliminierung und die bereits nachgewiesene IFN- γ -Konzentration in der Lunge.

5.8 Das Potenzial der generierten Tregs *in vivo*

Die Möglichkeit bestand, dass periphere Tregs nach hoher H1N1v-Infektion die T-Zellantwort inhibierte. Um das Potenzial der durch eine hohe Infektionsdosis generierten Tregs besser zu verstehen und deren Funktionalität *in vivo* zu überprüfen, wurde ein adoptiver Transfer durchgeführt, indem Tregs aus der Peripherie von C57BL/6-Donormäusen, die mit einer hohen H1N1v-Infektionsdosis infiziert wurden, in C57BL/6-Akzeptormäuse transferiert wurden, die wiederum mit der niedrigen Infektionsdosis infiziert waren (Abbildung 5.XXV und Abbildung 5.XXVI). Donormäuse wurden an Tag 4 getötet und deren Tregs aus der Milz isoliert. Die frisch isolierten Tregs wurden den Akzeptormäusen, die ebenfalls vier Tage zuvor mit der niedrigen Infektionsdosis infiziert wurden, intravenös appliziert. Zusätzlich wurden weiteren infizierten Mäusen ab Tag 4 dreimalig Rapamycin appliziert. Durch Rapamycin können Tregs *in vitro*, aber auch *in vivo* expandieren (Gao et al., 2007). Alle Mäuse wurden auf Überleben, Gewicht, Körpertemperatur und der Gesamtaktivität hin beobachtet.

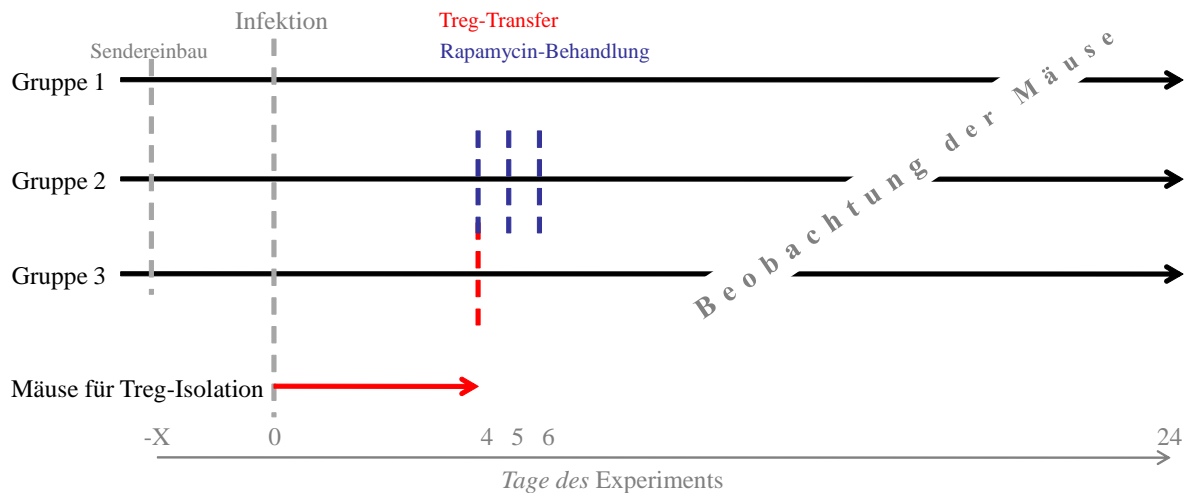


Abbildung 5.XXV Schema des adoptiven Transfers. C57BL/6-Mäusen wurde ein Sender, der Temperatur und Bewegung an einen Empfänger überträgt, in den Bauchraum implantiert. Sobald bei allen Mäusen ein gesunder Zustand beobachtet werden konnte, wurden diese mit der niedrigen H1N1v-Dosis infiziert. Parallel hierzu wurden zehn weitere C57BL/6-Mäuse mit der hohen Infektionsdosis infiziert. Vier Tage später wurden diese getötet und aus der Milz Tregs isoliert. Je 1×10^6 Zellen dieser Treg-Fraktion wurden nun allen Tieren der Gruppe 3 intravenös appliziert. Parallel hierzu wurde allen Tieren der Gruppe 2 Rapamycin intraperitoneal verabreicht. Diese Behandlung wurde an Tag 5 und 6 wiederholt. Tiere der Gruppe 1 dienten als Kontrolle. Anschließend wurden die Mäuse beobachtet.

Jede Maus, die mit einer niedrigen Infektionsdosis infiziert wurde, überlebte, verlor aber an Gewicht und wurde krank (Abbildung 5.XXVIA-C). Die Mäuse der Kontrollgruppe, die weder Rapamycin noch Tregs appliziert bekamen, verloren bis zum Tag 8 nach Infektion etwa 15% ihres ursprünglichen Körpergewichts. Zu diesem Zeitpunkt waren auch die Krankheitssymptome am stärksten ausgeprägt mit einem Wert von 2 und die Temperatur von ursprünglich $36,5^\circ\text{C}$ auf 35°C an Tag 9 am niedrigsten (Abbildung 5.XXVIB-D *schwarze Linie*). Der Krankheitsbeginn belief sich auf den Zeitpunkt als die unterschiedlichen Therapieansätze begannen. Dementsprechend begannen die Mäuse, die Rapamycin erhielten, zum selben Zeitpunkt Gewicht zu verlieren. Erst an Tag 13 wiesen sie die höchste Abnahme auf 80% des Ursprunggewichts auf. Auch der Krankheitszustand blieb bis Tag 11 mit einem Wert von 2 konstant hoch. Erst ab Tag 17 konnten keine Krankheitsanzeichen mehr erkannt werden. Auch der verringerte Temperaturwert blieb länger erhalten, wobei die niedrigste Temperatur an Tag 10 zu messen war (Abbildung 5.XXVIB-D *blaue Linie*). Mäuse, die eine einzelne Gabe von Tregs erhielten, wiesen einen schlechteren Allgemeinzustand als Tiere der Kontrollgruppe auf. Alle Treg-Akzeptormäuse überlebten, verloren jedoch stark an Gewicht und brauchten länger für die Rekonvaleszenz als Kontrolltiere. Auch der schlechte Krankheitszustand hielt länger an. Erst ab Tag 20 konnten hier keine

Anzeichen einer Erkrankung mehr beobachtet werden. Die Temperatur wies den stärksten Abfall im Vergleich mit den anderen beiden Gruppen auf. Zwischen Tag 9 und 11 hatten die Tiere eine Körpertemperatur von nur noch 34°C (Abbildung 5.XXVIB-D rote Linie). Für alle drei Gruppen um den Zeitraum des Tages 10 nach Infektion nahm die Aktivität ab. Es konnten jedoch keine deutlichen Unterschiede beobachtet werden (Abbildung 5.XXVIE,F).

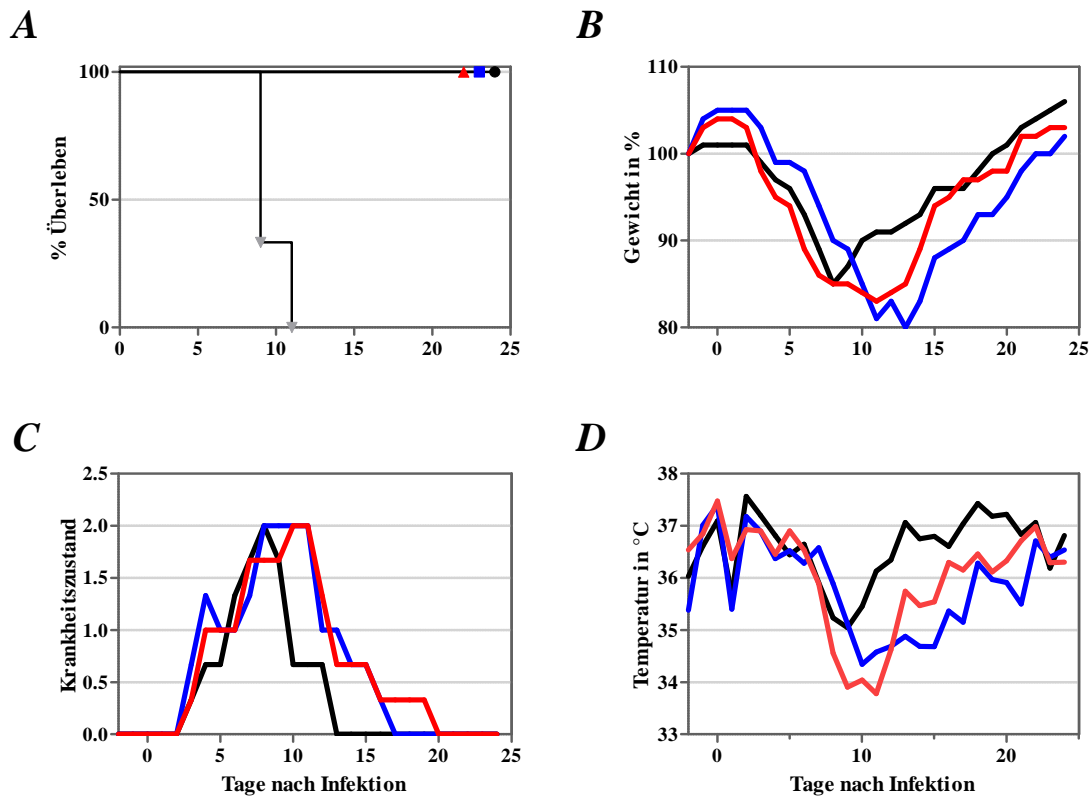


Abbildung 5.XXVI Teil 1 Ergebnisse des adoptiven Transfers von Treg.

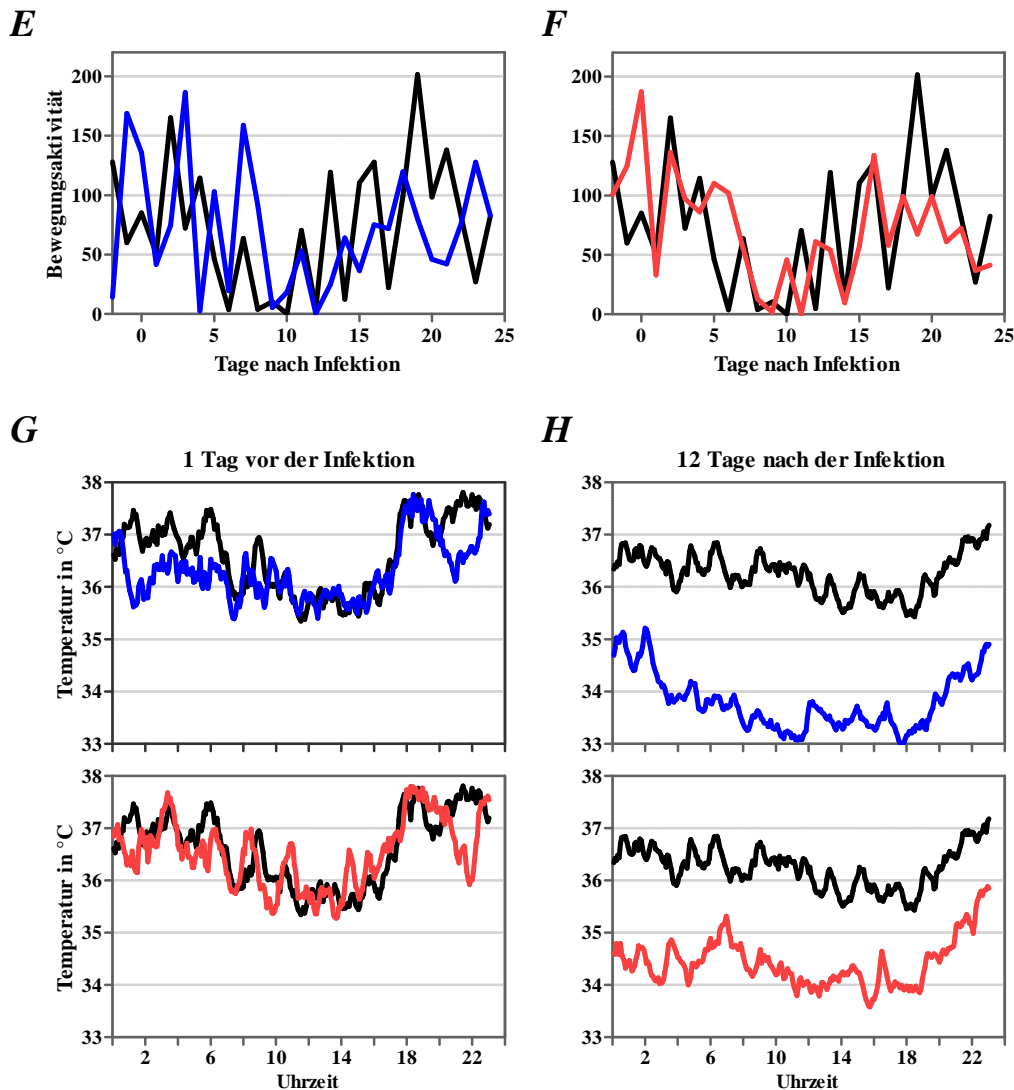


Abbildung 5.XXVI *Fortsetzung* Ergebnisse des adoptiven Transfers von Treg-Mäusen, die mit der niedrigen H1N1v-Infektionsdosis infiziert wurden, wurden an Tag 4 aufgeteilt in Kontrolltiere (*schwarz*), Tiere, die eine Rapamycinbehandlung erhielten (*blau*), und Tiere, die eine einmalige Treg-Gabe erhielten (*rot*). Alle Tiere überlebten; weitere Kontrolltiere, die mit einer hohen Dosis zeitgleich mit den Treg-Spendertieren infiziert wurden, starben (*A*). Alle Tiere nahmen an Gewicht ab (*B*) und zeigten optisch gemessene Krankheitssymptome auf einer Skala von 1 bis 4 (*C*). Zum gleichen Zeitpunkt verloren die Tiere an Temperatur (*D*). Zusätzlich wurde über den gesamten Zeitraum die Bewegungsaktivität gemessen (*E,F*). Alle fünf Minuten wurden Werte für Bewegung und Temperatur ermittelt. Auf einen Tag aufgeteilt haben gesunde Tiere einen Temperaturwert von etwa 36 bis 37°C (*G*). Durch die Infektion und unterschiedlichen Behandlungsmethoden konnte dieser Wert an Tag 12 bis 33°C zurückgehen (*H*). Jede Gruppe bestand aus drei Tieren, wobei jeder aufgezeigte Wert ein Mittelwert dieser ist. Die Tiere der Kontrollgruppen der niedrigen Infektionsdosis und die Überlebenskurve der Kontrollgruppe der hohen Infektionsdosis sind mit den Mäusen aus Abbildung 5.XIV identisch.

Mäuse haben einen zirkadianen Rhythmus mit der höchsten Aktivität abends, was auch einen Anstieg der Temperatur in den Abendstunden verursacht. Für alle drei Gruppen konnte dieser Temperaturanstieg nachts vor der Infektion beobachtet werden (Abbildung 5.XXVIG). Zwölf Tage nach Infektion hatten die Mäuse der Kontrollgruppe ihre ursprüngliche Temperatur wieder erreicht, im Gegensatz hierzu waren die Temperaturen der Rapamycin- und Treg-erhaltenden Gruppen bis zu 3°C geringer. Auch war der zirkadiane Rhythmus beeinträchtigt (Abbildung 5.XXVIF).

Die ermittelten Ergebnisse dieses Versuchs wiesen auf, dass die transferierten T-Zell-supprimierende Tregs einen additiven Einfluss auf die Pathogenese durch Influenzaviren hatten und dass deren Generierung stark von der Infektionsdosis abhing. Die Tatsache, dass Tregs auch während einer akuten, nicht-chronischen Infektion am Krankheitsverlauf beteiligt sind, war neu und deutete zudem auf die Wichtigkeit der Tregs während einer viralen Infektion hin. Ein besseres Verständnis der Treg-Funktionen während einer Infektion wäre somit erstrebenswert. Aus diesem Grund wurden in einem weiteren Modell Regulatorische T-Zellen untersucht.

5.9 Der Einfluss regulatorischer T-Zellen auf die Borna Disease Virus-induzierte Immunpathogenese im Gehirn

Nach der Infektion mit dem Borna Disease Virus (BDV) kommt es zu einer Immunpathologie im Gehirn der Ratte, die aus unbekanntem Gründen selbst-limitierend ist. Im Rahmen dieser Arbeit trat jedoch die Frage auf, ob Regulatorische T-Zellen an der Limitierung der antiviralen Immunantwort beteiligt sein könnten. Aus diesem Grund wurden Lewis-Ratten mit 50µl eines zehnpromzentigen Borna Disease Virus-positiven Gehirnhomogenats (BDV Gießen He/80) i.c. infiziert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Infektion getötet. Das Gehirn wurde entnommen und unterschiedliche Zytokinkonzentrationen nachgewiesen (Abbildung 5.XXVII).

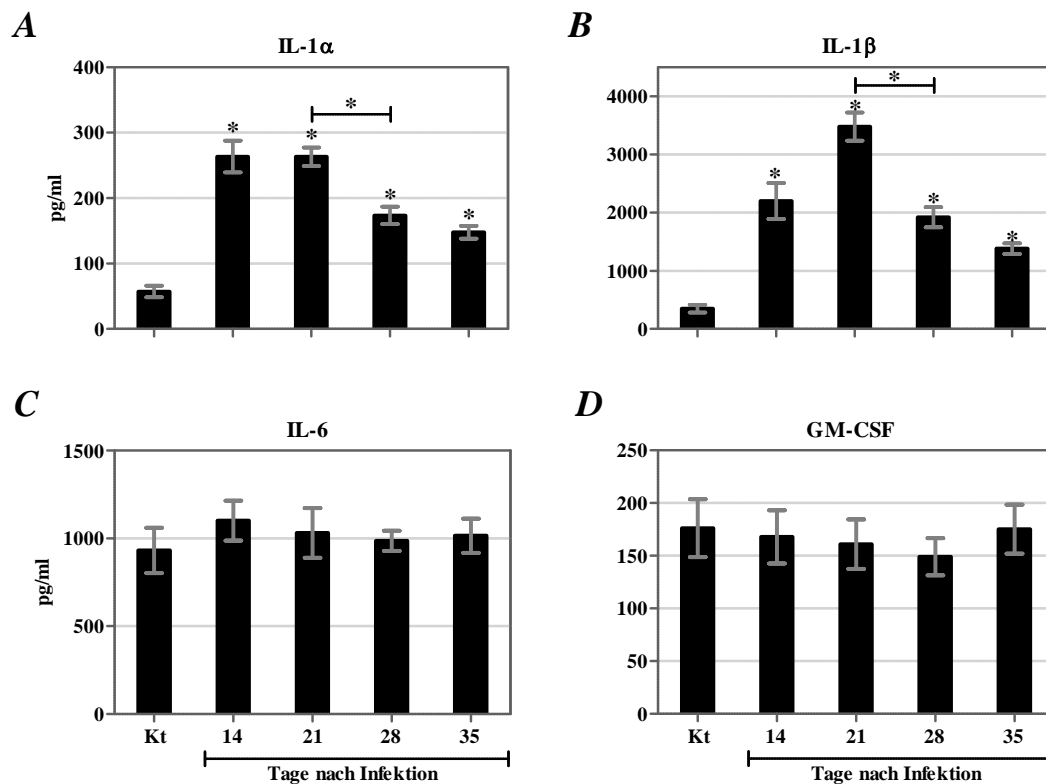


Abbildung 5.XXVII Teil 1 Quantitative Bestimmung unterschiedlicher Zytokinkonzentrationen im Gehirn von Ratten nach BDV-Infektion.

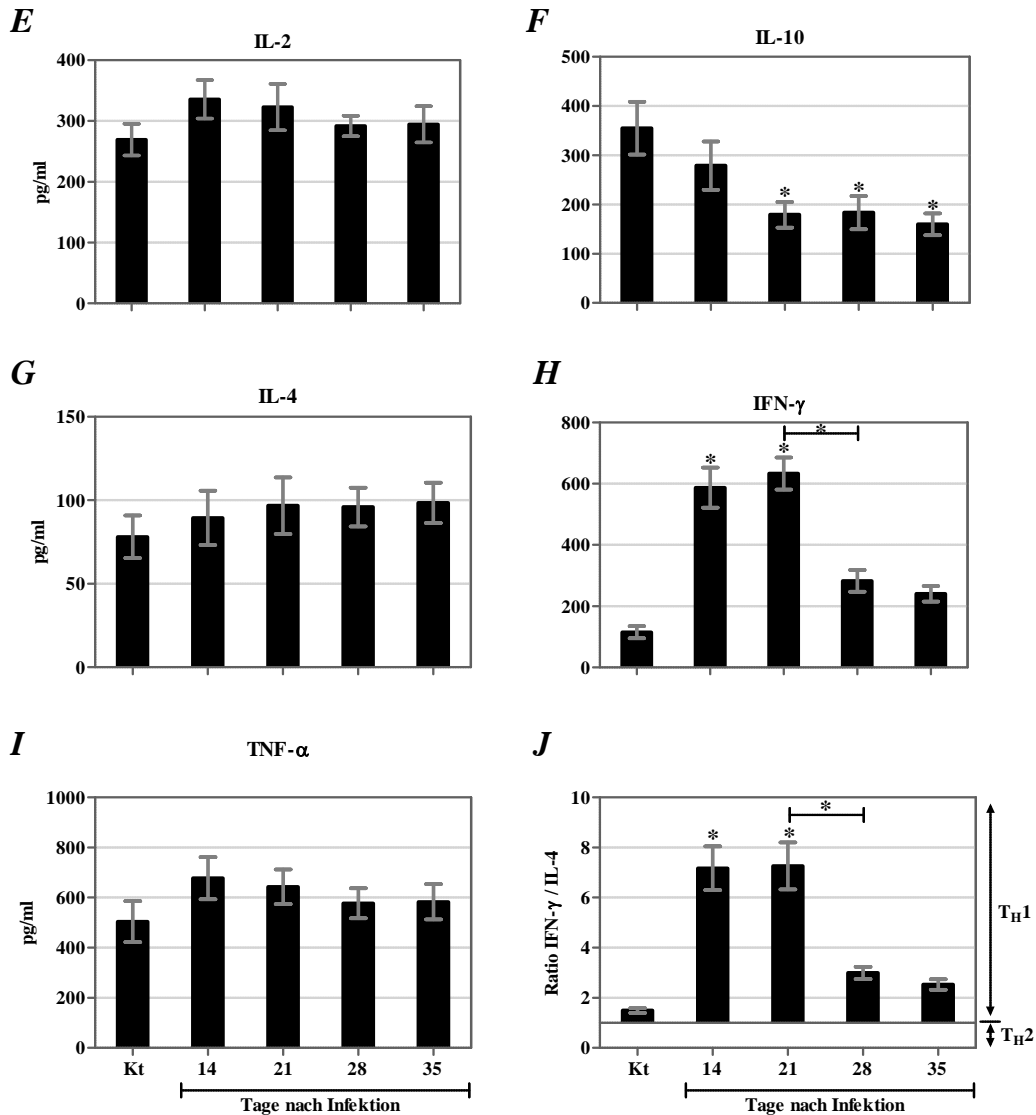


Abbildung 5.XXVII *Fortsetzung* Quantitative Bestimmung unterschiedlicher Zytokinkonzentrationen im Gehirn von Ratten nach BDV-Infektion. Ratten wurden an unterschiedlichen Tagen nach BDV-Infektion getötet und die Konzentration von IL-1 α (A), IL-1 β (B), IL-6 (C), GM-CSF (D), IL-2 (E), IL-10 (F), IL-4 (G), IFN- γ (H) und TNF- α (I) bestimmt. Tag 35 bestand aus vier Tieren, alle anderen Gruppen beinhalten drei Tiere. Jede Probe wurde zweimal gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte und deren SEM. Der Tukey-Test gibt die Signifikanzen an (* $p < 0,05$).

Im Gehirn fand die Infektion statt und eine Inflammation war nachweisbar. Sowohl IL-1 α und IL-1 β waren an Tag 14 und 21 nach Infektion signifikant zur Kontrolle, aber Tag 21 auch signifikant zu darauffolgenden Zeitwerten erhöht. Während IL-1 α in den Kontrollen eine Konzentration von 57pg/ml hatte und an Tag 14 einen Maximalwert von 263pg/ml, wies IL-1 β eine Konzentration von 3,5ng/ml an Tag 21 auf (Abbildung 5.XXVIIA,B). Im Gegensatz hierzu konnten für IL-6, GM-CSF und IL-2 keine Konzentrationsunterschiede über die Dauer des Versuchs beobachtet werden (Abbildung 5.XXVIIC-E). Die Konzentra-

tion an IL-10 nahm während des Versuchs ab und erreichte bereits an Tag 21 einen niedrigen Wert von 180pg/ml bei ursprünglich 355pg/ml der Kontrolle (Abbildung 5.XXVIIF). Auch für IL-4 konnten keine Unterschiede beobachtet werden (Abbildung 5.XXVIIG). Ähnlich den IL-1-Konzentrationen nahm auch IFN- γ sowohl an Tag 14 auf 587pg/ml als auch Tag 21 auf 633pg/ml signifikant gegenüber der Kontrolle zu. Auch hier war der Abfall an Tag 28 signifikant (Abbildung 5.XXVIIF). Die TNF- α -Expression erhöhte sich ab Tag 14 leicht und blieb konstant (Abbildung 5.XXVIIF). Während an Tag 14 und 21 im Generellen ein inflammatorisches Zytokinmilieu entstand, konnte zu keinem Zeitpunkt eine hohe Expression inhibierender oder T-zellspezifischer Zytokine beobachtet werden. Eine Ausnahme bildete die IFN- γ -Expression. Wurde nun der Quotient IFN- γ /IL-4 genauer betrachtet, war auffällig, dass lediglich an Tag 14 und 21 eine starke Unterstützung der zytotoxischen T-Zellantwort stattfand. Anschließend ging der Wert des Quotienten zurück und glich sich an die Kontrollgruppe an (Abbildung 5.XXVIIF).

Diese Untersuchungen zeigten, dass bis zu Tag 21 eine Konzentrationserhöhung inflammatorischer Zytokine stattfand. Auch die hohe IFN- γ -Konzentration wies auf eine hohe zytotoxische T-Zellantwort hin. Daher wurde in einem nächsten Schritt die Quantität der unterschiedlichen T-Zellpopulationen im Gehirn nachgewiesen. Hierfür wurden Ratten mit 50 μ l eines zehnpromzentigen Borna Disease Virus-positiven Gehirnhomogenats (BDV Gießen He/80) i.c. infiziert und ab Tag 14 bis Tag 42 alle sieben Tage Tiere getötet, um unterschiedliche T-Zellen mittels Durchflusszytometrie nachzuweisen (Abbildung 5.XXVIIF). Im Gehirn nicht-infizierter Ratten waren wenige T-Zellen nachweisbar. So belief sich der Anteil der CD8⁺ T-Zellen auf 0,4%. Bereits nach 14tägiger Infektion vermehrte sich dieser Anteil auf 14%. Im Anschluss verringerte sich die CD8⁺ T-Zellzahl wieder (Abbildung 5.XXVIIF). Auch die CD4⁺ T-Zellen wiesen bereits an Tag 14 nach Infektionen eine starke Einwanderung von 0,9% auf 15,5% auf. Über die Dauer des Versuchs blieb dieser Wert konstant bei etwa 10%. Erst an Tag 42 nach Infektion konnte ein weiterer Rückgang auf 7,3% beobachtet werden (Abbildung 5.XXVIIF). Tregs waren in einem nicht-infizierten Gehirn kaum nachweisbar und der Anteil der Ereignisse, die dennoch als Tregs gewertet werden mussten, belief sich auf 0,02%. Bereits nach 14tägiger Infektion waren Tregs im Gehirn nachweisbar und machten 0,9% der Ereignisse aus. Dieser Anteil blieb über die Dauer des Experiments konstant und erreichte sein Maximum an Tag 28 mit 1,5% (Abbildung 5.XXVIIF).

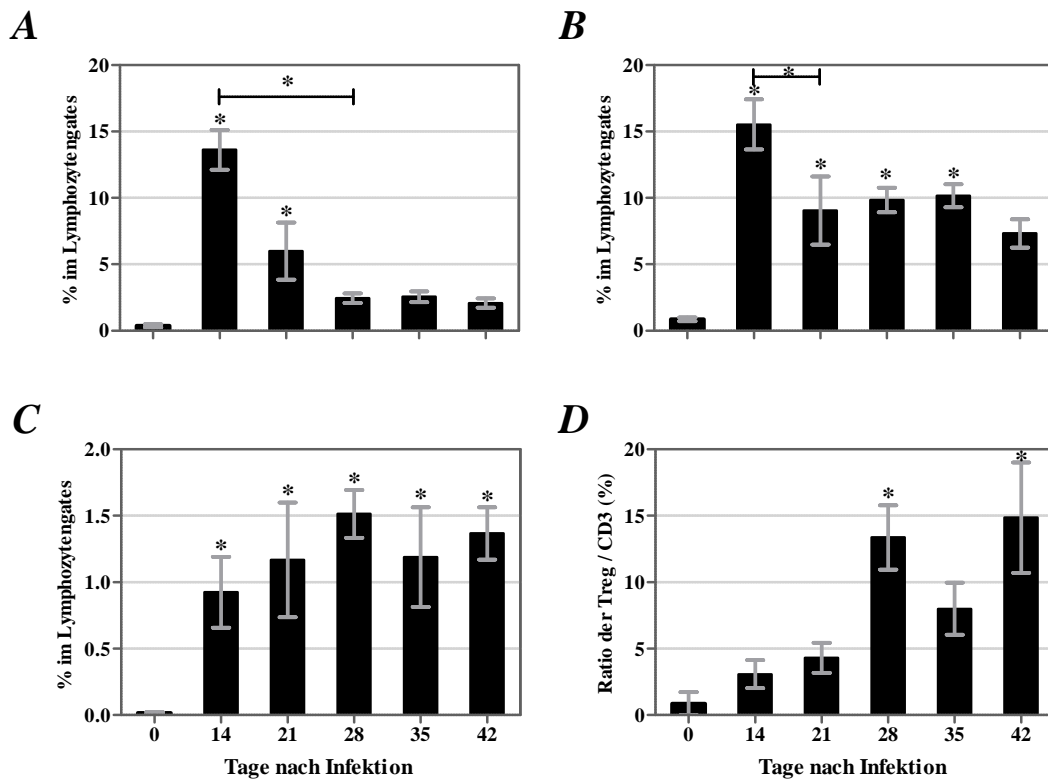


Abbildung 5.XXVIII Der Nachweis von T-Zellen in Gehirnen BDV-infizierter Ratten. Nachgewiesen wurden $CD8^+$ T-Zellen (A), $CD4^+$ T-Zellen (B) und Tregs (C). Zusätzlich wurde der Anteil an Tregs zu der $CD3^+$ Gesamtmenge an Zellen in Prozent bestimmt (D). Gruppen bestanden aus drei bis neun Tieren. Dem Mittelwert ist die Standardabweichung in SEM hinzugefügt. Der Tukey-Test gibt die Signifikanzen an, wobei * für ein p-Wert $< 0,05$ steht.

Wurden die Tregs mit der Gesamt-T-Zellzahl in ein Verhältnis gesetzt, zeigte sich deutlich, dass der Anteil an Tregs innerhalb der $CD3^+$ T-Zellpopulation im Gehirn stieg. Während der Anteil in Kontrolltieren lediglich 0,9% betrug und an Tag 14 3,1%, waren anteilig an Tag 42 14,9% der T-Zellen Regulatorische T-Zellen. Dies war kein systemischer Effekt. Parallel zum Gehirn wurden auch die T-Zellen innerhalb des zervikalen Lymphknotens quantifiziert. Hier zeigten sich quantitativ kaum Veränderungen (Abbildung 5.XXIX).

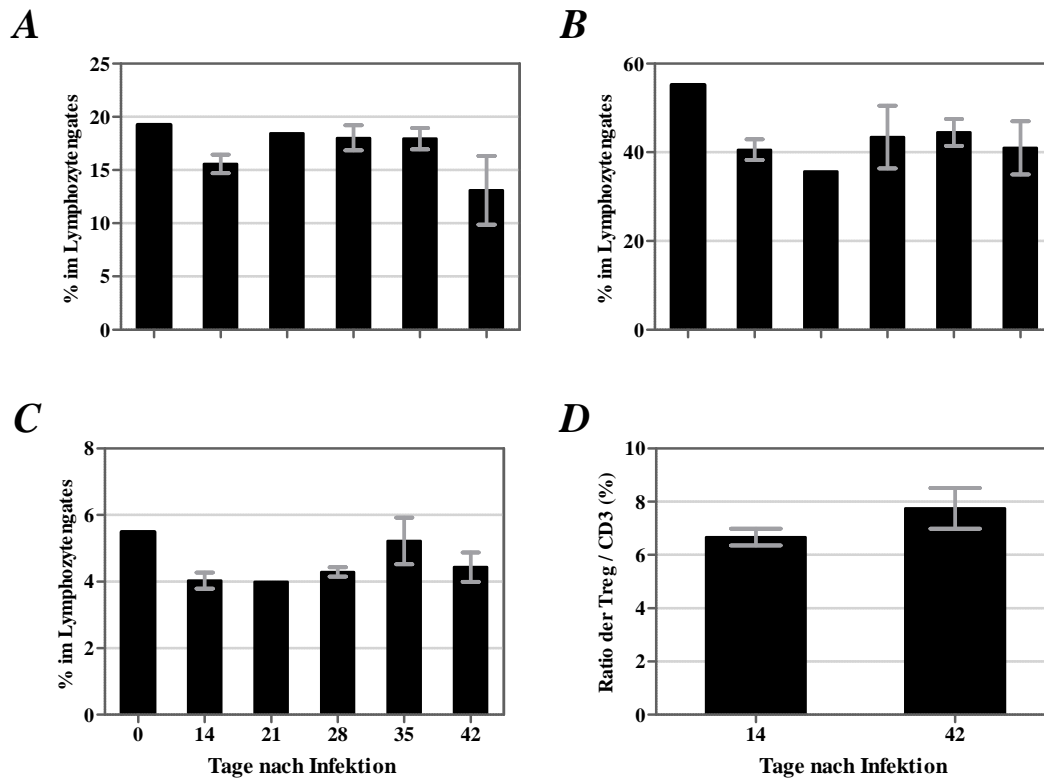


Abbildung 5.XXIX Der Nachweis von T-Zellen in zervikalen Lymphknoten BDV-infizierter Ratten. Nachgewiesen wurden $CD8^+$ T-Zellen (A), $CD4^+$ T-Zellen (B) und Tregs (C). Zusätzlich wurde für Tag 14 und 42 der Anteil an Tregs zu der $CD3^+$ Gesamtmenge an Zellen in Prozent bestimmt (D). Gruppen bestanden aus ein bis vier Tieren. Dem Mittelwert ist die Standardabweichung in SEM hinzugefügt. Aufgrund der geringen Gruppengrößen konnten keine Signifikanzen berechnet werden.

Die starke Einwanderung der T-Zellen und Tregs ist demnach nicht auf das ganze System übertragbar, sondern für das BDV-infizierte Gehirn spezifisch.

Dies ließ die Vermutung zu, dass Tregs in das Gehirn einwanderten, um immunpathologische Effekte durch die T-zellbedingte Immunantwort zu minimieren. Aus diesem Grund wurde die Funktionalität der eingewanderten Tregs untersucht. Hierfür wurde ein Proliferations-Inhibitionsassay angesetzt. Tiere wurden mit BDV infiziert und an Tag 28 nach Infektion getötet, um das inhibitorische Potenzial der peripheren Tregs zu charakterisieren (Abbildung 5.XXX).

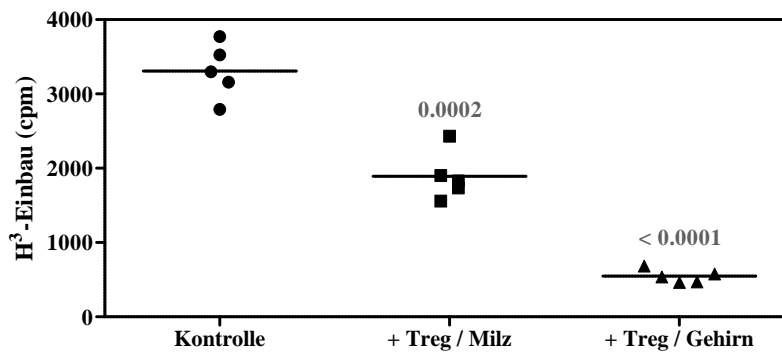


Abbildung 5.XXX Inhibitions-Proliferationsassay durch BDV-induzierte Tregs. Zellen wurden am Tag 28 nach Infektion aus den Lewis-Ratten gewonnen und in einem Test eingesetzt. Lymphozyten der Milz wurden zur Proliferation angeregt (*Kreise*). Parallel wurde diesen Zellen die angereicherte Treg-Fraktion aus der Milz (*Quadrate*) oder aus dem Gehirn (*Dreiecke*) hinzugegeben. Jede Gruppe bestand aus einem Pool von drei Ratten und jeder Pool wurde für die Messung fünf-fach angesetzt.

Die Proliferation der Milz-Lymphozyten aus BDV-infizierten Tieren verursachte durch die Stimulierung einen Thymidineinbau von durchschnittlich 3.308cpm. Die Zugabe der Treg-Fraktion aus der Milz verringerte den gemessenen H³-Einbau auf 1.890cpm und damit die Proliferation. Die Zugabe der Tregs aus dem Gehirn inhibierte die Proliferation um 83,42% auf einen gemessenen Wert von 548cpm. Die isolierten Tregs aus dem Gehirn waren demnach hoch-aktiv und konnten eine T-Zellproliferation unspezifisch inhibieren.

Nicht nur dieses letzte Ergebnis zeigte, dass Tregs einen großen Einfluss auf die Limitierung der Immunpathogenese während einer BDV-Infektion hatten und wichtig für die immunologische Toleranz waren. Zudem erschien es wichtig, aus welchem Organ die Tregs stammten. Die Tatsache, dass die peripheren Tregs der Milz die Proliferation der T-Zellen nicht genauso effektiv inhibierten wie die Tregs aus dem Gehirn zeigte, dass der Ursprung der isolierten Tregs auch Unterschiede im inhibitorischen Potenzial hatte und vermehrt hoch-aktive Tregs fähig waren, das lymphoide System zu verlassen.

6 Diskussion

Während der jährlichen Influenzavirusepidemien sterben etwa 300.000 Menschen weltweit (Maines et al., 2008). Insbesondere bei zoonotischen Übersprünge der Viren ist der Krankheitsverlauf im Menschen schwer und HPAIV-Infektionen im Menschen weisen eine hohe Mortalitätsrate auf (bdel-Ghafar et al., 2008; Neumann et al., 2010). Obwohl das pandemische H1N1v-Virus meist milde klinische Verläufe mit einer sehr hohen Transmissionsrate aufwies, konnten auch hier öfter als im Vergleich zu saisonalen Influenzavirusinfektionen schwerverlaufende Fälle beobachtet werden (Gill et al., 2010). Sowohl eine H5N1-Infektion als auch die pandemische H1N1v-Infektion sind oft mit einer verstärkten Sezernierung von Zytokinen verbunden, die als Hyperzytokinämie bezeichnet wird (de Jong et al., 2006; Louie et al., 2011). Ein weiterer klinischer Befund nach Infektion mit diesen Influenzavirustämmen ist eine Lymphopenie mit einer zum Teil drastischen Reduktion der Lymphozyten. Die Gründe der auftretenden Lymphopenie sind unklar (Maines et al., 2008; Bautista et al., 2010; Coskun et al., 2010). Häufig sind im Gegensatz zu den jährlichen Epidemien junge Menschen, die *per se* ein hochaktives Immunsystem haben, von einer schwerverlaufenden H5N1-Infektion betroffen (Smallman-Raynor and Cliff, 2007). Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher die Hypothese aufgestellt, dass hochpathogene Influenzaviren Einfluss auf die virusspezifische T-Zellantwort haben. In der vorliegenden Arbeit konnten Untersuchungen zeigen, dass schwere Infektionsverläufe in der Maus zu einer Lymphopenie in lymphoiden Organen führten. Der Thymus war in solchen Fällen atrophisch und infiziert, die Folge war eine gestörte T-Zellreifung und T-Zellselektion. Es konnte gezeigt werden, dass Viren den Thymus über migrierende DCs erreichten und infizierten. Durch die Manipulation der T-Zellselektion gingen doppelt-positive CD4⁺CD8⁺-Thymozyten verloren und es wurden vermehrt regulatorische T-Zellen (Tregs) im Thymus der Maus gebildet, zusätzlich konnten auch in der Peripherie vermehrt Tregs nachgewiesen werden, die eine T-Zellantwort stark unterdrückten, wodurch eine Kontrolle der Infektion durch zellvermittelte Effektormechanismen erschwert wurde und ein schwerer Krankheitsverlauf resultierte.

Im Allgemeinen ist bekannt, dass der Thymus im Laufe des Lebens an Aktivität verliert. Die höchste Aktivitätsphase im Menschen ist während eines Alters bis zehn Jahren und ein starker Abfall ist ab einem Alter von 39 Jahren zu beobachten (Geenen et al., 2003; Hale et al., 2006). Die verminderte Aktivität des Thymus korreliert zudem mit einer schwächeren Immunantwort (Taub and Longo, 2005). Durch H5N1-Ausbrüche waren unerklärlicher-

weise vermehrt junge Menschen betroffen mit einem durchschnittlichen Alter unter 20 Jahren (Tran et al., 2004; Kandun et al., 2006). Auch klinische Fälle von H1N1v betrafen eher junge Menschen (Nitsch-Osuch et al., 2010). Diese Beobachtungen ließen die Vermutung zu, dass ein junges Alter selbst ein Risikofaktor sein könnte. In Verbindung hierzu konnten in den durchgeführten *in vivo*-Experimenten die Infektion des Thymus nachgewiesen werden. Dies rückte den Thymus in den Fokus, während einer Influenzavirusinfektion in der Maus und nach Infektion von Mäusen mit HPAIV oder H1N1v war eine Reduktion der Thymusgröße zu beobachten. Des Weiteren konnten infektiöse Viruspartikel in der corticomedulären Schnittstelle des Thymus nachgewiesen werden und der auftretende atrophische Prozess war auf den massiven Verlust der Leukozytenfraktion, im Besonderen der doppelt-positiven CD4⁺CD8⁺-Thymozytenfraktion (DP-Zellen) zurückzuführen.

Dass der Thymus Ziel einer Infektion sein kann, konnte auch für andere Erreger gezeigt werden. Meist ist eine Thymusatrophie die Folge (Savino, 2006). Parasiten wie *Trypanosoma cruzi* (Erreger der Chagas-Krankheit) oder Plasmodien (Erreger der Malaria) gelangen während des Krankheitsverlaufs in den Thymus. Viren wie HIV, das Masern- und Rabiesvirus oder das Hepatitis-C-Virus infizieren den Thymus ebenfalls. Bei all diesen Infektionen kann im Thymus eine Depletion der DP-Zellen und eine erhöhte Apoptose beobachtet werden (reviewed in (Savino et al., 2007)). Bei der experimentellen Chagas-Erkrankung waren während der akuten Infektionsphase zudem DP-Zellen in der Peripherie nachweisbar, die den Thymus vor vollendeter T-Zellreifung verlassen hatten (Cotta-de-Almeida et al., 2003). Diese Zellen besaßen einen aktivierten Phänotyp und trugen nachweislich zur Immunpathologie bei (Morrot et al., 2011). Ein ähnliches immunpathologisches Potenzial konnte im Rahmen dieser Arbeit beobachtet werden, denn im Thymus nahm die Frequenz aktivierter DP-Zellen nach einer HPAIV-Infektion stark zu. Andere *in vivo*-Studien zeigten, dass auch *Plasmodium berghei* den murinen Thymus infizierte (Andrade et al., 2008). Im Thymus traten Expressionsänderung von Chemokinen und Zytokinen, die für die Migration der Zellen wichtig sind, auf und klare morphologische Abgrenzungen zwischen Cortex und Medulla waren nicht mehr möglich. Die Atrophie konnte auch auf den Verlust der DP-Zellen zurückgeführt werden, die verführt in die Peripherie entlassen wurden. Zudem erhöhte sich der Anteil apoptotischer Zellen im Thymus (Francelin et al., 2011). Während in den dazu gehörigen Studien CCL25 eine verminderte Expression im Thymus aufwies, war die Expression von CXCL12 erhöht (Gameiro et al., 2010). Das Chemokin CXCL12, welches für eine funktionelle Wanderung der Thymozyten

essenziell ist, wird sowohl von corticalen als auch medullären Epithelzellen produziert und durch den CXCR4-Rezeptor der T-Zellen erkannt (Savino et al., 2002). Für die T-Zellentwicklung *in vivo* ist diese Signalerkennung CXCL12/CXCR4 bedeutend (Ara et al., 2003). Einfach-positive T-Zellen besitzen eine geringere Konzentration an CXCR4, was die Auswanderung der naiven T-Zellen aus dem Thymus erlaubt (Suzuki et al., 1999). Der Rezeptor CCR9, der auf doppelt-positiven Thymozyten exprimiert ist, erkennt CCL25. Dieser Ligand befindet sich auf Epithelzellen des Thymus. CCL25 ist für die Wanderung und damit verbundenen Aktivierung der Thymozyten wichtig (Parmo-Cabanas et al., 2007). In *Trypanosoma cruzi*-Studien konnte gezeigt werden, dass durch die Infektion verursachte Hochregulierung des CXCL12 eine Auswanderung unreifer Thymozyten in die Peripherie ausgelöst wurde (Cao et al., 2009). Durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten IAV-Infektionsexperimente konnte nachgewiesen werden, dass nach Infektion des Thymus CXCL12 und CCL25 geringer exprimiert wurden. Diese Veränderungen beeinflussten die Migration der Thymozyten innerhalb des Thymus, wie soeben diskutiert, stark und innerhalb einer IAV-Infektion scheint es wahrscheinlich, dass DP-Zellen vermehrt in die Peripherie wanderten. In der Peripherie befindliche DP-Zellen haben autoreaktive Eigenschaften, deren Aktivität durch Tregs inhibiert werden kann (Asano et al., 1996).

Nach Infektion konnten andere Viren, wie das humane Immundefizienz-Virus (HIV), ebenfalls im Thymus nachgewiesen werden. HIV gehört mit seinem RNA-Genom zu der Familie der Lentiviren. Es löst das erworbene Immundefektsyndrom (AIDS; *Acquired immunodeficiency syndrome*) aus, welches 1981 erstmals beschrieben wurde. 2009 waren über 33 Millionen Menschen HIV-infiziert und 2,6 Millionen Neuinfektionen wurden erfasst (*UNAIDS Report on the global AIDS Epidemic, 2010*). Das HIV stammt ursprünglich von dem Simianen Immundefizienzvirus (SIV) ab, das im natürlichen Wirt keine Pathogenese auslöst, und zoonotische Übergänge dieses Virus auf den Menschen kamen retropektiv schon 1910 vor (Sharp and Hahn, 2008). Heute tritt das HI-Virus im Menschen epidemisch auf und eine ständige Adaptation des Virus an den Menschen findet statt, welche die Pathogenität herabsetzt (Brander and Walker, 2003).

Ein weiteres Beispiel eines Virus, welches im Rahmen einer Infektion den Thymus erreicht, ist das japanische Enzephalitis-Virus (Mathur et al., 1981). Das japanische Enzephalitis-Virus (JEV) ist ein Flavivirus und besitzt ebenfalls zoonotisches Potenzial. Werden Mäuse mit JEV infiziert, repliziert auch dieses im Thymus. Zudem führte die i.c.-Infektion

von Mäusen zu einer Veränderung der T-Zellreifung und Depletion der Thymozyten (Kavitha and Manjunath, 2004). Während der spezifische Rezeptor für JEV noch nicht bekannt ist, möglicherweise nutzt dieses Virus das Hitzeschockprotein-70 als Rezeptor (Das et al., 2009), erkennt HIV den CD4-Rezeptor auf T-Zellen und kann *in vitro* Thymozyten infizieren. Im Menschen führt eine HIV-Infektion zu einer verminderten Thymusaktivität mit einer daraus folgenden Lymphopenie (Young and Angel, 2011; Douek et al., 1998). HIV infiziert *in vitro* auch humane Tregs (Oswald-Richter et al., 2004). Die Immunodefizienz kann durch die direkte Infektion der T-Zellen sicherlich teilweise erklärt werden. Ebenso sind plasmazytäre DCs (pDCs) für eine produktive HIV-Infektion empfänglich, wodurch die T-Zellselektionsprozesse im Thymus beeinflusst werden (Evans et al., 2011). Dies zeigt, dass HIV die Selektionsprozesse im Thymus massiv manipuliert und durch die direkte Infektion der T-Zellpopulationen die Immunantwort herabsetzt. Tumore und schwerwiegende Infektionen mit vermeintlich niedrigpathogenen Erregern sind die Folge dieser relativen Funktionssuppression. Auch bei Influenzaviren kommt es häufig zu bakteriellen Sekundärinfektionen, deren Verlauf schwer sein kann. IAV infiziert, wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt, den Thymus, jedoch sind Thymozyten anders als bei HIV für IAV nicht das primäre Infektionsziel. Zudem ist die periphere Lymphopenie bei IAV-Infektionen nicht durch eine direkte Infektion der T-Zellen und Thymozyten erklärbar, da diese, wie durch die qRT-PCR-Ergebnisse gezeigt, nicht die Zielzellen des Virus sind. Dennoch kann bei schwerwiegenden IAV-Infektionen eine Lymphopenie nachgewiesen werden. Interessanterweise bestand der Thymus der Mäuse nach HPAIV-Infektion zu einem Großteil aus aktivierten Thymozyten und T-Zellen, letztere zeigten auch antivirale Aktivität. Das Vorhandensein zytotoxischer T-Zellen im Thymus HPAIV-infizierter Tiere war möglicherweise neben der Infektion selbst für die Organzerstörung mittels immunpathologischer Mechanismen verantwortlich. Ob diese Zellen bereits im Thymus aktiviert wurden oder ob sie aus der Peripherie stammten, konnte innerhalb der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden. Der Wiedereintritt reifer oder aktivierter T-Zellen zurück in den Thymus wurde jedoch bereits in anderen Zusammenhängen beschrieben (Hale and Fink, 2009; Hardy et al., 2001).

Die aufgeführten HIV- und JEV-Studien im Zusammenhang mit den Ergebnissen dieser Arbeit lassen die Folgerung zu, dass im Speziellen Viren zoonotischen Ursprungs mit einer Thymusinfektion und damit verbundenen eingeschränkten T-Zellantwort in Verbindung zu bringen sind. Auch das 2009 aufgetretene pandemische H1N1v-Virus besitzt Gensegmen-

te, die nicht von humanen IAV abstammen (siehe hierzu Abbildung 2.IV). Wie schnell IAV die Adaptation an einen neuen Wirt, den Menschen, durchführen konnte, wurde durch die verminderte Pathogenität des H1N1v zwischen 2009 und heute deutlich. Während zu Beginn der Pandemie bis zu 26% der H1N1v-infizierten Patienten intensive medizinische Versorgung benötigten, ist H1N1v zwischenzeitlich im Menschen endemisch (Falagas et al., 2011).

Der besondere Verlauf zoonotischer Influenzavirusinfektionen im Menschen und die Frage, wie IAV ohne systemische Infektion den Thymus erreichen kann, ist jedoch noch nicht beantwortet. Im Rahmen dieser Fragestellung wurde die Hypothese aufgestellt, dass Influenzaviren Transportzellen nutzen, sodass eine systemische Infektion nicht notwendig ist. Welche Zelle kann einen Transport aus Peripherie in den Thymus jedoch bewerkstelligen? Die Einbringung fremder Antigene in den Thymus ist bereits bekannt und diese können im Thymus anstelle naiver T-Zellen die Entwicklung von Tregs induzieren, die wiederum in der Peripherie bereits existierende T-Zellpopulationen inhibieren (Cabarrocas et al., 2006; Song et al., 2006). In diesem Zusammenhang können insbesondere APCs zurück in den Thymus wandern und wurden bereits innerhalb der corticomedullären Bindestelle nachgewiesen (Mori et al., 2007). Aufgrund der Tatsache, dass insbesondere in diesen Bereichen virale RNA mittels *in situ*-Hybridisierung nachweisbar war, wurden im Rahmen dieser Arbeit APCs als mögliche Transportzellen untersucht. DCs spielen hierbei eine wichtige Rolle innerhalb der Toleranzmechanismen und auch in anderen Studien konnte die Infektion der DCs durch Influenzaviren *in vitro* nachgewiesen werden (Hao et al., 2008). Die im Rahmen dieser Arbeit aufgeführten Ergebnisse wiesen auf, dass in der Peripherie DCs, aber nicht Makrophagen H5N1- und H1N1v-Proteine beinhalten. Die Präsenz viraler Proteine war teilweise hoch. Dies im Zusammenhang mit den Ergebnissen, dass in den Makrophagen keine viralen Proteinen nachweisbar waren, und Studien, in denen DCs *in vitro* infizierbar waren, ließ das Ergebnis zu, dass H7N7, H5N1 und H1N1v DCs *in vivo* infizierten.

DCs wandern ständig in Lymphknoten und Thymus ein, unabhängig davon, ob sie mit einem Antigen beladen sind oder nicht, und spielen eine wichtige Rolle bei der negativen Selektion und der Induktion von Tregs (Proietto et al., 2008). Sie werden durch unterschiedlichste Viren in der Peripherie infiziert, wobei meistens die Aufnahme des Virus in die Zelle über den Rezeptor DC-SIGN stattfindet. Dieser Rezeptor scheint eine Schlüsselrolle in der Infektion, aber auch Aktivierung der Immunantwort zu spielen. Die Hypothese

besteht, dass dieser Rezeptor die Empfänglichkeit der DCs gegenüber viralen Infektionen einleitet, um die antivirale CD8⁺ T-Zellantwort professionell und kreuzreaktiv aktivieren zu können (Freigang et al., 2005). Die Infektion der DCs durch humanpathogene Viren könnte somit nicht Virus-spezifisch sein, sondern aufgrund der Anwesenheit eines geeigneten Rezeptors für viele unterschiedliche Viren stattfinden und somit durch einen DC-exprimierenden Rezeptor selbst eingeleitet werden. So infiziert auch das Masernvirus DCs über den DC-SIGN-Rezeptor (de et al., 2006), wobei für Masernviren auf anderen Zellen in erster Linie SLAM (CD150) der eigentliche Rezeptor ist. Dieser Rezeptor befindet sich auf unterschiedlichen Lymphozyten, was den Lymphtropismus erklärt (Yanagi et al., 2006). Experimente mit einem transgenen Mausstamm weisen daraufhin, dass nach i.n. Infektion mit Masernviren Makrophagen und DCs infiziert wurden. Im Anschluss war das Masernvirus in lymphoiden Organen nachweisbar, was die Autoren darauf schließen ließ, dass diese Zellen das Virus im Zuge der Antigenpräsentation transportierten (Ferreira et al., 2010). Einen Nachweis lieferten die Autoren jedoch nicht. IAV erkennen auf Zelloberflächen α 2,3-*N*- und α 2,6-*N*-Acetylsialinsäuren. SIGN-R1, ein DC-SIGN-ähnlicher Rezeptor der sich hauptsächlich auf Makrophagen befindet, kann inaktiviertes H1N1-Virus binden (Gonzalez et al., 2010). Die Bindung zwischen dem SIGN-R1 auf DCs und IAV ist essenziell für die humorale Immunantwort und daher scheint diese Bindung durch den Rezeptor und nicht durch das Virus eingeleitet zu werden. *In vitro* infiziert IAV Zellen über DC-SIGN (Londrigan et al., 2011). Makrophagen selbst konnten durch Influenzaviren *in vitro*, jedoch ebenso *in vivo* infiziert werden (Gabriel et al., 2009). Das in der Studie von Gabriel et al. 2009 verwendete H7N7-Virus war stark Maus-adaptiert und führte in der Maus zu einer systemischen Infektion. Eine selektive Infektion der APCs schien nicht vorzuliegen, wobei auch hier eine Lymphopenie beobachtet werden konnte. Der Thymus wurde in der genannten Arbeit nicht auf infektiöses Virus untersucht. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass die beobachtete Lymphopenie auf die direkte Infektion des Thymus zurückzuführen war. Durch die in der hier vorliegenden Arbeit eingesetzten HPAI-Viren H7N7 und das Wildisolat H5N1 konnte im Gegensatz zu der eben erwähnten Studie keine systemische Infektion nachgewiesen werden und die Ergebnisse scheinen daher spezifischere Aussagen bezüglich der Pathogenese zu ermöglichen. Auch eine letale Dosis des H1N1v-Virus verursachte keine systemische Infektion. Alle drei Stämme infizierten effektiv Dendritische Zellen *in vivo*. Makrophagen wurden nicht infiziert. Dies ließ die Vermutung zu, dass DCs nicht im Zuge der Antigenpräsentation Zell-gerichtet infiziert wurden,

sondern die Viren selektiv die Infektionsempfänglichkeit der DCs nutzten. Diese Arbeit beschreibt somit ein neu beobachtetes Phänomen, dass Viren zoonotischen Ursprungs DCs infizieren können und hierdurch nicht die Immunantwort unterstützen, sondern vielmehr zu einem schweren Verlauf der Infektion beitragen.

Die Infektion der DCs ließ sich auch auf die CD103⁺ Subpopulation hin verfolgen. CD103 ist ein Integrin, das von verschiedenen Zellen exprimiert wird und die Einwanderung in Epithelgewebe über Bindung an E-Cadherin fördert. CD103⁺ DCs sind nicht nur für die Toleranzbildung wichtig, sondern auch für die Eindämmung von Entzündungsreaktionen. Die Induktion peripherer Tregs aus naiven CD4⁺ T-Zellen durch intestinale CD103⁺ DCs wurde bereits beschrieben und ist TGF- β -abhängig (del Rio et al., 2010; Scott et al., 2011). Die Funktionalität des CD103 innerhalb der Toleranzinduktion wird durch Beobachtungen gefestigt, dass infiltrierende Tregs CD103 exprimieren und CD103 möglicherweise ein Marker für aktivierte Tregs ist (Anz et al., 2011; Zhao et al., 2008). Wieso das verwendete aviäre H5N2-Virus nicht fähig war, DCs zu infizieren, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Jedoch ist die Infizierbarkeit respiratorischer Dendritischer Zellen durch Influenzaviren von der zellulären MHC-II-Expression *in vitro* und *in vivo* abhängig. Möglicherweise ist dieser Effekt auf eine Interaktion zwischen MHC-II und dem viralen HA zurückzuführen, da unterschiedliche Virussubtypen APCs unterschiedlich effektiv infizieren können (Hargadon et al., 2011).

Da HPAIV und H1N1v DCs infizierten, stellte sich im Anschluss die Frage, ob diese infizierten DCs das Virus in lymphoide Organe transportieren konnten. Der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte adoptive Transfer von GFP⁺DCs aus infizierten H7N7-GFP⁺-Mäusen in infizierte H7N7-C57BL/6-Wildtypmäuse zeigte deutlich, dass im Thymus DCs vorhanden waren, die über i.n. Applikation übertragen wurden. Folgender Verbreitungsmechanismus der Influenzaviren nach i.n. Infektion entwickelte sich daher aufgrund der bisherigen Daten (Abbildung 6.I): In der Lunge wurden respiratorische DCs durch IAV infiziert. Diese infizierten Zellen wanderten in Lymphknoten und Thymus und aus diesem Grund konnte das Virus nur selektiv in lymphatischen Organen nachgewiesen werden. APCs im Thymus, nämlich Epithelzellen, aber auch DCs sind für die Selektionsprozesse verantwortlich (Proietto et al., 2009). Die einwandernden, infizierten DCs förderten somit nicht nur die virale Verbreitung innerhalb des Organismus, sie beeinträchtigten zudem die T-Zellselektion stark. Eine funktionelle T-Zellentwicklung und Migration, aber auch T-Zellselektion war nicht mehr möglich. Dies führte zu einer massiven Depletion der Thy-

mozyten, die Ergebnisse wiesen aber andererseits auch auf eine Expansion der Tregs im Thymus und in der Peripherie hin.

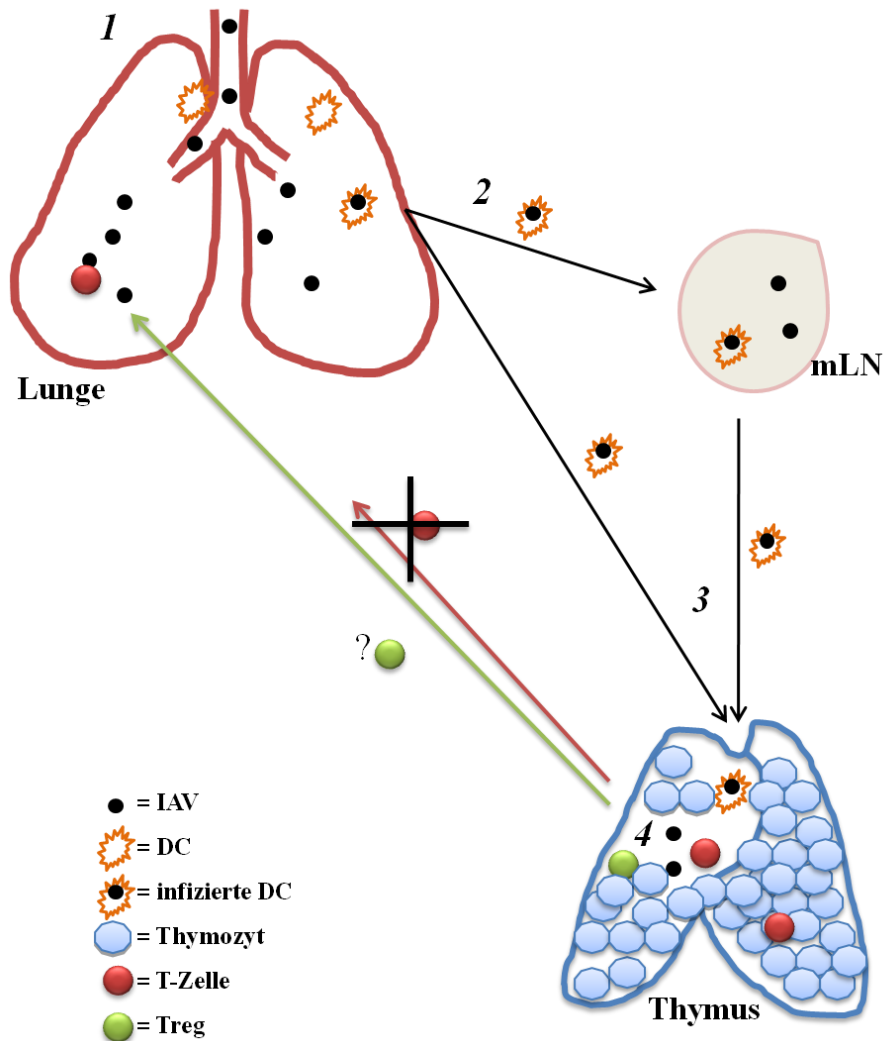


Abbildung 6.I Möglicher Mechanismus, wie HPAIV und H1N1v den Thymus ohne systemische Verbreitung infizieren. Viren gelangten über intranasale Infektion in den oberen Respirationstrakt und in die Lunge (1). DCs wurden infiziert und wanderten in den nächstgelegenen LN (2). Zudem wanderten DCs in den Thymus (3). Sowohl in mLN als auch Thymus fand eine Virusreplikation statt. Eine Immunantwort erfolgte (4). Zudem infizierte das Virus thymidiales Gewebe. Dadurch wurden DP-Zellen depletiert und Tregs möglicherweise gebildet.

Natürliche Regulatorische T-Zellen (nTregs) werden im Thymus gebildet und erkennen Selbstpeptide. Sie proliferieren in der Peripherie, wenn sie das Selbstpeptid erkennen (Picca et al., 2006). Daher spielt der Thymus eine zentrale Rolle in der Bildung einer immunologischen Toleranz. Dies nicht nur, weil er der Bildungsort von T-Zellen ist und somit die Aktivität gegen Selbstpeptide mittels Depletion autoreaktiver T-Zellen limitieren kann,

sondern auch weil die Präsenz von Fremdanitigenen im Thymus beschrieben wurde und somit auch eine Toleranz gegen diese eingeleitet werden kann (Pircher et al., 1989). Die Toleranz basiert auf der schnellen Elimination der zuvor vorhandenen T-Zellantwort und einer Apoptose von Thymozyten (Bercovici et al., 1999; Verbeek et al., 2007). Die Generierung der Tregs ist nicht nur von unterschiedlichen Zytokinen wie TGF- β und Expression verschiedener Faktoren wie dem Transkriptionsfaktor foxp3 abhängig (Curotto de Lafaille and Lafaille, 2009; Liu et al., 2008; Hori et al., 2003; Sakaguchi, 2005). Wichtig für die Generierung der Tregs sind zusätzlich Dendritische Zellen. Im humanen Thymus liegen T-Zellselektion-beeinflussende DCs insbesondere in der corticomedullären Schnittstelle vor (Lafontaine et al., 1997). DCs nehmen nicht nur Erreger direkt auf, sie prozessieren zudem apoptotische und nekrotische Zellen. Wurde die Zelle aufgrund einer Infektion eliminiert, werden parallel Eigen- und Fremdpeptide präsentiert. Eine Toleranz gegen das Fremdantigen kann hierdurch gebildet werden (Liu et al., 2002). Die Treg-Induktion in der Peripherie aus CD4⁺ T-Zellen ist direkt von antigenbeladenen DCs abhängig (Yamazaki et al., 2003). All dies steht mit den hier vorgestellten Ergebnissen in Verbindung, da im Rahmen dieser Arbeit im Speziellen virale RNA an der corticomedullären Schnittstelle nachgewiesen wurde (Vogel et al., 2010). Dieses Ergebnis verdeutlichte nicht nur die Einwanderung DCs in den Thymus, sondern auch die Möglichkeit der Beeinträchtigung der T-Zellselektion und der unterstützenden Wirkung der Treg-Generierung.

Daher stellt sich die Frage, ob eine Infektion tatsächlich die Ursache einer Treg-Expansion sein kann. Tregs inhibieren autoreaktive Immunzellen und sind für eine immunologische Homöostase entscheidend (Zaiss et al., 2010). Ihre Expansion kann jedoch auch nach viralen Infektionen beobachtet werden und meist handelt es sich hierbei um chronische Infektionen wie durch eine HIV- oder HCV-Infektion (Curotto de Lafaille and Lafaille, 2009; Joosten and Ottenhoff, 2008). Noch ist unklar, ob diese Präsenz zum Nutzen des Wirtes oder des Pathogens ist, da zum einen immunologisch-bedingte Schäden durch die Treg-Aktivität minimiert werden, zum anderen kann das Pathogen jedoch nicht eliminiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein Modell vorgestellt werden, indem eine Treg-Expansion zum Schutz des Wirts einsetzte. Bei der durchgeführten i.c. BDV-Infektion in der Ratte führt eine hohe zytotoxische T-Zellaktivität im Gehirn zu immunpathologisch-bedingten, massiven Schäden. Tiere können die Erkrankung überleben, die Immunpathogenität endet aber unerklärlich und ohne Eliminierung des Virus. Eine chronische Infektion, die jedoch keine Auswirkungen auf den Gesundheitszustand des infizierten Tieres hat,

entwickelt sich (Stitz et al., 1991; Planz et al., 1993). Zeitgleich mit der Eliminierung der immunpathologischen Zellen konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmals die Präsenz von Tregs im Gehirn nach BDV-Infektion nachgewiesen werden. Dies legte die Hypothese nahe, dass mit Eintritt der Tregs in das BDV-infizierte Gehirn immunpathologische Prozesse beendet wurden und die Regenerierung des Wirts möglich war. Die Ergebnisse des Inhibitions-Proliferationsassay bestätigten diese Annahme. Mit der BDV-Infektion in der Ratte konnte somit ein Modell vorgestellt werden, indem die Funktionalität von Tregs spezifisch innerhalb eines Organes untersucht werden kann.

Bei einer IAV-Infektion handelt es sich jedoch nicht um eine chronische Infektion und die Treg-Expansion setzte sehr früh ein. Die Experimente zeigten, dass die Treg-Expansion vor einer Effektor-T-Zellantwort aktiviert wurde. Untersuchungen müssen zeigen, welche viralen Faktoren die Expansion von Tregs beeinflussen könnten. Aufgrund der kritischen Rolle der DCs für eine Treg-Expansion könnte die Infektion dieses Zelltyps eine Rolle spielen. Jedoch infizieren die unterschiedlichsten Viren DCs, darunter Influenzaviren, EBV, HIV, HSV und das Denguevirus. Die meisten Viren infizieren die DC über DC-SIGN, wobei dieser nicht den Virus-spezifischen Rezeptor darstellt (Connolly et al., 2011; Moore and Klasse, 2007; Dalrymple and Mackow, 2011). Wie bereits diskutiert besteht die Möglichkeit, dass die Infektion der DCs nicht Virus-eingeleitet, sondern von Eigenschaften der DCs abhängig sind und strategisch wichtig für eine zytotoxische T-Zellantwort ist, da die infizierte APC eine adaptive Immunantwort effektiver aktivieren kann als eine infizierte Epithelzelle und zudem zur Kreuzpräsentation fähig ist (Freigang et al., 2005). Jedoch ist die Infektion von DCs nicht prinzipiell von Vorteil für den Wirt. HIV infiziert bevorzugt DCs. Hierdurch wird die T-Zellselektion gestört und Thymozyten depletiert (Cameron et al., 2007; Evans et al., 2008). Während die DC-Infektion durch epidemische Viren also von Vorteil für die T-Zellaktivierung ist, kann die Infektion der DCs durch zoonotische Viren die Pathogenese mitbegründen. Die scheinbar leichte Permissivität der DCs für Infektionen ist während des HIV-, aber auch IAV-Infektionsverlaufs von Nachteil. Die zentrale Rolle der DC-Infektion in der Pathogenese kann auch dadurch begründet werden, dass nach Übertragung der H1N1v- oder H5N1-Infektionen auf den Menschen eine Lymphopenie auftrat, wobei eine direkte Infektion der Lymphozyten *in vivo* noch nicht nachgewiesen werden konnte (Cunha et al., 2009; Li et al., 2008b; Gabriel et al., 2009). Der Hauptmechanismus der IAV-induzierten Lymphopenie ist demnach nicht die direkte Infektion der T-Zellen, sondern während einer letalen IAV-Infektion konnten bereits pDCs im LN für die

Eliminierung der zytotoxischen T-Zellen verantwortlich gemacht werden und trugen so zur Letalität bei (Langlois and Legge, 2010). Bei der IAV-Infektion handelt es sich um eine akute Erkrankung, bei solchen wurden Treg-Quantität und Funktion selten untersucht. Lediglich in Studien mit dem JEV, dessen akute Infektion in 20% der Fälle letal ist, konnte die DC-Infektion nachgewiesen werden, die ebenfalls zu einer Treg-Expansion führte und die Pathogenese mitbegründet (Cao et al., 2011). JEV ist ein Flavivirus und ebenfalls wie H5N1 oder H1N1v zoonotisch (Unni et al., 2011). Werden Mäuse mit JEV infiziert, repliziert auch dieses im Thymus (Mathur et al., 1981). Zudem führte die i.c.-Infektion von Mäusen zu einer Veränderung der T-Zellreifung und Depletion der Thymozyten (Kavitha and Manjunath, 2004). Diese Studien im Zusammenhang mit den in dieser Arbeit aufgeführten Ergebnisse verdeutlichen, dass das hohe pathogenetische Potenzial zoonotischer Viren auf die direkte DC-Infektion, Infektion des Thymus und Beeinflussung der T-Zellselektion und Bildung der Treg zurück zu führen ist.

Im Rahmen der hier durchgeführten *in vivo*-Experimente in der Maus wurden erhöhte Treg-Frequenzen in der Lunge nach letaler H1N1v-Dosis schon sechs Tage nach Infektion nachgewiesen bei gleichzeitig verminderter T-Zellaktivität. Die virale Last zu diesem Zeitpunkt nach Infektion war jedoch nicht ausschlaggebend für die frühe Treg-Expansion. Zwischen letaler und subletaler Infektion gab es an Tag 3 nach Infektion keinen quantitativen Unterschied in Bezug auf infektiöse Viruspartikel. Dies stimmte mit Influenzastudien überein, die keine Korrelation zwischen viraler Last und Stärke der Krankheit ausmachen konnten und im Menschen ist die virale Last abhängig von Alter und Dauer der Infektion (Lee et al., 2011).

Zu Beginn der Infektion mit einer hohen Virusdosis waren womöglich alle Zielzellen infiziert und Viruspartikel lagen im Organ frei vor. Diese konnten phagozytiert werden und bildeten damit ein zusätzliches von der intrazellulären Infektion unabhängiges Signal. In diesem Zusammenhang haben TLRs Auswirkungen auf eine Treg-Expansion (Liu and Zhao, 2007). So führte die Aktivierung des TLR7, der virale RNA und DNA erkennt, zu einer Treg-Expansion via DCs (Caramalho et al., 2003). Daher konnte davon ausgegangen werden, dass nicht nur infizierte DCs, sondern auch die extrazellulären Viruspartikel selbst zu einer Expansion von Tregs führten. Die Zahl der DCs nahm einen Tag nach Infektion bereits stark zu. Da DCs Ziel der Infektion waren, bildeten sie eine zusätzliche Zielzelle für infektiöse Viruspartikel. Das H1N1-Virus der Spanischen Grippe infizierte DCs, wobei die Folge eine TGF- β 1-Ausschüttung war (Oh et al., 2000). TGF- β ist ein wichtiges Ef-

fektormolekül für die Bildung von Tregs. Eine durch die hohe Infektionsdosis eingeleitete TGF- β -Ausschüttung der DCs war möglicherweise unterstützend für die Treg-Generierung in der Peripherie. Zusätzlich stieg die Zahl der Neutrophilen an. Die Funktion der Neutrophilen war abhängig von der Virulenz des Influenzavirusstamms und nicht Dosis-abhängig (Perrone et al., 2008). Deshalb wurde dieser Zelltyp als Grund für die schwerverlaufende Infektion ausgeschlossen. NK-Zellen und NKT-Zellen expandierten nach hoher Infektionsdosis schnell. NKT-Zellen besitzen immunmodulierenden Charakter und haben Einfluss auf die sich entwickelnde T-Zellantwort (Liu and Huber, 2011). NK-Zellen lysieren entartete Tumorzellen oder infizierte Zellen Antigen-unabhängig. Jedoch erkennen NK-Zellen auch wenige virale Peptide wie das HCMV-Protein pp65 direkt (Arnon et al., 2005). In diesem Zusammenhang konnten Untersuchungen zeigen, dass der NK-Zellrezeptor nKp46 auch virales Hämagglutinin erkennt und dadurch H1N1v-infizierte Zellen direkt eliminiert (Achdout et al., 2010). Die Aktivität einer NK-Zelle ist abhängig vom IAV-Subtyp, aber auch von der Infektionsdosis (Du et al., 2010). Die effektive Viruseliminierung ohne starke T-Zellantwort verwies zudem auf die Potenz der antiviralen Immunantwort der NK-Zellen. Es gibt erste Hinweise unter anderem durch Untersuchungen mit säugenden Mäusen darauf, dass NKT- aber auch NK-Zellen die Expansion von Tregs während einer Influenzavirusinfektion unterstützen (Chang et al., 2011; La et al., 2006). Möglicherweise hatte die in dieser Arbeit höhere NK- und NKT-Zellpopulation bei der hohen Infektionsdosis *in vivo* einen Effekt auf die frühe Treg-Expansion. All dies zeigte auf, dass die Treg-Expansion während einer hochdosierten IAV-Infektion nicht nur von einem Faktor abhängig war, sondern ein Zusammenspiel der Infektionsdosis, extrazellulärer Viruspartikel, der Erkennung durch TLRs, der Infektion der DCs und des Thymus, aber auch der starken Aktivierung der angeborenen Immunantwort war (Abbildung 6.II).

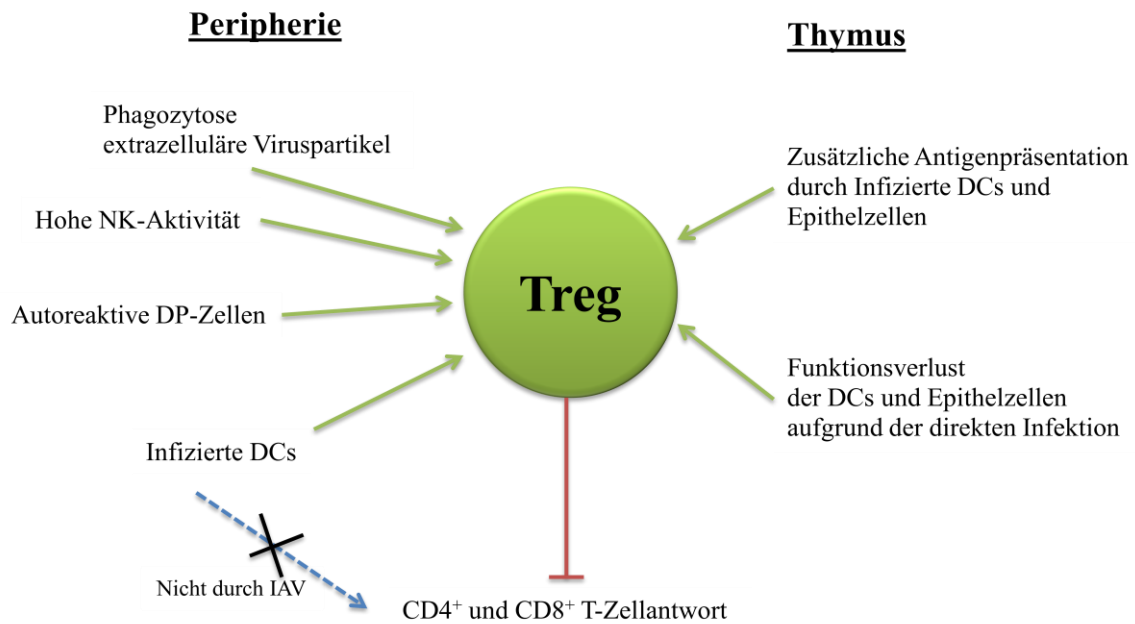


Abbildung 6.II Unterschiedliche Faktoren, die für die Treg-Expansion in Thymus und Peripherie während der IAV-Infektion verantwortlich waren.

Durch den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten adoptiven Transfer konnte *in vivo* gezeigt werden, dass wenige zusätzliche Tregs ausreichen, um die H1N1v-Pathogenese zu verstärken. Dies deutet daraufhin, dass die durch eine IAV-Infektion früh induzierten Tregs nicht zum Vorteil des Wirts gebildet wurden. Innerhalb dieser Arbeit war am neunten Tag nach Infektion der Maus in der Lunge nach hoher und niedriger H1N1v-Infektionsdosis kein Frequenzunterschied der Tregs zu beobachten. Zwar war zu diesem Zeitpunkt das Virus bereits größtenteils eliminiert, das Ergebnis verdeutlichte jedoch auch, dass nicht nur die Infektionsdosis entscheidend war, sondern auch wichtig war, mit welchem Stamm infiziert wurde. In diesem Zusammenhang wurde bereits beschrieben, dass H1N1v nicht aber eine saisonalen Influenzavirusinfektionen eine Treg-Expansion verursachte (Chen et al., 2011). Virale Faktoren sind für die Treg-Expansion also mitverantwortlich. Möglich ist, dass dieser Prozess von der viralen Neuraminidase, die bei H5N1-Infektionen in der Maus eine TGF- β -Ausschüttung auslöst, abhängig war (Carlson et al., 2010).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die zoonotischen HPAIV- und H1N1v-Viren in der Lage waren, DCs und Thymus zu infizieren. Diese Eigenschaften sind ein wichtiger Faktor in der Pathogenese bestimmter Influenzavirusinfektionen, da hierdurch eine Lymphopenie mittels Thymozyten-Depletion und Treg-Generierung erklärt werden können.

7 Literaturverzeichnis

Achdout,H., Meningher,T., Hirsh,S., Glasner,A., Bar-On,Y., Gur,C., Porgador,A., Mendelson,M., Mandelboim,M., and Mandelboim,O. (2010). Killing of avian and Swine influenza virus by natural killer cells. *J. Virol.* *84*, 3993-4001.

Amorij,J.P., Huckriede,A., Wilschut,J., Frijlink,H.W., and Hinrichs,W.L. (2008). Development of stable influenza vaccine powder formulations: challenges and possibilities. *Pharm. Res.* *25*, 1256-1273.

Andrade,C.F., Gameiro,J., Nagib,P.R., Carvalho,B.O., Talaisys,R.L., Costa,F.T., and Verinaud,L. (2008). Thymic alterations in Plasmodium berghei-infected mice. *Cell Immunol.* *253*, 1-4.

Anz,D., Mueller,W., Golic,M., Kunz,W.G., Rapp,M., Koelzer,V.H., Ellermeier,J., Ellwart,J.W., Schnurr,M., Bourquin,C., and Endres,S. (2011). CD103 is a hallmark of tumor-infiltrating regulatory T cells. *Int. J. Cancer* *129*, 2417-2426.

Ara,T., Itoi,M., Kawabata,K., Egawa,T., Tokoyoda,K., Sugiyama,T., Fujii,N., Amagai,T., and Nagasawa,T. (2003). A role of CXC chemokine ligand 12/stromal cell-derived factor-1/pre-B cell growth stimulating factor and its receptor CXCR4 in fetal and adult T cell development in vivo. *J. Immunol.* *170*, 4649-4655.

Arnon,T.I., Achdout,H., Levi,O., Markel,G., Saleh,N., Katz,G., Gazit,R., Gonen-Gross,T., Hanna,J., Nahari,E., Porgador,A., Honigman,A., Plachter,B., Mevorach,D., Wolf,D.G., and Mandelboim,O. (2005). Inhibition of the NKp30 activating receptor by pp65 of human cytomegalovirus. *Nat. Immunol.* *6*, 515-523.

Asano,M., Toda,M., Sakaguchi,N., and Sakaguchi,S. (1996). Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *J. Exp. Med.* *184*, 387-396.

Banchereau,J. and Steinman,R.M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* *392*, 245-252.

Batra,A., Planz,O., Bilzer,T., and Stitz,L. (2003). Precursors of Borna disease virus-specific T cells in secondary lymphatic tissue of experimentally infected rats. *J. Neurovirol.* *9*, 325-335.

Bautista,E., Chotpitayasunondh,T., Gao,Z., Harper,S.A., Shaw,M., Uyeki,T.M., Zaki,S.R., Hayden,F.G., Hui,D.S., Kettner,J.D., Kumar,A., Lim,M., Shindo,N., Penn,C., and Nicholson,K.G. (2010). Clinical aspects of pandemic 2009 influenza A (H1N1) virus infection. *N. Engl. J. Med.* *362*, 1708-1719.

bdel-Ghafar,A.N., Chotpitayasunondh,T., Gao,Z., Hayden,F.G., Nguyen,D.H., de,J., Naghdaliyev,A., Peiris,J.S., Shindo,N., Soeroso,S., and Uyeki,T.M. (2008). Update on avian influenza A (H5N1) virus infection in humans. *N. Engl. J. Med.* *358*, 261-273.

Bercovici,N., Delon,J., Cambouris,C., Escriou,N., Debre,P., and Liblau,R.S. (1999). Chronic intravenous injections of antigen induce and maintain tolerance in T cell receptor-transgenic mice. *Eur. J. Immunol.* 29, 345-354.

Berget,S.M., Moore,C., and Sharp,P.A. (1977). Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 74, 3171-3175.

Bilzer,T. and Stitz,L. (1993). Brain cell lesions in Borna disease are mediated by T cells. *Arch Virol Suppl* 7, 153-158.

Blackburn,C.C. and Manley,N.R. (2004). Developing a new paradigm for thymus organogenesis. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 278-289.

Bonasio,R., Scimone,M.L., Schaerli,P., Gräbe,N., Lichtman,A.H., and Von Andrian,U.H. (2006). Clonal deletion of thymocytes by circulating dendritic cells homing to the thymus. *Nat. Immunol.* 7, 1092-1100.

Brander,C. and Walker,B.D. (2003). Gradual adaptation of HIV to human host populations: good or bad news? *Nat. Med.* 9, 1359-1362.

Cabarrocas,J., Cassan,C., Magnusson,F., Piaggio,E., Mars,L., Derbinski,J., Kyewski,B., Gross,D.A., Salomon,B.L., Khazaie,K., Saoudi,A., and Liblau,R.S. (2006). Foxp3+ CD25+ regulatory T cells specific for a neo-self-antigen develop at the double-positive thymic stage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103, 8453-8458.

Cameron,P.U., Handley,A.J., Baylis,D.C., Solomon,A.E., Bernard,N., Purcell,D.F., and Lewin,S.R. (2007). Preferential infection of dendritic cells during human immunodeficiency virus type 1 infection of blood leukocytes. *J. Virol.* 81, 2297-2306.

Cao,B., Li,X.W., Mao,Y., Wang,J., Lu,H.Z., Chen,Y.S., Liang,Z.A., Liang,L., Zhang,S.J., Zhang,B., Gu,L., Lu,L.H., Wang,D.Y., and Wang,C. (2009). Clinical features of the initial cases of 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus infection in China. *N. Engl. J. Med.* 361, 2507-2517.

Cao,S., Li,Y., Ye,J., Yang,X., Chen,L., Liu,X., and Chen,H. (2011). Japanese encephalitis Virus wild strain infection suppresses dendritic cells maturation and function, and causes the expansion of regulatory T cells. *Virol. J.* 8, 39.

Caramalho,I., Lopes-Carvalho,T., Ostler,D., Zelenay,S., Haury,M., and Demengeot,J. (2003). Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* 197, 403-411.

Carlson,C.M., Turpin,E.A., Moser,L.A., O'Brien,K.B., Cline,T.D., Jones,J.C., Tumpey,T.M., Katz,J.M., Kelley,L.A., Gaudie,J., and Schultz-Cherry,S. (2010). Transforming growth factor-beta: activation by neuraminidase and role in highly pathogenic H5N1 influenza pathogenesis. *PLoS Pathog.* 6, e1001136.

Chan,P.K. (2002). Outbreak of avian influenza A(H5N1) virus infection in Hong Kong in 1997. *Clin. Infect. Dis.* 34 *Suppl* 2, S58-S64.

Chang, Y.J., Kim, H.Y., Albacker, L.A., Lee, H.H., Baumgarth, N., Akira, S., Savage, P.B., Endo, S., Yamamura, T., Maaskant, J., Kitano, N., Singh, A., Bhatt, A., Besra, G.S., van den Elzen, P., Appelmelk, B., Franck, R.W., Chen, G., DeKruyff, R.H., Shimamura, M., Illarionov, P., and Umetsu, D.T. (2011). Influenza infection in suckling mice expands an NKT cell subset that protects against airway hyperreactivity. *J. Clin. Invest.* *121*, 57-69.

Chen, H.X., Chen, B.G., Shi, W.W., Zhen, R., Xu, D.P., Lin, A., and Yan, W.H. (2011). Induction of cell surface human leukocyte antigen-G expression in pandemic H1N1 2009 and seasonal H1N1 influenza virus-infected patients. *Hum. Immunol.* *72*, 159-165.

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

Colombo, M.P. and Piconese, S. (2007). Regulatory-T-cell inhibition versus depletion: the right choice in cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* *7*, 880-887.

Connolly, S.A., Jackson, J.O., Jardetzky, T.S., and Longnecker, R. (2011). Fusing structure and function: a structural view of the herpesvirus entry machinery. *Nat. Rev. Microbiol.* *9*, 369-381.

Coskun, O., Avci, I.Y., Sener, K., Yaman, H., Ogur, R., Bodur, H., and Eyigun, C.P. (2010). Relative lymphopenia and monocytosis may be considered as a surrogate marker of pandemic influenza A (H1N1). *J. Clin. Virol.* *47*, 388-389.

Cotta-de-Almeida, V., Bonomo, A., Mendes-da-Cruz, D.A., Riederer, I., De, M.J., Lima-Quaresma, K.R., Vieira-de-Abreu, A., Villa-Verde, D.M., and Savino, W. (2003). Trypanosoma cruzi infection modulates intrathymic contents of extracellular matrix ligands and receptors and alters thymocyte migration. *Eur. J. Immunol.* *33*, 2439-2448.

Cunha, B.A., Pherez, F.M., and Schoch, P. (2009). Diagnostic importance of relative lymphopenia as a marker of swine influenza (H1N1) in adults. *Clin. Infect. Dis.* *49*, 1454-1456.

Curotto de Lafaille, M.A. and Lafaille, J.J. (2009). Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity.* *30*, 626-635.

Dalrymple, N. and Mackow, E.R. (2011). Productive dengue virus infection of human endothelial cells is directed by heparan sulfate-containing proteoglycan receptors. *J. Virol.* *85*, 9478-9485.

Das, K., Aramini, J.M., Ma, L.C., Krug, R.M., and Arnold, E. (2010). Structures of influenza A proteins and insights into antiviral drug targets. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *17*, 530-538.

Das, S., Laxminarayana, S.V., Chandra, N., Ravi, V., and Desai, A. (2009). Heat shock protein 70 on Neuro2a cells is a putative receptor for Japanese encephalitis virus. *Virology* *385*, 47-57.

de Jong, M.D., Simmons, C.P., Thanh, T.T., Hien, V.M., Smith, G.J., Chau, T.N., Hoang, D.M., Chau, N.V., Khanh, T.H., Dong, V.C., Qui, P.T., Cam, B.V., Ha, d.Q., Guan, Y., Peiris, J.S., Chinh, N.T., Hien, T.T., and Farrar, J. (2006). Fatal outcome of human influenza A (H5N1) is associated with high viral load and hypercytokinemia. *Nat. Med.* *12*, 1203-1207.

de, W.L., Abt, M., Schneider-Schaulies, S., van, K.Y., and Geijtenbeek, T.B. (2006). Measles virus targets DC-SIGN to enhance dendritic cell infection. *J. Virol.* *80*, 3477-3486.

del Rio, M.L., Bernhardt, G., Rodriguez-Barbosa, J.I., and Forster, R. (2010). Development and functional specialization of CD103+ dendritic cells. *Immunol. Rev.* *234*, 268-281.

Douek, D.C., McFarland, R.D., Keiser, P.H., Gage, E.A., Massey, J.M., Haynes, B.F., Polis, M.A., Haase, A.T., Feinberg, M.B., Sullivan, J.L., Jamieson, B.D., Zack, J.A., Picker, L.J., and Koup, R.A. (1998). Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature* *396*, 690-695.

Du, N., Zhou, J., Lin, X., Zhang, Y., Yang, X., Wang, Y., and Shu, Y. (2010). Differential activation of NK cells by influenza A pseudotype H5N1 and 1918 and 2009 pandemic H1N1 viruses. *J. Virol.* *84*, 7822-7831.

Evans, V.A., Cameron, P.U., and Lewin, S.R. (2008). Human thymic dendritic cells: regulators of T cell development in health and HIV-1 infection. *Clin. Immunol.* *126*, 1-12.

Evans, V.A., Lal, L., Akkina, R., Solomon, A., Wright, E., Lewin, S.R., and Cameron, P.U. (2011). Thymic plasmacytoid dendritic cells are susceptible to productive HIV-1 infection and efficiently transfer R5 HIV-1 to thymocytes in vitro. *Retrovirology*. *8*, 43.

Falagas, M.E., Koletsi, P.K., Baskouta, E., Rafailidis, P.I., Dimopoulos, G., and Karageorgopoulos, D.E. (2011). Pandemic A(H1N1) 2009 influenza: review of the Southern Hemisphere experience. *Epidemiol. Infect.* *139*, 27-40.

Ferreira, C.S., Frenzke, M., Leonard, V.H., Welstead, G.G., Richardson, C.D., and Cattaneo, R. (2010). Measles virus infection of alveolar macrophages and dendritic cells precedes spread to lymphatic organs in transgenic mice expressing human signaling lymphocytic activation molecule (SLAM, CD150). *J. Virol.* *84*, 3033-3042.

Feschotte, C. (2010). Virology: Bornavirus enters the genome. *Nature* *463*, 39-40.

Fouchier, R.A., Munster, V., Wallensten, A., Bestebroer, T.M., Herfst, S., Smith, D., Rimmelzwaan, G.F., Olsen, B., and Osterhaus, A.D. (2005). Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J. Virol.* *79*, 2814-2822.

Francelin, C., Paulino, L.C., Gameiro, J., and Verinaud, L. (2011). Effects of *Plasmodium berghei* on thymus: high levels of apoptosis and premature egress of CD4(+)CD8(+) thymocytes in experimentally infected mice. *Immunobiology* *216*, 1148-1154.

Freigang,S., Probst,H.C., and van den Broek,M. (2005). DC infection promotes antiviral CTL priming: the 'Winkelried' strategy. *Trends Immunol.* 26, 13-18.

Gabriel,G., Klingel,K., Planz,O., Bier,K., Herwig,A., Sauter,M., and Klenk,H.D. (2009). Spread of infection and lymphocyte depletion in mice depends on polymerase of influenza virus. *Am. J. Pathol.* 175, 1178-1186.

Gambaryan,A., Tuzikov,A., Pazynina,G., Bovin,N., Balish,A., and Klimov,A. (2006). Evolution of the receptor binding phenotype of influenza A (H5) viruses. *Virology* 344, 432-438.

Gameiro,J., Nagib,P.R., Andrade,C.F., Villa-Verde,D.M., Silva-Barbosa,S.D., Savino,W., Costa,F.T., and Verinaud,L. (2010). Changes in cell migration-related molecules expressed by thymic microenvironment during experimental *Plasmodium berghei* infection: consequences on thymocyte development. *Immunology* 129, 248-256.

Gao,W., Lu,Y., El,E.B., Oukka,M., Kuchroo,V.K., and Strom,T.B. (2007). Contrasting effects of cyclosporine and rapamycin in de novo generation of alloantigen-specific regulatory T cells. *Am. J. Transplant.* 7, 1722-1732.

Garten,R.J., Davis,C.T., Russell,C.A., Shu,B., Lindstrom,S., Balish,A., Sessions,W.M., Xu,X., Skepner,E., Deyde,V., Okomo-Adhiambo,M., Gubareva,L., Barnes,J., Smith,C.B., Emery,S.L., Hillman,M.J., Rivaller,P., Smagala,J., de,G.M., Burke,D.F., Fouchier,R.A., Pappas,C., Alpuche-Aranda,C.M., Lopez-Gatell,H., Olivera,H., Lopez,I., Myers,C.A., Faix,D., Blair,P.J., Yu,C., Keene,K.M., Dotson,P.D., Jr., Boxrud,D., Sambol,A.R., Abid,S.H., St,G.K., Bannerman,T., Moore,A.L., Stringer,D.J., Blevins,P., Demmler-Harrison,G.J., Ginsberg,M., Kriner,P., Waterman,S., Smole,S., Guevara,H.F., Belongia,E.A., Clark,P.A., Beatrice,S.T., Donis,R., Katz,J., Finelli,L., Bridges,C.B., Shaw,M., Jernigan,D.B., Uyeki,T.M., Smith,D.J., Klimov,A.I., and Cox,N.J. (2009). Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science* 325, 197-201.

Gatherer,D. (2009). The 2009 H1N1 influenza outbreak in its historical context. *J. Clin. Virol.* 45, 174-178.

Geenen,V., Poulin,J.F., Dion,M.L., Martens,H., Castermans,E., Hansenne,I., Moutschen,M., Sekaly,R.P., and Cheyner,R. (2003). Quantification of T cell receptor rearrangement excision circles to estimate thymic function: an important new tool for endocrine-immune physiology. *J. Endocrinol.* 176, 305-311.

Gill,J.R., Sheng,Z.M., Ely,S.F., Guinee,D.G., Beasley,M.B., Suh,J., Deshpande,C., Mollura,D.J., Morens,D.M., Bray,M., Travis,W.D., and Taubenberger,J.K. (2010). Pulmonary pathologic findings of fatal 2009 pandemic influenza A/H1N1 viral infections. *Arch. Pathol. Lab Med.* 134, 235-243.

Gonzalez,S.F., Lukacs-Kornek,V., Kuligowski,M.P., Pitcher,L.A., Degn,S.E., Kim,Y.A., Cloninger,M.J., Martinez-Pomares,L., Gordon,S., Turley,S.J., and Carroll,M.C. (2010). Capture of influenza by medullary dendritic cells via SIGN-R1 is essential for humoral immunity in draining lymph nodes. *Nat. Immunol.* 11, 427-434.

Goto,H. and Kawaoka,Y. (1998). A novel mechanism for the acquisition of virulence by a human influenza A virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 10224-10228.

Hale,J.S., Boursalian,T.E., Turk,G.L., and Fink,P.J. (2006). Thymic output in aged mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103, 8447-8452.

Hale,J.S. and Fink,P.J. (2009). Back to the thymus: peripheral T cells come home. *Immunol. Cell Biol.* 87, 58-64.

Hampson,A.W. and Mackenzie,J.S. (2006). The influenza viruses. *Med. J. Aust.* 185, S39-S43.

Hao,X., Kim,T.S., and Braciale,T.J. (2008). Differential response of respiratory dendritic cell subsets to influenza virus infection. *J. Virol.* 82, 4908-4919.

Harari,A., Enders,F.B., Cellerai,C., Bart,P.A., and Pantaleo,G. (2009). Distinct profiles of cytotoxic granules in memory CD8 T cells correlate with function, differentiation stage, and antigen exposure. *J. Virol.* 83, 2862-2871.

Harber,M., Sundstedt,A., and Wraith,D. (2000). The role of cytokines in immunological tolerance: potential for therapy. *Expert. Rev. Mol. Med.* 2, 1-20.

Hardy,C.L., Godfrey,D.I., and Scollay,R. (2001). The effect of antigen stimulation on the migration of mature T cells from the peripheral lymphoid tissues to the thymus. *Dev. Immunol.* 8, 123-131.

Hargadon,K.M., Zhou,H., Albrecht,R.A., Dodd,H.A., Garcia-Sastre,A., and Braciale,T.J. (2011). MHC Class II Expression and Hemagglutinin Subtype Influence the Infectivity of Type A Influenza Virus for Respiratory Dendritic Cells. *J. Virol.*

Hatta,M., Gao,P., Halfmann,P., and Kawaoka,Y. (2001). Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses. *Science* 293, 1840-1842.

Hollander,G.A. and Peterson,P. (2009). Learning to be tolerant: how T cells keep out of trouble. *J. Intern. Med.* 265, 541-561.

Hori,S., Nomura,T., and Sakaguchi,S. (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299, 1057-1061.

Hsieh,C.S., Zheng,Y., Liang,Y., Fontenot,J.D., and Rudensky,A.Y. (2006). An intersection between the self-reactive regulatory and nonregulatory T cell receptor repertoires. *Nat. Immunol.* 7, 401-410.

Joosten,S.A. and Ottenhoff,T.H. (2008). Human CD4 and CD8 regulatory T cells in infectious diseases and vaccination. *Hum. Immunol.* 69, 760-770.

Josefowicz,S.Z. and Rudensky,A. (2009). Control of regulatory T cell lineage commitment and maintenance. *Immunity.* 30, 616-625.

Kandun,I.N., Wibisono,H., Sedyaningsih,E.R., Yusharmen, Hadisoedarsuno,W., Purba,W., Santoso,H., Septiawati,C., Tresnaningsih,E., Heriyanto,B., Yuwono,D., Harun,S., Soeroso,S., Giriputra,S., Blair,P.J., Jeremijenko,A., Kosasih,H., Putnam,S.D., Samaan,G., Silitonga,M., Chan,K.H., Poon,L.L., Lim,W., Klimov,A., Lindstrom,S., Guan,Y., Donis,R., Katz,J., Cox,N., Peiris,M., and Uyeki,T.M. (2006). Three Indonesian clusters of H5N1 virus infection in 2005. *N. Engl. J. Med.* 355, 2186-2194.

Kavitha,Y. and Manjunath,R. (2004). Induction of MHC-I and thymic depletion due to replication of JEV in mouse brain. *Arch. Virol.* 149, 2079-2093.

Kubota,N., Ebihara,T., Matsumoto,M., Gando,S., and Seya,T. (2010). IL-6 and IFN-alpha from dsRNA-stimulated dendritic cells control expansion of regulatory T cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 391, 1421-1426.

Kuo,R.L., Zhao,C., Malur,M., and Krug,R.M. (2010). Influenza A virus strains that circulate in humans differ in the ability of their NS1 proteins to block the activation of IRF3 and interferon-beta transcription. *Virology* 408, 146-158.

La,C.A., Van,K.L., and Fu,D.S. (2006). CD4+CD25+ Tregs and NKT cells: regulators regulating regulators. *Trends Immunol.* 27, 322-327.

Lafontaine,M., Landry,D., and Montplaisir,S. (1997). Human thymic dendritic cells. *Microsc. Res. Tech.* 38, 267-275.

Lamb,R.A. and Choppin,P.W. (1983). The gene structure and replication of influenza virus. *Annu. Rev. Biochem.* 52, 467-506.

Langlois,R.A. and Legge,K.L. (2010). Plasmacytoid dendritic cells enhance mortality during lethal influenza infections by eliminating virus-specific CD8 T cells. *J. Immunol.* 184, 4440-4446.

Lee,C.K., Lee,H.K., Loh,T.P., Lai,F.Y., Tambyah,P.A., Chiu,L., Koay,E.S., and Tang,J.W. (2011). Comparison of pandemic (H1N1) 2009 and seasonal influenza viral loads, Singapore. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 287-291.

Li,J., Park,J., Foss,D., and Goldschneider,I. (2009). Thymus-homing peripheral dendritic cells constitute two of the three major subsets of dendritic cells in the steady-state thymus. *J. Exp. Med.* 206, 607-622.

Li,S., Gowans,E.J., Chougnet,C., Plebanski,M., and Dittmer,U. (2008a). Natural regulatory T cells and persistent viral infection. *J. Virol.* 82, 21-30.

Li,Y.G., Thawatsupha,P., Chittaganpitch,M., Rungrojcharoenkit,K., Li,G.M., Nakaya,T., Auwanit,W., Ikuta,K., and Sawanpanyalert,P. (2008b). Higher in vitro susceptibility of human T cells to H5N1 than H1N1 influenza viruses. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 371, 484-489.

Liu,G. and Zhao,Y. (2007). Toll-like receptors and immune regulation: their direct and indirect modulation on regulatory CD4+ CD25+ T cells. *Immunology* 122, 149-156.

Liu,K., Iyoda,T., Saternus,M., Kimura,Y., Inaba,K., and Steinman,R.M. (2002). Immune tolerance after delivery of dying cells to dendritic cells in situ. *J. Exp. Med.* 196, 1091-1097.

Liu,W. and Huber,S.A. (2011). Cross-talk between cd1d-restricted nkt cells and gammadelta cells in t regulatory cell response. *Viol. J.* 8, 32.

Liu,Y., Zhang,P., Li,J., Kulkarni,A.B., Perruche,S., and Chen,W. (2008). A critical function for TGF-beta signaling in the development of natural CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 9, 632-640.

Londrigan,S.L., Turville,S.G., Tate,M.D., Deng,Y.M., Brooks,A.G., and Reading,P.C. (2011). N-linked glycosylation facilitates sialic acid-independent attachment and entry of influenza A viruses into cells expressing DC-SIGN or L-SIGN. *J. Virol.* 85, 2990-3000.

Louie,J.K., Jean,C., Acosta,M., Samuel,M.C., Matyas,B.T., and Schechter,R. (2011). A Review of Adult Mortality Due to 2009 Pandemic (H1N1) Influenza A in California. *PLoS One* 6, e18221.

Ludwig,S., Stitz,L., Planz,O., Van,H., Fitch,W.M., and Scholtissek,C. (1995). European swine virus as a possible source for the next influenza pandemic? *Virology* 212, 555-561.

Maines,T.R., Szretter,K.J., Perrone,L., Belser,J.A., Bright,R.A., Zeng,H., Tumpey,T.M., and Katz,J.M. (2008). Pathogenesis of emerging avian influenza viruses in mammals and the host innate immune response. *Immunol. Rev.* 225, 68-84.

Mathur,A., Arora,K.L., and Chaturvedi,U.C. (1981). Congenital infection of mice with Japanese encephalitis virus. *Infect. Immun.* 34, 26-29.

Matrosovich,M., Matrosovich,T., Garten,W., and Klenk,H.D. (2006). New low-viscosity overlay medium for viral plaque assays. *Viol. J.* 3, 63.

McAuley,J.L., Chipuk,J.E., Boyd,K.L., Van,D., V, Green,D.R., and McCullers,J.A. (2010). PB1-F2 proteins from H5N1 and 20 century pandemic influenza viruses cause immunopathology. *PLoS Pathog.* 6, e1001014.

Moore,J.P. and Klasse,P.J. (2007). HIV-1 pathogenesis: the complexities of the CCR5-CCL3L1 complex. *Cell Host. Microbe* 2, 281-283.

Mori,K., Itoi,M., Tsukamoto,N., Kubo,H., and Amagai,T. (2007). The perivascular space as a path of hematopoietic progenitor cells and mature T cells between the blood circulation and the thymic parenchyma. *Int. Immunol.* 19, 745-753.

Morrot,A., Terra-Granado,E., Perez,A.R., Silva-Barbosa,S.D., Milicevic,N.M., Farias-de-Oliveira,D.A., Berbert,L.R., De,M.J., Takiya,C.M., Beloscar,J., Wang,X., Kont,V., Peterson,P., Bottasso,O., and Savino,W. (2011). Chagasitic thymic atrophy does not affect negative selection but results in the export of activated CD4+CD8+ T cells in severe forms of human disease. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5, e1268.

Muller,Y.D., Mai,G., Morel,P., Serre-Beinier,V., Gonelle-Gispert,C., Yung,G.P., Ehirchiou,D., Wyss,J.C., Bigenzahn,S., Irla,M., Heusser,C., Golshayan,D., Seebach,J.D., Wekerle,T., and Buhler,L.H. (2010). Anti-CD154 mAb and rapamycin induce T regulatory cell mediated tolerance in rat-to-mouse islet transplantation. *PLoS One* 5, e10352.

Munn,D.H. and Mellor,A.L. (2007). Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance. *J. Clin. Invest* 117, 1147-1154.

Munoz-Jordan,J.L., Laurent-Rolle,M., Ashour,J., Martinez-Sobrido,L., Ashok,M., Lipkin,W.I., and Garcia-Sastre,A. (2005). Inhibition of alpha/beta interferon signaling by the NS4B protein of flaviviruses. *J. Virol.* 79, 8004-8013.

Neumann,G., Chen,H., Gao,G.F., Shu,Y., and Kawaoka,Y. (2010). H5N1 influenza viruses: outbreaks and biological properties. *Cell Res.* 20, 51-61.

Neumann,G., Noda,T., and Kawaoka,Y. (2009). Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature* 459, 931-939.

Nitsch-Osuch,A., Kuchar,E., Gyrczuk,E., Topczewska-Cabanek,A., Zycinska,K., and Wardyn,K. (2010). Clinical manifestations of influenza caused by A/H1N1v virus among children and teenagers consulted in general practice. *Eur. J. Med. Res.* 15 Suppl 2, 105-107.

O'Garra,A. and Vieira,P. (2004). Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. *Nat. Med.* 10, 801-805.

Oh,S., McCaffery,J.M., and Eichelberger,M.C. (2000). Dose-dependent changes in influenza virus-infected dendritic cells result in increased allogeneic T-cell proliferation at low, but not high, doses of virus. *J. Virol.* 74, 5460-5469.

Oswald-Richter,K., Grill,S.M., Shariat,N., Leelawong,M., Sundrud,M.S., Haas,D.W., and Unutmaz,D. (2004). HIV infection of naturally occurring and genetically reprogrammed human regulatory T-cells. *PLoS Biol.* 2, E198.

Ouabed,A., Hubert,F.X., Chabannes,D., Gautreau,L., Heslan,M., and Josien,R. (2008). Differential control of T regulatory cell proliferation and suppressive activity by mature plasmacytoid versus conventional spleen dendritic cells. *J. Immunol.* 180, 5862-5870.

Paessens,L.C., Singh,S.K., Fernandes,R.J., and van,K.Y. (2008). Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) provide co-stimulation in positive selection along with survival of selected thymocytes. *Mol. Immunol.* 45, 42-48.

Parmo-Cabanas,M., Garcia-Bernal,D., Garcia-Verdugo,R., Kremer,L., Marquez,G., and Teixeira,J. (2007). Intracellular signaling required for CCL25-stimulated T cell adhesion mediated by the integrin alpha4beta1. *J. Leukoc. Biol.* 82, 380-391.

Peiris,J.S., Poon,L.L., and Guan,Y. (2009). Emergence of a novel swine-origin influenza A virus (S-OIV) H1N1 virus in humans. *J. Clin. Virol.* 45, 169-173.

Perrone,L.A., Plowden,J.K., Garcia-Sastre,A., Katz,J.M., and Tumpey,T.M. (2008). H5N1 and 1918 pandemic influenza virus infection results in early and excessive infiltration of macrophages and neutrophils in the lungs of mice. *PLoS. Pathog.* 4, e1000115.

Pfaffl,M.W., Tichopad,A., Prgomet,C., and Neuvians,T.P. (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol. Lett.* 26, 509-515.

Picca,C.C., Larkin,J., III, Boesteanu,A., Lerman,M.A., Rankin,A.L., and Caton,A.J. (2006). Role of TCR specificity in CD4+ CD25+ regulatory T-cell selection. *Immunol. Rev.* 212, 74-85.

Piccirillo,C.A. (2008). Regulatory T cells in health and disease. *Cytokine* 43, 395-401.

Pircher,H., Burki,K., Lang,R., Hengartner,H., and Zinkernagel,R.M. (1989). Tolerance induction in double specific T-cell receptor transgenic mice varies with antigen. *Nature* 342, 559-561.

Planz,O., Bilzer,T., Sobbe,M., and Stitz,L. (1993). Lysis of major histocompatibility complex class I-bearing cells in Borna disease virus-induced degenerative encephalopathy. *J. Exp. Med.* 178, 163-174.

Pletnikov,M.V., Rubin,S.A., Carbone,K.M., Moran,T.H., and Schwartz,G.J. (2001). Neonatal Borna disease virus infection (BDV)-induced damage to the cerebellum is associated with sensorimotor deficits in developing Lewis rats. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 126, 1-12.

Poland,G.A., Rottinghaus,S.T., and Jacobson,R.M. (2001). Influenza vaccines: a review and rationale for use in developed and underdeveloped countries. *Vaccine* 19, 2216-2220.

Proietto,A.I., van,D.S., and Wu,L. (2009). The impact of circulating dendritic cells on the development and differentiation of thymocytes. *Immunol. Cell Biol.* 87, 39-45.

Proietto,A.I., van,D.S., Zhou,P., Rizzitelli,A., D'Amico,A., Steptoe,R.J., Naik,S.H., Lahoud,M.H., Liu,Y., Zheng,P., Shortman,K., and Wu,L. (2008). Dendritic cells in the thymus contribute to T-regulatory cell induction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 105, 19869-19874.

Rasche,C., Wolfram,C., Wahls,M., and Worm,M. (2007). Differential immunomodulating effects of inactivated probiotic bacteria on the allergic immune response. *Acta Derm. Venereol.* 87, 305-311.

Richt,J.A., Schmeel,A., Frese,K., Carbone,K.M., Narayan,O., and Rott,R. (1994). Borna disease virus-specific T cells protect against or cause immunopathological Borna disease. *J Exp Med* 179, 1467-1473.

Sakaguchi,S. (2005). Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat. Immunol.* 6, 345-352.

Sakaguchi,S., Sakaguchi,N., Asano,M., Itoh,M., and Toda,M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* *155*, 1151-1164.

Savino,W. (2006). The thymus is a common target organ in infectious diseases. *PLoS Pathog.* *2*, e62.

Savino,W., Dardenne,M., Velloso,L.A., and yse Silva-Barbosa,S. (2007). The thymus is a common target in malnutrition and infection. *Br. J. Nutr.* *98 Suppl 1*, S11-S16.

Savino,W., Mendes-da-Cruz,D.A., Silva,J.S., Dardenne,M., and Cotta-de-Almeida,V. (2002). Intrathymic T-cell migration: a combinatorial interplay of extracellular matrix and chemokines? *Trends Immunol.* *23*, 305-313.

Scheffold,A., Murphy,K.M., and Hofer,T. (2007). Competition for cytokines: T(reg) cells take all. *Nat. Immunol.* *8*, 1285-1287.

Schnitzler,S.U. and Schnitzler,P. (2009). An update on swine-origin influenza virus A/H1N1: a review. *Virus Genes* *39*, 279-292.

Scott,C.L., Aumeunier,A.M., and Mowat,A.M. (2011). Intestinal CD103+ dendritic cells: master regulators of tolerance? *Trends Immunol.* *32*, 412-419.

Sharma,R. and Ju,S.T. (2010). Genetic control of the inflammatory T-cell response in regulatory T-cell deficient scurfy mice. *Clin. Immunol.* *136*, 162-169.

Sharp,P.M. and Hahn,B.H. (2008). AIDS: prehistory of HIV-1. *Nature* *455*, 605-606.

Shi,L., Summers,D.F., Peng,Q., and Galarz,J.M. (1995). Influenza A virus RNA polymerase subunit PB2 is the endonuclease which cleaves host cell mRNA and functions only as the trimeric enzyme. *Virology* *208*, 38-47.

Singer,K.H. (1990). Interactions between epithelial cells and T lymphocytes: role of adhesion molecules. *J. Leukoc. Biol.* *48*, 367-374.

Smallman-Raynor,M. and Cliff,A.D. (2007). Avian influenza A (H5N1) age distribution in humans. *Emerg. Infect. Dis.* *13*, 510-512.

Smith,G.J., Vijaykrishna,D., Bahl,J., Lycett,S.J., Worobey,M., Pybus,O.G., Ma,S.K., Cheung,C.L., Raghwani,J., Bhatt,S., Peiris,J.S., Guan,Y., and Rambaut,A. (2009). Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature* *459*, 1122-1125.

Sojka,D.K., Huang,Y.H., and Fowell,D.J. (2008). Mechanisms of regulatory T-cell suppression - a diverse arsenal for a moving target. *Immunology* *124*, 13-22.

Song,F., Guan,Z., Gienapp,I.E., Shawler,T., Benson,J., and Whitacre,C.C. (2006). The thymus plays a role in oral tolerance in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* *177*, 1500-1509.

Spackman,E., Senne,D.A., Myers,T.J., Bulaga,L.L., Garber,L.P., Perdue,M.L., Lohman,K., Daum,L.T., and Suarez,D.L. (2002). Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. *J. Clin. Microbiol.* 40, 3256-3260.

Steinhauer,D.A. (1999). Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus. *Virology* 258, 1-20.

Stitz,L., Bilzer,T., Richt,J.A., and Rott,R. (1993). Pathogenesis of Borna disease. *Arch. Virol. Suppl.* 7, 135-151.

Stitz,L., Planz,O., Bilzer,T., Frei,K., and Fontana,A. (1991). Transforming growth factor-beta modulates T cell-mediated encephalitis caused by Borna disease virus. Pathogenic importance of CD8+ cells and suppression of antibody formation. *J. Immunol.* 147, 3581-3586.

Suzuki,G., Sawa,H., Kobayashi,Y., Nakata,Y., Nakagawa,K., Uzawa,A., Sakiyama,H., Kakinuma,S., Iwabuchi,K., and Nagashima,K. (1999). Pertussis toxin-sensitive signal controls the trafficking of thymocytes across the corticomedullary junction in the thymus. *J. Immunol.* 162, 5981-5985.

Taub,D.D. and Longo,D.L. (2005). Insights into thymic aging and regeneration. *Immunol. Rev.* 205, 72-93.

Taubenberger,J.K., Reid,A.H., Janczewski,T.A., and Fanning,T.G. (2001). Integrating historical, clinical and molecular genetic data in order to explain the origin and virulence of the 1918 Spanish influenza virus. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* 356, 1829-1839.

Tran,T.H., Nguyen,T.L., Nguyen,T.D., Luong,T.S., Pham,P.M., Nguyen,V.C., Pham,T.S., Vo,C.D., Le,T.Q., Ngo,T.T., Dao,B.K., Le,P.P., Nguyen,T.T., Hoang,T.L., Cao,V.T., Le,T.G., Nguyen,D.T., Le,H.N., Nguyen,K.T., Le,H.S., Le,V.T., Christiane,D., Tran,T.T., Menno,d.J., Schultz,C., Cheng,P., Lim,W., Horby,P., and Farrar,J. (2004). Avian influenza A (H5N1) in 10 patients in Vietnam. *N. Engl. J. Med.* 350, 1179-1188.

Unni,S.K., Ruzek,D., Chhatbar,C., Mishra,R., Johri,M.K., and Singh,S.K. (2011). Japanese encephalitis virus: from genome to infectome. *Microbes. Infect.* 13, 312-321.

van der Vliet,H.J. and Nieuwenhuis,E.E. (2007). IPEX as a result of mutations in FOXP3. *Clin. Dev. Immunol.* 2007, 89017.

Van Kerkhove,M.D., Mumford,E., Mounts,A.W., Bresee,J., Ly,S., Bridges,C.B., and Otte,J. (2011). Highly pathogenic avian influenza (H5N1): pathways of exposure at the animal-human interface, a systematic review. *PLoS One* 6, e14582.

Verbeek,R., van der Mark,K., Wawrousek,E.F., Plomp,A.C., and van Noort,J.M. (2007). Tolerization of an established alphaB-crystallin-reactive T-cell response by intravenous antigen. *Immunology* 121, 416-426.

Vogel,A.B., Haasbach,E., Reiling,S.J., Droebner,K., Klingel,K., and Planz,O. (2010). Highly pathogenic influenza virus infection of the thymus interferes with T lymphocyte development. *J. Immunol.* *185*, 4824-4834.

Weinreich,M.A. and Hogquist,K.A. (2008). Thymic emigration: when and how T cells leave home. *J. Immunol.* *181*, 2265-2270.

Wen,Y., Deng,B.C., Zhou,Y., Wang,Y., Cui,W., Wang,W., and Liu,P. (2011). Immunological features in patients with pneumonitis due to influenza A H1N1 infection. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* *21*, 44-50.

Wing,K., Onishi,Y., Prieto-Martin,P., Yamaguchi,T., Miyara,M., Fehervari,Z., Nomura,T., and Sakaguchi,S. (2008). CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science* *322*, 271-275.

Wing,K. and Sakaguchi,S. (2010). Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nat. Immunol.* *11*, 7-13.

Yamazaki,S., Iyoda,T., Tarbell,K., Olson,K., Velinzon,K., Inaba,K., and Steinman,R.M. (2003). Direct expansion of functional CD25+ CD4+ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. *J. Exp. Med.* *198*, 235-247.

Yanagi,Y., Takeda,M., and Ohno,S. (2006). Measles virus: cellular receptors, tropism and pathogenesis. *J. Gen. Virol.* *87*, 2767-2779.

Yi,H., Zhen,Y., Jiang,L., Zheng,J., and Zhao,Y. (2006). The phenotypic characterization of naturally occurring regulatory CD4+CD25+ T cells. *Cell Mol. Immunol.* *3*, 189-195.

Young,C.D. and Angel,J.B. (2011). HIV infection of thymocytes inhibits IL-7 activity without altering CD127 expression. *Retrovirology.* *8*, 72.

Zaiss,M.M., Frey,B., Hess,A., Zwerina,J., Luther,J., Nimmerjahn,F., Engelke,K., Kollias,G., Hunig,T., Schett,G., and David,J.P. (2010). Regulatory T cells protect from local and systemic bone destruction in arthritis. *J. Immunol.* *184*, 7238-7246.

Zhang,W., Zhang,D., Shen,M., Liu,Y., Tian,Y., Thomson,A.W., Lee,W.P., and Zheng,X.X. (2010). Combined administration of a mutant TGF-beta1/Fc and rapamycin promotes induction of regulatory T cells and islet allograft tolerance. *J. Immunol.* *185*, 4750-4759.

Zhao,D., Zhang,C., Yi,T., Lin,C.L., Todorov,I., Kandeel,F., Forman,S., and Zeng,D. (2008). In vivo-activated CD103+CD4+ regulatory T cells ameliorate ongoing chronic graft-versus-host disease. *Blood* *112*, 2129-2138.

Zhirnov,O.P., Ikizler,M.R., and Wright,P.F. (2002). Cleavage of influenza A virus hemagglutinin in human respiratory epithelium is cell associated and sensitive to exogenous antiproteases. *J. Virol.* *76*, 8682-8689.

zur Hausen,H. (2009). Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. *Virology* *384*, 260-265.

8 Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Prof. Dr. Oliver Planz bedanken, der mir diese Dissertation ermöglicht hat. Danke für die konstruktiven Diskussionen, die Unterstützung der Versuche und Begutachtung sowie die Möglichkeit, Teil einer fabelhaften Arbeitsgruppe zu sein.

Ein weiterer Dank geht an Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee, der sich bereit erklärt hat, diese Arbeit zu begutachten.

Aber auch ohne meine Kollegen wären viele Ergebnisse so nicht möglich gewesen. Bei Emanuel Haasbach möchte ich mich für seine andauernde Unterstützung der Tierexperimente, der Diskussionsbereitschaft und die Einführung in die Welt der qRT-PCR bedanken. Carmen Müller, die beste TA der Welt –obwohl sie Biologielaborantin ist-, ohne die ich heute noch vor dem AutoMACS stehen würde. Und wenn ich nicht da wäre, würde ich RNA isolieren oder 96well Platten mit 10 unterschiedlichen Lösungen befüllen, pro Well! Hier möchte ich auch Mirijam Steck erwähnen, die auch oft RNA für mich isolierte. Sarah Reiling möchte ich für die Unterstützung am Immunfluoreszenz-Mikroskop danken, genauso wie ich Karolin Droebner für ihre Unterstützung bei der Virustitration danken möchte. Ein Dank geht auch an Ulrich Wulle, der die Bioplex-Versuche betreute und auch wenn das Thema in dieser Promotion keinen Platz gefunden hat, mir bei den Untersuchungen der Rhinovirusinfektionen geholfen hat. Wir waren eine tolle Arbeitsgruppe!

Natürlich möchte ich mich auch bei allen anderen Kollegen des Friedrich-Loeffler-Instituts in Tübingen bedanken. Jeder hatte ein offenes Ohr, Hilfe fand man überall. Ein ganz besonderer Dank gilt Prof. Dr. Lothar Stitz, der mit seinem Angebot in letzter Sekunde, dieser schriftlichen Arbeit noch einen wichtigen Schliff verschafft hat.

Bedanken möchte ich mich auch bei meiner Familie und Freunden; bei meinen Eltern, die meine Entscheidung Biologie zu studieren wohl nicht immer verstanden haben, und bei meinen Stuggi-Freunden, die es eigentlich (fast) immer geschafft haben, mich auf andere Gedanken zu bringen, wenn das Laborleben doch mal zu frustrierend war. Danke auch an Dani!

„Leider läßt sich eine wahrhafte Dankbarkeit mit Worten nicht ausdrücken.“

Johann Wolfgang von Goethe (1749-1832)

9 Publikationsliste

Vogel, A. B., Haasbach, E., Reiling, S. J., Droebner, K., Klingel, K. & Planz, O. (2010). Highly pathogenic influenza virus infection of the thymus interferes with T lymphocyte development. *J Immunol* **185**, 4824-4834.

Muhammad, S., Haasbach, E., Kotchourko, M., Strigli, A., Krenz, A., Ridder, D. A., Vogel, A. B., Marti, H. H., Al-Abed, Y., Planz, O. & Schwaninger, M. (2011). Influenza virus infection aggravates stroke outcome. *Stroke* **42**, 783-791.

Haasbach, E., Droebner, K., Vogel, A. B. & Planz, O. (2011). Low-Dose Interferon Type I Treatment Is Effective Against H5N1 and Swine-Origin H1N1 Influenza A Viruses In Vitro and In Vivo. *J Interferon Cytokine Res.*

10 Lebenslauf

Name: Annette B. Vogel
Geburtsdatum: 29. Dezember 1981
Geburtsort: Waiblingen, Deutschland
Nationalität: deutsch

Schulbildung:

1987- 1991 Grundschule Luginsland, Stuttgart
1991-1999 Württemberg-Gymnasium Untertürkheim, Stuttgart
1999-2001 Elly Heuss-Knapp-Gymnasium Bad Cannstatt, Stuttgart

Studium:

2002-2004 Georg August Universität Göttingen
Abschluss: Vordiplom, Biologie
2004-2008 Eberhard Karl-Universität Tübingen
Abschluss: Diplom, Biologie
2007-2008 Diplomarbeit am Friedrich-Loeffler-Institut, Tübingen unter Anleitung von Prof. Dr. Oliver Planz
2008-2011 Dissertation an der Eberhard Karl-Universität Tübingen am Friedrich-Loeffler-Institut, Tübingen unter Anleitung von Prof. Dr. Oliver Planz

Beruf:

2011-2012 Wissenschaftliche Angestellte Friedrich-Loeffler-Institut, Tübingen bei Prof. Dr. Lothar Stitz
Ab 2012 Wissenschaftliche Angestellte Friedrich-Loeffler-Institut, Greifswald-Insel Riems bei Prof. Dr. Lothar Stitz