



Spatiotemporale Entwicklung der Immunantwort nach Pneumovirus-Infektion

Spatiotemporal Development of the Immune Response after Pneumovirus Infection

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Klasse Infection and Immunity

Vorgelegt von

Lisa Prager

aus

Dresden

Würzburg 2019



Eingereicht am:
Bürostempel

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzende/r: Prof. Dr. Georg Gasteiger

1. Betreuer: Dr. Christine D. Krempl

2. Betreuer: Prof. Dr. Manfred Lutz

3. Betreuer: Prof. Dr. Markus Sauer

(4. Betreuer:)

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Spatiotemporale Entwicklung der Immunantwort nach Pneumovirus-Infektion“ eigenständig, d. h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ort, Datum

Unterschrift

Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled “Spatiotemporal Development of the Immune Response after Pneumovirus Infection” is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and/or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Place, Date

Signature

INHALT

Zusammenfassung	1
Summary	3
1. Einleitung	5
1.1 Das Immunsystem der Lunge	5
1.1.1 Anatomie des Respirationstrakts.....	5
1.1.2 Die Immunabwehr des Respirationstraktes.....	8
1.2 Pneumoviren	12
1.2.1 Das Respiratorische Synzytial-Virus (RSV)	12
1.2.2 Das Pneumonievirus der Maus (PVM)	16
1.3 Pneumovirus-spezifische Immunantworten	17
1.3.1 Zeitlicher Verlauf der angeborenen und adaptiven Immunantwort während einer Virusinfektion	17
1.3.2 Rekrutierungsmuster und Bedeutung einzelner Immunkompartimente nach einer RSV-Infektion	19
1.3.3 Rekrutierungsmuster und Bedeutung einzelner Immunkompartimente nach einer PVM-Infektion	24
1.3.4 Rekrutierung und Bedeutung eosinophiler Granulozyten während einer Pneumovirus-Infektion	25
1.3.4.1 Funktionen von eosinophilen Granulozyten während einer Virusinfektion	25
1.3.4.2 Rekrutierung und Funktion von eosinophilen Granulozyten während einer Pneumovirus-Infektion	26
1.3.5 Bedeutung der B-Lymphozyten während einer Pneumovirus-Infektion	29
1.3.5.1 Funktionen der B-Zellen nach einer Infektion.....	29
1.3.5.2 T-Zellabhängige und T-Zellunabhängige B-Zell-Antwort	30
1.3.5.3 B-Zell-Antwort während einer Pneumovirus-Infektion	31
1.4 Immunpathogenese nach pneumoviraler Infektion	32
1.4.1 RSV-induzierte Immunpathogenese	33
1.4.2 PVM-induzierte Immunpathogenese	35
1.5 Pneumovirus-Infektionen unter Immunsuppression	36

1.6 Zielsetzung.....	39
2. Material und Methoden.....	40
2.1 Materialien.....	40
2.1.1 Geräte.....	40
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	42
2.1.3. Chemikalien.....	43
2.1.4. Medien und Puffer.....	45
2.1.5 Narkosemittel.....	49
2.1.6 Mauslinien.....	50
2.1.7 Viren.....	50
2.1.8 Zelllinien/Bakterienstämme.....	50
2.1.9 Histologie.....	51
2.1.10 Antikörper.....	52
2.1.11 Primer.....	55
2.1.12 Plasmide.....	55
2.1.13 Enzyme.....	55
2.1.14 Kits.....	56
2.1.15 Software.....	57
2.2 Methoden.....	58
2.2.1 Zellkultur.....	58
2.2.2 Virologische Methoden.....	58
2.2.2.1 Virusanzucht.....	58
2.2.2.2 Charakterisierung der multizyklischen Virusvermehrung.....	58
2.2.2.3 Anlegen von Kryokulturen.....	59
2.2.2.4 Herstellung von Lungenhomogenaten.....	59
2.2.2.5 Virustiterbestimmung mittels Plaquetest.....	59
2.2.2.6 Virus-Neutralisationstest.....	61
2.2.3 Tierversuche.....	61
2.2.3.1 Infektion von Mäusen.....	62
2.2.3.2 Transplantationsversuche.....	62
2.2.3.3 Töten der Tiere.....	63
2.2.3.4 Organentnahme.....	63
2.2.3.5 Serum-Gewinnung.....	64
2.2.4 Zellisolierung.....	64
2.2.4.1 Zellisolation aus der Lunge.....	64
2.2.4.2 Zellisolation aus Milzgewebe.....	64

2.2.4.3 Isolierung/Anreicherung von B-Zellen	65
2.2.4.4 Zellisolation aus Knochenmark	66
2.2.4.5 Zellzahlbestimmung.....	67
2.2.5 Immunologische/histologische Methoden	67
2.2.5.1 Herstellung von Kryoschnitten und immunhistologische Färbung von Lungengewebe.....	67
2.2.5.2 Durchflusszytometrie	69
2.2.5.3 PVM-spezifischer ELISA	71
2.2.6 Generierung von rPVM-mCherry.....	74
2.2.6.1 Spezifische Mutagenese-PCR zur Herstellung und Amplifikation des <i>mCherry</i> -Gens.....	74
2.2.6.2 Insertion des mCherry-Gens in die cDNA von PVM	74
2.2.6.3 Gewinnung von rPVM-mCherry durch DNA-Transfektion.....	80
2.2.6.4 Überprüfung der mCherry-Sequenz in rPVM-mCherry	81
2.2.7 Statistische Auswertungen	82

3. Ergebnisse83

3.1 Spatiotemporale Analyse einer PVM-Infektion und der daraus resultierenden Immunantwort..... 83

3.1.1 Rekrutierungsmuster verschiedener T-Zellpopulationen während einer subletalen PVM-Infektion	83
3.1.2. Spatiotemporale Rekrutierung von B-Lymphozyten nach PVM-Infektion	89
3.1.3. Die Rekrutierung von Zellen der angeborenen Immunantwort geschieht parallel bzw. verzögert zur Virusvermehrung	91
3.1.4. Transiente Depletion von Alveolarmakrophagen während einer PVM-Infektion.....	96
3.1.5 Generierung und Charakterisierung von rPVM-mCherry zur Untersuchung der Infektion von AM Φ	98
3.1.6 PVM infiziert Alveolarmakrophagen <i>in vivo</i>	101
3.1.7 Die Depletion der AM Φ scheint überwiegend unabhängig von Lymphozytenpopulationen. ...	104

3.2 Pathogenese und Immunantwort in immunsupprimierten Mäusen nach PVM-Infektion 106

3.2.1 B-Lymphozyten tragen zur partiellen Viruskontrolle in T-Zell-defizienten Mäusen bei.	106
3.2.2 Die Letalität ist assoziiert mit Kontrollverlust über die Virusvermehrung.	109
3.2.3 B-Lymphozyten werden effizient in das infizierte Lungengewebe von B6.TCR $\beta\delta^{-/-}$ -Mäusen rekrutiert.....	113
3.2.4 Neutralisationsaktivität und PVM-spezifische IgM-Antikörper im Serum von B6.TCR $\beta\delta^{-/-}$ -Mäusen	121
3.2.5 Adoptiver B-Zell-Transfer in B6.Rag1 $^{-/-}$ -Mäuse verändert die Krankheitsverläufe nach PVM-Infektion.	124

3.2.6 Adoptiv transferierte B-Lymphozyten werden in lymphatische Organe und in infiziertes Lungengewebe rekrutiert.....	127
3.2.7 NK-Zellen werden in immundefizienten Mäusen verstärkt in infiziertes Lungengewebe rekrutiert.	132
3.2.8 Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in die Lunge von immunsupprimierten Tieren nach Pneumovirusinfektion	133
3.2.9 B6.Rag1 ^{-/-} -Mäuse zeigen eine signifikant gesteigerte Rekrutierung eosinophiler Granulozyten im Lungengewebe und im Bronchoalveolarlumen.	135

4. Diskussion 138

4.1 Spatiotemporale Entwicklung von Immunantworten im PVM-Infektionsmodell 138

4.1.1 Spatiotemporales Rekrutierungsmuster von T-Zellpopulationen in die Lunge nach PVM-Infektion	139
4.1.2 Spatiotemporales Rekrutierungsmuster von B-Lymphozyten in die Lunge nach PVM-Infektion	142
4.1.3 Verzögerte Rekrutierung von NK-Zellen in das Lungengewebe nach PVM-Infektion	144
4.1.4 Spatiotemporales Rekrutierungsmuster verschiedener Granulozytenpopulationen in die Lunge nach PVM-Infektion	147
4.1.4.1 Neutrophile Granulozyten.....	147
4.1.4.2 Eosinophile Granulozyten.....	150
4.1.5 Transiente Depletion von AM Φ während einer PVM-Infektion	153
4.1.6 Vergleich der Pneumovirus-induzierten Immunantwort im murinen PVM-Infektionsmodell zum Verlauf der Immunantwort im Menschen.....	157

4.2. Pneumovirus-Infektionen unter Immunsuppression 161

4.2.1. Krankheitsverlauf und Virusvermehrung in Mäusen mit definierter Immunsuppression	161
4.2.2. B-Lymphozyten vermitteln Schutz während einer akuten PVM-Infektion von T-Zell-defizienten Mäusen	168
4.2.3 Rekrutierung von Zellen des angeborenen Immunsystems in immundefizienten Mäusen nach einer subletalen PVM-Infektion.....	175

Abkürzungsverzeichnis 178

Literaturverzeichnis..... 181

Abbildungsverzeichnis 199

Tabellenverzeichnis..... 201

<i>Danksagung</i>	203
<i>Publikationen</i>	204
<i>Curriculum Vitae</i>	205

ZUSAMMENFASSUNG

Das humane Respiratorische Synzytial-Virus (RSV) gilt als wichtiger Krankheitserreger für Säuglinge und Kleinkinder sowie für ältere Personen und immunsupprimierte Patienten. Krankheitssymptome und teils schwerwiegende Verläufe werden dabei eher einer Immunpathogenese zugeschrieben als der Virusvermehrung selbst. Aus Ermangelung eines adäquaten Tiermodells wird häufig das RSV-verwandte Pneumovirus der Maus (PVM) als Ersatzmodell für schwere Pneumovirusinfektionen verwendet.

In dieser Dissertation wurde zum einen die spatiotemporale Rekrutierung von zellulären Komponenten der angeborenen und adaptiven Immunantwort im Verhältnis zum Verlauf einer PVM-Infektion in immunkompetenten und immunsupprimierten Wirten untersucht. Zum anderen wurde die Pathogenese einer Pneumovirusinfektion anhand des PVM-Modells in Mauslinien mit definierten Immundefizienzen analysiert.

Wie bereits in einer früheren Untersuchung ermittelt, korrelierte die Rekrutierung von CD8⁺ T-Lymphozyten mit der Viruseliminierung (Frey et al., 2008). B-Lymphozyten wurden aktiv in das Lungengewebe PVM infizierter C57BL/6-Mäuse rekrutiert, wobei sie perivaskuläre und peribronchiale Foki, die ebenfalls CD4⁺ T-Zellen enthielten, bildeten. Dies könnte auf die Bildung tertiärer lymphoider Gewebe hindeuten. Die Rekrutierung von Zellen der angeborenen Immunantwort (NK-Zellen, neutrophile Granulozyten) geschah parallel bzw. verzögert zur Virusvermehrung und damit eher spät während der Infektion. Die Rekrutierung von eosinophilen Granulozyten erfolgte erst in der Eliminationsphase der PVM-Infektion zusammen mit CD4⁺-T-Zellen. Zusätzlich wurde ermittelt, dass Alveolarmakrophagen (AM Φ) *in vivo* mit PVM infiziert und dabei transient depletiert wurden. Die Depletion der AM Φ schien dabei nicht durch Lymphozytenpopulationen zu erfolgen.

Die Charakterisierung der PVM-Infektion bei Mäusen mit definierten Immundefizienzen ergab, dass B-Lymphozyten zur partiellen Viruskontrolle in T-Zell-defizienten Mäusen beitragen und dadurch zur Protektion vor letalen Verläufen bei diesen Mäusen führen. Die Letalität bei diesen Mäusen, insbesondere in Abwesenheit von funktionellen B-Zellen, war mit Kontrollverlust über die Virusvermehrung assoziiert. B-Lymphozyten

wurden effizient in das infizierte Lungengewebe von T-Zell-defizienten Mäusen rekrutiert. Das Serum T-Zell-defizienter Mäuse wies eine PVM-neutralisierende Aktivität auf, die mit dem Erscheinen PVM-spezifischer IgM-Antikörper, T-Zell-unabhängig synthetisiert, korrelierte. IgG-Antikörper waren jedoch zu diesen Zeitpunkten (14 d.p.i.) nicht nachweisbar. Dies wurde möglicherweise durch unvollständigen oder verzögerten Reifungsprozess von B-Lymphozyten in T-Zell-defizienten Mäusen reflektiert, da verschiedene Antikörperklassen, wie IgM- und IgG-Antikörper zeitgleich exprimiert wurden.

Eine hohe Heterogenität bzgl. der klinischen Symptome und dem Ausgang der Infektion schien außerdem ein Kennzeichen von PVM-Infektionen unter bestimmten Immundefizienzen zu sein. Der adoptive B-Zell-Transfer in B6.Rag1^{-/-}-Mäuse verändert die Krankheitsverläufe nach PVM-Infektion, da einige B-Zell-transplantierte Mäuse ohne klinische Symptome zu zeigen überlebten und andere zwar Gewicht verloren und die Versuchsabbruchkriterien erreichten, aber die Heterogenität der Krankheitsverläufe reduziert war. Adoptiv transferierte B-Lymphozyten wurden außerdem in lymphatische Organe und in infiziertes Lungengewebe rekrutiert und waren in der Lage zu Plasmazellen zu reifen. Es gibt somit erste Indizien, dass B-Zellen zu einem Schutz bei einer akuten PVM-Infektion beitragen.

SUMMARY

The human respiratory syncytial virus (RSV) is an important pathogen for infants, elderly and immunosuppressed patients. The disease symptoms are rather attributed to a dysregulated immune response and a resulting immunopathology than to virus replication itself. Due to lack of a permissive animal model the RSV-related pneumonia virus of mice (PVM) is frequently used as surrogate model for severe pneumovirus infection.

During this thesis, the spatiotemporal recruitment of cellular components of the innate and adaptive immune response was analyzed in relation to PVM infection of immunocompetent and immunosuppressed hosts, on one hand. On the other hand, the PVM-infection model was used to investigate the pathogenesis of a pneumovirus infection in mouse strains with defined immunodeficiencies.

The recruitment of CD8⁺ T lymphocytes correlated with the virus elimination, thus, confirming a previous study (Frey et al., 2008). B lymphocytes were actively recruited to the lung tissue of PVM-infected C57BL/6 mice and formed perivascular and peribronchial foci that also contained CD4⁺ T lymphocytes. This points towards formation of tertiary lymphoid tissue. The recruitment of cells of the innate immune response (NK cells, neutrophils) occurred rather late in infection that is in parallel or delayed respective to the virus replication. Eosinophils increased during the elimination phase of the PVM infection together with an increase in CD4⁺ T cells. Additionally, it was determined that alveolar macrophages (AMΦ) were infected by PVM *in vivo* leading to a transient depletion. However, lymphocyte population appeared not to contribute to the depletion of AMΦ.

The characterization of the PVM infection in mice with defined immunodeficiencies revealed a contribution of B lymphocytes to partial control over PVM replication, thereby preventing disease or even lethality. The fact that lethal disease progression in these mice was associated with loss of control over virus replication further confirmed a controlling role of B lymphocytes. B lymphocytes were efficiently recruited to the lung tissue of infected T cell-deficient mice. The serum of these mice also contained PVM-neutralizing activity that correlated with an increase of PVM-specific IgM antibodies

synthesized in a T cell-independent manner. However, up to day 14 p.i. PVM-specific IgG antibodies were not detectable. This correlated with an incomplete or delayed maturation phenotype of B lymphocytes in T cell-deficient mice illustrated by simultaneous expression of more than one Ig subclass, e.g. IgM and IgG.

A significant heterogeneity of disease progression and unpredictable outcome seemed to be characteristic for PVM infections of immunodeficient hosts, in particular those lacking functional B cells. Adoptive B cell transfer into B6.Rag1^{-/-} mice influenced the disease progression and outcome after a PVM infection to some extent: some recipient mice survived the infection without any signs of disease, meanwhile other mice showed rather homogenous weight loss progressing to the humane endpoint similarly to lethally infected wildtype mice. Adoptively transferred B lymphocytes, some of which differentiated to plasma cells, were detected in lymphatic organs and the infected lung tissue. Taken together, there are first indications for a protective contribution of B lymphocytes during acute PVM infections.

1. EINLEITUNG

1.1 Das Immunsystem der Lunge

1.1.1 Anatomie des Respirationstrakts

Der humane Respirationstrakt ist definiert als ein System, dessen Organe für die Atmung zuständig sind. Er besteht aus den oberen und den unteren Atemwegen, sowie der Lunge. Die oberen Atemwege reichen von der Nasenhöhle bis zur Glottis im Larynx. Die unteren Atemwege bestehen aus der Trachea, den sich anschließenden Bronchien sowie den für den Gasaustausch zuständigen Bereichen der Lunge, den Bronchioli respiratorii und den Alveolen. Die Luftwege von der Nase bis in die Bronchien dienen dem Erwärmen, Säubern und Anfeuchten der Atemluft. In den Bronchioli respiratorii und Alveolen befindet sich die Blut-Luft-Schranke, in welcher der Gasaustausch zwischen Atemluft und Blut stattfindet (Moll and Moll, 2006). Die Trachea sowie die Hauptbronchien werden durch C-förmige elastische Knorpelspannen, die nach dorsal hin geöffnet sind, stabilisiert und offengehalten. Die Hauptbronchien gehen anschließend in die Lunge über, welche aus den weiteren Verzweigungen des Bronchialbaums, den Alveolen, sowie den Verzweigungen der Lungenarterien und -venen bestehen (Lüllmann-Rauch, 2015). Die Lunge ist paarig aufgebaut und gliedert sich beim Menschen in einen rechten Lungenflügel, mit drei Lungenlappen, und in einen linken Lungenflügel mit zwei Lappen (Schiebler and Korf, 2007). Mäuse haben ebenfalls 5 Lungenlappen, die jedoch anders angeordnet sind: der rechte Lungenflügel besteht aus 4 Lungenlappen und der linke aus einem einzelnen Lungenlappen (Cook, 1965).

Nach der Aufteilung der Trachea in die Hauptbronchien und deren Eintritt in die Lunge teilen diese sich weiter auf in Lappenbronchien, Segmentbronchien über die Bronchioli terminale bis hin zu Bronchioli respiratorii mit den sich anschließenden Ducti alveolares und den Alveolen (Abb. 1, Übersicht unterer Respirationstrakt). Die Lufträume, die mit einem Bronchiolus terminales verbunden sind, werden als Azinus bezeichnet (Abb. 1,

Azinus). Als Bronchien werden die Teile des Bronchialbaumes bezeichnet, die durch Knorpelgewebe und seromuköse Drüsen gekennzeichnet sind. Fehlen diese beiden Bestandteile, bezeichnet man diese Verästelungen des Bronchialbaumes als Bronchiolen (Lüllmann-Rauch, 2015). Die Mukosa der Trachea und Bronchien besteht aus einem einschichtigen, mehrreihigen respiratorischen Epithel und ist durchzogen von afferenten Nervenfasern, die wichtig sind für den Hustenreflex und die Dehnung des Gewebes. Das respiratorische Epithel ist aufgebaut aus Flimmerzellen, Basalzellen, Becherzellen, Bürstenzellen und neuroendokrinen Zellen. Flimmerzellen tragen auf ihrer apikalen Oberfläche Kinozilien und Mikrovilli. Sie dienen dem Transport des Schleimteppichs. Die Basalzellen verankern das Epithel in der Basalmembran. Die Becherzellen bilden Muzine, die anti-mikrobielle Wirkung haben (Abb. 1, Bronchus-Mukosa). Bürstenzellen hingegen haben die Funktion von Chemosensoren. Neuroendokrine Zellen bilden Hormone wie Serotonin und dienen wahrscheinlich ebenso als Chemorezeptoren oder Mechanorezeptoren. In den kleineren Bronchien nimmt die Anzahl der Becherzellen ab, bis sie in den Bronchioli terminales völlig fehlen. Dafür befinden sich sogenannte Keulenzellen (früher Clarazellen) im respiratorischen Epithel, die Proteine der natürlichen Abwehr produzieren (Abb. 1, Alveolen). Zu diesen Proteinen zählen die *Surfactant*-Proteine SP-A und SP-D, sowie das Keulenzellprotein CC10 (Lüllmann-Rauch, 2015).

Die Alveolen gehören zum respiratorischen Abschnitt der Lunge und weisen eine polygonale Struktur (Durchmesser 250 µm) auf. Interalveolarepten, in welchen sich die Blutkapillaren befinden, begrenzen die Alveolen, wodurch sie als Stütze der Alveolen dienen. Die Alveolen sind einzeln angeordnet oder in Gruppen, den Sacculi alveolares. Auf beiden der Atemluft zugewandten Seiten der kollagenhaltigen Interalveolarepten befindet sich das Alveolarepithel, welches sich aus den Pneumozyten Typ I und II zusammensetzt. Die Pneumozyten vom Typ I haben eine großflächige und flache Struktur, mit welcher sie direkt die Alveolen auskleiden und direkt an die Blutkapillaren grenzen. Typ I-Zellen sind nicht mehr teilungsfähig (Moll and Moll, 2006) und erreichen einen Durchmesser von 50-150 µm (Schiebler and Korf, 2007). Außerdem dienen sie dem Gasaustausch. Die kubischen Typ II Pneumozyten liegen in Nischen zwischen den Typ I-Zellen und besitzen multilamelläre Körper, in welchem sie *Surfactant* speichern

bzw. sezernieren können. Diese Zellen haben eine hohe Teilungsrate und ersetzen so abgestorbene Typ I Epithelzellen (Abb. 1, Alveolen). Alle Alveolarepithelzellen sind durch *Tight junctions* eng miteinander verknüpft, wodurch sie eine Barriere für Gewebeflüssigkeit bilden (Schiebler and Korf, 2007).

Die Blut-Luft-Schranke besteht aus dem Kapillarendothel der Blutgefäße und den Pneumozyten vom Typ I. Zwischen diesen Strukturen befindet sich die gemeinsame Basallamina, welche aus der verschmolzenen Basallamina des Alveolarepithels und des Endothels der Kapillaren besteht. Zur Blut-Luft-Schranke gehört ebenfalls der Flüssigkeitsfilm auf der Oberfläche des Alveolarepithels sowie das Blutplasma in den Kapillaren. Somit beträgt der Diffusionsweg der Gase aus den Alveolen bis zum Erythrozyten und zurück rund 1,1 μm (Lüllmann-Rauch, 2015).

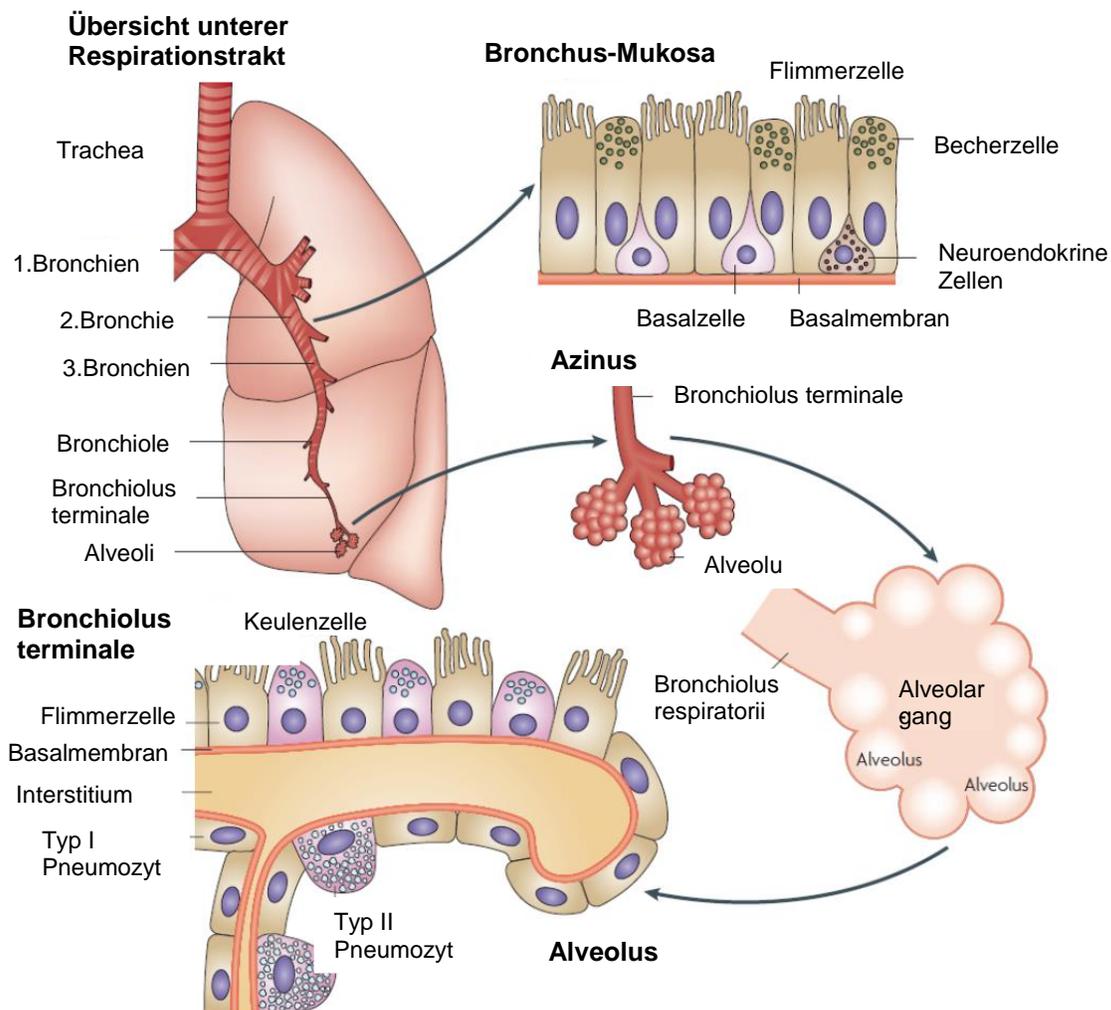


Abb. 1: Schematische Darstellung des unteren Respirationstrakts (verändert und übersetzt nach (Sun et al., 2007)). Dargestellt ist der untere Respirationstrakt beginnend in der Trachea über die Bronchien bis zu den Alveoli. Vergrößert dargestellt ist der zelluläre Aufbau der Bronchus-Mukosa sowie eines Alveolus.

Surfactant wird von Typ II Pneumozyten gebildet und dort auch gespeichert (Hasenberg et al., 2013) und bildet einen Schutzfilm welcher die der Atemluft-zugewandten Seite der Alveolen bedeckt. Dieser Film besteht aus 90% Lipiden, hauptsächlich Phospholipiden, und 10% Proteinen. Die Phospholipide dienen der Reduzierung der Oberflächenspannung des Flüssigkeitsfilms auf dem Alveolarepithel. Fehlen diese Lipide, könnten, auf Grund der Oberflächenspannung, sich die Alveolen nach dem Ausatmen nicht wieder entfalten (Lüllmann-Rauch, 2015). Die Proteinkomponente wird gebildet aus den hydrophoben Proteinen SP-B und SP-C. Diese dienen der Stabilisierung der monomolekularen Phospholipidschicht an der Wasser/Luft-Grenze (Olmeda et al., 2017).

1.1.2 Die Immunabwehr des Respirationstraktes

Neben der durch Menschen produzierten Verschmutzung der Atemluft befinden sich in der Luft noch verschiedenste Mikroorganismen, wie Pilzsporen, Bakterien und Viren. Die Lunge mit ihrer 140 m² Oberfläche ist somit täglich verschiedenen potentiell pathogenen Stoffen ausgesetzt (Lüllmann-Rauch, 2015). Bemerkenswert ist der Umstand, dass die unteren Atemwege und die Alveolen nahezu steril sind. Einigen nicht-pathogenen Organismen bzw. Kommensalen ist es jedoch möglich in der Lunge zu überleben. Es wird sogar vermutet, dass sie für die Aufrechterhaltung der Abwehr in der Lunge notwendig sind (Chiu and Openshaw, 2015). Aufgrund des ständigen Kontaktes der Atemwege mit der äußeren Umwelt gibt es humorale und zelluläre Immunmechanismen, um die Oberflächen der Alveolen und der konduktiven Luftwege zu schützen.

Durch ein komplexes System aus Reinigung und Kontrolle werden verschiedene schwerwiegende respiratorische Erkrankungen verhindert. Bereits in der Nase wird die Atemluft durch Haare und Mukus gefiltert. Durch den Niesreflex kommt es außerdem zur effizienten Beförderung von Schmutz und potenziell pathogenen Partikeln aus dem Körper. Der Nasenschleim enthält außerdem verschiedene Moleküle mit antibiotischen

Eigenschaften, wie anti-mikrobielle Peptide und oxidierende Enzyme (Hasenberg et al., 2013). Dazu zählen Cathelicidine, α - und β -Defensine, sowie Lactoferrin und das Bakterien permeabilisierende Protein (*Bactericidal/Permeability Increasing Protein*: BPIP) (Martin et al., 2015). Becherzellen und Drüsen der konduktiven Atemwege sezernieren einen viskösen Schleimteppich aus gequollenen Muzinen. An dieser Schicht können Pathogene und Staub haften bleiben. Unter der viskösen Schicht befindet sich die zweite, weniger visköse perizilliäre Flüssigkeitsschicht. Hier können sich die Zilien der Flimmerzellen frei bewegen. Die Bewegung der Zilien befördert Schleim und die darin enthaltenen Fremdstoffe mittels sich anschließendem Hustenreiz aus dem Körper (Lüllmann-Rauch, 2015). In den Alveolen wird hingegen kein Schleim gebildet, da hier der Gasaustausch stattfindet.

Trotz der vorangegangenen Reinigung der Atemluft können noch Pathogene, wie Pneumokokken, Viren oder Pilzsporen, in die Lunge gelangen (Lüllmann-Rauch, 2015). Verschiedene Subpopulationen Dendritischer Zellen (DZ) dienen in der Lunge dem Aufspüren verschiedener Krankheitserreger und der Aktivierung der adaptiven Immunantwort zur Eliminierung dieser Fremdorganismen. Unter normalen Bedingungen kommen drei verschiedene DZ-Typen in der Lunge vor: CD103⁺ konventionelle DZ (cDZ), CD11b⁺ cDZ und CD11c^{dim} plasmazytoide DZ (pDZ). CD103⁺ cDZ bilden ein Netzwerk in der Epithelschicht der konduktiven Atemwege. Sie bilden außerdem zelluläre Fortsätze, die sich zwischen den basalen Epithelzellen befinden. CD11b⁺ cDZ befinden sich in der *Lamina propria* unterhalb der Basalmembran. Ebenfalls in den konduktiven Luftwegen vertreten sind die pDZ. Alle drei DZ-Subpopulationen sind ebenfalls in den Inter-alveolarsepten der Alveolen lokalisiert (Neyt and Lambrecht, 2013). Werden fremde Antigene in der Lunge erkannt, werden zusätzlich Monozyten-abgeleitete DZ in das Lungenparenchym und die Atemwege rekrutiert. Außerdem werden Antigene durch migratorische CD103⁺ cDZ in die anliegenden Lymphknoten transportiert. Durch diese DZ werden CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen aktiviert, die anschließend in das Lungenparenchym migrieren (Neyt and Lambrecht, 2013).

In der respiratorischen Mukosa befinden sich verschiedene antimikrobielle Moleküle. Dazu zählen unter anderem sezernierte dimere IgA- sowie IgG-Antikörper (Chiu and Openshaw, 2015). Diese Antikörperantwort findet hauptsächlich in den drainierenden

Lymphknoten und in tertiären lymphoiden Strukturen in der Lunge statt, die ähnlich zu Germinalen Zentren in drainierenden Lymphknoten oder der Milz aufgebaut sind und somit direkt im Gewebe die adaptive Immunantwort aufrechterhalten. Hierzu zählt auch in den oberen Atemwegen das *nasal-associated lymphoid tissue* (NALT), sowie in den unteren Atemwegen das *bronchus-associated lymphoid tissue* (BALT) (Batista and Harwood, 2009). Im Menschen lassen sich diese Strukturen jedoch nur sehr schwer nachweisen (Chiu and Openshaw, 2015; Moyron-Quiroz et al., 2006).

Die von den Keulenzellen und Pneumozyten Typ II gebildeten *Surfactant*-Proteine SP-A und SP-D haben eine direkte antimikrobielle Wirkung. Sie binden an Zuckermoleküle auf der Oberfläche vieler Pathogene und können die so markierten Mikroorganismen schneller durch Alveolarmakrophagen beseitigen (Lüllmann-Rauch, 2015).

In den zilienfreien, terminalen Luftwegen und den Alveolen sind Alveolarmakrophagen (AM Φ) während der Homöostase der vorherrschende Immunzelltyp. AM Φ werden als gewebespezifische Immunzellen schon wenige Tage nach der Geburt in die Lunge rekrutiert und dienen als erste Hürde für in die Lunge eindringende Pathogene. Diese Zellen dienen der Reinigung des Lungengewebes u.a. von Bestandteilen toter Zellen und Pathogenen, sowie der Erhaltung der Lungenhomeostase (Hussell and Bell, 2014). Dazu gehört auch die Beseitigung von durch Typ II Pneumozyten sezerniertes, nicht rezirkulierendes *Surfactant*. Auch wurde in Ratten und Mäusen ermittelt, dass AM Φ immunregulatorische Funktionen haben. Sie können überschießende Immunreaktionen durch die Bildung von *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β), Stickstoffmonooxyd (NO), Interleukin 10 (IL-10) und Prostaglandinen unterbinden (Garbi and Lambrecht, 2017). Neben AM Φ gibt es weitere Makrophagen im Lungeninterstitium, der bronchialen Submukosa und in der vaskulären Bindegewebshülle (Garbi and Lambrecht, 2017).

Die Zellen des respiratorischen Epithels erkennen über *pattern recognition* Rezeptoren (PRR), wie *Toll-like*-Rezeptoren (TLR) auf der Zelloberfläche bzw. Endosomen oder *retinoic acid inducible gene 1* (Rig-I) und Rig-I-ähnliche Rezeptoren im Zellplasma, virale und bakterielle Komponenten. Über eine Signalkaskade binden daraufhin im Zellkern der *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF- κ B) und Interferon-regulierende Faktoren (IRF) an die entsprechenden Abschnitte im Genom und

initiieren so die Transkription und Expression von Interferonen (IFN) vom Typ I, Chemokinen, Zytokinen und kostimulatorischen Molekülen (CD80, CD86) sowie endothelialen Adhäsionsmoleküle wie E-Selektin (Abbas et al., 2015). Der so etablierte antivirale Status dient der Aktivierung der adaptiven Immunantwort sowie der Aktivierung zellulärer intrinsischer Abwehrmechanismen in angrenzenden Zellen (Abbas et al., 2015). Die angeborene Immunantwort, bestehend aus neutrophilen Granulozyten und natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), wird über Zytokine und Chemokine aktiviert. NK-Zellen produzieren Zytokine wie z.B. Interferon- γ (IFN- γ) und können infizierte Zellen eliminieren (Kohlmeier and Woodland, 2009). Neben der angeborenen Immunantwort gibt es auch die adaptive Immunantwort die durch T- und B-Zellen vermittelt wird (schematisch dargestellt in Abb. 2). Zur Aktivierung von T- und B-Zellen werden DZs benötigt. Diese nehmen in der Lunge virale Komponenten auf und durch verschiedene Stimuli (TLRs) entwickeln sich die unreifen DZ zu professionellen Antigen-präsentierenden Zellen (APZ). APZ stimulieren dann ihrerseits naive T-Zellen, welche zu CD4⁺ T-Helferzellen (Th-Zellen) oder zu zytotoxischen T-Zellen (CTLs) differenzieren. Naive B-Zellen entwickeln sich nach Antigenkontakt zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen (Chiu and Openshaw, 2015). Ein wichtiger Teil der Immunabwehr in der Lunge ist das Vorhandensein neutralisierender und opsonisierender Antikörper im Gewebe, um die Infektion von Beginn an zu inhibieren. In den oberen Atemwegen wird hauptsächlich dimere IgA-Antikörper gebildet, in den unteren Atemwegen dominiert dagegen IgG (Chiu and Openshaw, 2015). Bei Influenzavirus-Infektionen werden neben IgG- und IgA-Antikörpern auch pentamere IgM-Antikörper generiert (Baumgarth et al., 2000; Wang et al., 2016).

Ausdifferenzierte Gedächtnis-B-Zellen migrieren nicht nur in das Knochenmark, sondern auch in den Respirationstrakt. Dort erhalten sie für lange Zeit die schützende Antikörperkonzentration aufrecht, indem sie Infektionen bzw. die Ausbreitung von Infektionen verhindern (Abb. 2). Wird die Immunantwort in der Lunge nicht reguliert, z.B. durch regulatorische T-Zellen (T_{reg}), kann es zu einer Immunpathogenese und dadurch bedingten schweren Krankheitsverläufen kommen.

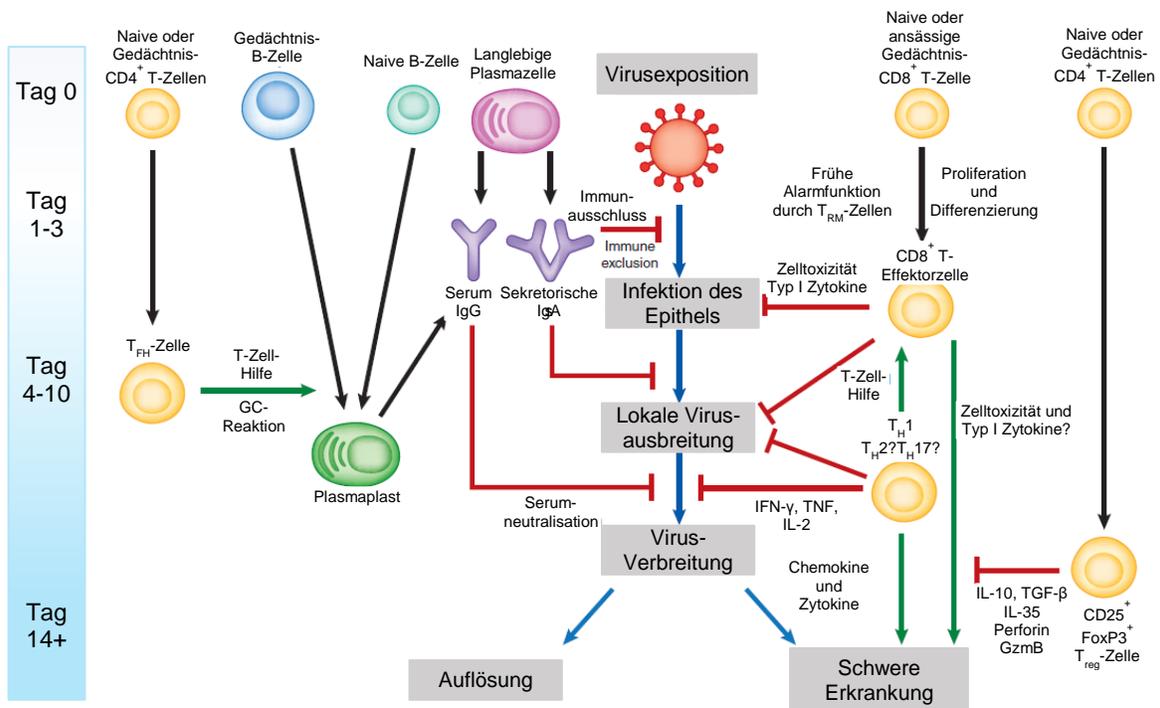


Abb. 2: Zusammenfassung der antiviralen T- und B-Zell-Antwort in der Lunge. Durch T- bzw. B-Lymphozyten kann an verschiedenen Zeitpunkten eine weitere Ausbreitung der Infektion im Lungengewebe verhindert werden. T-Zellen dienen der vollständigen Viruseliminierung im Gewebe. Des Weiteren regulieren Treg-Zellen die Immunantwort und verhindern somit schwere Krankheitsverläufe. Ist dieser Schutzmechanismus fehlerhaft oder nicht ausreichend, können schwerwiegende Schäden im Lungengewebe auftreten (verändert bzw. übersetzt nach (Chiu and Openshaw, 2015)).

1.2 Pneumoviren

1.2.1 Das Respiratorische Synzytial-Virus (RSV)

Pneumoviren gehören zur Ordnung der *Mononegavirales* und der Familie der *Pneumoviridae*. Diese Familie wird in zwei Gattungen unterteilt: *Metapneumoviren* und *Orthopneumoviren*. Zu letzterem zählt das humane RSV (HRSV) sowie seine Verwandten, das bovine RSV (BRSV) und das murine Pneumonievirus (MPV). Zu den *Metapneumoviren*, gehört das humane Metapneumovirus (HMPV) und das aviäre Metapneumovirus (AMPV) (Afonso et al., 2016; Amarasinghe et al., 2017; Rima et al., 2017). RSV wird mittels serologischer Methoden in zwei antigene Subtypen A und B unterteilt. Die Unterscheidung innerhalb der RSV-Subtypen erfolgt auf Grundlage der Sequenz der zweiten hypervariablen Region des RSV-G-Gens (Collins and Crowe, 2007).

Der Name „Respiratorisches Synzytial-Virus“ leitet sich von der Tatsache ab, dass dieses Virus in Zellkulturen gut sichtbare Synzytien bildet und Infektionen des oberen und unteren Atemtrakts verursacht. Die Synzytienbildung tritt aber nicht oder nur selten im Wirt auf (Collins and Crowe, 2007). 1956 konnte erstmals RSV aus den oberen Atemwege eines Schimpansen isoliert werden (Blount et al., 1956). Darauf folgend konnte das Virus auch bei Kindern mit Krupp-Symptomen und Lungenentzündung nachgewiesen werden (Chanock et al., 1957).

RSV tritt im gemäßigten Klima saisonal in den kalten und feuchten Wintermonaten auf (Kim et al., 1973; Mufson et al., 1973). In tropischen Gebieten sind Patienten hauptsächlich in der Regenzeit betroffen (Hillis et al., 1971; Yusuf et al., 2007). Der Mensch gilt als einziger natürlicher Wirt und kann mehrmals in seinem Leben mit HRSV infiziert werden (Glezen et al., 1986). Studien zur Epidemiologie kommen zu dem Schluss, dass es jährlich zu 33,1 Mio. RSV-vermittelten akuten Infektionen der unteren Atemwege in Kindern unter fünf Jahren kommt, die in 3,2 Mio. Hospitalisierungen und in 59 600 Todesfällen resultieren. Bei Kindern jünger als sechs Monaten müssen 1,4 Mio. stationär behandelt werden. Die Sterblichkeit beträgt hier 27 300 Patienten pro Jahr (2015, (Shi et al., 2017)). Neben Säuglingen und Kleinkindern sind auch ältere Personen oder Patienten mit einer Immunsuppression von schweren Infektionen der unteren Atemwege betroffen. Eine symptomatische Erstinfektion mit RSV, u.a. mit einer Infektion der unteren Atemwege (20-40%), tritt meist schon im ersten Lebensjahr auf. Eine fast 100%ige Durchseuchung der Kinder erfolgt bis zum Ende des zweiten Lebensjahrs. Wiederkehrende Infektionen sind in der Regel milder als die Primärinfektion (Glezen et al., 1986; Kapikian et al., 1961). Es gibt verschiedene Faktoren, welche das Risiko einer schweren RSV-Erkrankung beträchtlich erhöhen können. Dazu gehören Frühgeburten, geringe Mengen maternaler Antikörper oder das Fehlen einer vorhergehenden RSV-Infektion. Weitere Risikogruppen sind Individuen mit Herzerkrankungen, sowie Patienten, die unter einer primären oder sekundären Immunschwäche leiden (Murata and Falsey, 2007).

Die Infektion mit RSV erfolgt über Aerosole oder direkten Kontakt und etabliert sich zuerst im Nasopharynx. Die Inkubationszeit beträgt 4-5 Tage. Anschließend kann eine Ausbreitung der Infektion in die unteren Atemwege beobachtet werden (Collins and

Crowe, 2007). HRSV verursacht neben Husten, Rhinorrhö und leichtem Fieber schwere Infektionen der unteren Atemwege. Klinische Zeichen einer Bronchiolitis sind erhöhter Atemwegswiderstand durch die Verlegung der Atemwege bei der Ausatmung und rasselnde Atemgeräusche (Collins and Graham, 2008). RSV infiziert hauptsächlich zilierte Zellen der Bronchiolen und Typ I Pneumozyten, es können aber auch andere Zelltypen betroffen sein (Johnson et al., 2007). Nach Infektion kommt es in der Lunge zur Nekrose des Alveolarepithels und zur Rekrutierung verschiedener Zellpopulationen wie Monozyten, T-Zellen und neutrophiler Granulozyten (Collins and Graham, 2008).

RSV besitzt ein einzelsträngiges, negativ-orientiertes RNA-Genom mit ca. 15,2 kb Länge. Es besteht aus 10 Genen, die für 11 Proteine kodieren (Abb. 3B). Wie bei allen *Mononegavirales* befinden sich vor dem ersten Gen eine kurze extragenische Leaderregion und nach dem letzten Gen im Genom eine extragenische Trailerregion (Collins and Melero, 2011). Form und Eigenschaften des Virions werden durch die viralen Proteine festgelegt. Orthopneumoviren, zu denen RSV gehört, weisen Gene auf, die für folgende Proteine kodieren: das Phosphoprotein P, das Nukleoprotein N, das Matrixprotein M, das Fusionsglykoprotein F und das Protein für die Polymerase L. Pneumoviren wie RSV besitzen zusätzlich ein Gen, welches für ein zweites Glykoprotein G kodiert. Das M2-Gen kodiert zwei verschiedene Proteine, M2-1 und M2-2, deren offener Leserahmen sich auf der M2-mRNA überlappen. Weitere exprimierte Proteine sind die Nichtstrukturproteine NS1 und NS2, sowie das kleine hydrophobe SH-Protein (Abb. 3A). Das Virus-Partikel hat eine von der Zellmembran abstammende Lipidhülle, die durch Ausknospung gebildet wird und drei virale Membranproteine enthält: das G-, F- und das SH-Protein. An der Innenseite der Lipidhülle bildet das Matrixprotein M eine durchgehende Schicht. Im Virion selbst befindet sich das helikale, virale Nukleokapsid, welches aus der viralen RNA und dem Nukleoprotein N gebildet wird. Zusammen mit dem Nukleokapsid werden außerdem noch die Polymerase L, das Phosphoprotein P und der virale Transkriptionsfaktor M2-1 verpackt (Collins and Melero, 2011).

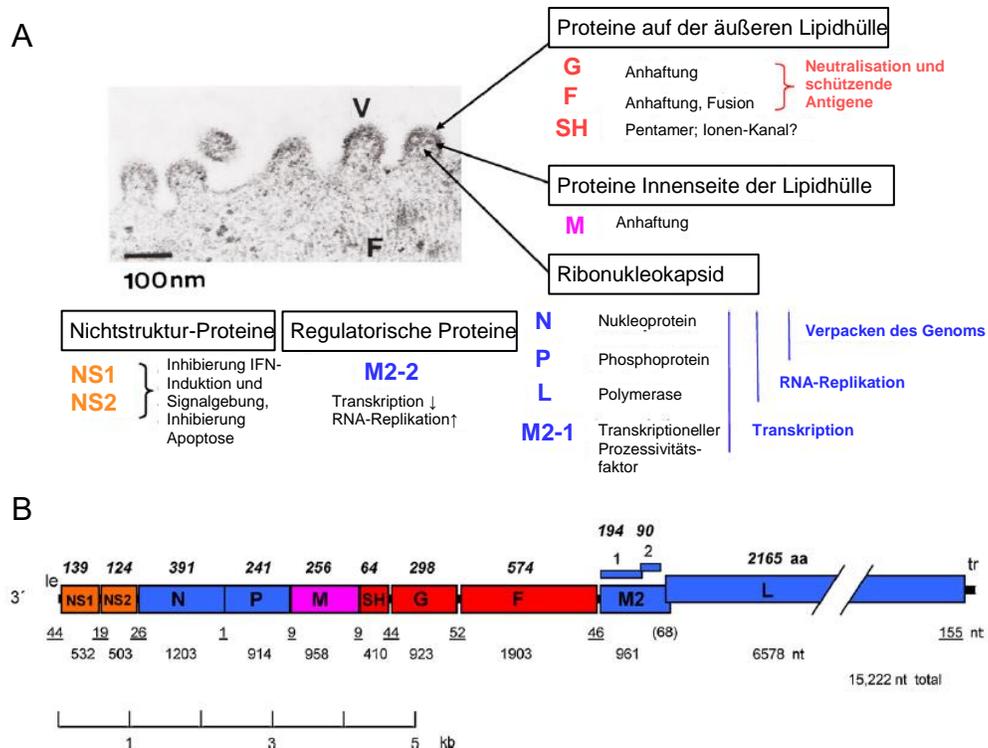


Abb. 3: Aufbau und Genom des respiratorischen Synzytial-Virus (A) Struktur und Proteine des respiratorischen Synzytial Virus. Die Abbildung zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme eines an der Plasmamembran entstehenden Virions. (B) Negativ-orientiertes RSV-Genom. Die Anzahl der Nukleotide pro Gen bzw. intergenischer Region sind unterhalb des Genoms angezeigt. Über dem Genom befinden sich die Anzahl der Aminosäuren für jedes nichtmodifizierte Protein (Collins and Melero, 2011; Eaton et al., 1944).

Weltweit existiert kein zugelassener Impfstoff gegen RSV. Einige Impfstoffkandidaten sowie monoklonale Antikörper zur passiven Immunisierung befinden sich jedoch bereits in der klinischen Phase III (zusammengefasst in (Mazur et al., 2018; Neuzil, 2016)). Der Weg zu einem schützenden Impfstoff dauert seit über 60 Jahren an. Der erste Impfstoff stammt aus den 60er Jahren des letzten Jahrhunderts. Hier wurden Patienten, Säuglinge und Kleinkinder mit Formalin-inaktiviertem RSV (FI-RSV) immunisiert. Die immunisierten Patienten entwickelten jedoch teilweise nach einer natürlichen RSV-Infektion schwerere Lungenentzündungen als nicht-vakzinierte Patienten (Kapikian et al., 1961; Kim et al., 1969). Die Infektion verlief in zwei dieser Patienten fatal (Kim et al., 1969). Dieses Phänomen wurde in folgenden Untersuchungen als *Vaccine Enhanced RSV Disease* bezeichnet. Als Ursache dafür wurde eine verstärkte Rekrutierung eosinophiler Granulozyten beschrieben (Kim et al., 1969), die jedoch nach erneuter Analyse des Autopsie-Materials nicht bestätigt werden konnte (Prince et al., 2001).

Für die Erforschung der Immunantwort gegenüber RSV existiert kein permissives Tiermodell. Häufig werden BALB/c-Mäuse mit einer Dosis von 10^6 Viruspartikeln infiziert, um vergleichsweise milde Symptome zu generieren (Graham et al., 1988). In neueren Studien werden auch Erwachsene, und somit RSV-erfahrene Freiwillige mit einer definierten Menge RSV infiziert (zusammengefasst in (Habibi and Chiu, 2017)). Beide Modelle zeigen jedoch nur relativ milde Krankheitsverläufe, die nur bedingt der Wirklichkeit einer RSV-Infektion entsprechen. Diese relativ milden Krankheitsverläufe spiegeln jedoch auch hier nicht die Symptome bzw. Krankheitsverläufe bei den Gruppen wieder, die ein hohes Risiko für schwere Krankheitsverläufe haben, z.B. Säuglinge, ältere Erwachsene und Patienten mit verschiedenen Immundefizienzen.

1.2.2 Das Pneumonievirus der Maus (PVM)

PVM gehört ebenfalls zur Gattung der Orthopneumoviren (Amarasinghe et al., 2017; Rima et al., 2017) und wird nach neuester taxonomischer Einordnung als murines Pneumovirus (MPV) bezeichnet (Afonso et al., 2016). In dieser Arbeit wird jedoch weiterhin die Bezeichnung PVM verwendet. Zum ersten Mal isoliert wurde dieses Virus nach sequentieller Passage von Lungenhomogenaten vermeintlich gesunder Mäuse, die Krankheitssymptome und tödliche Pneumonien entwickelten (Horsfall and Hahn, 1939; Horsfall and Hahn, 1940). Andere Nagetiere, wie Ratten und Baumwollratten können ebenfalls mit PVM infiziert werden (Eaton et al., 1944). Es sind zwei verschiedene PVM-Stämme beschrieben: PVM 15 und J3666, wobei ersterer sich in PVM 15/Warwick, welcher *in vivo* sehr attenuiert ist (Randhawa et al., 1995), und in PVM 15/ATCC, welcher in BALB/c- und C57BL/6-Mäusen symptomatische Infektionen verursacht (Krempf and Collins, 2004), unterscheiden. Ein dritter Stamm, heute als PVM Y bezeichnet (Genbank-Nummer: JQ899033), konnte aus den Lungen athymischer Mäuse isoliert werden, die sich spontan mit PVM infiziert hatten (Weir et al., 1988).

PVM hat, wie HRSV, ein negativ-orientiertes RNA-Genom mit rund 15 kb Länge (Krempf et al., 2005). Dieses Genom enthält 10 Gene, die im Unterschied zu HRSV, potentiell für 12 Proteine kodieren. 11 dieser Proteine entsprechen den Proteinen von RSV. Das potentiell 12. Protein hat kein Gegenstück in HRSV oder BRSV und besteht

voraussichtlich aus 137 Aminosäuren. Es wird von einem zweiten ORF des P-Gens kodiert dessen Funktion nicht eindeutig charakterisiert ist (Barr et al., 1994). Es gibt jedoch Hinweise, dass dieses P2-Protein dosisabhängig die virale Transkription inhibiert (Dibben et al., 2008). Die Nichtstrukturproteine von PVM sind Pathogenese-Faktoren in Mäusen. Das NS1- und das NS2-Protein von PVM sind Antagonisten der IFN-Typ I- und Typ III-Antwort (Buchholz et al., 2009). NS-Deletionsmutanten replizieren in IFN-kompetenten murinen embryonalen Fibroblasten (MEF) schlechter als in MEFs, welche eine Defizienz im IFN- α/β -Rezeptor aufweisen. rPVM hingegen zeigt eine gute Replikation in IFN-kompetenten Zellen. In Zellkultur und *in vivo* unterdrückt das wildtypische Virus die IFN-Typ I- und III- Expression im Lungengewebe, im Unterschied zu den NS-Deletionsmutanten. Außerdem konnte ermittelt werden, dass die Virulenz eines NS1- bzw. NS2- oder doppelt-defizienten Virus durch Deletion des INF- α -Rezeptors und des IL28R α in Mäusen nicht vollständig wiederhergestellt werden konnte (Heinze et al., 2011).

Um eine symptomatische Infektion mit PVM in Mäusen zu generieren, reicht eine um ein vielfaches niedrigere Infektionsdosis PVM (50-300 Pfu/Maus) im Vergleich zu einer RSV-Infektion in Mäusen aus. Dies ist einer der Gründe, aus welchem PVM als Ersatzmodell für humane RSV-Infektionen verwendet wird (Easton et al., 2004; Rosenberg and Domachowske, 2008).

1.3 Pneumovirus-spezifische Immunantworten

1.3.1 Zeitlicher Verlauf der angeborenen und adaptiven Immunantwort während einer Virusinfektion

Nach einer viralen Infektion kommt es innerhalb der ersten 12 bis 24 Stunden zur Aktivierung der angeborenen Immunantwort. Nach Erkennung viraler Antigene über TLR und Rig-I in infizierten Zellen werde über eine Signalkaskade Typ I IFN, also IFN- α und IFN- β , gebildet und freigesetzt (Abbas et al., 2015; Perry et al., 2005). Über IFN- α/β -Rezeptoren reagieren benachbarte Zellen auf diese Interferone und initialisieren einen antiviralen Status. Dieser bewirkt über die *double-stranded RNA-activated*

serine/threonine protein kinase (PKR), welche die virale Transkription und Translation inhibieren, die 2',5'-Oligoadenylate-Synthetase und RNase L, welche die Degradation der viralen RNA unterstützt, eine gewisse Resistenz der Zellen gegenüber Viren (Abbas et al., 2015; Perry et al., 2005). Unabhängig vom Erreger werden Leukozyten direkt und schnell in das entzündete und infizierte Gewebe rekrutiert. Dazu zählen eosinophile und neutrophile Granulozyten. Neutrophile Granulozyten können innerhalb von drei Stunden in das betroffene Gewebe migrieren und eliminieren über Phagozytose Erreger und tote Zellen. Zusätzlich wird ihre antimikrobielle Funktion durch die Degranulation von Myeloperoxidasen (MPO), Proteinase 3 (PR3) und Matrix-Metalloproteinase (MMP) unterstützt (Jonsson et al., 2013). Über inflammatorische Zytokine, wie Eotaxin 1-3 sowie Interleukin-5, werden inflammatorische, eosinophile Granulozyten aus dem Knochenmark in das betroffene Gewebe innerhalb von 8-12 Stunden rekrutiert (Bass, 1975; Ramirez et al., 2018). Gleichzeitig werden Pathogene sowie tote Zellen durch phagozytierende Zellen wie Makrophagen aufgenommen und eliminiert (Abbas et al., 2015). Bis zu 10% der Lymphozyten in der Lunge sind NK-Zellen (zusammengefasst in (Vivier et al., 2008)). Zusätzlich zu diesen NK-Zellen werden weitere NK-Zellen innerhalb von 4 Tage in das infizierte Gewebe rekrutiert (Abbas et al., 2015; Culley, 2009). Sie sind in der Lage infizierte Zellen über direkte Zytotoxizität durch Perforin/Granzym B bzw. über die Freisetzung von IFN- γ und die daraus resultierende Aktivierung von Makrophagen zu eliminieren (Abbas et al., 2015).

Professionelle Antigen-präsentierende Zellen, wie DZ, nehmen ebenfalls Pathogene oder deren Bestandteile auf und migrieren anschließend in die drainierenden Lymphknoten zur Aktivierung der Zellen der adaptiven Immunantwort (Abbas et al., 2015). Sie sind das Bindeglied zwischen angeborener und erworbener Immunität. Die angeborene und adaptive Immunantwort verlaufen zeitlich versetzt. Letztere erreicht ihren Höhepunkt an Tag 7 *post infection* (p.i.) mit der Rekrutierung virusspezifischer, zytotoxischer T-Zellen, die über Fas/FasL und Perforin/Granzym B infizierte Zellen direkt eliminieren können (Abbas et al., 2015). T-Helferzellen werden ebenfalls in das infizierte Gewebe rekrutiert. Dabei sezernieren Th1-Zellen IFN- γ zur Aktivierung der Makrophagen im Gewebe. Neben Th1-Zellen spielen auch Th2-Zellen eine wichtige Rolle während einer Virusinfektion. Sie vermitteln über die Ausschüttung von IL-4/5 und

13 die Aktivierung von eosinophilen Granulozyten und Mastzellen und führen zur alternativen Aktivierung von Makrophagen, die notwendig für die Gewebereparatur sind. Th17-Zellen stimulieren indes über die Freisetzung von IL-17 und IL-22 die Ausschüttung von antimikrobiellen Peptiden, z.B. Defensine, durch Gewebezellen und unterstützen die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in das entzündete Gewebe (Abbas et al., 2015). In den sekundären lymphatischen Organen findet neben der T-Zell-Aktivierung und -Proliferation auch die T-Zell-abhängige und -unabhängige Antikörperproduktion durch sich aus reifen B-Zellen entwickelnden kurz- bzw. langlebigen Plasmazellen statt. Bereits acht bis zehn Tage nach der Infektion kann ein Anstieg der Antikörper festgestellt werden. Im Verlauf der Lymphozyten-Aktivierung werden zusätzlich Gedächtnis-B- und T-Zellen gebildet, die auf eine erneute Infektion des gleichen Erregers schneller reagieren können (Abbas et al., 2015).

1.3.2 Rekrutierungsmuster und Bedeutung einzelner Immunkompartimente nach einer RSV-Infektion

Werden unter experimentellen Bedingungen Mäuse mit RSV infiziert, erreicht die Viruslast bereits an Tag 4 p.i. ihren Höhepunkt (Graham et al., 1991b). Während einer Erstinfektion beim Menschen ist es jedoch schwer den Verlauf der Virusreplikation zu ermitteln, da meist nicht bekannt ist, wann sich die Patienten infiziert haben und nicht alle stationär behandelt werden müssen. Die Viruslast wird meist erst nach Auftreten der ersten Symptome untersucht (Brint et al., 2017). Untersuchungen der pulmonalen Viruslast im Menschen nach einer experimentellen RSV-Infektion zeigen jedoch einen Anstieg bis Tag 7 p.i. mit anschließender Abnahme der Viruspartikel. Dies entspricht jedoch keiner Primärinfektion beim Menschen (Jozwik et al., 2015).

Während einer primären RSV-Infektion im murinen Wirt fällt das Auftreten von Krankheitssymptomen mit der Rekrutierung von Lymphozyten in die Lunge zusammen. Über die Bedeutung von T-Helfer-Zellen und zytotoxischen T-Zellen im RSV-Mausmodell gibt es bereits Daten zur Rekrutierung dieser Zellpopulationen. Erste Hinweise beim Menschen liegen ebenfalls vor, über deren Bedeutung lassen sich jedoch noch keine eindeutigen Schlüsse ziehen (Openshaw et al., 2017). Im

Bronchoalveolarlumen von Kindern mit einer RSV-induzierten Infektion der unteren Atemwege befinden sich CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, wobei CD4⁺ T-Zellen der vorherrschende Zelltyp sind (Everard et al., 1994; Heidema et al., 2007). Der Höhepunkt der Rekrutierung der CD8⁺ RSV-spezifischen T-Zellen in das Lungengewebe ist Tag 9 nach dem Auftreten der ersten Symptome (Heidema et al., 2007). Diese Zellen weisen einen Effektorphänotyp auf (Bem et al., 2008). Jedoch konnten relativ wenige T-Zellen in *post mortem* Lungengewebe von Säuglingen nachweisen (Larranaga et al., 2009; Welliver et al., 2007). Bei Erwachsenen sind CD8⁺ T-Zellen direkt in die Klärung der Virusinfektion in Lunge involviert (Jozwik et al., 2015). Eine RSV-Infektion wird außerdem charakterisiert durch eine auftretende Th1-T-Zellantwort, in welcher T-Zellen IFN- γ sezernieren und infizierte Zellen mittels Perforin und Granzym B eliminiert werden (Openshaw and Chiu, 2013). Das Rekrutierungsmuster von CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen im RSV-Mausmodell zeigt eine gesteigerte Rekrutierung dieser Zellen sowie eine gesteigerte IFN- γ -Expression bis Tag 10 p.i. im Bronchoalveolarlumen (Hussell and Openshaw, 1998). CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen spielen dabei eine wichtige Rolle für die Viruseliminierung im Respirationstrakt, aber auch für die Entwicklung einer Immunpathogenese während einer RSV-Infektion (Chiu and Openshaw, 2015; Christiaansen et al., 2014). Während im RSV-Mausmodell CD8⁺ T-Lymphozyten zur Viruseliminierung und zur Immunpathogenese beitragen, kann über die Rolle der CD8⁺ T-Zellen beim Menschen keine genauen Rückschlüsse gezogen werden.

$\gamma\delta$ -T-Zellen werden ebenfalls transient in das Lungengewebe nach einer RSV-Infektion im BALB/c-Mausmodell rekrutiert und erreichen ihren Höhepunkt Tag 4 p.i. (Dodd et al., 2009). Auch kommt es beim Menschen und im BALB/c-Mausmodell zu vermehrter Freisetzung von Proteinen der IL-17-Familie, sezerniert von Th17-Zellen (Mukherjee et al., 2011), die im Menschen mit der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten während einer RSV-Infektion assoziiert sind. Andere Studien hingegen kommen zu dem Schluss, dass die IL-17-Antwort eher während der Genesungsphase auftritt (Lukens et al., 2010; Stoppelenburg et al., 2013).

Weitere untersuchte Zellpopulationen in Mäusen sind neutrophile und eosinophile Granulozyten sowie NK-Zellen und AM Φ . Beim Menschen kann, aus ethischen Gründen, nur schwer auf genaue Rekrutierungsmuster hin untersucht werden, da die

Patienten erst in den Fokus von Ärzten und Forschern rücken, wenn sie mit schweren Lungenentzündungen oder Bronchiolitiden vorstellig werden. Es konnten allerdings erste Rückschlüsse auf die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und NK-Zellen als Bestandteile der angeborenen Immunantwort gezogen werden (Openshaw et al., 2017).

Das Rekrutierungsmuster von NK-Zellen im RSV-Mausmodell zeigt eine gesteigerte Rekrutierung dieser Zellen sowie eine gesteigerte IFN- γ -Expression und Zellzytotoxizität bis Tag 4 p.i. im Bronchoalveolarlumen mit anschließender Abnahme dieser Zellpopulation (Hussell and Openshaw, 1998). Die NK-Zellen können infizierte Zellen entweder direkt, oder indirekt über die Freisetzung von IFN- γ eliminieren und so eine antivirale Th1-Antwort in RSV infizierten Mäusen unterstützen (Kaiko et al., 2010). Für die Rekrutierung und Aktivierung von NK-Zellen in das Lungengewebe sind AM Φ notwendig (Pribul et al., 2008). Während einer RSV-Infektion in Säuglingen kommt es zu einer Verringerung der Anzahl der NK-Zellen in der Zirkulation, was mit der Schwere der Infektion korreliert (Larranaga et al., 2009; Welliver et al., 2007). Im Lungengewebe von fatalen Fällen kommen diese CD56⁺ NK-Zellen ebenfalls nur sehr vereinzelt vor (Larranaga et al., 2009; Welliver et al., 2007). Dafür erhöht sich die Anzahl einzelner NK-Zell-Subpopulationen innerhalb der NK-Zell-Population im Blut (Larranaga et al., 2009; Welliver et al., 2007). Dies könnte auf die Migration von NK-Zell-Subpopulationen aus dem Blutkreislauf in die Lunge hindeuten. Dafür spricht unter anderem die Akkumulation von Granzym B-exprimierenden NK-Zellen in der Lunge von Säuglingen, die unter einer schweren RSV-Bronchiolitis leiden (Bem et al., 2008; Kerrin et al., 2017).

Schwere RSV-Infektionen in Säuglingen werden seit langem mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von Asthma im Laufe des Lebens assoziiert (Mathias, 2015). Eine Untersuchung zeigt, dass NK-Zell-Defizienzen während einer primären RSV-Infektion in Mäusen in einer Unterdrückung der IFN- γ -Produktion resultiert und die Entwicklung einer RSV-spezifischen Th2-Antwort und nachfolgender allergischer Lungenerkrankung begünstigt (Kaiko et al., 2010). Im Unterschied zur vorherigen Untersuchung konnten Long et al. zeigen, dass es nach einer akuten RSV-Infektion in BALB/c-Mäusen (Tag 21/28) zu einer Erhöhung der Typ 2 Zytokine und der NK-Zellen im Bronchoalveolarlumen kommt. Durch Depletion von NK-Zellen nach der akuten Infektion

kann die persistierende Entzündung und die akute Hyperresponsibilitäts-Reaktion (AHR) reduziert werden (Long et al., 2016). Es scheint somit von Bedeutung zu sein, in welchem Stadium der RSV-Infektion die NK-Zellen depletiert werden. Zusammengefasst kann gesagt werden, dass NK-Zellen zur Immunpathogenese während einer primären RSV-Infektion beitragen und auch vor einer sich eventuell später entwickelnden Asthma-Symptomatik schützen.

Die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten erfolgt über das Blut in das infizierte Gewebe. Nach einer RSV-Infektion konnte der höchste Wert neutrophiler Granulozyten im Blut erst rund 4 Tage nach dem Höhepunkt der viralen Replikation nachgewiesen werden (Lukens et al., 2010), was auf eine verzögerte Rekrutierung dieses Zelltyps schließen lässt. Über das Rekrutierungsmuster neutrophiler Granulozyten in die Lunge lässt sich jedoch schwer eine Aussage treffen. Es ist allerdings bekannt, dass es während einer RSV-Infektion zu einer gesteigerten Infiltration von neutrophilen Granulozyten in das Lungengewebe kommt (Heidema et al., 2008; Smith et al., 2001; Welliver et al., 2007). Granulozyten sind der vorherrschende Zelltyp in den Atemwegen von teilweise künstlich ventilierten Säuglingen mit einer Bronchiolitis (Everard et al., 1994). Im Lungengewebe von Patienten, die an einer RSV-Infektion der unteren Atemwege verstorben sind, konnte ebenfalls eine großflächig verteilte Infiltration von neutrophilen Granulozyten nachgewiesen werden (Johnson et al., 2007; Welliver et al., 2007). In neutrophilen Granulozyten wurden außerdem neben verschiedenen RSV-Proteinen auch virale RNA und mRNA identifiziert (Halfhide et al., 2011; Yui et al., 2003), was auf eine direkte Infektion der neutrophilen Granulozyten mit RSV oder auf Phagozytose von Viruspartikeln schließen lässt. Die für neutrophile Granulozyten typische NET-Bildung konnte ebenfalls *in vitro* (Funchal et al., 2015) und in Lungen von künstlich beatmeten Kindern nachgewiesen werden (Cortjens et al., 2016a). Auch in der *Vaccine Enhanced RSV Disease* scheinen neutrophile Granulozyten eine wichtige Rolle zu spielen, da neuere Untersuchungen des Autopsiematerials aus den 1960er Jahren (Kim et al., 1969) neutrophile Granulozyten als Hauptimmunzellpopulation in diesen Lungen identifizieren (Prince et al., 2001). Neutrophile Granulozyten sind zwar der vorherrschende Zelltyp in Säuglingen mit Bronchiolitiden (Everard et al., 1994) und in

mit hohen Dosen RSV-infizierten Mäusen (Johnson et al., 2007), allerdings wurde deren Bedeutung für den Krankheitsverlauf noch nicht vollständig verstanden.

Nach einer hohen Infektionsdosis im murinen RSV-Infektionsmodell konnte eine Depletion der AM Φ bereits nach sechs Stunden festgestellt werden (Kolli et al., 2014). Über das Rekrutierungsmuster von AM Φ wurden noch keine Aussagen getroffen. Jedoch sind AM Φ aus dem Lungenlumen von RSV-infizierten Säuglingen und erwachsenen Transplantatempfängern in fluoreszenz-mikroskopischen Untersuchungen positiv für das RSV G-Protein, HLA-DR, IL-1 β und TNF- α . Dies könnten Hinweise für eine lokale immunregulatorische und antigen-präsentierende Rolle der AM Φ sein (Midulla et al., 1993; Panuska et al., 1992). Diese Zellen scheinen auch direkt mit RSV infizierbar zu sein, da in isolierten AM Φ aus RSV-infizierten Patienten eine virale Replikation nachweisbar ist (Midulla et al., 1993). In *ex vivo* infizierten murinen AM Φ konnte indes eine abortive Infektion durch die Bildung von Einschlusskörperchen nachgewiesen werden (Makris et al., 2016). Die experimentelle Depletion von AM Φ vor der Infektion mit RSV hat keinen Einfluss auf die T-Zell-Rekrutierung oder die Pathogenese nach einer RSV-Infektion, jedoch auf die Produktion früher Zytokine, wie IFN- α , TNF- α oder IL-6, und die Rekrutierung und Aktivierung von NK-Zellen (Pribul et al., 2008). Entgegengesetzt zu dieser Studie konnten Reed et al. zeigen, dass es in *New Zealand Black* Mäusen, die eine defektive Makrophagen-Aktivität aufweisen, zu Atemwegsverengungen, assoziiert mit fortschreitender Krankheit, kommt (Reed et al., 2008). Ebenfalls konnte in der Lunge eine erhöhte Entzündung der Atemwege und eine erhöhte AHR, jedoch keine Änderung im Körpergewicht feststellen (Kolli et al., 2014). In folgenden Untersuchungen wurden AM Φ als Hauptquelle für Typ I Interferone identifiziert, die zur verstärkten Rekrutierung von inflammatorischen Monozyten in das Lungengewebe führt (Goritzka et al., 2015). Diese Produktion von Typ I Interferonen ist abhängig von MAVS und dem IFNAR-Signalweg (Makris et al., 2016). AM Φ sind somit also notwendig für die Viruseliminierung und die Initialisierung der angeborenen Immunantwort über Typ I Interferone.

1.3.3 Rekrutierungsmuster und Bedeutung einzelner Immunkompartimente nach einer PVM-Infektion

Eine akute PVM-Infektion wird mit vermehrtem Influx von CD8⁺ T-Zellen in das Lungengewebe assoziiert (Claassen et al., 2005; Frey et al., 2008). Durch Co-Stimulationsversuche von PVM-infizierten Makrophagen mit aus PVM-infizierten Mäusen isolierten CD8⁺ T-Zellen konnte ermittelt werden, dass eine starke virusspezifische CD8⁺ T-Zell-Antwort auftritt (Frey et al., 2008). Auch Claassen et al. konnten gegen drei verschiedene PVM-Epitope gerichtete, virusspezifische CD8⁺ T-Zellen im Lungengewebe finden. Diese Zellen hatten eine verminderte Kapazität Zytokine während einer akuten Infektion oder sogar im Anschluss an diese zu sezernieren (Chang and Braciale, 2002; Claassen et al., 2005). Ähnliches konnte auch für eine RSV-Infektion im murinen Wirt ermittelt werden (Chang and Braciale, 2002). Dieses Phänomen ist jedoch unabhängig vom Erreger, sondern dient dem Schutz des Lungengewebes (Vallbracht et al., 2006). CD8⁺ T-Zellen expandieren spät in der Infektion. Dabei findet die CD8⁺ T-Zell-Rekrutierung vermehrt an Tag 10 p.i. statt, wenn das Virus bereits unter Kontrolle des Immunsystems ist (van Helden et al., 2012). CD4⁺ T-Zellen sowie $\gamma\delta$ -T-Zellen migrieren ebenfalls vermehrt in das Lungengewebe PVM-infizierter Mäuse, jedoch erst Tag 6-9 nach der Infektion (Spolski et al., 2012; Vandersarren et al., 2017).

Zur Bedeutung von NK-Zellen während einer PVM-Infektion gibt es wenige Untersuchungen. Im Vergleich zu Mock-infizierten Kontrollmäusen konnte Watkiss et al. einen leichten Anstieg dieses Zelltyps in C57BL/6-Mäusen an Tag 6 p.i. feststellen. Diese NK-Zellen sezernierten außerdem IFN- γ (Watkiss et al., 2013). Auch Scheer et al. konnte einen Anstieg der absoluten Zellzahl im Bronchoalveolarlumen bis Tag 7 p.i. mit anschließender Abnahme der Zellzahlen der NK-Zellen feststellen (Scheer et al., 2014). Während einer subletalen PVM-Infektion werden NK-Zellen erst relativ spät in das Lungengewebe rekrutiert.

Nach einer subletalen PVM-Infektion steigt der prozentuale Anteil neutrophiler Granulozyten im Bronchoalveolarlumen von 1-2% an Tag 0 bis auf rund 10% an Tag 7 p.i. kontinuierlich an, um anschließend bis Tag 21 p.i. wieder auf den anfänglichen Wert

abzusinken (Glineur et al., 2014). Auch die absoluten Zahlen neutrophiler Granulozyten im Bronchoalveolarlumen und der Lunge steigen bis Tag 6 p.i. nach einer letalen PVM-Infektion an (Spolski et al., 2012). Neutrophile Granulozyten migrieren während einer PVM-Infektion vermehrt in das Lungengewebe, wobei der Höhepunkt der Rekrutierung erst spät während des Infektionsverlaufs erreicht wird. Die Bedeutung von neutrophilen Granulozyten wurde während einer PVM-Infektion ebenfalls untersucht. Es konnten dabei keine klinischen Unterschiede zwischen Neutrophil-depletierten und unbehandelten Mäusen nach einer subletalen PVM-Infektion festgestellt werden. Auch waren keine Unterschiede in der pulmonalen Viruslast und nach Analyse der histopathologischen Präparate der Lunge sichtbar (Cortjens et al., 2016b). Die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in die Lunge scheint somit die Viruseliminierung und Krankheit nach einer schwerer PVM J3666 Infektion nicht zu beeinflussen.

PVM kann, zusätzlich zu Pneumozyten Typ I und II, AM Φ direkt infizieren, was in einer aktiven Virusreplikation bzw. Produktion infektiöser Viruspartikel resultiert (Dyer et al., 2015). Außerdem nimmt die Gesamtzahl der AM Φ während einer letalen PVM-Infektion ab (Dyer et al., 2015). AM Φ weisen einen aktivierten Phänotyp auf und exprimieren verstärkt TNF- α , IL-1 und IL-6. Eine experimentell induzierte Depletion von AM Φ ist mit einer erhöhten Viruslast und mit einer höheren Überlebensrate nach einer PVM-Infektion assoziiert. Durch eine Depletion von AM Φ in Mäusen vor einer Infektion kommt es ebenfalls zu einer erhöhten NK-Zell-Rekrutierung und IFN- γ -Produktion durch NK-Zellen, CD4⁺ - und CD8⁺ T-Zellen (Rigaux et al., 2012). AM Φ regulieren das Immunsystem während einer PVM-Infektion über die Expression von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen.

1.3.4 Rekrutierung und Bedeutung eosinophiler Granulozyten während einer Pneumovirus-Infektion

1.3.4.1 Funktionen von eosinophilen Granulozyten während einer Virusinfektion

Während einer Infektion haben eosinophile Granulozyten die Aufgabe verschiedene Lymphozytenpopulationen aufrechtzuerhalten und zu rekrutieren (Jacobsen et al., 2008). Eosinophile Granulozyten fungieren weiter als Antigen-präsentierende Zellen

gegenüber CD4⁺ T-Zellen (Ravin and Loy, 2016) und dienen der Immunmodulation (Jacobsen et al., 2011). Sie interagieren außerdem mit Bestandteilen der Komplement-Kaskade (Weiler et al., 1995). Über PRR können sie außerdem direkt *pathogen-associated molecular patterns* (PAMP) erkennen und durch diese aktiviert werden (Shamri et al., 2011). Sie sind ebenfalls in der Lage fremde Proteine und Moleküle zu phagozytieren (Shamri et al., 2011). Wie neutrophile Granulozyten sind sie in der Lage über katapultartige Freisetzung von mitochondrialer DNA Bakterien zu umschließen und festzuhalten (Nizet and Rothenberg, 2008; Shamri et al., 2011; Yousefi et al., 2008). Eosinophile Granulozyten sind involviert in der Wundheilung sowie bei der Bildung von fibrotischem Gewebe und der Gefäßumbildung in der Lunge während asthmatischer Prozesse (Aceves and Broide, 2008; Detoraki et al., 2010; Todd et al., 1991). Außerdem sind sie Teil der anti-mikrobiellen und anti-fungalen Immunität (zusammengefasst in (Ravin and Loy, 2016)). Die in den kristalloiden Granula gelagerten Proteine *Eosinophil-derived neurotoxin* (EDN) und *Eosinophil cationic protein* (ECP) haben durch ihre Ribonukleaseaktivität potentielle anti-virale Eigenschaften (Rosenberg and Domachowske, 1999). Die eosinophile Peroxidase (EPO) generiert außerdem reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die extrazelluläre Pathogene inaktivieren können (Hogan et al., 2008). Problematisch ist allerdings, dass die generierten ROS und die Freisetzung von granulären Proteine Zelltoxizität bewirkt und dadurch Gewebeschäden und Schäden an der extrazellulären Matrix verursacht (Van Epps and Bankhurst, 1978). Auch stimulieren eosinophile Granulozyten direkt über die Freisetzung von TGF- β , IL-4 und IL-13 oder indirekt durch Stimulation von Epithelzellen über das *major basic protein* (MBP) und EPO die Bildung von fibrotischem Gewebe (Pegorier et al., 2006). Die Leukotriene- Eikosanoide, z.B. Leukotrien C₄, werden in den Lipidkörperchen eosinophiler Granulozyten gelagert und spielen eine bedeutende Rolle während einer Atemwegsentzündung (McBrien and Menzies-Gow, 2017).

1.3.4.2 Rekrutierung und Funktion von eosinophilen Granulozyten während einer Pneumovirus-Infektion

Die Bedeutung von eosinophilen Granulozyten für eine Pneumovirus-Infektion ist umstritten. Es gibt Studien, die eosinophilen Granulozyten als Ursache für Pathologien

sehen (zusammengefasst in (Rosenberg et al., 2013)), sowie Untersuchungen, in denen eosinophile Granulozyten zur antiviralen Immunantwort beitragen (Adamko et al., 1999; Davoine et al., 2008; Domachowske et al., 1998; Phipps et al., 2007). Andere Quellen zeigen, dass eosinophile Granulozyten z.B. während einer *Vaccine Enhanced RSV Disease* nur eine untergeordnete Funktion haben (Castilow et al., 2008).

Eosinophile Granulozyten werden in der akuten Phase einer RSV-induzierten Infektion der unteren Atemwege aktiviert und tragen wahrscheinlich zur Wiederherstellung des Lungengewebes nach einer Infektion bei (Russell et al., 2017). Es konnte gezeigt werden, dass nach stationärer Behandlung Kinder eine höhere Anzahl eosinophiler Granulozyten aufweisen im Vergleich zum Beginn bei ihrer Aufnahme und dies mit einer Genesung einhergeht (Kawasaki et al., 2006). Da die direkte Rekrutierung von eosinophilen Granulozyten in humanes Lungengewebe nicht untersucht werden kann, kann nur indirekt Aussagen über deren Aktivität getroffen werden. Zum Beispiel sind die in den Granula gespeicherten zytotoxischen Proteine, wie Leukotrien C₄, EDN, ECP im Respirationstrakt während einer Bronchiolitis in Säuglingen erhöht (Dimova-Yaneva et al., 2004; Harrison et al., 1999; Kim et al., 2007). Im Unterschied zur Rolle der eosinophilen Granulozyten während der Genesung nach einer RSV-Infektion kann es andererseits zu einer vermehrt Th₂-assoziierten Immunantwort kommen, in welcher eine Eosinophilie mit einer Verstärkung der Krankheitssymptome korreliert (Russell et al., 2017). In Impfstudien von 1966 konnte eine starke Rekrutierung eosinophiler Granulozyten in mit FI-RSV immunisierten Kleinkindern nach einer natürlichen RSV-Infektion beschrieben werden, die in zwei Fällen tödlich verlief (Kim et al., 1969). In neueren Untersuchungen des Autopsiematerials konnte dies jedoch nicht bestätigt werden (Prince et al., 2001).

Die Bedeutung eosinophiler Granulozyten während einer PVM-Infektion ist, wie nach einer RSV-Infektion im Menschen, noch sehr umstritten. In fatal verlaufenden Infektionen bei BALB/c-Mäusen infiziert mit PVM J3666 wurde eine Rekrutierung von eosinophilen Granulozyten (bis $1,4 \cdot 10^5$ Zellen/ml im Bronchoalveolarlumen) bis Tag 3 nach einer Infektion und anschließender Abnahme um das 10fache beschrieben. Auch scheint die Ribonukleaseaktivität in der Bronchoalveolarflüssigkeit positiv mit der Anzahl der eosinophilen Granulozyten zu korrelieren (Domachowske et al., 2000a). Scheer und

Kollegen beschrieben allerdings, dass es während einer subletalen PVM-Infektion über einen Zeitraum von 10 Tagen zu keiner gesteigerten Rekrutierung eosinophiler Granulozyten in das Bronchoalveolarlumen kommt (Scheer et al., 2014).

Eosinophile Granulozyten scheinen antivirale Eigenschaften gegenüber PVM zu haben, da das Fehlen eosinophiler Granulozyten zu einem Anstieg der pulmonalen Viruslast (Domachowske et al., 2000) und eine verstärkte Bildung von eosinophilen Granulozyten zu einer Verringerung der pulmonalen Viruslast in Mäusen führt (Domachowske et al., 2000a; Phipps et al., 2007). Experimentell können eosinophile Granulozyten, generiert im Knochenmark, mit PVM infiziert werden und welche dann proinflammatorische Moleküle sezernieren (Dyer et al., 2009). Über die Möglichkeit der Infizierbarkeit eosinophiler Granulozyten *in vivo* und die daraus resultierende Bedeutung können jedoch noch keine Aussagen getroffen werden.

Auch scheinen aktivierte eosinophile Granulozyten in verschiedenen Asthma-Modellen, wie Eotaxin-2 und IL-5 überexprimierenden Mäusen und in *Aspergillus fumigatus* immunisierten und stimulierten Mäusen, schützende Eigenschaften gegenüber letalen PVM-Infektionen zu haben. In nicht-immunisierten Mäusen konnte an Tag 4 p.i. jedoch nur eine geringe Anzahl eosinophiler Granulozyten im Bronchoalveolarlumen festgestellt werden (Percopo et al., 2014). Vakzinierung mit FI-PVM-Antigen mit anschließender Infektion führt zur Infiltration des Lungengewebes mit eosinophilen Granulozyten und zu einer Reduzierung der Viruslast, sowie zu weniger Gewichtsverlust nach der Infektion im Vergleich zu Kontrollantigen-immunisierten Mäusen (Percopo et al., 2009). *Schistosoma mansoni* bzw. Ovalbumin immunisierte Mäuse zeigen nach einer subletalen PVM-Infektion ebenfalls eine gesteigerte Infiltration von eosinophilen Granulozyten in das Bronchoalveolarlumen (Scheer et al., 2014). Eosinophile Granulozyten werden erst durch vorhergehende pulmonale Stimulation des Immunsystems in die Lunge rekrutiert. Die Bedeutung während einer subletalen PVM-Infektion für die Pathogenese oder die Wiederherstellung des Gewebes in zuvor naiven Mäusen konnte auch hier nicht geklärt werden.

Nach der experimentellen Depletion von eosinophilen Granulozyten in Mäusen gab es keinen Unterschied in der Viruslast oder im Gewichtsverlust zu wildtypischen Mäusen.

Das Fehlen oder Vorhandensein von eosinophilen Granulozyten in diesem Versuchsaufbau scheint somit keinen Einfluss auf den Schutz vor einer schweren PVM-Infektion zu haben (Percopo et al., 2009). Im Unterschied dazu scheinen eosinophile Granulozyten im RSV-Mausmodell einen Schutz zu generieren (Phipps et al., 2007).

1.3.5 Bedeutung der B-Lymphozyten während einer Pneumovirus-Infektion

1.3.5.1 Funktionen der B-Zellen nach einer Infektion

B-Lymphozyten gehören ebenfalls zur adaptiven Immunantwort. Sie fungieren als professionelle Antigen-präsentierende Zellen, sie sezernieren Antikörper und Zytokine und bilden ein Gedächtnis, um auf spätere Infektionen desselben Erregers schneller und effizienter reagieren zu können. Ausgereifte B-Lymphozyten unterteilen sich in drei verschiedene Unterklassen (je nach Ort ihres Vorkommens): folliculäre B-Zellen (FOB), Marginalzonen-B-Zellen (MZB) und B1-Zellen. FOB sind in den Follikeln der Milz und Lymphknoten lokalisiert, wo sie hauptsächlich auf T-Zell-abhängige Antigene reagieren. MZB befinden sich im marginalen Sinus der Milz, wo sie Pathogene oder deren Antigene im Blut zu detektieren. B1-Zellen kommen in den peritonealen und pleuralen Höhlen des Körpers sowie an mukosalen Oberflächen im intestinalen Trakt oder den Atemwegen vor. B1-Zellen sowie MZB sind in der Lage, schnell auf T-Zell-unabhängige Antigene zu reagieren (Nutt et al., 2015).

Die Hauptaufgabe von B-Lymphozyten ist die Produktion verschiedener Antikörper, die Pathogene direkt neutralisieren können oder diese opsonisieren, um diese somit besser für Fc-Rezeptor tragende Phagozyten kenntlich zu machen. Des Weiteren aktivieren Antikörper durch Komplexbildung das Komplementsystems und vermitteln die antikörperabhängigen, zellulären Zytotoxizität (Abbas et al., 2015).

Durch somatische Genumlagerungen entstehen fünf verschiedene Antikörperklassen, IgD, IgM, IgG, IgA und IgE, mit jeweils verschiedenen Funktionen. Pentamere IgM-Antikörper mit einer geringen Affinität zirkulieren als natürliche Antikörper immer im Organismus und bilden die erste Abwehr gegenüber Mikroorganismen. Die hoch spezifischen IgG- und IgA-Antikörper sind notwendig um bakterielle Toxine zu

inaktivieren, Viren zu neutralisieren und Mikroorganismen oder deren Bestandteile vollständig zu entfernen. IgE-Antikörper sind reaktiv gegen Helminthen, jedoch vermitteln sie auch die Degranulation von Mastzellen, was zu Hypersensitivitätsreaktionen führen kann (Abbas et al., 2015).

1.3.5.2 T-Zellabhängige und T-Zellunabhängige B-Zell-Antwort

Eine Möglichkeit der Bildung von Antikörper-sezernierenden Plasmazellen ist die T-Zellabhängige Stimulation mit Antigenen im germinalen Zentrum der B-Zell-Follikel in lymphoiden Organen (MacLennan et al., 2003). Dieser Prozess verläuft in zwei Stufen. Erst findet die „extrafollikuläre Antwort“ statt, in welcher B-Zellen ein Antigen-Rezeptor-abhängiges Signal erhalten, woraufhin die Zellen weiter in B-Lymphoblasten differenzieren und die ersten Antikörper produzieren (Nutt et al., 2015). Im zweiten Schritt migrieren einige der aktivierten B-Zellen in die B-Zell-Follikel und agieren mit speziellen follikulären Th-Zellen. Durch Proliferation entstehen germinale Zentren, in denen die somatische Hypermutation (SHM) und der Ig-Klassenwechsel stattfindet (Li et al., 2004). Durch die SHM werden hochaffine Antigenbindestellen generiert, der Klassenwechsel dagegen definiert die Antikörperklasse welche mit unterschiedlichen Funktionen einhergeht. Durch beide Prozesse entstehen hochaffine, langlebige Plasmazellen, welche große Mengen an spezifischen Antikörpern produzieren. Im germinalen Zentrum werden ebenfalls Gedächtnis-B-Lymphozyten gebildet, die nach nochmaliger Erkennung des Antigens schnell und spezifisch Antikörper bilden können (Nutt et al., 2015).

T-Zell-abhängigen Antigene sind sehr stark immunogen (native Proteine und Peptide) und werden über *major histocompatibility complex* (MHC)-Moleküle präsentiert. T-Zell-unabhängige Antigene dagegen sind Moleküle, die eine Antikörperantwort ohne die Beteiligung MHC-II-vermittelter T-Zell-Hilfe ermöglichen. Typisch sind multivalente Polysaccharide oder andere Moleküle mit einer sich wiederholenden Struktur, die dadurch den B-Zell-Rezeptor stark kreuzvernetzen können und somit das Aktivierungssignal erzeugen (Defrance et al., 2011). Dazu gehören zum Beispiel bakterielle Lipopolysaccharide, Glykolipide, Nukleinsäuren oder die sich wiederholenden Strukturen auf Viren oder virusinfizierten Zellen (Löffler, 2007). Die T-Zell-unabhängige

Antikörper-Antwort wird über die Stimulation von DZ mit T-Zell-unabhängigen Antigenen über PRR initialisiert. Umliegende Gewebezellen sowie DZ und Makrophagen sezernieren zusätzlich *a proliferation-inducing ligand* (APRIL), *B cell activating factor* (BAFF) und TGF- β (Mackay et al., 2007), die zum Klassenwechsel der Immunglobuline führen. Im Darm erfolgt der Klassenwechsel zum Beispiel in Richtung IgA-Antikörper (Abbas et al., 2015).

1.3.5.3 B-Zell-Antwort während einer Pneumovirus-Infektion

Die Antikörperantwort beim Menschen nach einer RSV-Infektion erreicht ihren Höhepunkt erst rund 30 Tage nach der Infektion, bei Mäusen etwas früher. Über das eigentliche Rekrutierungsmuster von B-Zellen in das Lungengewebe beim Mausmodell liegen noch keine Daten vor, im Menschen dagegen konnte ein Anstieg verschiedener B-Zell-Populationen im Blut und im Lungengewebe nachgewiesen werden (Openshaw et al., 2017).

Bei Säuglingen mit einer RSV-Infektion der unteren Atemwege kommt es zu einem Anstieg der zirkulierenden B-Zellen (gereift und Vorstufen) (Raes et al., 1997) zwischen der akuten Infektion und der Genesungsphase (Shinoff et al., 2008), die später auch in *post mortem* Lungengewebe von Säuglingen mit fatalen Bronchiolitiden neben IgM⁺, IgG⁺ und IgA⁺ Plasmazellen nachgewiesen werden konnten (Raes et al., 1997; Reed et al., 2009; Roman et al., 1997). In Lungen-Präparaten von Kindern nach einer tödlich verlaufenden RSV-Infektion konnte ebenfalls die Bildung von iBALT beobachtet werden (Johnson et al., 2007). In Lungen von Kleinkindern mit einer Infektion der unteren Atemwege konnten RSV-spezifische IgG-, IgA- und IgM-Antikörper zusammen mit BAFF und APRIL nachgewiesen werden, jedoch nur geringe Mengen von T-Zellabhängigen Zytokinen (Jensen et al., 1997; Reed et al., 2009). Die Oberflächenexpression von Antikörpern ist ein Indiz für die Sezernierung von Antikörpern während einer RSV-Infektion, die eventuell virus-neutralisierende Eigenschaften aufweisen. Die pulmonale Antikörperantwort in Säuglingen und Kleinkindern scheint außerdem über eine T-Zell-unabhängige Antikörperproduktion über BAFF und APRIL vermittelt zu werden (Sakai and Akkoyunlu, 2017).

IgA-Antikörper scheinen eine große Rolle in der Verhinderung einer RSV-Infektion der oberen Atemwege zu spielen (Olson and Varga, 2008), wogegen virus-spezifische IgG-Antikörper wichtig für die Eliminierung von RSV in den unteren Atemwegen sind (Prince et al., 1987; Siber et al., 1994). Auch korreliert ein hoher virus-spezifischer neutralisierender IgG-Titer mit einer Verringerung des Auftretens von schweren RSV-Infektionen in älteren Personen (Falsey and Walsh, 1998; Walsh et al., 2004). Bei RSV-infizierten Erwachsenen ist eine längere Virusausscheidung mit einer verlängerten Zirkulation von RSV-spezifischen Plasmazellen assoziiert, die vermutlich auf das längere Vorhandensein von viralem Antigen zurückzuführen ist (Lee et al., 2010b). Fehlen virale Antigene, werden auch die RSV-spezifischen Plasmazellen reduziert, was eventuell zur nicht vollständigen Immunität nach einer RSV-Infektion führt.

Die Rekrutierung von B-Lymphozyten und ihre Funktionen nach einer PVM-Infektion in Mäusen ist nicht vollständig untersucht. In C57BL/6-Mäusen, infiziert mit 300 Pfu PVM 15, konnten IgA-Antikörper in der Lunge und IgG-Antikörper im Serum und der Lunge an Tag 14 p.i. bis Tag 28 p.i. festgestellt werden. Serum und der Überstand von Lungenfragment-Kulturen hatten außerdem neutralisierende Eigenschaften (Watkiss et al., 2013).

1.4 Immunpathogenese nach pneumoviraler Infektion

Direkte zytopathologische Effekte verschiedener Viren während ihrer Replikation können zur infektionsspezifischen Symptomatik führen. Eine bedeutende Ursache für zum Teil auftretende schwerwiegende Erkrankungen ist die Immunpathogenese. Dabei entwickelt sich die Erkrankung aufgrund der Immunantwort. Es kommt zu fehlgesteuerten und unangemessenen immunologischen Reaktionen sowie zu „Bystander“-Effekten während der Viruseliminierung. Ursächlich für eine auftretende Immunpathogenese können eine Dysregulation der Immunantwort oder der Verlust der Viruskontrolle durch den Wirt sein (Openshaw and Chiu, 2013).

1.4.1 RSV-induzierte Immunpathogenese

Auch RSV scheint eine Immunpathogenese zu verursachen. Während einer humanen RSV-Infektion treten klinische Symptome erst am Höhepunkt der Virusvermehrung sowie während der Eliminationsphase des Virus auf. Dies korreliert mit der Rekrutierung von Immunzellen in die Lunge (Openshaw and Chiu, 2013). Ursächlich für diese Immunpathogenese scheinen T-Lymphozyten zu sein. Hinweise für eine T-Zell-vermittelte Immunpathogenese liefert die Fallbeschreibung eines 4-Monate alten Jungen, der mit dem kombinierten Immundefizienz-Syndrom (SCID) diagnostiziert wurde. Aufgrund einer genetischen Mutation im *IL2rg*-Gen konnte dieser Patient keine T- und NK-Zellen bilden. Zusätzlich litt der Patient zu Beginn an Husten, Gewichtsverlust und leichtem Fieber, verursacht durch eine RSV-Infektion. Nach einer T-Zell-depletierten, allogenen Zelltransplantation verschlechterte sich der Zustand des Patienten dahingehend, dass er unter vermehrter Atemnot litt. Nach Auftreten der ersten Lymphozyten, speziell CD8⁺ T-Zellen, verringerte sich die Viruslast, allerdings verschlechterte sich auch der Gesundheitszustand des Patienten mit weiter ansteigender Anzahl an Lymphozyten. Nach einer Behandlung mit Cyclosporin und Corticosteroiden verbesserte sich der Gesundheitszustand des Patienten, da die Anzahl der Lymphozyten abnahm und die Viruslast wieder anstieg (El Saleeby et al., 2004). Auch im RSV-Mausmodell war die Depletion von CD4⁺- bzw. CD8⁺-T-Zellen mit mildereren Verläufen assoziiert, allerdings auf Kosten einer effektiven Viruselimination (Graham et al., 1991b). Der adoptive Transfer von RSV-spezifischen, zytotoxischen T-Zellen in RSV-infizierte Mäuse führte zur Viruselimination, aber auch zu verstärkter Krankheit und Tod (Cannon et al., 1988). Folglich haben zytotoxische T-Zellen das Potential schwere Krankheitsverläufe nach einer RSV-Infektion zu verursachen. Diese These konnte jedoch noch nicht eindeutig bewiesen werden, da der Höhepunkt der Rekrutierung virus-spezifischer CD8⁺ T-Zellen im peripheren Blut, vermutlich während der Migration in das Lungengewebe, in der Erholungsphase nach dem Auftreten der ersten Symptome stattfindet (Heidema et al., 2007; Lukens et al., 2010).

Die erhöhte Stimulation von Th2-Zellen könnte ebenfalls zur Entwicklung einer Immunpathogenese beitragen, da Symptome nach einer RSV-Infektion wie übermäßige

Produktion von Mukus, Atemwegsverlegung, keuchende Atmung und Langzeit-Effekte auf die Lungenfunktion viele Gemeinsamkeiten mit Asthma aufweisen, bei dem bekanntermaßen Th2-vermittelte Immunantworten involviert sind (Collins and Melero, 2011).

Erste Indizien für den Beitrag unkonventioneller T-Zellen, wie $\gamma\delta$ -T-Zellen, zur Immunpathogenese nach einer RSV-Infektion liefert die experimentelle Depletion dieser Zellen im BALB/c-Mausmodell nach vorheriger Immunisierung mit dem RSV-F-Protein. Durch die Depletion von $\gamma\delta$ -T-Zellen verringert sich die Entzündung in der Lunge und die Schwere der Krankheit nimmt ab, aber es kommt zu einer Erhöhung der viralen Replikation (Dodd et al., 2009).

In einer anderen Arbeit konnte im Mausmodell die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in die Atemwege, eine verstärkte Mukusproduktion und eine verminderte Viruseliminierung mit IL-17a/b assoziiert werden (Mukherjee et al., 2011). Auch kommt es zur Bildung von C3a und der damit einhergehenden Ausschüttung von Tachykinin, welches ebenfalls den IL-17-Signalweg aktiviert und über IL-17 zur AHR führt (Bera et al., 2011; Mukherjee et al., 2011). Im RSV-Mausmodell tragen Th17-Zellen zur Immunpathogenese bei, beim Menschen ist die Rolle von IL-17 während einer RSV-Infektion jedoch noch nicht vollständig geklärt. Es ist jedoch bekannt, dass IL-17 während einer Infektion in der Lunge vermehrt freigesetzt wird (Mukherjee et al., 2011). Einige Studien weisen auf eine erhöhte IL-17-Antwort mit assoziierter Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten während einer RSV-Infektion in Säuglingen hin. Andere hingegen konnten eine verstärkte IL-17-Antwort während der Genesungsphase feststellen (Lukens et al., 2010; Stoppelenburg et al., 2013).

Regulatorische T-Zellen (T_{reg}) sind ein wichtiger Bestandteil des Immunsystems, da sie die Immunantwort nach Viruseliminierung wieder beenden. Während einer RSV-Infektion könnte eine defekte T_{reg} -Antwort die Entwicklung einer Immunpathogenese fördern. In Mäusen führte die Depletion von T_{reg} -Zellen zu einer verzögerten Viruselimination, aber auch zu einer Verschlechterung der Symptomatik und zusätzlich zu einer erhöhten Anzahl von $CD4^+$ T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen und neutrophilen

Granulozyten sowie antigenspezifischer IFN- γ und TNF- α produzierender CD8⁺ T-Zellen (Fulton et al., 2010; Lee et al., 2010a).

Neben verschiedenen T-Zell-Populationen tragen auch NK-Zellen zur Immunpathogenese nach einer RSV-Infektion bei. In Depletionsexperimenten wurde ermittelt, dass Mäuse durch das Fehlen von NK-Zellen weniger Gewicht verloren, jedoch die Viruslast in der Lunge anstieg (Li et al., 2012).

Ein erstes Indiz für die Beteiligung neutrophiler Granulozyten an der Immunpathogenese nach einer RSV-Infektion ist die Tatsache, dass die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in die Atemwege dem Höhepunkt der klinischen Symptome und der pulmonalen Viruslast folgt (Lukens et al., 2010).

1.4.2 PVM-induzierte Immunpathogenese

Neben RSV induziert auch PVM eine Immunpathogenese. Diese ist, wie die Pathogenese nach einer RSV-Infektion, wahrscheinlich das Ergebnis einer ausgeprägten T-Zell-Infiltration in das Lungengewebe, um möglichst alle infizierten Zellen in diesem sehr großen Gewebe zu eliminieren. Die höchste Viruslast wurde an Tag 7 p.i. im Lungengewebe ermittelt, wohingegen die maximale Anzahl an virus-spezifischen CD8⁺ T-Zellen an Tag 10 p.i. im Interstitium und in den Alveoli in infizierten und auch in nicht infizierten Regionen der Lunge nachgewiesen werden konnte. T-Zellen tragen somit zur Pathogenese bei, wenn das Virus bereits eliminiert ist (Frey et al., 2013). Werden T-Zell-defiziente Mäuse mit PVM infiziert, kommt es zu einer anhaltenden Virusreplikation im Lungengewebe, jedoch nicht zu klinischen Symptomen wie dem Gewichtsverlust oder sichtbaren Atemproblemen (Frey et al., 2008). CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen tragen beide zur Entwicklung einer Immunpathogenese bei, da es in entsprechenden transgenen Mäusen zu einem geringeren Gewichtsverlust, also zum verbesserten Krankheitsverlauf kommt als in wildtypischen Mäusen. Der Effekt ist beim Fehlen von CD8⁺ T-Zellen stärker ausgeprägt und folglich tragen CD8⁺ T-Zellen stärker zu Immunpathogenese bei als CD4⁺ T-Zellen (Frey et al., 2008).

Es gibt außerdem Hinweise, dass AM Φ ebenfalls zur Immunpathogenese im PVM-Infektionsmodell beitragen, da deren Depletion zu einem verlängerten Überleben nach einer letalen Infektion führt (Rigaux et al., 2012).

Des Weiteren gibt es Indizien dafür, dass Granzym A und B, sezerniert von NK-Zellen und zytotoxischen T-Zellen, zu einer Immunpathogenese während einer schweren PVM-Infektion beitragen. Granzym A und B-Cluster-defiziente Mäuse weisen nach einer letalen PVM-Infektion eine verzögerte Entwicklung der klinischen Symptome, in Form von einer verzögerten Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten sowie einer reduzierten Lungendurchlässigkeit, auf (Bem et al., 2010). IL-21 scheint ebenfalls ein wichtiger Faktor im Entstehen einer Immunpathogenese zu sein, da dessen Depletion zu einer Verringerung der Entzündung in der Lunge nach einer PVM-Infektion führt (Spolski et al., 2012).

1.5 Pneumovirus-Infektionen unter Immunsuppression

Patienten, die unter einer angeborenen oder erworbenen Immunsuppression leiden, sind sehr anfällig für eine große Anzahl an Virusinfektionen der Atemwege. Zu den wichtigsten Erregern gehören RSV, Influenzaviren, Rhinoviren, Coronaviren, Bocaviren und auch Metapneumoviren. Diese Virus-Infektionen treten saisonal auf, währenddessen Parainfluenzavirus-Infektionen das ganze Jahr über registriert werden (Boeckh, 2008). Über die Immunantwort in immunsupprimierten Patienten nach einer RSV-Infektion ist relativ wenig bekannt.

RSV-Infektionen treten im gemäßigten Klima überwiegend in den Wintermonaten auf und bis zu 17% der Patienten nach einer hämatopoetischen Stammzelltransplantation (HSZT) können sich dabei mit RSV infizieren (Chemaly et al., 2014; Hirsch et al., 2013). Eine RSV-Infektion beginnt hier, wie für immunkompetente Individuen beschrieben, in den oberen Atemwegen. 38% der Patienten entwickeln Symptome in den unteren Atemwegen. Führt die Infektion zu akutem Lungenversagen, müssen diese Patienten auf einer Intensivstation betreut und eventuell künstlich beatmet werden. Bei bis zu 70% dieser Patienten verläuft die Infektion tödlich, wobei die Zahlen von Studie zu Studie variieren (Hirsch et al., 2013; Shah and Chemaly, 2011). Schwankungen in den

Statistiken könnten darauf zurückzuführen sein, dass man in jüngster Zeit mehr auf RSV-Infektionen bei diesen Patienten achtet und entsprechende Infektionen früher diagnostiziert werden. Auch haben sich die Behandlungsmöglichkeiten über die letzten Jahre stark verbessert, was zusätzlich zu höheren Überlebensraten führt (Hirsch et al., 2013; Shah and Chemaly, 2011). Die Infektion wird am häufigsten verzeichnet, wenn sich die stammzelltransplantierten Patienten einer ambulanten Nachbehandlung unterziehen. Das Immunsystem ist zu diesem Zeitpunkt noch nicht vollständig wiederhergestellt, d.h. die Patienten weisen hauptsächlich Granulozyten und Thrombozyten auf. Außerdem sind sie gekennzeichnet durch eine Lymphozytopenie und eine Hypogammaglobulinämie (Boeckh, 2008). Als Risikofaktoren für einen schweren Verlauf gelten myoablative Konditionierung, Lymphozytopenie und Rauchen (Kim et al., 2014). Rund ein Drittel der Patienten, die unter einer RSV-induzierten Pneumonie leiden, erkranken zusätzlich an Co-Infektionen mit anderen Pathogenen (Boeckh, 2008).

Ein deutliches Beispiel für die Problematik einer RSV-Infektion in immunsupprimierten Patienten war der nosokomiale Ausbruch von RSV in einer Transplantationseinheit. Hier infizierten sich in der Wintersaison 2011/2012 56 Patienten, wobei 40 unter einer Infektion der unteren Atemwege litten und 14 verstarben. Alle Infektionen konnten auf das gleiche RS-Virus vom Subtyp A zurückgeführt werden. Nach der Infektion litten einige Patienten unter leichten Symptomen, aber auch fatale Verläufe traten auf. Bei Patienten mit einer milden Symptomatik konnte zusätzlich eine verlängerte Virusfreisetzung festgestellt werden. Ein großer Teil der Patienten litt allerdings unter einer Ko-Infektion, sodass die alleinige Bedeutung von RSV für einen fatalen Verlauf nicht exakt nachvollzogen werden konnte. Hier galten auch Hypogammaglobulinämie und Aplasie als Risikofaktoren (Geis et al., 2013; Lehnert et al., 2013).

Nicht nur stammzelltransplantierte Patienten infizieren sich mit RSV, auch Patienten mit angeborenen Immundefizienzen können unter schweren Infektionen der unteren Atemwege leiden. Der im Kapitel 1.4 beschriebene Fall eines SCID-Patienten ist ein Beispiel dafür, dass das Fehlen von Zellen der adaptiven Immunantwort zu einem verbesserten Gesundheitszustand trotz fortschreitender Virusreplikation führt (El Saleeby et al., 2004). In einer größeren Studie mit 608 Kindern konnte gezeigt werden,

dass ein geschwächter Immunstatus einen großen Einfluss auf die RSV-Pathogenese hat. Patienten mit Immundefizienz-Syndromen oder in chemotherapeutischer Behandlung hatten schwerwiegendere RSV-assoziierte Pneumonien mit hohen Sterblichkeitsraten (Hall et al., 1986). Die Virusausscheidung in immunsupprimierten Patienten konnte außerdem bis zu 80 Tage lang anhalten (Lehners et al., 2013).

Eine weitere Gruppe, die verstärkt unter schweren RSV-Infektionen zu leiden hat, sind ältere Patienten über 65 Jahre. Diese Patienten haben weniger RSV F-Protein-spezifische IFN- γ -produzierende T-Zellen als Patienten im Alter zwischen 20 und 30 Jahren (Cherukuri et al., 2013). Auch ist die Anzahl RSV-spezifischer CD8⁺ T-Gedächtniszellen verringert (de Bree et al., 2005). Diese Ergebnisse könnten darauf hinweisen, dass das Fehlen spezifischer T-Zellen zu einer gesteigerten Suszeptibilität gegenüber schweren RSV-Infektionen in älteren Patienten führt.

1.6 Zielsetzung

Das humane Respiratorische Synzytial-Virus (RSV) gilt als wichtiger Krankheitserreger für Säuglinge und Kleinkinder sowie für ältere Patienten und immunsupprimierte Patienten. Der hohe Anteil an Erkrankungen und teils schwerwiegenden Verläufen wird dabei eher einer auftretenden Immunpathogenese zugeschrieben als der Virusvermehrung selbst. Es kommt hier zu einer fehlgesteuerten und unangemessenen Immunantwort.

- I. Zum besseren Verständnis der immunologischen Vorgänge im spatiotemporalen Verlauf einer Infektion wurde die Entwicklung und der Verlauf der verschiedenen zellulären Komponenten der Immunantwort im Verhältnis zum Infektionsverlauf in immunkompetenten Wirten unter Verwendung des natürlichen Ersatzmodells der RSV-Infektion, des verwandten Pneumovirus der Maus (PVM) untersucht. Verwendung fanden dabei die Durchflusszytometrie, die konfokale Mikroskopie sowie *in vivo* Experimente. Zu diesem Zweck wurde ebenfalls ein neues Pneumovirus der Maus generiert und charakterisiert.

- II. Eine RSV-Infektion in immunsupprimierten Patienten führt häufig zu schwerwiegenden Infektionen der unteren Atemwege, häufig mit letalem Ausgang. Dabei ist die Pathogenese nur unzureichend verstanden. Aus Ermangelung eines passenden Tiermodells für RSV wurde hier die Pathogenese einer Pneumovirus-Infektion anhand des PVM-Modells in Mauslinien mit definierten Immundefizienzen unter Verwendung der unter I. genannten Methoden untersucht.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Tab. 1: Liste der verwendeten Geräte und deren Hersteller

Geräte	Bezeichnung/Typ	Hersteller
Brutschrank	Heraeus BB16	Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold, D
	Heraeus BB6220	
	Heraeus B5060 EK- CO2	
Durchflusszytometer	BD LSR II + FACS Diva Software	BD Biosciences, Heidelberg, D
	BD FACS Calibur + Cell Quest Pro Software	
ELISA-Reader	SpectraMax Pro 384 Microplate reader	Molecular Devices, LLC. Sunnyvale, CA (USA)
Gel-Dokumentation	Intas UV-Systeme Gel Jet Imager	INTAS Science Imaging Instruments GmbH. Göttingen, D
Heizblock	MHR11	HLC Biotech, Bovenden, D
Multikanalpipette	Finnpipette 50-300µl, Finnpipette 5-50µl	Thermo Fisher Scientific Corp., Waltham, MA (USA)

Kryostat	CM1900	Leica Biosystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, D
Mikroskope	LSM 780	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, D
	ECLIPSE TS2000	Nikon Instruments Europe BV, Amsterdam, NE
Spektrophotometer	NANODROP 2000 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific Corp., Waltham, MA (USA)
pH-Meter	PB-11	Sartorius AG, Göttingen, D
Pipetten	2µl-1000µl	Gilson Inc., Middleton, WI USA
Pipettierhilfe	accu-jet pro	Brand GmbH+Co.KG, Wertheim, D
Schüttler	Certomat® R	Bachofer GmbH + Co KG Laboratoriumsgeräte, Reutlingen, D
Sterilwerkbank	Class II Type A/B3	NUAIRE Biological Safety Cabinets, Plymouth, USA
Vortex	L24	Gesellschaft für Laborbedarf mbH, Würzburg, D
Waagen	PCB600-2	KERN+Sohn GmbH, Balingen, D
	MC1 Analytic AC 210	Sartorius AG, Göttingen, D
Wasserbad	WB14	Memmert GmbH und Co.KG, Schwabach, D
	A100	Lauda GmbH und Co.KG, Lauda- Königshofen, D
Wiegeschüttler	RT-2S	Labortechnik Fröbel-GmbH, Lindau, D
Zentrifugen	Centrifuge 5415 R	Eppendorf AG, Hamburg, D
	Megafuge 1.0R	Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold, D
	Biofuge13	Heraeus Sepotech GmbH, Hanau, D

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tab. 2: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien und deren Hersteller

Material	Bezeichnung/Typ	Hersteller
FACS-Röhrchen	5 ml, 75x12 mm, Polystyrol	SARSTEDT AG & Co., Nürnberg, D
Homogenisatoren mit Pistill	Potter-Elvehjem- Homogenisatoren, Glas, 5 ml	
Kanülen	Neobject® 27Gx3/4“	Dispomed WITT oHG, Gelnhausen, D
	Sterican® 20Gx1½ “	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, D
	Sterican® 26G 3/8“	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Kryoröhrchen	Cryo.s™, Polypropylen, steril, mit Schraubverschluss	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Mikrotiterplatte	96 well, Polystyrol, U-Form, steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Mikrotiterplatte (half area)	Corning® 96 Well half Area, Polystyrol, F-Form	Corning GmbH, Kaiserslautern, D
Pipettenspitzen	Standard MIKRO	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, D
	Multi® Universal	
	ratiolab®Pipettenspitzen Blau	Ratiolab GmbH, Dreieich, D
Reaktionsgefäße	Safe-Lock Tubes 1,5/2 ml	Eppendorf AG, Hamburg, D
Spritzen	Inject® 10 ml Luer Solo, steril	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, D
	SOFT-JECT® 5 ml Luer, steril	Henke-Sass, Wolf GmbH, Tuttlingen, D
	Einmalspritze TBC 1 ml Luer, steril	Dispomed WITT oHG, Gelnhausen, D
	BD Plastipak™ Tuberkulin-	BD Biosciences, Heidelberg, D

	spritze 1 ml mit Kanüle	
Venenverweilkanüle	Vasofix®Safety 20G rosa	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Zellkulturflaschen	Nunclon™Delta Surface 175 mm ²	Thermo Fisher Scientific Nunc A/S, Roskilde, DNK
	Cellstar®Cell Culture Flask, 250 ml, 75 mm ²	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Zellkulturplatten	Cellstar® 24well Cell Culture Plate	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Zellsieb	40 µm, Gammabestrahlt	SPL Lifesciences, Korea
Zentrifugenröhrchen	Cellstar®Tubes 15ml/50ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D

2.1.3. Chemikalien

Tab. 3: Liste der verwendeten Chemikalien und deren Hersteller

Chemikalie	Hersteller
Agar-Agar	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, D
Agarose Low EEC	BioFroxx GmbH, Einhausen, D
Ammoniumchlorid	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Ampicillin	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Amphotericin B	PAN-Biothech GmbH, Aidenbach, D
Albumin Fraktion V, biotinfrei	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, D
Bromphenolblau-Natriumsalz	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
Chloroform	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, D
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	Thermo Fisher Scientific Corp., Waltham, MA (USA)
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, D
3,3-Diaminobenzidin- Tetrahydrochlorid (DAPT)	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, D

Di-Natriumhydrogenphosphat	Ferak Berlin GmbH, Berlin, D
Eagle's Minimal Essential Medium (EMEM)	Thermo Fisher Scientific Corp., Waltham, MA (USA)
Enzygnost® Substrate TMB Chromogen TMB STOP POD	Siemens Healthcare Diagnostic Products GmbH, Marburg, D
Ethidiumbromidlösung 0,07%	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Lösung 0,5M pH 8	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Essigsäure	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Ethanol	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom GmbH, Berlin, D
Glasgow's MEM (GMEM)	Thermo Fisher Scientific Corp., Waltham, MA (USA)
Glukose	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, D
Glycerin wasserfrei	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Hefeextrakt	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
HEPES	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, D
Kaliumchlorid	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, D
Kaliumdihydrogenphosphat	Ferak Berlin GmbH, Berlin, D
Kaliumhydrogencarbonat	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Magermilchpulver	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, D
Magnesiumchlorid	Ferak Berlin GmbH, Berlin, D
Magnesiumsulfat	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
MEM-Aminosäuren	PAA, Pasching, D
Methanol	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, D
Methylcellulose	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, D
Natriumcarbonat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, D
Natriumdeoxycholat	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Natriumhydrogencarbonat	Merck KGaA, Darmstadt, D

L-Glutamin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
LipofectAmine2000	Thermo Fisher Scientific Corp., Waltham, MA (USA)
Natrium-Azid	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Opti-MEM	Thermo Fisher Scientific Corp., Waltham, MA (USA)
Paraformaldehyd	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, D
Penicillin/Streptomycin	PAN-Biothech GmbH, Aidenbach, D
Phenol	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, D
Phenolrot	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, D
2-Propanol	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, D
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, D
Stabile Glutamine	PAN-Biothech GmbH, Aidenbach, D
Saccharose	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Tris-HCl	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Triton X100	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, D
Trypsin	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, D
Trypton	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Tween-20	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, D
Wasserstoffperoxid	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, D

2.1.4. Medien und Puffer

Tab. 4: Zusammensetzung der verwendeten Medien und Puffer

Puffer/Medium	Zusammensetzung
Ampicillin-Stocklösung 50mg/ml	1 g Ampicillin-Salz 20 ml dH ₂ O Sterilfiltrieren, 1 ml Aliquots, -20°C
<i>Adjusted Trypsine Versene (ATV)</i>	37 mM NaCl 5 mM KCl 5 mM Glukose

	7 mM NaHCO ₃
	0,5 g/l Trypsin
	0,2 g/l Versene
	dH ₂ O
	pH=7,4
Basischer Lysepuffer	1% Triton X-100
	0,5% Natriumdeoxycholat
	1 mM EDTA
	1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid
	Carbonat-Puffer
<i>Balanced Salt Solution (BSS) I</i>	50 g Glucose
	3 g KH ₂ PO ₄
	11,9 g Na ₂ HPO ₄
	0,5 g Phenolrot
	auf 5 l mit dH ₂ O
BSS II	9,25 g CaCl ₂
	20 g KCl
	320 g NaCl
	10 g MgCl ₂
	10 g MgSO ₄
	auf 5 l mit dH ₂ O
BSS	125 ml BSS I
	125 ml BSS II
	750 ml dH ₂ O
BSS/BSA	0,2% BSA
	BSS
Carbonat-Puffer pH 9,6	15 mM Na ₂ CO ₃
	35 mM NaHCO ₃
	dH ₂ O
3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid-Lösung 1% (DABT)	1% 3,3-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
	dH ₂ O

DNA-Ladepuffer 10x	50% Glycerol 1 mM EDTA 0,25% Bromphenolblau dH ₂ O
EMEM-Erhaltungsmedium	EMEM 5% FKS 1% L-Glutamin 1% Penicillin/Streptomycin 1% Amphotericin B
EMEM-Wachstumsmedium	EMEM 10% FKS 1% L-Glutamin
Erythrozyten-Lysepuffer	155 mM NH ₄ Cl 10 mM KHCO ₃ 0,1 mM EDTA pH 7,5 dH ₂ O
FACS-Puffer	PBS 2% FKS 0,01% Na-Azid
GMEM-Erhaltungsmedium	GMEM 5% FKS 2% Aminosäuren 1% stabile Glutamine 1% Penicillin/Streptomycin 1% Amphotericin B
GMEM-Wachstumsmedium	GMEM 5% FKS 2% Aminosäuren 1% stabile Glutamine
Homogenisierungsmedium	EMEM-Erhaltungsmedium

LB-Agar	5% FKS 10% 10x Puffer zur Virusstabilisierung 7,5 g Agar-Agar 5 g Trypton 2,5 g Hefeextrakt 5 g NaCl Auf 500 ml dH ₂ O auffüllen
LB-Medium	5 g Trypton 2,5 g Hefeextrakt 5 g NaCl Auf 500 ml dH ₂ O auffüllen
80% Methanol	80% Methanol 20% dH ₂ O
0,8% Methylcellulose-EMEM	EMEM-Erhaltungsmedium 0,8% Methylzellulose
Magermilchpulver 5% in PBS	PBS 5% Magermilchpulver
PBS/PFA 4%	PBS 4% PFA pH 7,0
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	137 mM NaCl 2,7 mM KaCl 10 mM Gesamt-Phosphat pH 7,4
PBS/Tween 20 (PBST)	PBS 0,05% Tween®20
RPMI für Lungenverdau	RPMI (Gibco) 5% FKS 1% Penicillin/Streptomycin 1% Amphotericin B 1 mg/5 ml DNase I

	3,2 mg/5 ml Collagenase A
Saccharose-Lsg. 10%	10% Saccharose dH ₂ O
Saccharose-Lsg. 20%	20% Saccharose dH ₂ O
Saccharose-Lsg. 30%	30% Saccharose dH ₂ O
Salzpuffer (10x)	2 M NaCl 50 mM Tris 20 mM EDTA pH 7,5 in 100 ml dH ₂ O
TAE 50x	242 g Tris 57,1 ml Essigsäure 100 ml EDTA 0,5 M pH 8 Mit dH ₂ O auf 1 l auffüllen
Triton X 100 1%	1% Triton X 100 dH ₂ O
HEPES/MgSO ₄ 10x	1 M MgSO ₄ 0,5 M HEPES pH 7,5 dH ₂ O

2.1.5 Narkosemittel

Tab. 5: Verwendete Narkosemittel und deren Hersteller

Name	Substanz	Hersteller
Isofluran CP®	Isofluran	cp-pharma, Burgdorf, D

2.1.6 Mauslinien

Tab. 6: Verwendete Mauslinien und deren genetische und phänotypische Eigenschaften

Bezeichnung	Genotyp	Phänotyp	Herkunft
C57BL/6J ^{VIM}	-	Ohne Phänotyp	Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA
B6.TCR $\beta\delta^{-/-}$	<i>Tcrb</i> ^{tm1Mom} <i>Tcrd</i> ^{tm1Mom}	Keine reifen T-Zellen	Zucht: Institut für Virologie und Immunbiologie, Julius - Maximilians-Universität Würzburg
B6.Rag1 ^{-/-}	<i>Rag1</i> ^{tm1Mom}	Keine reifen T- und B-Zellen	
B6.Rag1 ^{-/-} .IL2R $\gamma^{-/-}$ (B6.Rag1.C $\gamma^{-/-}$)	<i>Rag1</i> ^{tm1Mom} <i>IL2rg</i> ^{tm1Wjl}	Keine reifen T-, B- und NK-Zellen	

2.1.7 Viren

Tab. 7: Verwendete Viren und ihre Eigenschaften

Bezeichnung	Eigenschaften
PVM15 (ATCC)	PVM-Referenzstamm, ATCC® VR-1819™ (Krempl and Collins, 2004)
rPVM-GFP	Rekombinantes PVM mit eingebrachtem <i>GFP</i> -Gen, welches für das Grün-Fluoreszierende Protein (GFP) kodiert (Krempl et al., 2007)
rPVM-mCherry	Rekombinantes PVM mit eingebrachtem <i>mCherry</i> -Gen, welches für das Fluoreszenzprotein mCherry kodiert (Siehe Kapitel 2.2.6)

2.1.8 Zelllinien/Bakterienstämme

Tab. 8: Verwendete Zelllinien/Bakterienstämme und deren Ursprung

Zelllinie	Ursprung
Vero	Nierenepithelzellen der Grünen Meerkatze (<i>Chlorocebus</i>), aneuploider Chromosomensatz, nicht IFN-kompetent (ATCC: CCI-81)

BHK-21	Nierenfibroblasten eines Syrischen Goldhamsters (Alter: ein Tag) (<i>Mesocricetus auratus</i>) (ATCC: CCL-10)
BSRT7/5	Ursprünglich BHK-21-Zellen, stabil exprimierte T7-Polymerase (Buchholz et al., 1999)
<i>Escherichia coli</i> K12-Derivat	NEB 10-beta Competent (High Efficiency), New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, D

2.1.9 Histologie

Tab. 9: Materialien und Lösungen für die Histologie

Material/Lösung	Hersteller
Deckgläser (24x60 mm)	Paul Marienfeld GmbH & Co.KG, Lauda-Königshofen, D
Flüssigkeitsblocker (Pap Pen)	Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt, D
Objektträger Menzel-Gläser Superfrost®Plus	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, D
Probenbehälter (2,5 ml, aus Polyethylen)	A. Hartenstein Laborbedarf GmbH, Würzburg, D
Roti®-Mount FluorCare Einschlussmittel	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, D
Dako Fluorescence Mounting Medium	DAKO Agilent, Santa Clara, CA, USA
Tissue Tek® O.C.T.™ Compound	Sakura Finetek Europe B.V., Alphen aan den Rijn, NL

2.1.10 Antikörper

Tab. 10: Verwendete Antikörper für die Durchflusszytometrie

Spezifität	Klon	Konjugat	Katalog-Nr.	Hersteller
CD3ε	145-2C11	PE-Cy5	100309	BioLegend, San Diego, CA (USA)
CD4	RM4-5	APC	100516	BioLegend, San Diego, CA (USA)
CD8a	53-6.7	PE-Cy7	100721	BioLegend, San Diego, CA (USA)
CD11b	M1/70	PE-CF594	562317	BD Biosciences, Heidelberg, D
		PE-Dazzle™594	101255	BioLegend, San Diego, CA (USA)
CD11c	N418	PerCP/Cy5.5	117328	BioLegend, San Diego, CA (USA)
CD19	6D5	PE-Cy7	115519	BioLegend, San Diego, CA (USA)
CD45	30-F11	PE	12-0451	eBioscience (Affymetrix)
CD45.2	104	FITC	109806	BioLegend, San Diego, CA (USA)
CD45R (B220)	RA3-6B2	APC-Cy7	103223	BioLegend, San Diego, CA (USA)
CD138	281-2	PE-Dazzle®594	142527	BioLegend, San Diego, CA (USA)
F4/80	BM8	APC-Cy7	123117	BioLegend, San Diego, CA (USA)
Ly-6G	1A8	PE-Cy7	127617	BioLegend, San Diego, CA (USA)

NK-1.1	PK136	PE	108707	BioLegend, San Diego, CA (USA)
SiglecF	E50-2440	AlexaFluor®647	562680	BD Biosciences, Heidelberg, D

Tab. 11: Verwendete Primär-Antikörper für die Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie

Antikörper	Klon	Konjugat	Katalog-Nr.	Hersteller
CD4	RM4-5	AlexaFluor® 488	100532	BioLegend, San Diego, CA (USA)
		AlexaFluor® 647	100533	
CD8b	YTS156.7.7	-	126602	BioLegend, San Diego, CA (USA)
CD11c	N418	-	ATCC® HB-224™	ATCC in coop. LGC Standards GmbH, Wesel, D
CD45R (B220)	RA3-6B2	AlexaFluor® 647	103229	BioLegend, San Diego, CA (USA)
F4/80	Cl:A3-1	-	MCA497	AbD Serotec
Ly-6G	1A8	AlexaFluor® 647	127609	BioLegend, San Diego, CA (USA)
SiglecF	E50-2440	AlexaFluor® 647	562680	BD Biosciences, Heidelberg, D
Vac2/4	Kaninchen- serum	-	-	(Krempf et al., 2007)
Maus IgA	RMA-1	-	407001	BioLegend, San Diego, CA (USA)

Tab. 12: Verwendete Sekundär-Antikörper für die Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Antikörper	Konjugat	Katalog-Nr.	Hersteller
Ziege anti-Ratte IgG	AlexaFluor® 488	4416	Cell Signaling Technology Europe, B.V., Frankfurt am Main, D
	AlexaFluor® 555	4417	
	DyLight™ 649	405411	
Ziege anti-Hamster IgG	AlexaFluor® 568	A21112	Thermo Fisher Scientific Corp., Waltham, MA (USA)
Ziege anti-Maus IgM	AlexaFluor® 488	A21042	Thermo Fisher Scientific Corp., Waltham, MA (USA)
Ziege anti-Maus IgG	AlexaFluor® 555	A21422	Thermo Fisher Scientific Corp., Waltham, MA (USA)
Anti-Kaninchen IgG	AlexaFluor® 555	A21428	Thermo Fisher Scientific Corp., Waltham, MA (USA)

Tab. 13: Verwendete HRP- bzw. Biotin-konjugierte Antikörper für Plaque-Assay und ELISA.

Antikörper	Konjugat	Katalog-Nr.	Hersteller
Ziege anti-Maus IgM	HRP	PA1-84383	Thermo Fisher Scientific Corp., Waltham, MA (USA)
Ziege anti-Maus IgG	HRP	G-21040	
Ziege anti-Maus IgA	HRP	62-6720	Thermo Fisher Scientific Corp., Waltham, MA (USA)
Ziege anti-Kaninchen IgG	Biotinyliert	65-6140	Thermo Fisher Scientific Corp., Waltham, MA (USA)
Streptavidin	HRP	554066	BD Biosciences, Heidelberg, D

2.1.11 Primer

Tab. 14: Verwendete Primer und deren Hersteller

Bezeichnung	Sequenz 5'→3'	Hersteller
mCherry Sequ fw	ctt ccc cga ggg ctt aaa gtg g	biomer.net GmbH, Ulm, D
mCherry Sequ rs	gct tca cct tgt aga	
mCherry fw	aca acc ggt tag gat aaa tac acc atg gtg agc aag g	
mCherry rs	aca acc ggt ttt taa tta act tac ttg tac agc tcg tcc	
Random Hexamers	-	Qiagen GmbH, Hilden, D

2.1.12 Plasmide

Tab. 15: Verwendete Plasmide und deren Hersteller

Bezeichnung	Hersteller
pTW22 mCherry 2A GFP	Zur Verfügung gestellt von Dr.Tatjana Wictorowicz, ehem. AG Axel Rethwilm
pPVM1	(Krempf et al., 2007)
pTMpvmN	(Krempf et al., 2007)
pTMpvmP	(Krempf et al., 2007)
pTMpvmL	(Krempf et al., 2007)
pTMpvmM2-1	(Krempf et al., 2007)

2.1.13 Enzyme

Tab. 16: verwendete Enzyme und deren Hersteller

Funktion	Enzym	Hersteller
Collagenasen	Collagenase A	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, D
DNasen	DNase I	Roche Diagnostics Deutschland GmbH,

DNA-Polymerasen	RevertAid™H Minus Reverse Transcriptase	Mannheim, D Fermentas - Thermo Fisher Scientific Corp., Waltham, MA (USA)
	Phusion®High Fidelity DNA Polymerase	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, D
	GoTaq®DNA Polymerase	Promega GmbH, Mannheim, D
	Alkalische Phosphatase CIP	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, D
Restriktionsenzyme	Agel-HF	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, D
	<i>PacI</i>	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, D
	<i>HindIII</i>	Fermentas - Thermo Fisher Scientific Corp., Waltham, MA (USA)
	<i>AccI</i>	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, D
RNasen	<i>NdeI</i>	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, D
	RNase H	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, D

2.1.14 Kits

Tab. 17: Verwendete Kits und deren Hersteller

Bezeichnung	Hersteller
BigDye™Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems - Thermo Fisher Scientific Corp., Waltham, MA (USA)
High Pure RNA Isolation Kit	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, D
MagniSort® Mouse B Cell Enrichment Kit	eBioscience (Affymetrix) - Thermo Fisher Scientific Corp., Waltham, MA

	(USA)
PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden, D
QIAGEN® Plasmid Maxi Kit	Qiagen GmbH, Hilden, D
QIAprep®Spin Miniprep Kit	Qiagen GmbH, Hilden, D
QIAquick®Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden, D
Rapid DNA Dephos and Ligation Kit	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, D
Roti®-Quant universal	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, D
Zombie Violet Fixable Viability Kit	BioLegend, San Diego, CA (USA)

2.1.15 Software

Tab. 18: Verwendete Software und deren Hersteller

Bezeichnung	Hersteller
DNASTAR Software (Lasergene)	DNASTAR, Inc., Madison, USA
FACS Diva Software	BD Biosciences, Heidelberg, D
FlowJo Software	FlowJo LLC., Ashland, USA
GraphPad PRISM	GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA
ImageJ Software	NIH, öffentlich zugänglich
ZEN Imaging Software	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, D

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Zur Propagierung von PVM wurden BHK-21-Zellen, und zur Durchführung des Plaquetests Vero-Zellen verwendet. Für die Passage der Zellen wurden diese mit PBS (ohne Mg^{2+} und K^+) gewaschen und mit ATV überschichtet. Nach Ablösung der Zellen von der Oberfläche wurden diese in entsprechendem Medium aufgenommen und neu in entsprechende Zellkulturflaschen oder -platten ausgesät. Für die Kultivierung von Vero-Zellen wurde EMEM und für die BHK-21-Zellen GMEM verwendet. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und 5% CO_2 .

2.2.2 Virologische Methoden

2.2.2.1 Virusanzucht

Für die Propagierung von PVM wurden BHK-21-Zellen, ausgesät in GMEM-Erhaltungsmedium, mit einer *Multiplicity of Infection* (MOI) von 0,01 *Plaque forming unit* (Pfu)/Zelle infiziert und nach einer Inkubationszeit von sieben Tagen mit zweimaligem Mediumwechsel das Virus isoliert (siehe 2.2.2.3).

2.2.2.2 Charakterisierung der multizyklischen Virusvermehrung

Zur Bestimmung der Replikationseigenschaften von PVM in der Zellkultur wurden BHK-21-Zellen in 12-well Platten ausgesät. Das Medium wurde für die Infektion verworfen und die Zellen mit einer MOI von 0,01 Pfu/Zelle PVM (hier: rPVM-GFP oder rPVM-mCherry) in 300 μ l GMEM-Erhaltungsmedium pro Vertiefung infiziert. Mit dem verbliebenen Inokulum wurde eine Rücktitration durchgeführt (Siehe 2.2.2.5). Nach dreistündiger Inkubation bei 32°C und nach mehrmaligem Schwenken der Platten wurde das Inokulum entfernt und die Zellen drei Mal mit sterilem erwärmten PBS gewaschen und mit GMEM-Erhaltungsmedium überschichtet. Für die Bestimmung der Viruslast wurden, wie unter 2.2.2.3 beschrieben, Zellen und Überstand geerntet und aufgeschlossen.

2.2.2.3 Anlegen von Kryokulturen

Nach Abschaben des Zellrasens in das Medium und Zugabe von HEPES/MgSO₄ 10x wurde die Suspension 10 min bei 4°C und 500 rcf (Megafuge 1.0R, Kendro Laboratory Products GmbH) zentrifugiert. Ein Teil des Überstandes wurde abgenommen und auf Eis gelagert. Der Zellaufschluss erfolgte mittels dreimaligen Einfrierens in flüssigem Stickstoff und anschließendem sofortigem Auftauen bei 37°C. Nach nochmaliger Zentrifugation wurde der Überstand mit dem restlichen Medium vereinigt, aliquotiert und mit flüssigem Stickstoff schock gefroren. Die Lagerung der Aliquots erfolgte bei -80°C.

Für die Analyse der Replikationseigenschaften von Viren wurden ab dem Tag der Infektion (d0) bis Tag 7 (d7) Proben genommen. Dazu wurden die Zellen in das Medium abgeschabt und in 2 ml Röhrchen, beschickt mit HEPES/MgSO₄ 10x, überführt. Die Zellsuspension wurde 3 min stark gemischt und dann 10 min bei 4°C und 8000 rcf (Centrifuge 5415 R, Eppendorf AG) zentrifugiert. Wie oben beschrieben wurde der Überstand aliquotiert und mit flüssigem Stickstoff schock gefroren.

2.2.2.4 Herstellung von Lungenhomogenaten

Mäuse wurden mittels CO₂ getötet und die infizierten Mauslungen steril entnommen, zur Lagerung in 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt, schockgefroren und bei -80°C bis zur Verwendung aufbewahrt. Zur Homogenisierung wurde das Gewebe nach dem Auftauen in vorgekühlte, mit 3 ml Homogenisierungsmedium beschickte Glas-Homogenisatoren (Fassungsvolumen: 5 ml) überführt. Der Aufschluss des Lungengewebes erfolgt 3-5 min lang durch eine sich drehende Auf-und-Ab-Bewegung des Pistills, bis das weiße Kollagengerüst der Lunge sichtbar wurde. Die Suspensionen wurden in frische 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und 10 min bei 500 rcf und 4°C zentrifugiert (Megafuge 1.0R, Kendro Laboratory Products GmbH). Der Überstand jeder Probe wurde in drei Kryoröhrchen aliquotiert, schockgefroren und bis zur Analyse bei -80°C gelagert.

2.2.2.5 Virustiterbestimmung mittels Plaquetest

Zur Bestimmung der Viruslast im Zellüberstand oder in homogenisiertem Lungengewebe wurde ein sogenannter Plaquetest durchgeführt. Dabei wurden durch

eine definierte Verdünnung der Virussuspension auf Zellen infektiöse Viruspartikel nachgewiesen.

Für die Viruslastbestimmung wurden Verdünnungsreihen (Doppel-/Dreifachansätze) in Zehnerschritten mit den entsprechenden Virussuspensionen erstellt und dann auf Vero-Zellen, ausgesät in 24 well-Platten, überführt. Die Zellkulturplatten wurden 3 h bei 32°C inkubiert. Alle 20-30 min wurden die Platten vorsichtig geschwenkt. Anschließend wurde das Virusinokulum entfernt und die Zellen mit 0,8% Methylcellulose-EMEM überschichtet. Die Inkubation der Zellen erfolgt 6 Tage bei 32°C und 5% CO₂.

Für die Färbung virusinfizierter Zellen wurde das Methylcellulose-EMEM steril entfernt und die Zellen zweimal mit kaltem Methanol 80% für 20 min bzw. 1 h bei 4°C inkubiert. Nach der Fixierung wurde die Methanol-Lösung verworfen und die Zellen mit 5%-Magermilchpulver in PBS 1 h bei RT geblockt. Für die Färbung des viralen G-Proteins wurden die Zellen mit einer 1:1000fachen Verdünnung des Antikörpers (Vac2/4) in 5%-Magermilchpulver in PBS für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Der biotinylierte und gegen Kaninchen-IgG gerichtete Sekundärantikörper wurde 1:5000 in Magermilchpulver in PBS verdünnt und die Zellen 1 h auf dem Wiegeschüttler inkubiert. Nach nochmaligem Waschen der Platten wurden die Zellen mit zuvor 1:2000 in PBS verdünnten Streptavidin-HRP überschichtet. Die Inkubation erfolgte ebenfalls 1 h auf dem Wiegeschüttler. Nach dem Waschen mit PBS erfolgte die eigentliche Färbereaktion mit DAPT. Die Zellen wurden ca. 5 min auf dem Wiegeschüttler mit DAPT 1% 1:10 verdünnt in ddH₂O und 1:1000 H₂O₂ inkubiert, bis sich braune punktförmige Färbungen entwickelten. Die Reaktion wurde durch Spülen der Platten mit Leitungswasser gestoppt und die einzelnen Plaques ausgezählt. Für die Berechnung wurden die letzten zwei, gut auszählbaren Verdünnungen bis maximal 200 Plaques gezählt. Die Viruskonzentration wurde durch folgende Formel bestimmt.

$$\text{Konzentration} \frac{\text{Pfu}}{\text{ml}} = \frac{\text{Mittelwert}(\text{ausgezählte Plaques})}{0,15\text{ml}} * 1/\text{Verdünnung}$$

Wurde die Viruslast in der Lunge bestimmt, wurde das durch obige Formel ermittelte Ergebnis mit 3 multipliziert, da nach der Homogenisierung des Gewebes die Probe in drei 1 ml-Aliquots aufgeteilt wurde. Wurde nur die halbe Lunge verwendet, wurde zusätzlich mit 2 multipliziert um auf den Virusgehalt in der kompletten Lunge rückzuschließen.

2.2.2.6 Virus-Neutralisationstest

Für die Analyse der Neutralisationseigenschaften in Serum oder in der Bronchoalveolären Lavage-Flüssigkeit (BALF) wurde ein *50% plaque reduction neutralization test* (PRNT₅₀) durchgeführt. Dabei wurde eine definierte Viruskonzentration mit hitzeinaktiviertem Serum oder BALF inkubiert und durch einen folgenden Plaque-Assay die noch vorhandenen infektiösen Viruspartikel analysiert.

Das zu untersuchende Material (Serum, BALF) wurde 1 h bei 56°C inaktiviert und über eine Verdünnungsreihe in Vierschritten in PBS titriert. Nach einer einstündigen Inkubation der Verdünnungen mit einer definierten Menge PVM 15 (50 Plaques pro Vertiefung einer 24-well-Platte) bei 37°C wurden Vero-Zellen mit der Virus-Antikörper-Suspension für 3 h bei 32°C inkubiert. Die Antikörper-Virus-Suspension wurde entfernt, die Zellen mit 1 ml Methylcellulose-EMEM (0,8%) überschichtet und für 6 Tage bei 32°C und 5% CO₂ kultiviert.

Die Fixierung und Färbung erfolgte analog zum Plaquetest (Kap. 2.2.2.5). Nach Auszählen der Plaques wurde die Verdünnung als reziproker Log₂ verwendet, in welcher weniger als die Hälfte der erwarteten Plaques dargestellt wurde. Als Kontrolle der genauen Anzahl viraler Partikel wurde die definierte Menge Virus mit PBS, statt mit Serum oder BALF, inkubiert.

2.2.3 Tierversuche

Die verwendeten Mäuse (Kap. 2.1.6) wurden im Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen gehalten und gezüchtet. Die Tierversuche wurden ebenfalls am Institut für Virologie und

Immunbiologie der Universität Würzburg durchgeführt. Die Tiere wurden in einzelventiliierten Käfigen unter negativen Druckbedingungen (50% Zuluft, 70% Abluft) gehalten. Alle Versuche wurden unter Einhaltung der tierschutzrechtlichen Regelungen unter der Genehmigungsnummer 55.2-2531.01-125/13 der Regierung von Unterfranken durchgeführt.

2.2.3.1 Infektion von Mäusen

Für die Infektion wurde PVM in 80 µl PBS pro Maus entsprechend der geplanten Infektionsdosis verdünnt. Die Tiere wurden mittels 2,5-3% Isofluran CP® (cp-pharma, Burgdorf, D) narkotisiert und 80 µl Virussuspension über die Nase appliziert. Das verwendete Virusinokulum wurde anschließend mittels Plaquetest rücktitriert (Kap. 2.2.2.5). Das Gewicht und der Phänotyp wurden bis Tag 14 p.i. oder bis zum Erreichen der Abbruchkriterien täglich kontrolliert. Die Tiere wurden wie folgt bewertet:

Tab. 19: Skala für die visuelle symptomatische Bewertung mit Versuchs-Abbruchkriterien

Bewertung	Phänotyp
1	keine Symptome
2	aufgerautes Fell
3	gekrümmte Haltung, abnormaler Gang, erschwerte Atmung
4	reduzierte Mobilität, Zyanose an Schwanz und Ohren, Lethargie (Versuchs-Abbruch!)
5	Tot

Die Abbruchkriterien waren gegeben, wenn das Körpergewicht der Mäuse für zwei oder mehr Tage unter 80% des Ausgangsgewichts fiel oder die klinische Bewertung 3-4 Punkte erreichte (Versuchsabbruch, VA).

2.2.3.2 Transplantationsversuche

Für die Transplantation von B-Zellen wurden entsprechend dem Protokoll aufgereinigte Zellen (Kap. 2.2.4.3) in 200 µl PBS aufgenommen und über die Schwanzvene der Empfänger-Maus injiziert (Neobject® 27Gx3/4“). Es wurde darauf geachtet, dass Alter und Geschlecht der Spendertiere mit den Empfängertieren übereinstimmten, um

eventuelle Abstoßungsreaktionen zu vermeiden. 24 h später erfolgte dann die Infektion mit PVM 15 und die Kontrolle der Tiere über einen Zeitraum von 14 Tagen oder bis Erreichen der Abbruchkriterien (wie unter Kap.2.2.3.1 beschrieben).

2.2.3.3 Töten der Tiere

Mäuse wurden an definierten Zeitpunkten oder bei Erreichen der Abbruchkriterien nach der Infektion mittels der Inhalation von CO₂ getötet.

2.2.3.4 Organentnahme

Nach dem Töten der Versuchstiere wurde das Abdomen und der Thorax eröffnet. Die Milz wurde mittels Pinzetten entfernt und in eine Petrischale überführt.

Vor der Lungenentnahme wurde die Vena cava zum Entbluten geöffnet. Anschließend wurde die Lunge freipräpariert. Für die Bestimmung der Viruslast wurde die Lunge direkt entnommen und in 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Für durchflusszytometrische Analysen wurden die Lunge zur Eliminierung der roten und weißen Blutzellen in der Lungenvaskulatur über den rechten Herzventrikel mit ca.10 ml PBS perfundiert. Um Immunzellen aus dem Bronchoalveolarlumen zu gewinnen wurde die Trachea frei präpariert und eine Venenverweilkanüle eingeführt. Das Bronchoalveolarlumen wurde vorsichtig mit 1 ml PBS lavagiert und die Spülflüssigkeit, die sogenannte BAL-Flüssigkeit, in ein 5 ml Röhrchen überführt. Diese Prozedur wurde wiederholt und die erhaltene BAL-Flüssigkeit in ein weiteres Röhrchen überführt. Bis zur weiteren Verwendung wurden beide BAL-Spülungen mit enthaltenen Zellen auf Eis gelagert. Die BAL-Flüssigkeiten wurden anschließend für 5 min bei 200 rcf und 4°C zentrifugiert (Megafuge 1.0R, Kendro Laboratory Products GmbH) und der Überstand der ersten Spülung für den Virusneutralisationstest und den ELISA eingefroren. Die sedimentierten Zellen beider Spülungen wurden vereinigt und in insgesamt 200 µl PBS aufgenommen und ausgezählt (Kap. 2.2.4.5).

Für die Gewinnung von Zellen aus Knochenmark wurde jeweils eine Tibia entnommen und das weiche Muskelgewebe entfernt. Alle Organe wurden bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert

2.2.3.5 Serum-Gewinnung

Zur Gewinnung von Serum wurde nach dem Eröffnen des Thorax das Herz punktiert und das Blut in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach der Blutgerinnung wurden die Reaktionsgefäße kurz zentrifugiert und das Serum in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.4 Zellisolierung

2.2.4.1 Zellisolation aus der Lunge

Um Immunzellen im Lungenparenchym analysieren zu können, wurde die lavagierte Lunge entnommen, das Lungengewebe mit Hilfe eines Skalpell's homogenisiert und mit Collagenase A und DNase I in RPMI-Lungenverdau-Medium für 1 h bei 37°C verdaut. Für eine weitere Homogenisierung größerer Gewebeteile mittels einer Kanüle (Sterican® 20Gx1½“) wurde die Zellsuspension drei bis vier Mal aspiriert. Einzelzellen wurden aus der Suspension durch Filtration durch Zellsiebe (Porengröße 40 µm) isoliert und durch 7-minütige Zentrifugation bei 300 rcf, 4°C sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen sowie noch enthaltene Erythrozyten durch Resuspension der Pellets in 5 ml Erythrozyten-Lysepuffer für 3-4 min lysiert. Die Lyse wurde durch Zugabe von PBS gestoppt und die Zellsuspension ein weiteres Mal wie beschrieben zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet in 5 ml PBS resuspendiert. Die Lebendzellzahl wurde wie unter Kap. 2.2.4.5 bestimmt.

2.2.4.2 Zellisolation aus Milzgewebe

Nach der Entnahme der Milz (Kap. 2.2.3.4) wurde diese anschließend durch 40 µm-Zellsiebe gepresst, wobei Immunzellen durch das Sieb filtriert und in Lysepuffer aufgenommen wurden, das Milzparenchym verblieb im Sieb. Nach Abstoppen der Lysereaktion durch die Zugabe von PBS und einer 5-minütigen Zentrifugation bei 300 rcf wurde der Überstandes verworfen und die Zellen im restlichen Lysepuffer/PBS-Gemisch resuspendiert. Die Zellsuspension wurde nochmals durch ein 40 µm-Zellsieb in ein frisches Zentrifugenröhrchen filtriert und das Zellsieb mit PBS gespült. Nach erneuter

Zentrifugation wurden die sedimentierten Zellen in 5 ml BSS/BSA aufgenommen. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Zellen auf Eis gelagert. Die so isolierten Splenozyten können direkt für durchflusszytometrische Analysen verwendet werden. Die Zellzahl wurde mittels Trypanblau und Neubauer-Zählkammer (Kap. 2.2.4.5) bestimmt.

2.2.4.3 Isolierung/Anreicherung von B-Zellen

Für Transplantationsversuche wurden B-Zellen mittels negativer Isolierung mit dem „MagniSort® Mouse B cell Enrichment Kit“, Fa. eBioscience, angereichert. Dabei werden die unerwünschten Zellen mit Biotin-konjugierten Antikörpern markiert und anschließend über Streptavidin-konjugierte magnetische Kügelchen und einem Magneten aussortiert. Die Anreicherung erfolgte gemäß dem Protokoll des Herstellers und ist im Folgenden kurz dargestellt.

Für die Gewinnung von murinen B-Zellen wurden aus Milzen von gesunden C57BL/6-Mäusen Einzelzellsuspension hergestellt (Kap. 2.2.4.2). Die Endkonzentration der Zellen wurde auf $10^7/100 \mu\text{l}$ eingestellt. Für alle Schritte wurde der BSS/BSA-Puffer verwendet. Es wurden $1 \cdot 10^7$ - $2 \cdot 10^8$ Zellen in ein FACS-Röhrchen überführt und mit dem Antikörpercocktail versetzt. Die Antikörper richteten sich gegen murines CD3, CD4, CD8, CD11b, CD49b, Ly-6G und Ter-119. Die Zellsuspension wurde gemischt und nach einer 10-minütigen Inkubationszeit mit BSS/BSA-Puffer gewaschen. Nach Zentrifugation für 5 min bei 300 rcf wurde der Überstand verworfen und die Zellen in ihrem Originalvolumen resuspendiert. Anschließend wurde die entsprechende Menge der magnetischen Beads zugesetzt, die Zellen gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Die Röhrchen wurden bis auf 2,5 ml BSS/BSA-Puffer aufgefüllt und im Magneten platziert. Nach 5-minütiger Inkubation wurden der Magnet mit dem Röhrchen invertiert und die Zellsuspension in ein frisches 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Der Bindschritt wurde ein weiteres Mal wiederholt und die beiden Fraktionen vereinigt. Die Reinheit der Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie unter Verwendung von Antikörpern, gerichtet gegen CD45, CD3 und B220, untersucht und mit der Zellsuspension vor der Anreicherung verglichen. Die Reinheit der B-Zellen betrug rund 96% (Abb.4). Die so gewonnenen Zellen konnten nun nach dem Auszählen mit Trypanblau zur Rekonstitution der B-Zellen in Mäusen verwendet werden (Kap. 2.2.4.5).

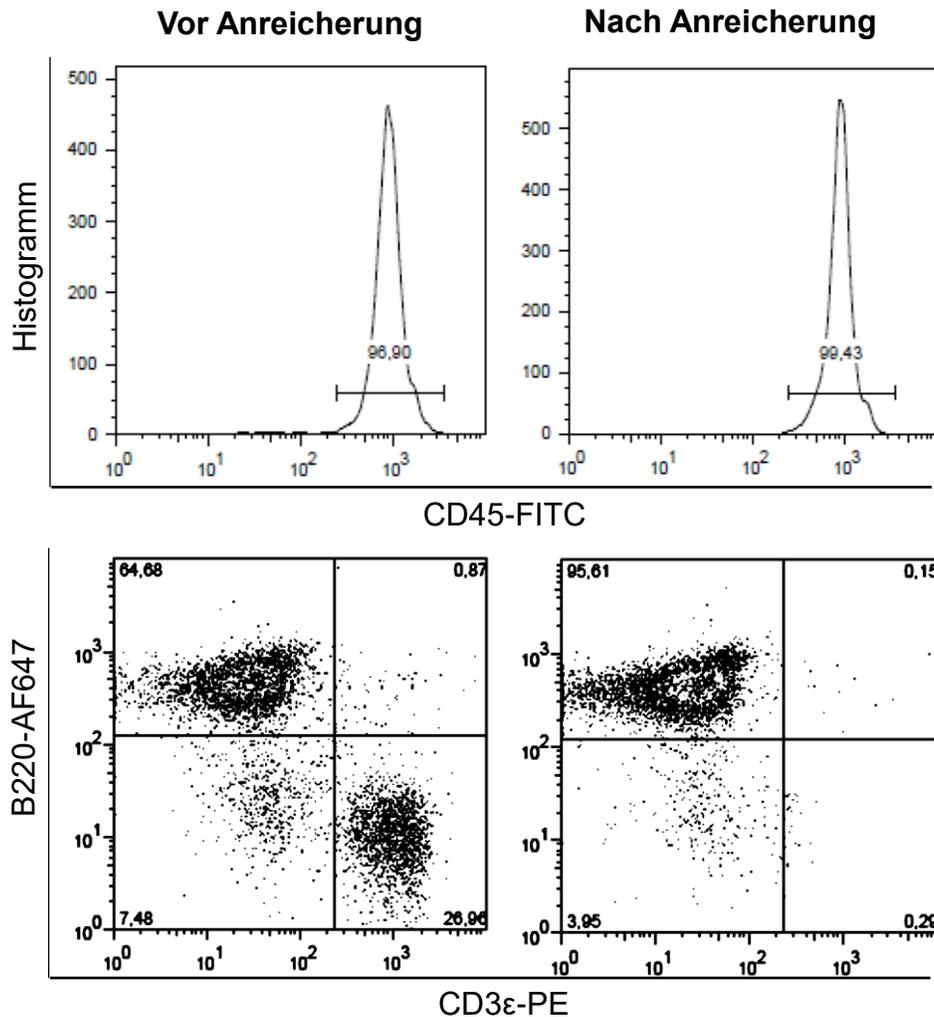


Abb. 4: Repräsentatives Beispiel einer durchflusszytometrischen Analyse von Splenozyten vor und nach der B-Zell spezifischen Anreicherung mittels MagniSort® Mouse B cell Enrichment Kit. CD45 positive Zellen (oben) wurden vor (linke Graphen) und nach (rechte Graphen) Anreicherung auf das Vorhandensein von CD3ε und B220 (unten) untersucht. Nach erfolgreicher Aufreinigung konnten nur noch rund 0,3% CD3ε-positive Zellen nachgewiesen werden.

2.2.4.4 Zellisolation aus Knochenmark

Die isolierten Tibias wurden an beiden Enden vorsichtig geöffnet. Mittels einer Kanüle (26G 3/8“) wurde der Knochen mit RPMI perfundiert und die Zellsuspension direkt durch ein 40 µm Zellsieb in ein Zentrifugenröhrchen gefiltert. Dieser Vorgang wurde bis zur vollständigen Entfärbung des Knochens mehrmals wiederholt. Anschließend wurde die Zellsuspension 10 min bei 300 rcf und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Nach Lyse der Erythrozyten mit Erythrozyten-Lysepuffer wurden die Reaktion mit PBS gestoppt und die Zellen durch Zentrifugation sedimentiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen in 5 ml BSS/BSA resuspendiert und auf Eis gelagert. Die Zellzahl wurde bestimmt (Kap. 2.2.4.5).

2.2.4.5 Zellzahlbestimmung

Die zu analysierende Zellsuspension wurde in PBS/Trypanblau 1% verdünnt und anschließend mittels einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Die Gesamtzellzahlen wurden dann mittels folgender Formel aus den gezählten Zellen bestimmt.

$$\text{Gesamtzellzahl} = \text{Mittelwert (gezählte Zellen)} * \frac{10^4 \text{ Zellen}}{\text{ml}} * \text{Verdünnung} * V(\text{ml})$$

Dabei entsprachen 10^4 Zellen/ml dem Kammerfaktor, die Verdünnung der eingesetzten Zellsuspension verdünnt in der Trypanblau-Lösung und V dem nach der Zellisolierung erhaltenem Volumen.

2.2.5 Immunologische/histologische Methoden

2.2.5.1 Herstellung von Kryoschnitten und immunhistologische Färbung von Lungengewebe

Für die Mikroskopie wurden die Lungen infizierter Mäuse mit 0,5 ml PBS/PFA 4%/Saccharose 8% über die Trachea perfundiert und in ein mit PBS beschicktes Zentrifugenröhrchen überführt. Wurde nur ein Teil der Lunge für immunhistologische Färbungen verwendet, wurden die rechten Lungenflügel mittels Gefäßklemme abgeklemmt und der linke Lungenflügel mit 0,25 ml PBS/PFA 4%/Saccharose 8% perfundiert. Das Lungengewebe wurden zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit PBS/PFA 4% von außen für 10 min fixiert. Zur Stabilisierung wurde das Gewebe in verschiedenen Konzentrationen Saccharose in ddH₂O inkubiert: 2 h 10%, 2 h 20% und über Nacht in 30% Saccharose. Für die Lagerung und das Anfertigen der Schnitte wurden die Lungenflügel in Tissue Tek O.C.T™ Compound eingebettet, schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Nach einer Mindestlagerung der Proben von 24 h bei -80°C wurden mittels eines Kryostats (Leica CM1900) 8-9 µm starke Gefrierschnitte angefertigt und auf Superfrost®Plus Objektträger aufgezogen. Nach einer Trocknungszeit von mindestens 2 h bei RT wurden die einzelnen Schnitte mit einem Flüssigkeitsblocker (Pap Pen) umrandet, um so eine wasserundurchlässige Schicht zwischen den einzelnen Schnitten zu schaffen. Nach nochmaligem kurzem Trocknen wurden die Schnitte mit 4% PFA fixiert und anschließend mit 0,2% Triton-X-100 in PBS permeabilisiert. Nach zweimaligem Waschen der Objektträger mit PBST wurden die Schnitte zur Vermeidung unerwünschter unspezifischer Bindungen mit FKS 5% und unspezifischem Mausserum 1% (NMS) in PBS geblockt. Die eigentliche Darstellung der jeweiligen zellspezifischen Oberflächenproteine folgte mittels spezifischer Antikörper. Die folgende Tabelle zeigt die verschiedenen verwendeten Antikörperkombinationen. Die Primärantikörper wurden in PBS/ FKS 2% verdünnt und die Schnitte über Nacht bei 4°C in einer Feuchtkammer inkubiert. Die Gefrierschnitte wurden eine Stunde bei RT mit dem Sekundär- und Tertiärantikörper inkubiert. Nach jedem Inkubationsschritt wurden die Objektträger zweimal zwei Minuten mit PBST schwenkend gewaschen.

Tab. 20: Verwendete Antikörperkombinationen zur Darstellung von Immunzellen

Zellpopulation	1. Antikörper (Spezifität) + Verdünnung	2. Antikörper/Fluoro- chrom/Spezies + Verdünnung	3. Antikörper/Fluoro- chrom/Spezies + Verdünnung
CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen	CD8b 1:50	Anti-Ratte IgG AlexaFluor® 555 1:500	CD4 AlexaFluor® 647 1:300
B-Zellen und CD4 ⁺ T-Zellen	CD4 1:100	Anti-Ratte IgG AlexaFluor® 555 1:500	B220 AlexaFluor® 647 1:200
B-Zellen, CD4 ⁺ T-Zellen, PVM G	Vac2/4 1:500	Anti-Kaninchen IgG AlexaFluor® 555 1:500	B220 AlexaFluor® 647 1:200 CD4- AlexaFluor® 488

			1:200
Neutrophile Granulozyten	Ly6G- AlexaFluor® 647	-	-
	1:500		
Eosinophile Granulozyten und AMΦ	CD11c	Anti-Hamster IgG AlexaFluor® 568	SiglecF AlexaFluor® 647
	1:25	1:200	1:200
B220, IgA und IgM	IgA	Anti-Ratte IgG AlexaFluor® 555	IgM AlexaFluor® 488
	1:50	1:500	1:500
			B220 AlexaFluor® 647
			1:200
IgA, IgM und IgG	IgA	Anti-Ratte IgG DyLight™649	IgM AlexaFluor® 488
	1:50	1:200	1:500
			IgG AlexaFluor® 555
			1:500

Nach letztmaligem Waschen der Objektträger mit H₂O wurden die Schnitte mit Fluoreszenz-Einschluss-Medium, dem DAPI (1:250) zur Darstellung der Zellkerne zugesetzt wurde, eingedeckt und über Nacht bei 4°C im Dunkeln getrocknet. Die Analyse erfolgte überwiegend mittels des Fluoreszenzmikroskops LSM780 (Firma Zeiss, Jena). In den Aufnahmen wurden mittels ImageJ-Software die Helligkeit und der Kontrast angepasst, sowie Maßbalken eingefügt.

2.2.5.2 Durchflusszytometrie

Für die hier durchgeführten durchflusszytometrischen Analysen wurden 2 ml FACS-Puffer (PBS/2% FKS/0,01% Na-Azid) vorgelegt und $1 \cdot 10^6$ der zu analysierenden Zellen in diese überführt. Das Volumen der verwendeten Zellen, entnommen aus der unter Kap. 2.2.4 erstellten Zellsuspension wurde hierbei für die spätere Bestimmung der absoluten Zellzahl notiert. Die Zellen wurden mittels Zentrifugation sedimentiert (5 min, 200 rcf, 4°C). Der Überstand wurde bis auf ca. 200 µl verworfen, die Zellen mit 50

µl/Probe PBS/FKS2%/NMS1% versetzt und 15 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Nach Zugabe der Antikörper-Verdünnungen wurde die Zellsuspension gemischt und 30 min bei 4°C inkubiert. Für die Färbung wurden verschiedene Antikörper-Panels verschiedener Spezifität zusammengestellt, die in Tab. 21 aufgeführt sind.

Tab. 21: Verwendete Färbepanels für die Durchflusszytometrie.

Panel (detektierte Zellen)	Antikörper (Spezifität und Fluorochrom)	Verdünnung
I (T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen)	CD45 AlexaFluor®700 bzw. CD45.2 FITC	1:500 bzw. 1:400
	CD3e PE-Cy5	1:300
	CD8a PE-Cy7	1:800
	CD4 APC	1:1600
	NK 1.1 PE	1:200
	B220 APC-Cy7	1:200
II (AMΦ, eosinophile und neutrophile Granulozyten)	CD45 PE	1:500
	Ly-6G PE-Cy7	1:400
	F4/80 APC-Cy7	1:100
	CD11c PerCP-Cy5.5	1:100
	SiglecF AlexaFluor®647	1:200
	CD11b PE-CF594 o. CD11b-PE-Dazzle™594	1:400
AMΦ	CD45.2 FITC	1:400
	SiglecF AlexaFluor®647	1:200
	CD11c PerCP-Cy5.5	1:100
B-Zellen	CD45.2 FITC	1:400
	CD3e PE	1:500
	B220 AlexaFluor®647	1:600
	CD19 PE-Cy7	1:600
	CD138 PE-Dazzle®594	1:100

Nach der Inkubation mit dem Antikörpercocktail wurde die Zellsuspension mit PBS gewaschen und zur Entfernung der ungebundenen Antikörper zentrifugiert (5 min, 200 rcf, 4°C). Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen mit 0,5 µl *Zombie Violet*

Fixable Viability Kit (Biolegend, San Diego) in 100 µl PBS pro Probe 30 min bei RT im Dunklen inkubiert. Dies dient der Diskriminierung zwischen lebenden und toten Zellen. Tote Zellen mit ihrer permeablen Plasmamembran lagern nicht nur auf der Oberfläche den Farbstoff an, sondern auch im Zellinneren, d.h., diese Zellen fluoreszieren nach Zugabe dieses Farbstoffs stärker als lebende Zellen und können somit von diesen unterschieden werden. Anschließend wurden die Zellsuspensionen gewaschen und die Zellen durch Zugabe von PBS/PFA 4% 10 min bei 4°C fixiert. Nach letztmaligem Waschen mit FACS-Puffer wurden die Zellen sedimentiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden im Restvolumen FACS-Puffer resuspendiert und in *Trucount Tubes* (BD, Heidelberg) überführt. Die Proben wurden auf 300 µl mit FACS-Puffer aufgefüllt (Testvolumen). Die Zellen wurden mittels Durchflusszytometer (LSRII, BD, Heidelberg) mit Hilfe der FACS Diva Software (BD, Heidelberg) analysiert. Zur Auswertung wurde die Software FlowJo Version 7.2.2 (FlowJo LLC., Ashland, Oregon) verwendet. Zur Bestimmung der absoluten Zellzahl im Testvolumen (Ausgangsvolumen) wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{Zellzahl im Testvolumen} = \frac{\text{Zahl der Aufgenommenen Zellen (Counts)}}{\text{Anzahl der aufgenommenen "Beads" (Counts)}} * \frac{\text{Anzahl der "Beads" pro Röhrchen}}{\text{Testvolumen (Ausgangsvolumen)}}$$

Zur Bestimmung der absoluten Zellzahl im Gewebe wurde die Zellzahl im Testvolumen auf das komplette Volumen der Zellsuspension des kompletten Gewebes hochgerechnet.

2.2.5.3 PVM-spezifischer ELISA

Herstellung von Viruslysat zum Belegen von ELISA-Platten

Zur Gewinnung viraler Proteine wurden BHK-21-Zellen mit rPVM-GFP MOI=0,01 infiziert und sechs Tage bei 32°C und 5% CO₂ kultiviert. Die Viruspartikel wurden mittels eines Saccharosekissens sedimentiert (2 h bei 25000 xg und 4°C). Das entstandene Pellet wurde nach Verwerfen des Überstandes mit basischem Lysepuffer (1% Triton X-100, 0,5% Natriumdeoxycholat, 1mM EDTA, 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid in Carbonat-Puffer) auf Eis lysiert und die Proteinkonzentration mittels eines abgewandelten Bicinchoninsäure-Tests bestimmt.

Proteinbestimmung mittels eines abgewandelten Bicinchoninsäure-Tests

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das Roti®Quant Universal Kit (Carl Roth, Karlsruhe) verwendet. Dabei wird eine abgewandelte Form des BCA-Protein-Assays genutzt. Bei der Biuret-Reaktion bilden Peptide mit Cu^{2+} Ionen farbige Komplexe, die Ionen werden dann durch den basischen pH zu Cu^+ reduziert. Die Lösung wird nun je nach Peptidkonzentration verschieden stark blau gefärbt. Nach der Biuret-Reaktion erfolgt eine Verstärker-Reaktion, um die zu messende Färbung zu intensivieren. Dazu wurden die entstandenen Cu^+ Ionen durch BCA chelatiert (Abb. 5). Die so gebildeten purpurfarbenen Kupfer-Chelat-Komplexe sind ebenfalls direkt proportional zur Proteinkonzentration und können bei 503 nm bzw. 492 nm gemessen werden.

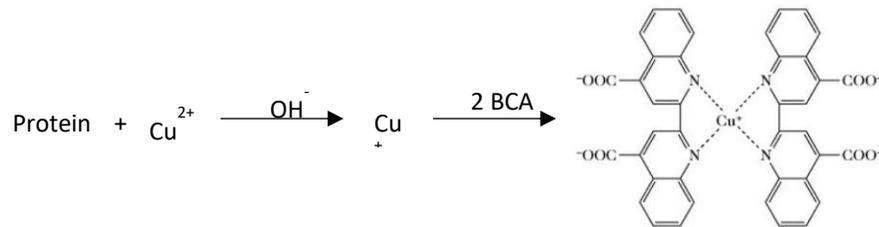


Abb. 5: Der Bicinchoninsäure-Test: Kombination der Biuret-Reaktion mit der BCA-Komplexierung von Cu^+ -Ionen (Smith et al., 1985).

Zur genauen Konzentrationsbestimmung wurde eine Verdünnungsreihe gemäß Protokoll des Herstellers aus einer Stammlösung vom BSA (2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in basischem Lysepuffer hergestellt und eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die zu bestimmenden Proben wurden 1:10, 1:20 bzw. 1:50 verdünnt. Alle Proben inkl. der Verdünnungsreihe wurden in eine 96-well-Mikrotiterplatte überführt und 30 min bei 37°C mit den im Verhältnis 1:15 gemischten Reagenzien 2 und 1 inkubiert. Im Anschluss wurde der Farbumschlag bei 492 nm gemessen. Mittels der aus der Standardkurve resultierenden Trendlinie (Abb. 6) konnte nun die Protein-Konzentration des Viruslysats bestimmt werden.

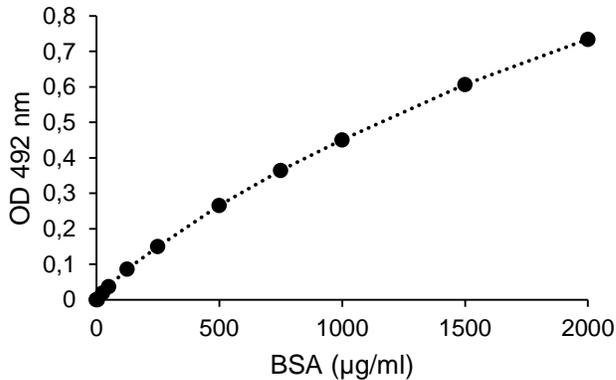


Abb. 6: BSA-Standardkurve in basischem Lysepuffer. Der Proteingehalt einer BSA-Verdünnungsreihe wurde colorimetrisch mittels einer abgewandelten Form des BCA-Protein-Assays analysiert und die daraus resultierende Geradengleichung erstellt.

PVM-spezifischer ELISA

Für die Detektion PVM-spezifischer Antikörper in Serum und BAL-Flüssigkeit wurde ein PVM-spezifischer indirekter *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) etabliert. Das verwendete PVM-Lysat hatte eine Konzentration von 10,3 mg/ml. Zur Beladung der Platten mit PVM-Lysat wurden Mikrotiterplatten (Corning® 96well) mit PVM-Lysat (25 ng Protein/well in 50 µl Carbonat-Puffer) über Nacht bei 4°C beschichtet. Nach dreimaligem Waschen mit PBST wurden verbliebene freie Bindungsstellen mit je 100 µl PBS/BSA 5% /well ebenfalls über Nacht bei 4°C geblockt. Nach zweimaligem Waschen mit PBST wurden Verdünnungsreihen (Doppelansätze) in Vierschritten der zuvor inaktivierten Proben in PBS und PBS allein als Leerwert in der Mikrotiterplatte angelegt und 1 h bei 4°C inkubiert. Die Seren wurden dabei initial 1:10 und anschließend bis 1:2560 verdünnt. Die BAL-Flüssigkeit wurde bis 1:256 verdünnt. PBS diente als Leerwert und wurde entsprechend den Proben behandelt und gefärbt. Nach dreimaligem Waschen wurde murine IgG-, IgM- und IgA-Antikörper mit HRP-konjugierten spezifischen Antikörpern (Verdünnung 1:2500 in 50 µl PBS pro well) 1 h bei RT im Dunkeln detektiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBST wurde die Menge an gebundenem Antikörper durch die Umsetzung des Chromogens, hier 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB, Enzygnost®, Siemens, Marburg), bestimmt. Das TMB wurde dazu im Verhältnis 1:10 mit dem dazugehörigen Substrat, Wasserstoffperoxid in Acetat-Puffer (Enzygnost®, Siemens, Marburg) verdünnt. Jede Vertiefung wurde mit 50 µl dieser Lösung beschickt und für 15 min bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde mit 50 µl/well Schwefelsäure 0,25 mol/l (Enzygnost®, Siemens, Marburg) gestoppt. Der Farbumschlag wurde sofort mittels des SpectraMax Pro 384 Microplate reader (Molecular Devices,

LLC, Sunnyvale, USA) bei 450 nm bestimmt. Zur Auswertung wurde der reziproke Wert der höchsten Verdünnung angegeben, deren Optische Dichte (OD) über der des Leerwertes (PBS) lag.

2.2.6 Generierung von rPVM-mCherry

2.2.6.1 Spezifische Mutagenese-PCR zur Herstellung und Amplifikation des *mCherry*-Gens

Die Methodik der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) dient der Amplifikation von spezifischen DNA-Fragmenten. Die Spezifität wird durch Primer festgelegt. Auch kann eine spezifische Mutagenese-PCR zur Herstellung definierter Mutationen eingesetzt werden. Mit Hilfe der hier verwendeten Primer wurde zusätzlich am Anfang und am Ende des offenen Leserahmens (ORF) von *mCherry*, welches für das Fluoreszenzprotein mCherry kodiert, eine *Agel*-Schnittstelle (2x 5bp) sowie Genstart des viralen N/P-Gens (GS, 15 bp) und Genende des viralen F-Gens (GE, 12 bp) eingeführt (analog zu (Krempl et al., 2007)). Das entstehende Produkt hatte eine Länge von 748bp. Für die Vervielfältigung und Verlängerung dieses Genabschnitts, wurde folgendes Protokoll verwendet:

Tab. 22: PCR-Ansatz und Cycler-Programm für die Vervielfältigung des *mCherry*-Gens inclusive GS, GE und die *Agel*-Schnittstelle.

Ansatz 50 µl		Programm	
50 ng	Plasmid (pTW22 <i>mCherry</i> 2A GFP)	94°C	hold
2,5 µl	0,1 µg/µl <i>mCherry</i> fw	98°C	30 s
2,5 µl	0,1 µg/µl <i>mCherry</i> rs	67°C	15 s
1 µl	dNTPs	72°C	20 s
0,5 µl	Phusion®HF DNA-Polymerase	72°C	5 min
10 µl	5x Reaktionspuffer HF	10°C	hold
32,5 µl	dH ₂ O		

2.2.6.2 Insertion des *mCherry*-Gens in die cDNA von PVM

Präparativer Enzymverdau von pPVM1 und des mCherry-PCR-Produkts

Für die Integration des neu generierten *mCherry*-Gens (inklusive GS, GE und *Agel*-Schnittstelle) in pPVM1 wurde ein präparativer Enzymverdau durchgeführt. Dabei wurden das Fragment sowie das Plasmid mit *Agel*-HF (NEB) verdaut, um kompatible DNA-Enden zu erhalten und um das Plasmid zu linearisieren. In folgender Tabelle sind die Ansätze für einen 50 µl-Verdau aufgeführt.

Tab. 23: Präparativer Enzymverdau des rPVM1-Plasmids und des *mCherry*-Fragments für die Ligation.

	pPVM1	mCherry
DNA	4 µl (2,88 µg)	29 µl
<i>Agel</i> -HF	1,5 µl	1,5 µl
Puffer 4	5 µl	5 µl
BSA	0,5 µl	0,5 µl
dH ₂ O	39 µl	13,5 µl

Der Enzymverdau wird über Nacht bei 37°C durchgeführt. Um eine spätere Religation zu vermeiden, wurde das linearisierte Plasmid pPVM1 zusätzlich dephosphoryliert. Zur Aufreinigung der entstandenen DNA-Produkte wurde das *PCR Purification Kit* (Qiagen, Hilden) gemäß den Angaben des Herstellers verwendet.

Gelelektrophorese zur Überprüfung von DNA-Produkten

Die Überprüfung der DNA-Produkte erfolgte mittels Gelelektrophorese. Dabei dienen analytische Gele der Visualisierung von Unterschieden in der Größe von Molekülen, hier DNA-Fragmenten. Präparative Gele werden hingegen zur Isolierung bestimmter Moleküle verwendet. Als Trägermaterial wird meist Agarose verwendet. Die Auftrennung der negativ geladenen DNA-Moleküle erfolgt in Richtung der positiv geladenen Anode.

Zur Analyse des *mCherry*-Fragments und des Plasmids pPVM1 wurde ein 1%iges Agarose-Gel gegossen. Die DNA wurde dabei mittels Ethidiumbromid-Lösung 0,07% nachgewiesen. Die Proben wurden entsprechend mit 10x DNA-Ladepuffer versetzt, resuspendiert und in die Taschen des Gels überführt. Zusätzlich wurden DNA-Marker zur Bestimmung der Fragmentgrößen (100 bp, 1 kb) aufgetragen. Das Agarose-Gel wurde an eine Stromquelle angeschlossen und je nach Größe des Agarose-Gels die

Spannung eingestellt (50 ml Gel: 90 Volt, 150 ml: 110 Volt). Die durch UV-Licht dargestellten DNA-Banden konnten nun aufgenommen werden (Abb. 7).

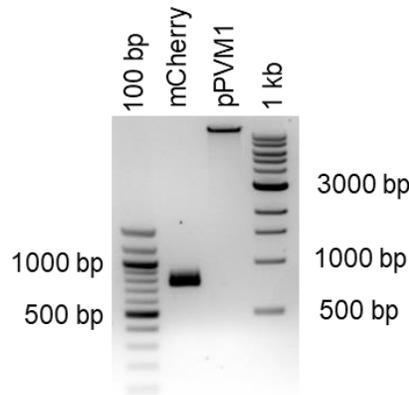


Abb. 7: Kontrolle der Plasmid-DNA von pPVM1 und des DNA-Fragments mCherry nach der Aufreinigung mit dem PCR Purification Kit der Firma Qiagen.

Ligation des mCherry-PCR-Fragments in das linearisierte pPVM1 und Transformation in E.coli

Die Ligation erfolgte unter Verwendung des *Rapid DNA Dephos and Ligation Kit* (Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, D) gemäß den Angaben des Herstellers. In der folgenden Tabelle sind die notwendigen Ansätze aufgelistet unter der Verwendung der Puffer und Ligase der Firma Roche. Der Vektor war das zuvor linearisierte pPVM1 und das Insert war das *mCherry*-Gen.

Tab. 24: Ansätze für die Ligation des mCherry-Gens in das rPVM1-Plasmid.

Ansatz	-Insert -Ligase	-Insert +Ligase	+Insert (mCherry) +Ligase
Vektor (pPVM1)	6,56 µl 1,44 µl dH ₂ O	6,56 µl 1,44 µl dH ₂ O	6,56 µl
Insert	-	-	1,06 µl 0,33 µl dH ₂ O
5x DNA-Dilutionpuffer	2 µl	2 µl	2 µl
2x Ligasepuffer	10 µl	10 µl	10 µl
T4-DNA-Ligase	-	1 µl	1 µl

Diese Reaktionsansätze wurden 40 min bei RT inkubiert.

Zur Vermehrung der ligierten Plasmide wurden kompetente Bakterien mittels Hitzeschock transformiert. Dafür wurden 3 µl eines Ligationsansatzes mit 2 µl dH₂O, 20 µl kompetente *Escherichia coli* (NEB 10-beta Competent (High Efficiency), New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, D) vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Danach folgte der Hitzeschock 45 s bei 42°C im Wasserbad. Die Bakterien wurden anschließend 2 min auf Eis abgekühlt und mit 180 µl S.O.C Medium versetzt. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37°C im Schüttler wurden die Bakterien auf Agarplatten ausgestrichen, die zu Selektierung des Plasmids pPVM-mCherry 50 µg/ml Ampicillin enthielten. Die Bakterienplatten wurden zwei Tage bei 32°C kultiviert.

Zur Identifizierung pPVM-mCherry positiver Bakterienkolonien wurden diese gepickt und über Nacht bei 32°C im Schüttler kultiviert. Die Plasmid-DNA wurde nach 24 h mittels dem *QIAprep®Spin Miniprep Kit* (Qiagen, Hilden) gemäß den Angaben des Herstellers isoliert und über einen analytischen Enzymverdau (*AgeI* und *PacI*) auf die Insertion des mCherry-PCR-Fragments in pPVM1 überprüft. Zwei Klone (Klon #3 und #10) wurden daraufhin ausgewählt und zur Gewinnung größerer Mengen an Plasmid-DNA in Maxikulturen vermehrt. Die Plasmid-DNA wurde nach einer 24 stündigen Inkubation bei 32°C mittels des *QIAGEN® Plasmid Maxi Kit* (Qiagen, Hilden) nach den Angaben des Herstellers isoliert.

Analytischer Enzymverdau zur Überprüfung des generierten pPVM-mCherry

Zur Kontrolle der generierten Plasmide wurde ein analytischer Restriktionsverdau der Plasmide durchgeführt. Die hier verwendeten Restriktionsenzyme waren *PacI*, *AccI*, *HindIII* und *NdeI*. Die Restriktionsverdaue wurden in 10 µl Ansätzen durchgeführt:

Tab. 25: Analytischer Enzymverdau zur Kontrolle von pPVM-mCherry

	<i>PacI</i> (NEB)	<i>HindIII</i> (Fermentas)	<i>AccI</i> (NEB)	<i>NdeI</i> (NEB)
DNA	2 µl	0,5 µl (500 ng)	0,5 µl (500 ng)	0,5 µl (500 ng)
Puffer	1 µl (Puffer 1)	1 µl (Puffer R)	1 µl (Puffer 4)	1 µl (Puffer 4)
Enzym	0,25 µl	0,5 µl	0,25 µl	0,25 µl

BSA	0,5 µl	-	-	-
dH ₂ O	6,5 µl	8 µl	8,25 µl	8,25 µl

Nach 4 h Inkubation bei 37°C wurden die Restriktionsverdauungen auf ein 1% Agarose-Gel aufgetragen und analysiert. Als Kontrolle dient das bereits etablierte Plasmid pPVM-GFP (Abb. 8).

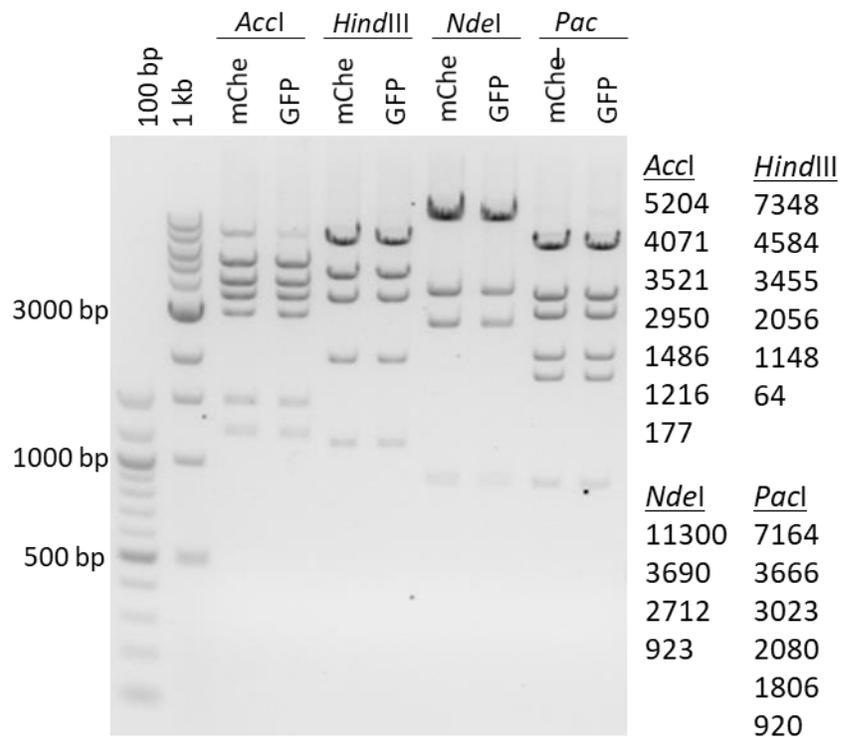


Abb. 8: Analytische Restriktionsverdauung von pPVM-mCherry (mCherry). Das bereits charakterisierte Plasmid pPVM-GFP wurde zur Kontrolle ebenfalls mit Accl, HindIII, NdeI und PacI analytisch verdaut, um die Plasmide auf ihre Richtigkeit zu überprüfen.

Die zu erwarteten Banden waren für pPVM-mCherry und pPVM-GFP identisch.

Sequenzierung zur Überprüfung der Nukleotidreihenfolge des mCherry-Gens im neu generierten pPVM-mCherry

Zur Analyse der richtigen Nukleotidreihenfolge wurde das mCherry-Gen im Plasmid pPVM-mCherry mittels des *BigDye™ Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit* (applied

biosystems, Waltham, USA) nach Angaben des Herstellers sequenziert. Als Primer wurden mCherry sequ fw bzw. mCherry sequ rs verwendet. Für die Sequenzierung wurde folgendes Protokoll verwendet:

Tab. 26: Ansatz für die Sequenzierung des mCherry-Gens mittels Sanger-Sequenzierung

Ansatz 5µl		Programm
DNA	1 µl (vorverdünnt auf ≈100 ng/µl)	96°C 30 s
BigDye (AB)	1 µl	50°C 15 s
Puffer	1 µl	60°C 4 min
Primer	0,5 µl	4°C hold
dH ₂ O	1,5 µl	

Anschließend wurden die PCR-Ansätze in der Diagnostik im Institut für Virologie aufgereinigt und sequenziert. Die Sequenzierungen wurden mit der DNASTAR Software (Lasergene) (DNASTAR, Inc., Madison, USA) ausgewertet.

Phenol-Chloroform-Extraktion zur Aufreinigung von pPVM-mCherry

Die Phenol-Chloroform-Extraktion dient der Entfernung von Proteinen und Endotoxinen aus DNA-Proben.

Dafür wurde die DNA (100 ng/µl) mit 10x Salzpuffer versetzt und mit je 0,5x Volumen Phenol und Chloroform vermischt. Die Proben wurden 5 min bei 16000 rcf und RT zentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit Chloroform vermischt. Nach nochmaligem Zentrifugieren wurde die wässrige Phase in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Die DNA wurde dann mit 2,5x Volumen 100% Ethanol ausgefällt und 20 min bei -20°C inkubiert. Nach 20 min Zentrifugation bei 4°C und 16000 rcf wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 70%Ethanol gewaschen. Nach weiteren 20 min Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das DNA-Pellet an der Luft getrocknet. Die DNA wurde in 20 µl dH₂O gelöst und die Konzentration mittels NANODROP 2000 Spectrophotometer bestimmt. Die Konzentration wurde auf 0,5 µg/µl eingestellt.

2.2.6.3 Gewinnung von rPVM-mCherry durch DNA-Transfektion

Für die Propagierung von rPVM-mCherry wurden BSRT7/5-Zellen ausgesät. Für die Transfektion wurden die Zellen zweimal mit Opti-MEM gewaschen und anschließend mit Opti-MEM 1 h bei 37°C inkubiert. Zur Vorbereitung der Plasmide wurden 20 µl der verwendeten Volle-Länge-Plasmide von PVM (hier pPVM-mCherry #3, pPVM-mCherry #10) in 4 ml Röhrchen für Doppelansätze vorgelegt und ein Mastermix der Support-Plasmide vorbereitet.

Tab. 27: Ansatz für die Transfektion von BSRT7/5-Zellen für die Virusherstellung

Support-Plasmid	Konzentration	Menge in µl
pTMpvmN	0,5µg µl	4
pTMpvmP		4
pTMpvmL		2
pTMpvmM2-1		2
Opti-MEM		78
	Gesamt	180

Der Mastermix wurde nun mit dem Plasmid vereinigt (Endvolumen 200 µl). das LipofectAmine2000 wurde entsprechend dem Protokoll verdünnt und mit der Plasmid-Lösung vereinigt und für 20 min inkubiert. Für die Transfektion wurde das Medium von den Zellen entfernt und diese mit der Plasmid-Lösung und weiterem Opti-MEM überschichtet. Die Zellen wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen zweimal mit GMEM-Erhaltungsmedium gewaschen und bei 32°C für drei weitere Tage inkubiert.

Anschließend wurden 500 µl des Überstandes auf Vero-Zellen, ausgesät in 6-well-Platten, übertragen und für drei Stunden inkubiert. Das Medium wurde dann vollständig entfernt und die Zellen mit 0,8% Methylcellulose-EMEM überschichtet. Der verbleibende Überstand wurde abgenommen und mit HEPES/MgSO₄ 10x vermischt und in Aliquots kryokonserviert (Passage 0). Die verbleibenden BSRT7/5-Zellen wurden in 3 ml frischem GMEM-Erhaltungsmedium resuspendiert und mit 1 ml einer BHK-21-Zellsuspension vermischt. Die Zellen wurden anschließend bei 32°C für 6 Tage mit

zweimaligem Mediumwechsel ko-kultiviert. Die weitere Viruspropagierung und Virusisolation wurde wie unter Kap. 2.2.2.1 und Kap.2.2.2.3 beschrieben durchgeführt.

2.2.6.4 Überprüfung der mCherry-Sequenz in rPVM-mCherry

Isolierung zellulärer RNA aus rPVM-mCherry-infizierten BHK-21-Zellen

Zur Gewinnung zellulärer und viraler RNA wurde das *High Pure RNA Isolation Kit* (Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, D) verwendet. Die sedimentierten Zellen (2×10^7 Zellen) wurden in 2 ml PBS resuspendiert. 10^6 Zellen wurden anschließend gemäß Protokoll des Herstellers lysiert und die RNA isoliert.

RT-PCR zur Generierung von cDNA aus zellulärer RNA nach rPVM-mCherry-Infektion

Für die RT-PCR wurde die RevertAid™H Minus Reverse Transcriptase (Fermentas - Thermo Fisher Scientific Corp., Waltham, USA) verwendet. Der PCR-Ansatz und das Programm sind in Tab. 28 dargestellt.

Tab. 28: Ansatz und Cycler-Programm für die RT-PCR zellulärer RNA nach rPVM-mCherry-Infektion

Ansatz 20 µl			Program m	
1.Schritt	RNA	5 µl	65°C	5 min (1.Schritt)
	Random Hexamers	1 µl (200 µg)	4°C	5 min (2.Schritt)
	dH ₂ O	12,5 µl	25°C	10 min
2.Schritt	5xReaktionspuffer	4 µl	50°C	60 min
	RNase-Inhibitor	0,5 µl	4°C	10 min (+2 U RNase H)
	dNTPs (Thermo Sc)	2 µl	37°C	20 min
	Reverse Transkriptase	1 µl	70°C	10 min

Nach der reversen Transkription wurde die verbliebene RNA mittels Zugabe von RNase H verdaut.

Die entstandene DNA wurde auf das Vorhandensein des mCherry-Gens und dessen richtiger Nukleotidreihenfolge mittels PCR (siehe Kap. 2.2.6.1) und anschließender Sequenzierung (siehe Kap. 2.2.6.2) überprüft.

2.2.7 Statistische Auswertungen

Statistische Auswertungen wurden durchgeführt, wenn die zu vergleichenden Gruppen mehr als 3 Datenpunkte hatten. One-way ANOVA mit *multiple comparison* und Dunnets-Test wurde verwendet, um Unterschiede innerhalb einer Mauslinie an verschiedenen Zeitpunkten mit PBS-infizierten Kontrolltieren zu erkennen. Two-way ANOVA mit anschließendem Bonferroni-Test wurden zur Bestimmung signifikanter Unterschiede zwischen mehr als zwei Gruppen verwendet. Der t-Test wurde zur Bestimmung signifikanter Unterschiede zwischen zwei Gruppen (z.B. PBS- vs. PVM 15-infiziert) verwendet. Die Signifikanz wurde als $p < 0,5$ definiert. Für alle statistischen Auswertungen wurde die GraphPad PRISM (GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA) verwendet.

3. ERGEBNISSE

3.1 Spatiotemporale Analyse einer PVM-Infektion und der daraus resultierenden Immunantwort

3.1.1 Rekrutierungsmuster verschiedener T-Zellpopulationen während einer subletalen PVM-Infektion

In vorangegangenen Arbeiten wurde bereits die T-Zellantwort nach einer subletalen PVM-Infektion untersucht (Frey et al., 2008). Ein Ziel meiner Arbeit war es, diese vorangegangenen Arbeiten auf andere Immunzellpopulationen auszuweiten, d.h. es wurden neben T-Zellen auch B-Lymphozyten, sowie Zellpopulationen der angeborenen Immunantwort, wie NK-Zellen, neutrophilen Granulozyten, eosinophilen Granulozyten und Alveolarmakrophagen (AM Φ), nach einer PVM-Infektion untersucht. Für die Infektion wurde überwiegend ein rekombinantes PVM mit einem eingebrachten *GFP*-Gen, welches für GFP kodiert (rPVM-GFP) verwendet. Zellen, die mit diesem „Reporter“-Virus infiziert werden, können ohne weitere Färbung, z.B. bei fluoreszenzmikroskopischen Methoden, dargestellt werden.

Für die Versuche wurden C57BL/6-Mäuse mit 1000 Pfu rPVM-GFP infiziert und die Lungen für durchflusszytometrische und fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen präpariert und bearbeitet. Für eine bessere Vergleichbarkeit der beiden Methoden war es notwendig, Tiere mit dem gleichen rekombinanten Virusisolat zu infizieren, da GFP selbst ein Immunogen darstellt. Nach der Infektion wurden die Tiere über 14 Tage täglich gewogen und zusätzlich wurde die klinische Symptomatik visuell bestimmt (nicht gezeigt). Einige Tiere wurden jeweils an den Tagen 2, 4, 7, 10 und 14 p.i. getötet und die Lunge mittels PFA fixiert und für immunhistologische Färbungen aufgearbeitet. Für durchflusszytometrische Untersuchungen des infizierten Gewebes wurde das Bronchoalveolarlumen gespült (Bronchoalveoläre Lavage, BAL) und anschließend aus

der verbliebenen Lunge (post-Lavage) Immunzellpopulationen aus dem Lungenparenchym isoliert (Abb. 9A).

Der Gewichtsverlauf (ausgedrückt in % relativ zum Ausgangsgewicht an Tag 0), als Parameter für den Krankheitsverlauf, entsprach dem bekannten Verlauf nach Infektion mit dem Referenzstamm PVM 15: bis Tag 6 p.i. wurde weder ein relevanter Gewichtsverlust beobachtet, noch zeigten sich klinische Symptome (nicht dargestellt). Zwischen Tag 7 und Tag 10 p.i. verloren die Tiere stetig bis zu 20% ihres Ausgangsgewichts. Da die Infektionsdosis einer nicht-letalen Dosis entsprach, erholten sich die Tiere ab Tag 10-11 p.i. und erreichten an Tag 14 p.i. überwiegend wieder das Ausgangsgewicht (Abb. 9B).

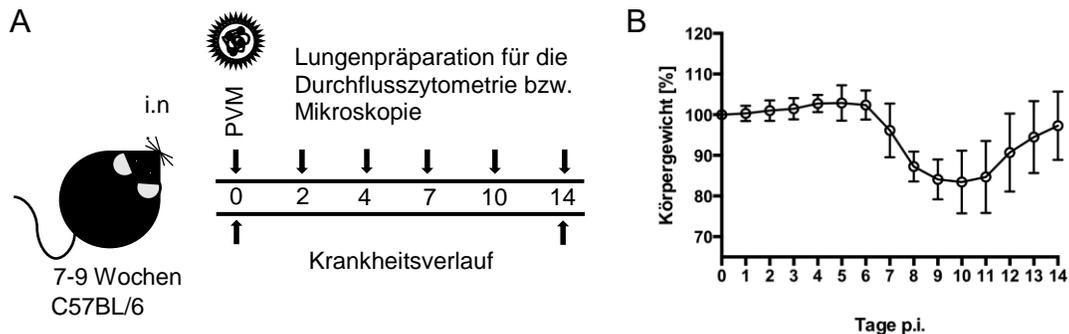


Abb. 9: Verlauf einer PVM-Infektion in C57BL/6-Mäusen. (A) Schematische Darstellung der Versuchsdurchführung. C57BL/6-Mäuse wurden an Tag 0 mit rPVM-GFP infiziert. An den Tagen 2, 4, 7, 10 und 14 p.i. wurden Tiere getötet und die Lungen für durchflusszytometrische und fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen präpariert. (B) Krankheitsverlauf der Tiere während einer PVM-Infektion über einen Zeitraum von 14 Tagen. C57BL/6-Mäuse wurden mit 1000 Pfu rPVM-GFP intranasal infiziert und das Gewicht täglich bestimmt.

Untersucht wurde weiterhin die absolute Zellzahl von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen im Interstitium der Lunge (post-Lavage) und im Bronchoalveolarlumen zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Infektion. Die absolute Zellzahl der CD8⁺ T-Zellen im Lungenparenchym stieg von durchschnittlich 1,2*10⁶ Zellen/Lunge an Tag 2 p.i. um das 7,3fache auf durchschnittlich 8,8*10⁶ Zellen/Lunge an Tag 10 p.i. an. Danach blieb die Zellzahl bis Tag 14 unverändert (Abb. 10A). Im Bronchoalveolarlumen konnte ebenfalls ein Anstieg der CD8⁺ T-Zellen bis Tag 10 p.i. festgestellt werden. Neben den CD8⁺ T-Zellen wurden auch CD4⁺ T-Zellen verstärkt in das Lungenparenchym rekrutiert. Bis Tag 14 p.i. stieg die absolute Zellzahl um das 2,7fache von 1,4*10⁶ Zellen/Lunge auf

$3,9 \cdot 10^6$ Zellen/Lunge an (Abb. 10C). $CD4^+$ T-Zellen traten außerdem vermehrt im Bronchoalveolarlumen an den Tagen 10 und 14 p.i. auf. Die Analyse des prozentualen Anteils der $CD8^+$ T-Zellen innerhalb der $CD3^+$ T-Zell-Population ergab einen Anstieg um fast das Doppelte, von 45% auf 80% im Interstitium, bzw. von 31% auf 90% im Bronchoalveolarlumen. Dagegen nahm der prozentuale Anteil an $CD4^+$ T-Zellen im Interstitium von ursprünglich 55% auf rund 20% an Tag 10 p.i. ab und stieg erst wieder gegen Tag 14 p.i. leicht an. Eine noch stärkere Abnahme gab es im Bronchoalveolarlumen, von fast 70% $CD4^+$ T-Zellen auf weniger als 10% (Abb. 10E und F).

Zusammenfassend wurden sowohl $CD8^+$ zytotoxische T-Zellen als auch $CD4^+$ T-Helferzellen aktiv in die Lunge rekrutiert. Dieses Rekrutierungsmuster ist jedoch nur anhand der absoluten Zellzahl erkennbar. Diese Ergebnisse entsprechen damit den vorangegangenen Daten (Frey et al., 2008). Zusätzlich zeigt sich, dass das allgemeine Rekrutierungsmuster von T-Zellen nach einer Infektion mit rPVM-GFP vergleichbar ist mit einer Infektion mit PVM 15. Aus den Daten lässt sich jedoch nicht ableiten, welcher Subpopulation, z.B. Th1, Th2, T_{reg} , Th17, oder Th9, die $CD4^+$ T-Zellen entsprechen. Dazu müssten diese über weitere Nachweise von Linien-bestimmenden Transkriptionsfaktoren und Zytokinsynthese charakterisiert werden.

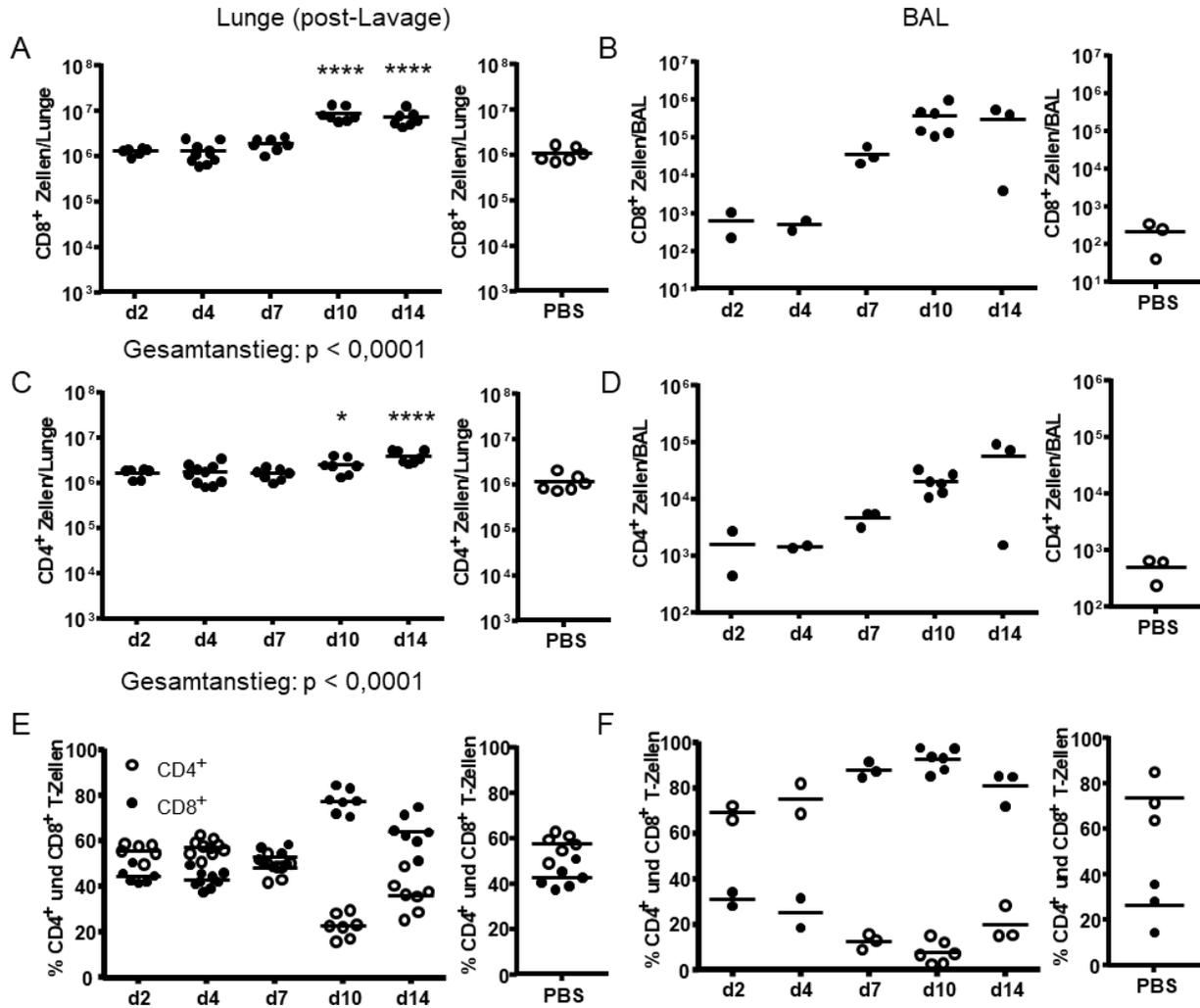


Abb. 10: T-Zellantwort nach PVM-Infektion im Interstitium der Lunge und im Bronchoalveolarlumen. (A-F) C57BL/6-Mäuse wurden mit 1000 Pfu rPVM-GFP oder mit PBS als Kontrolle intranasal infiziert und an den Tagen 2, 4, 7, 10 und 14 p.i. getötet. Die Lungen wurden lavagiert (BAL) und das Lungenparenchym (A,C,E), sowie die Zellen aus der BAL (B,D,F) für die durchflusszytometrische Untersuchung vorbereitet. Die T-Lymphozyten wurden mittels Färbepanel I (siehe Kap. 2.2.5.2) mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern gefärbt und nach Fixierung durchflusszytometrisch analysiert. Jeder Datenpunkt in den Graphen A, C und E, sowie für Tag 10 der Graphen B, D und E repräsentiert die Zellen von je einer einzelnen Maus. Für die Datenpunkte an den Tagen 2, 4, 7 und 14 der Graphen B, D und F wurden die Zellen von je zwei Tieren vereinigt. Die Datenpunkte stammen aus zwei oder mehr unabhängigen Versuchen. Statistische Auswertungen wurden durchgeführt, wenn die zu vergleichenden Gruppen mehr als 3 Datenpunkte hatten. Statistische Auswertung: One-Way-ANOVA mit multiple comparison und Dunnett-Test gegen die jeweilige PBS-Kontrolle; (*) p < 0.05, (****) p < 0.0001; Gesamtanstieg: One-Way-ANOVA mit multiple comparison und Bonferroni-Test gegen Tag 2 p.i..

Zur spatiotemporalen Darstellung der Rekrutierung und Verteilung von T-Zellen im Verhältnis zur Infektion in der Lunge wurden Tiere an den Tagen 2, 7, 10 und 14 p.i. getötet und die Lunge durch Instillation von 4% PFA fixiert. In Kryo-Gewebeschnitten (8 µm) wurden die jeweiligen T-Zellpopulationen durch Färbung mit Antikörpern gegen

CD8 β und CD4 angefärbt. Die infizierten Zellen konnten anhand ihrer endogenen GFP-Expression detektiert werden.

In Abb. 11 ist deutlich die fortschreitende Vermehrung von rPVM-GFP über einen Zeitraum von 7 Tagen in den Epithelzellen der Lunge zu erkennen. Eine Abnahme der GFP-Expression an den Tagen 10 und 14 p.i. zeigt die Reduktion virusinfizierter Zellen. Außerdem korreliert die Eliminierung von GFP⁺ Zellen mit einer starken Zunahme von CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen im Gewebe, welche ihren Höhepunkt an Tag 10 p.i. erreicht (Abb. 11A und B). Beide Zelltypen waren aber bereits vor der eigentlichen Infektion und bis Tag 7 p.i., dem Höhepunkt der Virusvermehrung, nur vereinzelt im Lungengewebe vorhanden. Die CD8⁺ T-Zellen waren gleichmäßig über den gesamten Schnitt verteilt, sowie vermehrt peribronchial (Abb. 11A). Die CD8⁺ T-Zellen befanden sich zum Höhepunkt ihrer Rekrutierung im Interstitium, sowie in den Alveolen in infizierten und nicht-infizierten Arealen des Gewebes. CD4⁺ T-Helferzellen waren an Tag 10 p.i. hauptsächlich im umliegenden Gewebe von kleineren und größeren Blutgefäßen zu beobachten. An Tag 14 p.i. konnten CD4⁺ T-Helferzellen weiterhin in der Umgebung von Blutgefäßen, aber auch im umgebenden Gewebe von Bronchien/Bronchiolen detektiert werden, wo sie Foki bildeten (Abb. 11B). Insgesamt reflektieren die hier beschriebenen Beobachtungen das von Frey et al. 2013 beschriebene spatiotemporale Rekrutierungsmuster von rPVM-GFPgp33-spezifischen CD8⁺ T-Zellen. Zusätzlich konnte in dieser Arbeit das Rekrutierungsmuster von CD4⁺ T-Zellen beobachtet werden (Abb. 10 und Abb. 11).

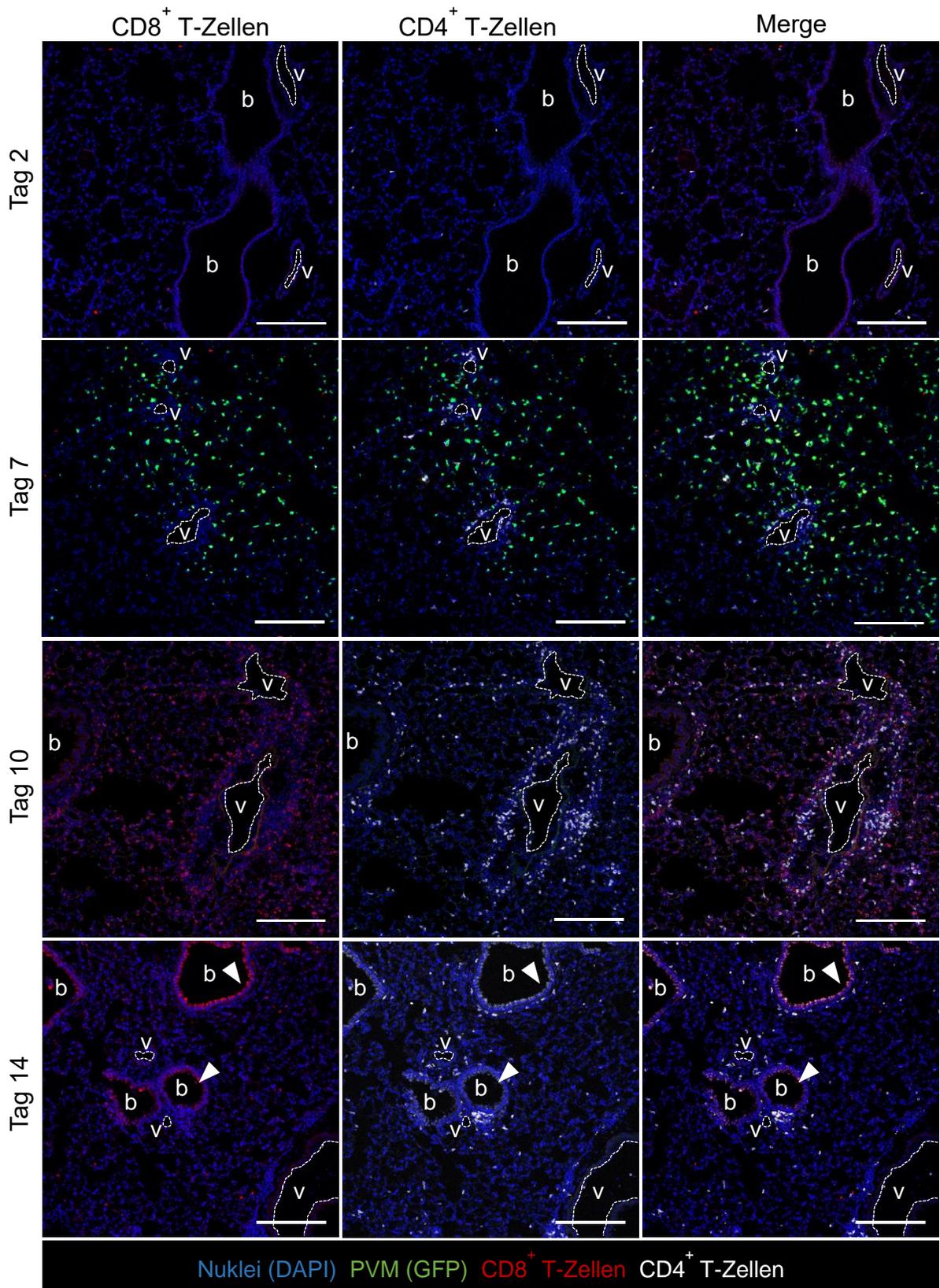


Abb. 11: Rekrutierung von T-Zellpopulationen während einer PVM-Infektion. C57BL/6-Mäuse wurden mit 1000 Pfu rPVM-GFP infiziert, an den Tagen 2, 7, 10 und 14 p.i. mittels CO₂ getötet und die Lungen durch Instillation von PFA 4% fixiert. Nach Entwässerung und Einbettung in Tissue Tek® O.C.T.™ wurden 8 µm dicke Kryoschnitte der Organe angefertigt. Die Lungenschnitte wurden mit Antikörpern gegen CD8β (Sekundärantikörper: Alexa®Fluor555 anti-Ratte IgG) sowie CD4 (konjugiert mit Alexa®Fluor647) gefärbt. Infizierte Zellen konnten durch die Expression von GFP nachgewiesen werden. Alle Schnitte wurden zur Identifizierung von Zellkernen mit DAPI behandelt. Je eine Maus wurde repräsentativ für je einen untersuchten Tag ausgewählt. Maßbalken 200 µm; (v) Blutgefäß; (b) Bronchien/Bronchiolen; (►) Autofluoreszenz des Gewebes

3.1.2. Spatiotemporale Rekrutierung von B-Lymphozyten nach PVM-Infektion

Neben den verschiedenen T-Zellpopulationen bilden B-Lymphozyten einen erheblichen Anteil der adaptiven Immunantwort im Lungengewebe. Die Untersuchungen zu diesem Zelltyp im Hinblick auf Rekrutierungsmuster und deren Bedeutung während einer Pneumovirus-Infektion sind jedoch nur unzureichend analysiert und konzentrieren sich eher auf die Synthese von Antikörpern.

Zur Bestimmung der absoluten Zellzahlen der B220⁺ B-Zellen in der Lunge wurden C57BL/6-Mäuse mit 300 Pfu PVM 15 infiziert, an den Tagen 2, 4, 10 und 14 p.i. getötet und die Lungen lavagiert (BAL). Das verbleibende Lungengewebe (post-Lavage) wurde entnommen und eine Einzelzellsuspension hergestellt. Zusammen mit den Zellen aus dem Bronchoalveolarlumen wurden diese mittels der Antikörper des Färbepanel I (Kap. 2.2.5.2) gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert: nach Fokussierung auf vitale, CD45⁺ Zellen, wurden B-Zellen anhand ihrer Größe im FSC/SSC, dem Ausschluss von Nk-1.1⁺ und CD3⁺ Zellen und der Expression von B220 auf der Oberfläche identifiziert. B220, auch als CD45R bezeichnet, wird ab dem Stadium des unreifen B-Lymphozyten bis zum Plasmazellstadium auf der Zelloberfläche exprimiert, wobei Plasmazellen durch eine geringere B220-Expression gekennzeichnet sind (Oracki et al., 2010). Mittels dieser Strategie konnte ausgeschlossen werden, dass B220⁺ pDZ das Ergebnis beeinflussen.

Im Infektionsverlauf konnte im Lungeninterstitium PVM-infizierter Mäuse eine geringe Zunahme von B220⁺ Zellen bis Tag 10 p.i. beobachtet werden. Im Vergleich zu PBS-infizierten Kontrolltieren war die Anzahl von B220⁺ Zellen um das 2,1fache von $3,9 \cdot 10^6$ Zellen/Lunge auf $8,4 \cdot 10^6$ Zellen/Lunge gesteigert (Abb.12A). Im Bronchoalveolarlumen kam es ebenfalls bis Tag 10 p.i. zu einem Anstieg der B-Zellen von $2 \cdot 10^2$ Zellen/Lunge auf $8 \cdot 10^3$ Zellen/Lunge und blieb anschließend konstant bis Tag 14 p.i. Aufgrund der zu

geringen Menge an Datenpunkten für das Bronchoalveolarlumen wurde hier keine statistische Analyse durchgeführt.

Für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen wurden C56BL/6-Mäuse mit rPVM-GFP infiziert, an den Tagen 2, 7, 10 und 14 p.i. getötet und die Lungen durch Instillation von PFA (4%) fixiert. Die, wie in Kap. 2.2.5.1 beschrieben, angefertigten Gewebeschnitte wurden nun mit Antikörpern gegen B220, konjugiert mit Alexa®Fluor647 und CD4 (Sekundärantikörper: Anti-Ratte IgG AlexaFluor® 555) gefärbt. Mit Hilfe eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops wurden die Schnitte analysiert.

Schon ab Tag 2 p.i. konnten B220⁺ B-Zellen vereinzelt und diffus gestreut im Lungengewebe nachgewiesen werden. Im Verlauf der Infektion wurden diese Zellen dann ab Tag 7 p.i. zunehmend in die Lunge rekrutiert. Dabei lokalisierten die B-Zellen, zusammen mit CD4⁺ T-Zellen (Abb.12C). An Tag 10 p.i. befinden sie sich hauptsächlich perivaskulär, was indikativ für eine Migration beider Zelltypen in das Lungengewebe spricht. Später im Infektionsverlauf (Tag 14 p.i.) waren beide Zellpopulationen nun mehr peribronchial lokalisiert (Abb.12C). Dies könnten erste Anzeichen eines tertiären lymphoiden Gewebes darstellen, in welchem B-Lymphozyten mit Hilfe von CD4⁺ T-Zellen maturieren (iBALT).

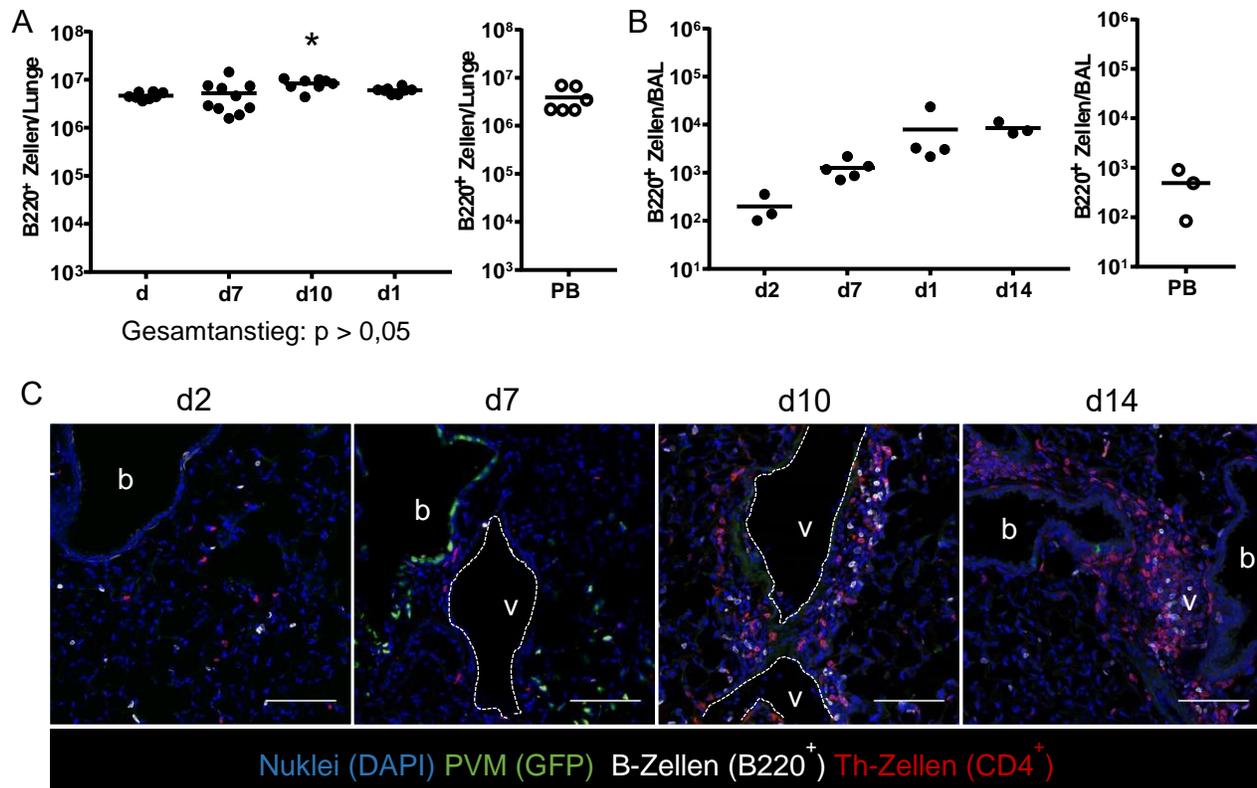


Abb. 12: Rekrutierung von B-Lymphozyten in das perivaskuläre Gewebe und Co-Lokalisierung mit T-Helferzellen. (A,B) C57BL/6-Mäuse wurden mit 300 Pfu PVM 15 intranasal infiziert bzw. Kontrollgruppen mit PBS mock-infiziert. An den Tagen 2, 7, 10 und 14 p.i. wurden die Tiere getötet. Die Lungen wurden lavagiert, anschließend entnommen und eine Einzelzellsuspension des Lungenparenchyms hergestellt (A), und diese, sowie die Zellen aus der BAL (B, BAL), für die durchflusszytometrische Untersuchung vorbereitet. Die B-Lymphozyten wurden mittels Färbepanel I (Kap. 2.2.5.2) gefärbt und nach Fixierung durchflusszytometrisch analysiert. Jeder Datenpunkt in Graph A, repräsentiert die Zellen von je einer einzelnen Maus. Für die Datenpunkte des Graphen B wurden die Zellen von je zwei Tieren vereinigt. Die Datenpunkte stammen aus zwei oder mehr unabhängigen Versuchen. Statistische Auswertungen wurden durchgeführt, wenn die zu vergleichenden Gruppen mehr als 3 Datenpunkte hatten. Statistische Auswertung: One-Way-ANOVA mit multiple comparison und Dunnett-Test gegen die jeweilige PBS-Kontrolle;(*) $p < 0,05$; Gesamtanstieg: One-Way-ANOVA mit multiple comparison und Bonferroni-Test gegen Tag 2 p.i.. (C) C57BL/6-Mäuse wurden mit 1000 Pfu rPVM-GFP infiziert, an den Tagen 2, 7, 10 und 14 pi mittels CO₂ getötet und die Lungen durch Instillation von PFA 4% fixiert. Nach Entwässerung und Einbettung in Tissue Tek® O.C.T.™ wurden 8 µm dicke Kryoschnitte der Lunge angefertigt und mit Antikörpern gegen B220, konjugiert mit Alexa®Fluor647, und CD4 (Sekundärantikörper: Anti-Ratte IgG AlexaFluor® 555) gefärbt. Infizierte Zellen konnten durch die Expression von GFP nachgewiesen werden. Alle Schnitte wurden zur Identifizierung von Zellkernen mit DAPI behandelt. Die Kryoschnitte je einer Maus wurde repräsentativ für je einen untersuchten Tag ausgewählt. Maßbalken 100 µm; (v) Blutgefäß; (b) Bronchien/Bronchiolen.

3.1.3. Die Rekrutierung von Zellen der angeborenen Immunantwort geschieht parallel bzw. verzögert zur Virusvermehrung

Der Verlauf sowie die Bedeutung der angeborenen Immunantwort während einer Pneumovirus-Infektion sind noch nicht vollständig entschlüsselt. NK-Zellen, neutrophile und eosinophile Granulozyten spielen in verschiedenen Infektionskrankheiten eine

entscheidende Rolle und tragen teilweise auch zur Pathogenese bei. Zur Analyse dieses Sachverhalts wurden C57BL/6-Mäuse mit 1000 Pfu rPVM-GFP infiziert und die Rekrutierung von Zellpopulationen der angeborenen Immunantwort in die Lunge an den Tagen 2, 4, 7, 10 und 14 p.i. mittels durchflusszytometrischer Analysen untersucht. NK-Zellen wurden dabei als CD3⁻ und NK1.1⁻ definiert und neutrophile Granulozyten wurden über die Expression von Ly-6G abgegrenzt.

NK-Zellen wurden verstärkt ab dem Tag der Infektion bis Tag 7 p.i. in das Lungengewebe und das Bronchoalveolarlumen rekrutiert. In Abb. 13A ist erkennbar, dass die absolute Anzahl der NK-Zellen während einer Infektion bis Tag 7 p.i. im Lungenparenchym um das Doppelte von $1,7 \cdot 10^6$ Zellen/Lunge auf $3 \cdot 10^6$ Zellen/Lunge im Vergleich zu PBS-infizierten Tieren anstieg. Im Bronchoalveolarlumen erhöhte sich die absolute Zellzahl an Tag 7 p.i. sogar um das 25-fache von $3,1 \cdot 10^3$ auf $8,1 \cdot 10^4$ Zellen (Abb. 13B). Durch Ermangelung an genügenden Datenpunkten wurde hier auf die statistische Analyse verzichtet. Ab Tag 7 p.i. reduzierte sich die absolute Anzahl der NK-Zellen im Interstitium und im Bronchoalveolarlumen wieder auf $2,9 \cdot 10^6$ Zellen/Lunge, bzw. $2,7 \cdot 10^6$ Zellen/Lunge an Tag 14 p.i.. Die Rekrutierung von NK-Zellen in die Lunge korrelierte damit mit dem normalen Verlauf der Viruslastentwicklung mit dem Höhepunkt an Tag 7 p.i. (Frey et al., 2008).

Die maximale Zellzahl an neutrophilen Granulozyten im Lungeninterstitium war an Tag 7 p.i. zu erkennen. Hier stieg die absolute Zellzahl um das 2,9-fache von $6,9 \cdot 10^5$ Zellen/Lunge an Tag 2 p.i. auf $2 \cdot 10^6$ Zellen/Lunge an. Im Bronchoalveolarlumen schien die absolute Anzahl der neutrophilen Granulozyten bereits Tag 2 p.i. im Vergleich zu der Zellzahl in nicht-infizierten Lungen leicht erhöht, und fiel auffälliger Weise im Verlauf der Infektion an Tag 4 p.i. auf das Niveau der PBS-infizierten Kontrolltiere zurück. Erst danach stieg die Zellzahl dieses Zelltyps bis zum Maximalwert an Tag 10 p.i. um das 50-fache auf $1,3 \cdot 10^4$ Zellen/Lunge im Vergleich zu den PBS-infizierten Kontrollmäuse, bzw. der Zellzahl an Tag 4 p.i. an (Abb. 13C und D), wonach die Zellzahl wieder bis Tag 14 auf $2 \cdot 10^3$ Zellen/Lunge reduziert wurde. Dies könnte auf ein zweiphasiges Rekrutierungsmuster von neutrophilen Granulozyten in das Bronchoalveolarlumen der Lunge hinweisen. Die um drei Tage verschobenen Rekrutierungshöhepunkte von

neutrophilen Granulozyten in das Interstitium (Tag 7p.i.) und in das Bronchoalveolarlumen (Tag 10p.i.) könnte die Migrationsrichtung der Zellen reflektieren.

Mittels Fluoreszenzmikroskopie konnten die Rekrutierung und die Lokalisierung der neutrophilen Granulozyten in der Lunge visualisiert werden. Ein Anstieg dieses Zelltyps im Bronchoalveolarlumen konnte hier nur bis Tag 7 p.i. ermittelt werden, was eher dem Rekrutierungsmuster in Abb. 13C in das Interstitium entspricht, nicht aber dem Rekrutierungsmuster in das Bronchoalveolarlumen (Abb. 13D). Dabei lokalisierten die neutrophilen Granulozyten nicht nur in infizierten Arealen der Lunge, sondern auch in GFP-negativen Arealen des Gewebes (Abb. 13E).

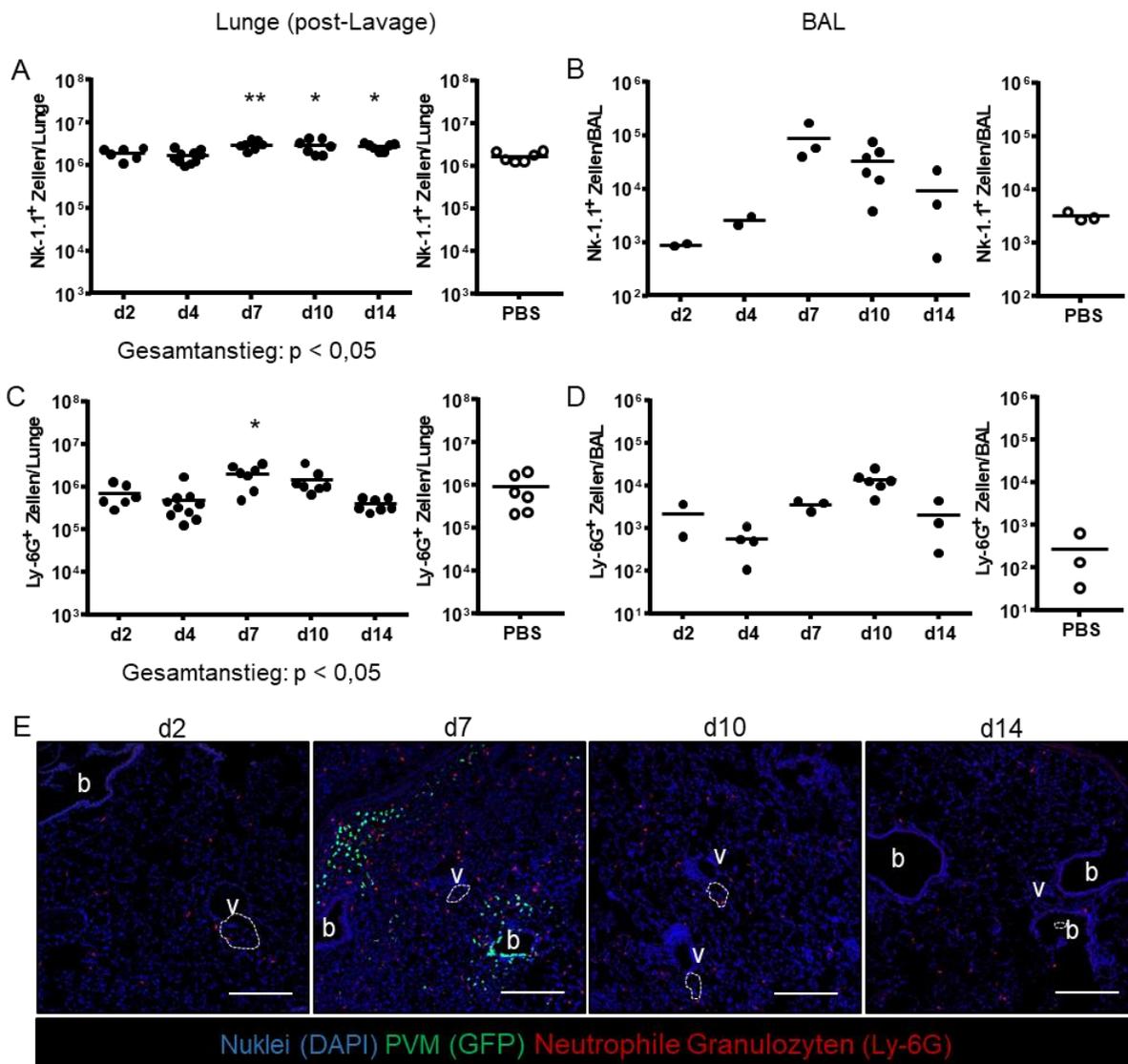


Abb. 13: Rekrutierung von natürlichen Killerzellen und neutrophilen Granulozyten während einer PVM-Infektion in die Lunge. C57BL/6-Mäuse wurden intranasal mit 1000 Pfu rPVM-GFP infiziert, bzw. Kontrollgruppen mit PBS mock-infiziert, und an den Tagen 2, 4, 7, 10 und 14 p.i. getötet. (A-D) Die Lungen wurden lavagiert (BAL), anschließend entnommen und eine Einzelzellsuspension des Lungenparenchyms hergestellt (A,C) und diese, sowie die Zellen aus der BAL (B,D), für die durchflusszytometrische Untersuchung vorbereitet. Die NK-Zellen wurden mittels dem Färbepanel I und die neutrophilen Granulozyten mittels Färbepanel II (Kap.2.2.5.2) mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern gerichtet gegen murines Nk-1.1 und Ly-6G gefärbt und nach Fixierung durchflusszytometrisch untersucht. Jeder Datenpunkt in den Graphen A und C sowie für Tag 10 der Graphen B und D repräsentiert die Zellen je einer einzelnen Maus. Für die Datenpunkte an den Tagen 2, 4, 7 und 14 der Graphen B, D wurden die Zellen von je zwei Tieren vereinigt. Die Datenpunkte stammen aus zwei oder mehr unabhängigen Versuchen. Statistische Auswertungen wurden durchgeführt, wenn die zu vergleichenden Gruppen mehr als 3 Datenpunkte hatten. Statistische Auswertung: One-Way-ANOVA mit multiple comparison und Dunnets-Test gegen die jeweilige PBS-Kontrolle; (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$; Gesamtanstieg: One-Way-ANOVA mit multiple comparison und Bonferroni-Test gegen Tag 2 p.i. (E) An den Tagen 2, 7, 10 und 14 p.i. wurden Mäuse mittels CO₂ getötet. Die Lungen wurden wie zuvor beschrieben fixiert und aufbereitet. Anschließend wurden Kryoschnitte (8 µm) der Organe angefertigt. Die Lungenschnitte wurden mit einem Antikörper gegen Ly-6G, konjugiert mit Alexa®Fluor647, gefärbt. Infizierte Zellen konnten durch die Expression von GFP nachgewiesen werden. Zellkerne wurden mithilfe einer DAPI-Färbung dargestellt. Die Kryoschnitte einer Maus wurden repräsentativ für alle untersuchten Tiere ausgewählt. Maßbalken 100 µm; (v) Blutgefäß; (b) Bronchien/Bronchiolen.

Eosinophile Granulozyten haben zum einen immunologische Effektorfunktionen, zum anderen dienen sie auch der Geweberegeneration oder der Umbildung von Geweben nach einer bereits erfolgten Immunantwort (Hogan et al., 2008). Während einer Pneumovirusinfektion ist ihre Rolle jedoch umstritten und nicht eindeutig definiert (Kap. 1.3.5.2). In den folgenden Untersuchungen wurde nun die Rekrutierung dieser Zellpopulation in die Lungen von naiven C57BL/6-Mäusen nach vorheriger rPVM-GFP-Infektion analysiert. Es war hier von Bedeutung, dass die Tiere naiv waren, da eosinophile Granulozyten häufig erst nach wiederholter Antigenstimulation sehr stark in das betroffene Gewebe rekrutiert werden (z.B. Asthma, (Hogan et al., 2008)). Eosinophile Granulozyten wurden als CD11c⁻ und SiglecF⁺ charakterisiert.

Die absolute Zellzahl eosinophiler Granulozyten sowohl im Interstitium, als auch im Bronchoalveolarlumen war zwischen Tag 2 und Tag 7 p.i. eher konstant und stieg erst danach bis Tag 14 p.i. an. Dabei war an Tag 2 p.i. die Zellzahl in beiden Kompartimenten etwas erhöht im Vergleich zu mock-infizierten Tieren. Nach Tag 7 p.i. stieg die Zellzahl eosinophiler Granulozyten im Lungengewebe bis Tag 14 p.i. um das 4-fache von $3 \cdot 10^5$ Zellen/Lunge auf $1,3 \cdot 10^6$ Zellen im Vergleich zu den PBS-infizierten Kontrollmäusen, bzw. im Vergleich zu Tag 2 p.i. von $5,1 \cdot 10^5$ Zellen/Lunge um das 2,5fache an (Abb. 14A). Durch die Rekrutierung in das Bronchoalveolarlumen nach Tag 7 p.i. war eine Steigerung der absoluten Zahl an eosinophilen Granulozyten um das 65-fache von $1,5 \cdot 10^2$ Zellen/Lunge auf $9,8 \cdot 10^3$ Zellen/Lunge im Vergleich zu den PBS-

infizierten Kontrolltieren, bzw. von $1,1 \cdot 10^3$ Zellen/Lunge um das 9fache im Vergleich zur Zellzahl an Tag 2p.i. zu beobachten (Abb. 14B).

In Gewebepräparationen für die Immunhistologie konnten eosinophile Granulozyten anhand ihrer Expression von SiglecF auf ihrer Oberfläche sowie durch ihren charakteristischen polymorphen Zellkern identifiziert werden. Eosinophile Granulozyten konnten an Tag 14 p.i. perivaskulär identifiziert werden (Abb. 14C, Vergrößerung).

Die Rekrutierung von eosinophilen Granulozyten geschah damit erst in der Eliminationsphase der PVM-Infektion und dauerte bis eventuell nach dem letzten Tag des Versuches an.

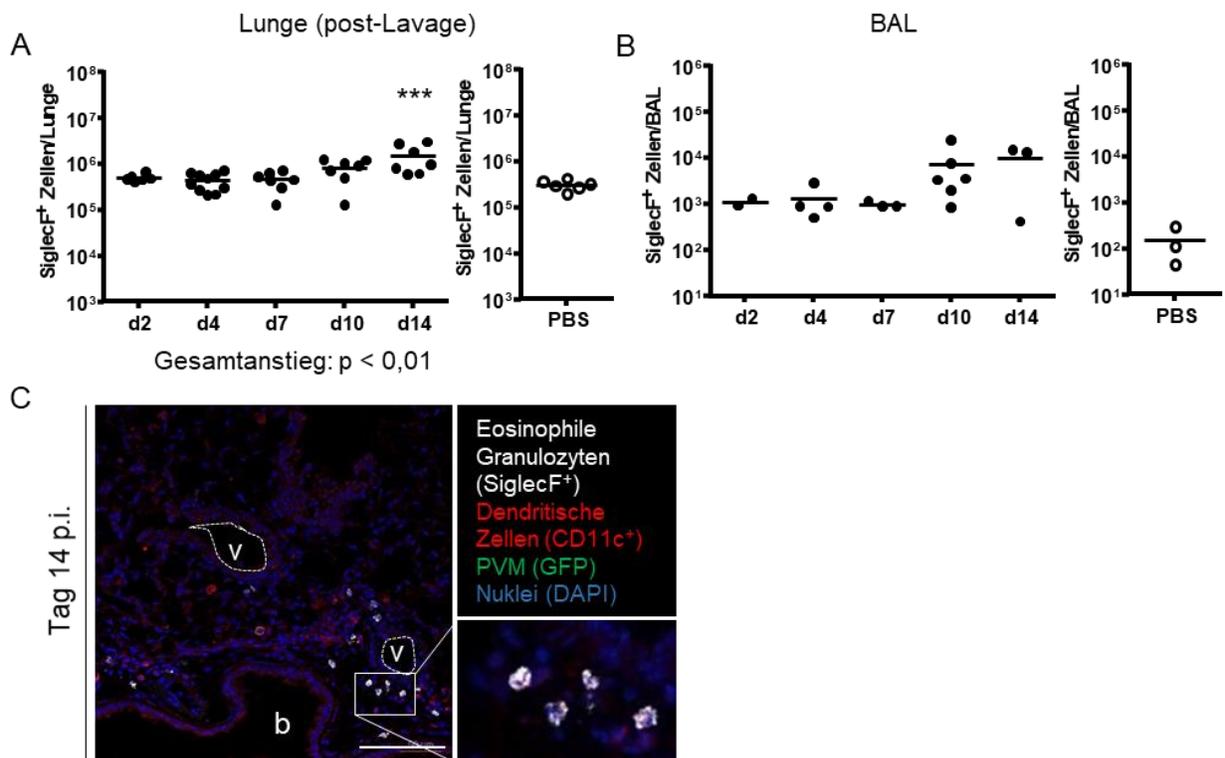


Abb. 14: Rekrutierung von eosinophilen Granulozyten während einer PVM-Infektion. C57BL/6-Mäuse wurden intranasal mit 1000 Pfu rPVM-GFP, oder Kontrollgruppen mit PBS mock-infiziert und an den Tagen 2, 4, 7, 10 und 14 p.i. getötet. (A,B) Die Lungen wurden lavagiert (BAL), die lavagierte Lunge entnommen, eine Einzelzellsuspension des Lungenparenchyms hergestellt (A) und diese, sowie die Zellen aus der BAL (B), für die die durchflusszytometrische Untersuchung vorbereitet. Eosinophile Granulozyten wurden mittels Farbepanel II (Kap. 2.2.5.2) mit Fluorochrom-konjugierten Primärantikörpern gegen CD45, SiglecF und CD11c gefärbt und nach Fixierung durchflusszytometrisch analysiert. Dabei entsprachen CD11c⁺ Zellen dendritischen Zellen und SiglecF⁺ Zellen eosinophilen Granulozyten. Doppelt positive Zellen entsprachen AMΦ. Jeder Datenpunkt des Graphen A sowie für Tag 10 des Graphen B repräsentiert die Zellen je einer einzelnen Maus. Für die Datenpunkte an den Tagen 2, 4, 7 und 14 der Graphen B wurden die Zellen von je zwei Tieren vereinigt. Die Datenpunkte stammen aus zwei oder mehr unabhängigen Versuchen. Statistische Auswertungen wurden durchgeführt, wenn die zu vergleichenden Gruppen mehr als 3 Datenpunkte hatten. Statistische Auswertung: One-Way-ANOVA mit multiple comparison und Dunnett-Test gegen die jeweilige PBS-Kontrolle; (***) $p < 0.001$; Gesamtanstieg: One-Way-ANOVA mit multiple comparison

und Bonferroni-Test gegen Tag 2 p.i. (C) An Tag 14 p.i. wurden Mäuse mittels CO₂ getötet. Die Lungen wurden wie zuvor beschrieben fixiert und aufbereitet. Anschließend wurden Kryoschnitte (8 µm) der Organe angefertigt. Die Lungenschnitte wurden mit einem Antikörper gegen SiglecF, konjugiert mit Alexa®Fluor647, und CD11c (Anti-Hamster IgG AlexaFluor® 568) gefärbt. Infizierte Zellen konnten durch die Expression von GFP nachgewiesen werden. Zellkerne wurden mithilfe einer DAPI-Färbung dargestellt. Die Kryoschnitte einer Maus wurden repräsentativ für alle untersuchten Tiere ausgewählt. Maßbalken 100 µm; (v) Blutgefäß; (b) Bronchien/Bronchiolen.

3.1.4. Transiente Depletion von Alveolarmakrophagen während einer PVM-Infektion

Alveolarmakrophagen (AMΦ) dienen der Reinigung des Lungengewebes von Bestandteilen toter Zellen und Pathogenen, sowie der Lungenhomöostase (Hussell and Bell, 2014) siehe Kap. 1.1.2). Das Rekrutierungsmuster der AMΦ wurde nach der Infektion von C57BL/6-Mäusen mit rPVM-GFP im Lungengewebe und dem Bronchoalveolarlumen mittels durchflusszytometrischer Analyse untersucht. Nach Ausschluss von Zellaggregaten und Zellfragmenten (nicht dargestellt) wurden vitale CD45.2⁺ Immunzellen auf die Expression von SiglecF und CD11c hin untersucht. AMΦ exprimieren auf ihrer Zelloberfläche CD11c und SiglecF und können anhand dieser Marker durchflusszytometrisch identifiziert und von eosinophilen Granulozyten (CD11c⁻, SiglecF⁺) unterschieden werden.

Im Lungengewebe verringerte sich die absolute Zahl an AMΦ im Verlauf der Infektion nach Tag 4 p.i. bis sie an Tag 10 p.i. um das 14-fache auf nur noch $5 \cdot 10^4$ Zellen/Lunge im Vergleich zur Zellzahl bei PBS-infizierten Kontrolltieren ($7,3 \cdot 10^5$ Zellen/Lunge), bzw. um das 7,6fache im Vergleich zur Zellzahl an Tag 2 p.i. ($3,8 \cdot 10^5$ Zellen/Lunge). Danach erholte sich die Population ab Tag 10 p.i. wieder, um am Versuchsende (Tag 14 p.i.) wieder eine Anzahl von $2,6 \cdot 10^5$ Zellen/Lunge zu erreichen (Abb. 15A). Bis Tag 7 p.i. reduzierte sich die absolute Anzahl AMΦ um fast 93% im Vergleich zu den PBS-infizierten Kontrollen. In Abb. 15B wurden außerdem Makrophagen mittels eines Antikörpers gegen F4/80, einem spezifischen Makrophagenmarker, in Gewebeschnitten PVM-infizierter Lungen dargestellt. Durch Lokalisierung der F4/80⁺ Zellen direkt in den Alveolen, konnten diese als AMΦ identifiziert werden. Dabei wurden GFP-exprimierende (GFP⁺) und damit PVM-infizierte, F4/80⁺ AMΦ beobachtet. AMΦ schienen neben den Lungenepithelzellen (hier vor allem gemäß der Lokalisation Typ II-Pneumozyten) ebenfalls mit PVM infizierbar zu sein (Abb. 15B, Vergrößerung). Durch die hohe

Eigenfluoreszenz der AM Φ im grünen Wellenlängenbereich konnte die absolute Anzahl infizierter, also GFP-exprimierender AM Φ , nicht adäquat mittels durchflusszytometrischer Analyse quantifiziert werden. Zu diesem Zweck wurde ein neues Virus, rPVM-mCherry, generiert, um die Infektion auch mittels dieser Methodik quantifizieren zu können.

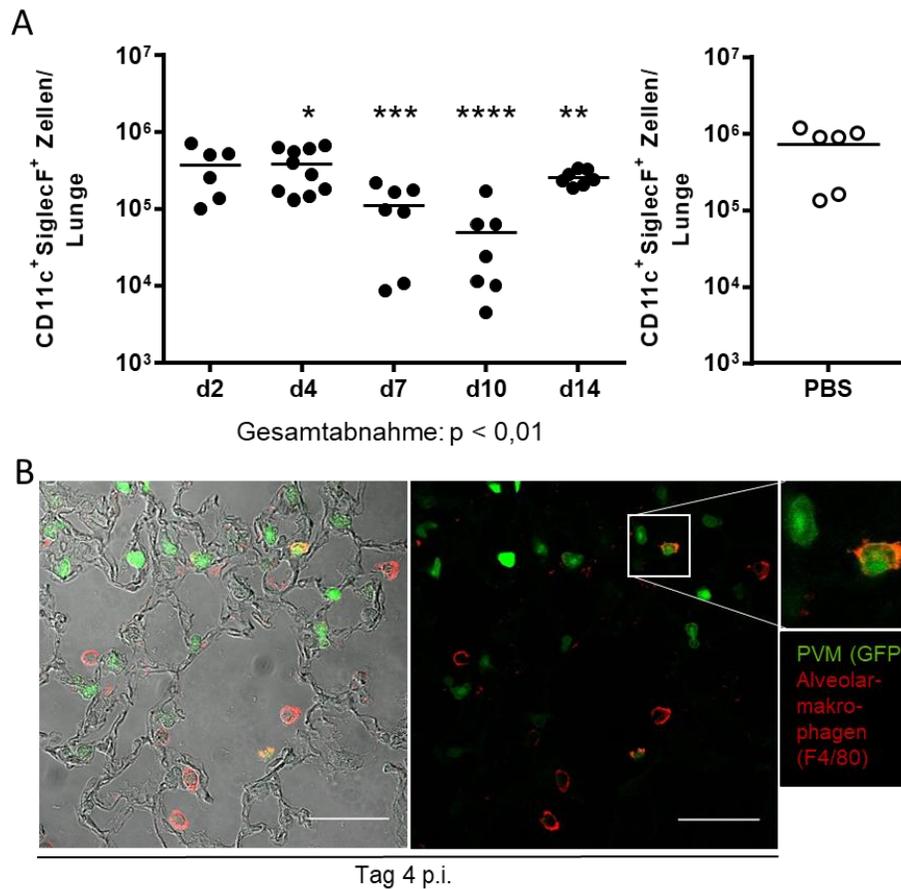


Abb. 15: Transiente Depletion von AM Φ während einer PVM-Infektion. C57BL/6-Mäuse wurden intranasal mit 1000 Pfu rPVM-GFP infiziert, oder Kontrollgruppen mit PBS mock-infiziert, und an den Tagen 2, 4, 7, 10 und 14 p.i. getötet. (A) Die Lungen wurden lavagiert und das Lungenparenchym, sowie die Zellen aus der BAL wurden für die durchflusszytometrische Analyse vorbereitet. Die AM Φ wurden mittels Färbepanel II (Kap.2.2.5.2) mit direktmarkierten Antikörpern gegen CD45, CD11c und SiglecF gefärbt und nach Fixierung durchflusszytometrisch analysiert. Für die Bestimmung der Gesamtzahl der AM Φ wurden die absoluten Zellzahlen aus dem Lungenparenchym mit den absoluten Zellzahlen aus der BAL addiert. Jeder Datenpunkt repräsentiert die Zellen einer Maus. Die Datenpunkte stammen aus zwei oder mehr unabhängigen Versuchen. Statistische Auswertungen wurden durchgeführt, wenn die zu vergleichenden Gruppen mehr als 3 Datenpunkte hatten. Statistische Auswertung: One-Way-ANOVA mit multiple comparison und Dunnett-Test gegen die jeweilige PBS-Kontrolle; (*) < 0.05, (**) p < 0.01, (***) p < 0.001, (****) p < 0.0001; Gesamtabnahme: One-Way-ANOVA mit multiple comparison und Bonferroni-Test. (C) Darstellung von infizierten Zellen und AM Φ an Tag 4 p.i. mittels konfokaler Laserrastermikroskopie. rPVM-GFP infizierte Zellen der Lungen wurden durch die Expression von GFP (grün), und AM Φ durch Oberflächenexpression des Pan-Makrophagen-Markers F4/80 (rot, Alexa@Fluor555) sowie der Lokalisation im Alveolarlumen identifiziert. Die Lungenstruktur konnte zusätzlich durch eine Durchlichtaufnahme visualisiert werden (links). Maßstab: 50 μ m

3.1.5 Generierung und Charakterisierung von rPVM-mCherry zur Untersuchung der Infektion von AM Φ

Wie in Kapitel 3.1.4 beschrieben, wurden AM Φ während einer Infektion mit rPVM-GFP transient depletiert. Das Interesse bestand nun darin, die Ursache für diese Depletion zu analysieren. Durch die sehr hohe Autofluoreszenz der AM Φ bei den Anregungswellenlängen 370 und 490 nm, und Emissionswellenlängen von 541 und 580 nm (Edelson et al., 1985) war es jedoch nicht möglich, diesen Sachverhalt durch Infektion mit rPVM-GFP durchflusszytometrisch zu klären. Aus diesem Grund wurde der offene Leserahmen (ORF) für ein anderes Fluoreszenzprotein, mCherry (Genbank: AY678264), unter Kontrolle von PVM-Transkriptionspromotoren als zusätzliches Gen in das Genom von PVM integriert. mCherry wurde synthetisch von Mitarbeitern um den Nobelpreisträger Roger Tsien durch Veränderung des monomeren rot fluoreszierenden Proteins mRFP1 erstmals hergestellt. Der N- und C-Terminus wurde zusätzlich durch die äquivalenten Enden von EGFP ersetzt. mCherry wird mit einer Wellenlänge von 587 nm angeregt und emittiert Fluoreszenz mit einer Wellenlänge von 610 nm. An den ORF von *mCherry* wurde eine *Agel*-Schnittstelle sowie die GS-Sequenz des viralen N/P-Gens und die GE-Sequenz des viralen F-Gens mittels PCR angefügt (Abb. 16A). Das so entstandene *mCherry*-Gen wurde in das Genom von rPVM1 zwischen dem SH- und dem G-Gen eingefügt. Die so generierte cDNA des viralen Antigenoms von rPVM-mCherry wurde durch Transfektion in BSR-T7/5-Zellen eingeführt. Durch die weitere Zugabe von Helfer-Plasmiden, die für das virale N-, P-, L- und M2-1-Protein kodieren, konnte replikationsfähiges Virus isoliert und kultiviert werden. Zur Kontrolle der Stabilität der mCherry-Sequenz wurde virale RNA aus mit rPVM-mCherry infizierten Zellen isoliert und nach reverser Transkription und PCR-Amplifikation das erhaltene Fragment der PVM-*mCherry*-cDNA sequenziert. Die erhaltene Sequenz wurde mit bereits veröffentlichten Sequenzen (GenBank: AY678264) sowie den vollständigen Sequenzen inklusive GS, GE und *Agel*-Schnittstelle verglichen und für korrekt befunden.

Zur Charakterisierung des neu generierten Virus wurde ein Replikationsvergleich mit dem bereits bekannten rPVM-GFP durchgeführt. rPVM-GFP ist für den Vergleich gut geeignet, da das kodierte Fluoreszenzprotein ähnlich zu mCherry ist, also die gleiche Größe und Struktur besitzt und an der gleichen Position des PVM-Genoms eingefügt

wurde (Krempf et al., 2007). Durch die Expression der Fluoreszenzproteine konnte die intrinsische Fluoreszenz beider Proteine insbesondere von mCherry zusätzlich mittels Mikroskopie dokumentiert werden.

Im Verlauf der Infektion von BHK-21-Zellen mit rPVM-GFP bzw. rPVM-mCherry konnten keine signifikanten Unterschiede, weder nach Analyse der Fluoreszenz mittels Mikroskopie noch nach Bestimmung der Virustiter mittels Plaque-Assay ermittelt werden (Abb. 16B, C). Die Expression von mCherry bzw. GFP in BHK-21-Zellen konnte erst ab Tag 2 p.i. in einzelnen Zellen durch deren Autofluoreszenz detektiert werden. Im Verlauf der Infektion wurden auch benachbarte Zellen infiziert und es bildeten sich Anhäufungen aus mCherry- bzw. GFP-exprimierenden Zellen. An Tag 7 p.i. waren fast 80% der Zellen positiv für mCherry bzw. GFP. Der Virustiter stieg bis Tag 7 p.i. stetig an. Dabei erreichte rPVM-GFP einen finalen Titer von $5,9 \cdot 10^5$ Pfu/ml und rPVM-mCherry $7,4 \cdot 10^5$ Pfu/ml. Beide Viruskonstrukte unterscheiden sich somit nicht bzgl. ihrer Replikation und intrinsischen Fluoreszenz *in vitro*.

Für die Untersuchungen der Pathogenese *in vivo* wurde als Vergleichsvirus wieder das gut charakterisierte rPVM-GFP mit einer Infektionsdosis von 1000 Pfu pro Maus eingesetzt. Um rPVM-mCherry zu charakterisieren, wurden Mäuse ebenfalls mit 1000 Pfu pro Maus infiziert. Beide Infektionsgruppen entwickelten ab Tag 7 p.i. die für eine PVM-Infektion typischen klinischen Symptome wie aufgerautes Fell und leicht erschwerte Atmung (nicht dargestellt). Es zeigte sich allerdings, dass Mäuse, infiziert mit rPVM-mCherry, eine verzögerte Gewichtsabnahme bis Tag 9 p.i. aufwiesen. Ab Tag 10 p.i. konnte jedoch kein Unterschied mehr im Gewichtsverlauf zwischen beiden Infektionsgruppen festgestellt werden. An Tag 10 p.i. konnte in beiden Versuchsgruppen die größte Gewichtsabnahme gemessen werden. Dabei hatten rPVM-GFP infizierte Mäuse rund 16,57% ihres ursprünglichen Gewichts abgenommen. Mäuse, infiziert mit rPVM-mCherry, hingegen zeigten eine Abnahme von 12,6% im Vergleich zum Gewicht an Tag 0. Nach Tag 10 p.i. erholten sich alle Mäuse bis zum Versuchsende an Tag 14 p.i. wieder. Das Gewicht stieg bei rPVM-GFP-infizierten Mäusen wieder auf 97,28% und in rPVM-mCherry-infizierten Mäusen auf 98,82% des Ausgangsgewichts an (Abb. 16D). Beide Viruskonstrukte unterschieden sich nur leicht bezüglich der Gewichtskurven *in vivo* nach einer subletalen Infektion. Trotz leichter Attenuierung von rPVM-mCherry im

Vergleich zu rPVM-GFP war es jedoch hinreichend pathogen und konnte so für nachfolgende Untersuchungen verwendet werden.

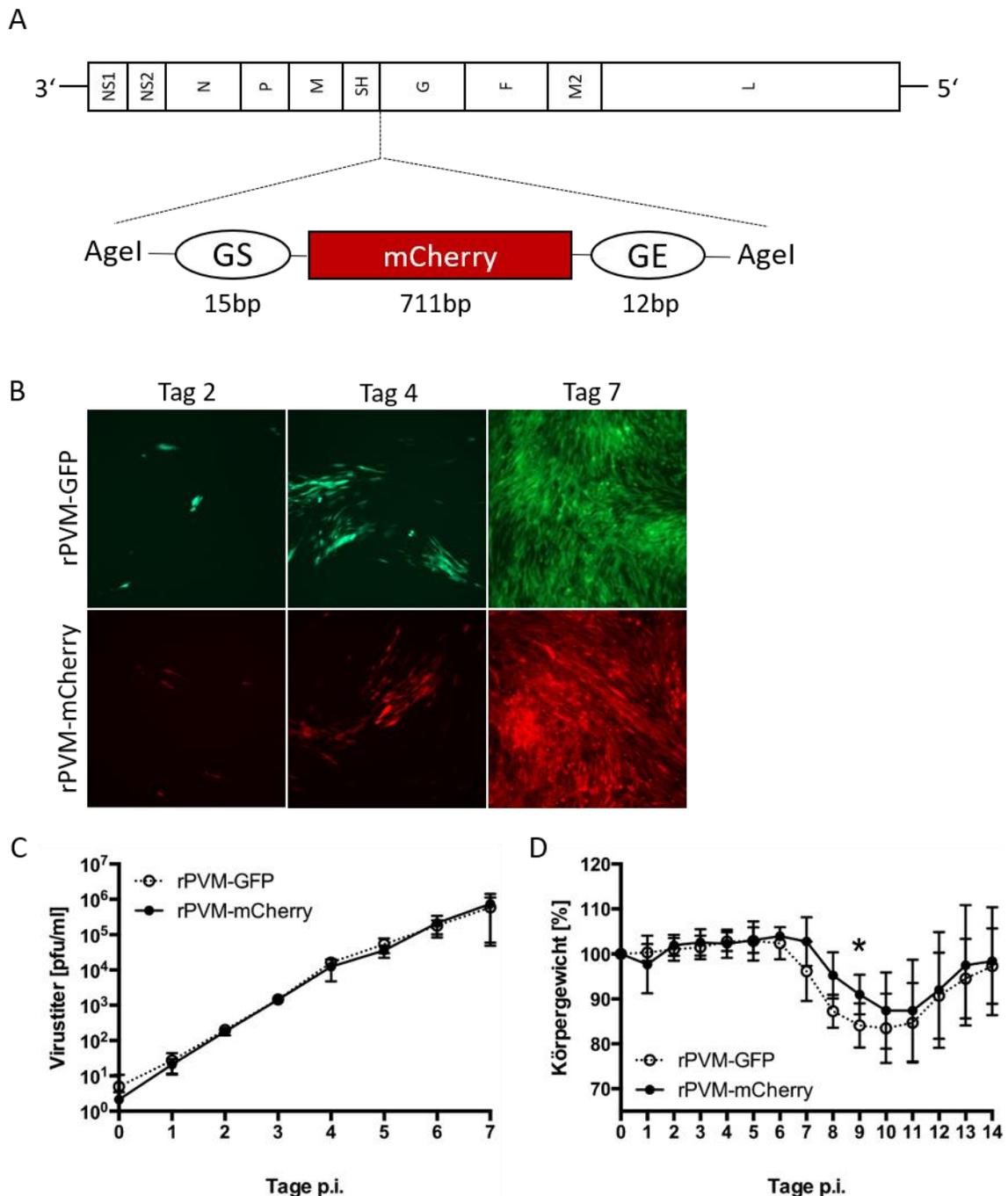


Abb. 16: Charakterisierung des neu generierten Virus rPVM-mCherry in Zellkulturen und in vivo. (A) Schematische Darstellung des PVM-Genoms mit integriertem mCherry-Gen zwischen den Genen für SH und G. (B, C) BHK-21-Zellen wurden mit rPVM-mCherry bzw. rPVM-GFP mit einer MOI von 0.01 Pfu/Zelle infiziert und täglich die Replikation mittels Plaque-Assay sowie die mCherry-Expression mittels Mikroskopie analysiert. (B) exemplarische Fluoreszenzaufnahmen der mCherry bzw. GFP-Expression nach 2, 4 und 7 Tagen p.i. (C) Dargestellt sind die Mittelwerte zweier unabhängiger Versuche die jeweils

in Duplikaten durchgeführt wurden. (D) C57BL/6-Mäuse wurden mit 1000 Pfu der indizierten Viren intranasal infiziert und über einen Zeitraum von 14 Tagen beobachtet. Der relative Gewichtsverlauf wurde im zeitlichen Verlauf graphisch aufgetragen. Die Daten stammen aus mehr als zwei unabhängigen Versuchen. Dargestellt sind die Mittelwerte der prozentualen Anteile des Ausgangsgewichtes und die Standardabweichung (rPVM-mCherry n=7, rPVM-GFP n=11). Statistische Auswertung: Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen an den jeweiligen Tagen wurden mittels multiple t-Test analysiert; (*) $p < 0,05$.

3.1.6 PVM infiziert Alveolarmakrophagen *in vivo*

Mit dem neu generierten rPVM-mCherry konnten nun *in-Vivo*-Analysen durchgeführt werden. Dazu wurden C57BL/6-Mäuse mit 1000 Pfu dieses Virus infiziert, zu verschiedenen Zeitpunkten getötet und die AM Φ im gesamten Lungengewebe mittels durchflusszytometrischer Analyse untersucht. Abb. 17 zeigt beispielhaft das Identifikationsschema für AM Φ in der durchflusszytometrischen Analyse. AM Φ exprimieren auf ihrer Oberfläche CD11c und SiglecF. Die als AM Φ identifizierten Zellen wurden anschließend bezüglich der mCherry-Expression (Emissionsmaximum: 610 nm) untersucht. Beispielhaft konnten deutlich mCherry⁺ AM Φ an Tag 4 p.i. in den Zellsuspensionen von Lungen infizierter Mäuse im Vergleich zu AM Φ aus mit PBS mock-infizierten Mäusen erkannt werden. Des Weiteren war die Reduktion der Anzahl dieses Zelltyps in der Lunge infizierter Tiere zu erkennen.

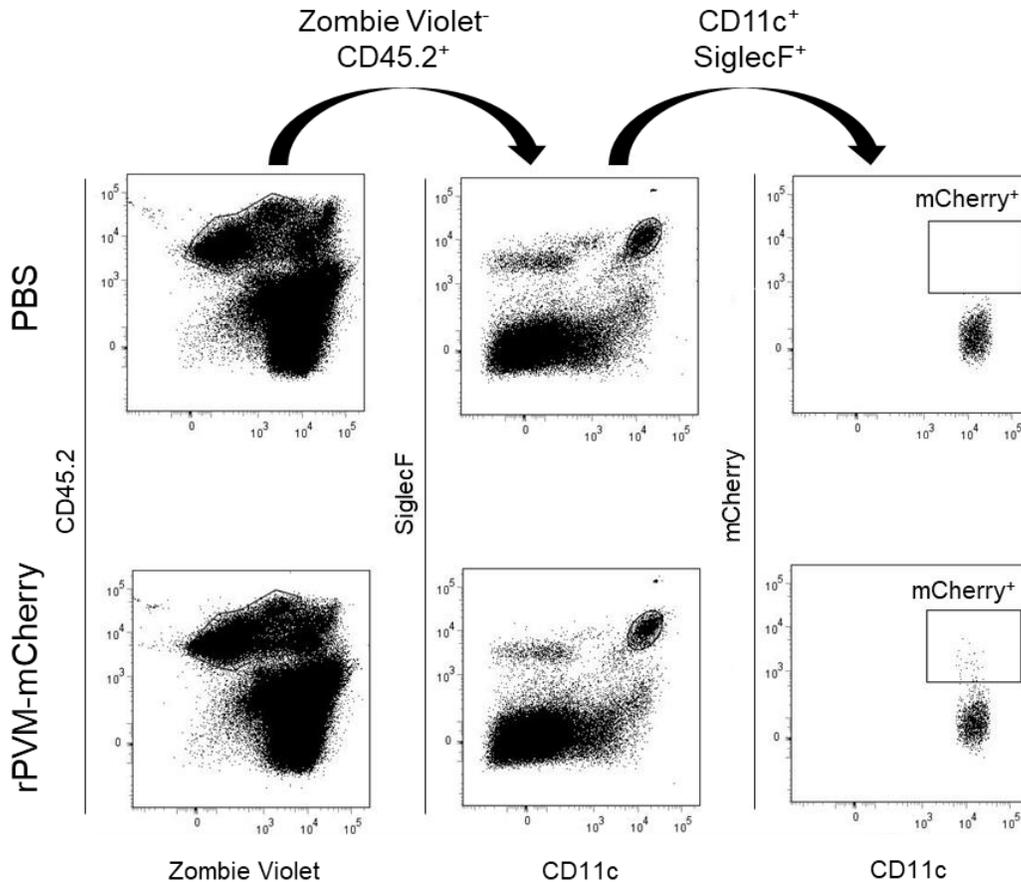


Abb. 17: Gating-Strategie zur Identifizierung von AM Φ im Lungengewebe mittels durchflusszytometrischer Analyse. C57BL/6-Mäuse wurden mit PBS mock-infiziert oder 1000 Pfu rPVM-mCherry infiziert und die AM Φ mittels Antikörper spezifisch für folgende Oberflächenmoleküle identifiziert: CD45.2, SiglecF und CD11c. Diese Grafik zeigt beispielhaft jeweils die analysierten Immunzellen aus der Lunge einer PBS-infizierte Maus (oben) und einer rPVM-mCherry-infizierte Maus (unten) an Tag 4 p.i..

Um die Anzahl infizierter AM Φ im Verlauf der Infektion zu analysieren, wurden an verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion Mäuse getötet und die Gesamtzellzahl an AM Φ sowie die Anzahl mCherry-exprimierender AM Φ im Lungengewebe quantifiziert. Als Vergleich wurde die absolute Zahl der AM Φ sowie die Autofluoreszenz in PBS-infizierten Mäusen bestimmt. Es konnten annähernd keine autofluoreszierenden AM Φ in PBS-infizierten Mäusen festgestellt werden ($5,3 \cdot 10^2$ Zellen/Lunge). Wie während einer Infektion mit rPVM-GFP (siehe 3.1.4) wurden auch nach Infektion mit rPVM-mCherry die AM Φ im gesamten Lungengewebe, d.h. Lungenparenchym und Bronchoalveolarlumen, bis zu 92% (von $9,4 \cdot 10^5$ Zellen auf $7,9 \cdot 10^4$ Zellen/Lunge) depletiert. Die Abnahme der Zellzahl erfolgte bis Tag 10 p.i.. Anschließend erholte sich die Anzahl der

CD11c⁺SiglecF⁺-Zellen in der Lunge wieder (Abb. 18A). mCherry⁺ AMΦ traten bereits ab Tag 2 p.i. im Lungengewebe auf und nahmen bis Tag 4 p.i. kontinuierlich von $5,1 \cdot 10^2$ Zellen auf $1,4 \cdot 10^4$ Zellen/Lunge zu (Abb. 18B). Zu diesem Zeitpunkt waren rund 1,5 % der Gesamtanzahl verbliebener AMΦ mCherry⁺. Bis Tag 10 p.i. erhöhte sich die Prozentzahl mCherry⁺ AMΦ auf 3,4% (Abb. 18C). Nach Tag 4 p.i. reduzierte sich die absolute Anzahl mCherry⁺ Zellen wieder. Der Anstieg an mCherry⁺ AMΦ war im gesamten Lungengewebe von Tag 2 p.i. nach Tag 4 p.i. signifikant. Diese Versuche verdeutlichen, dass AMΦ *in vivo* während des Infektionsverlaufs mit PVM infiziert werden können.

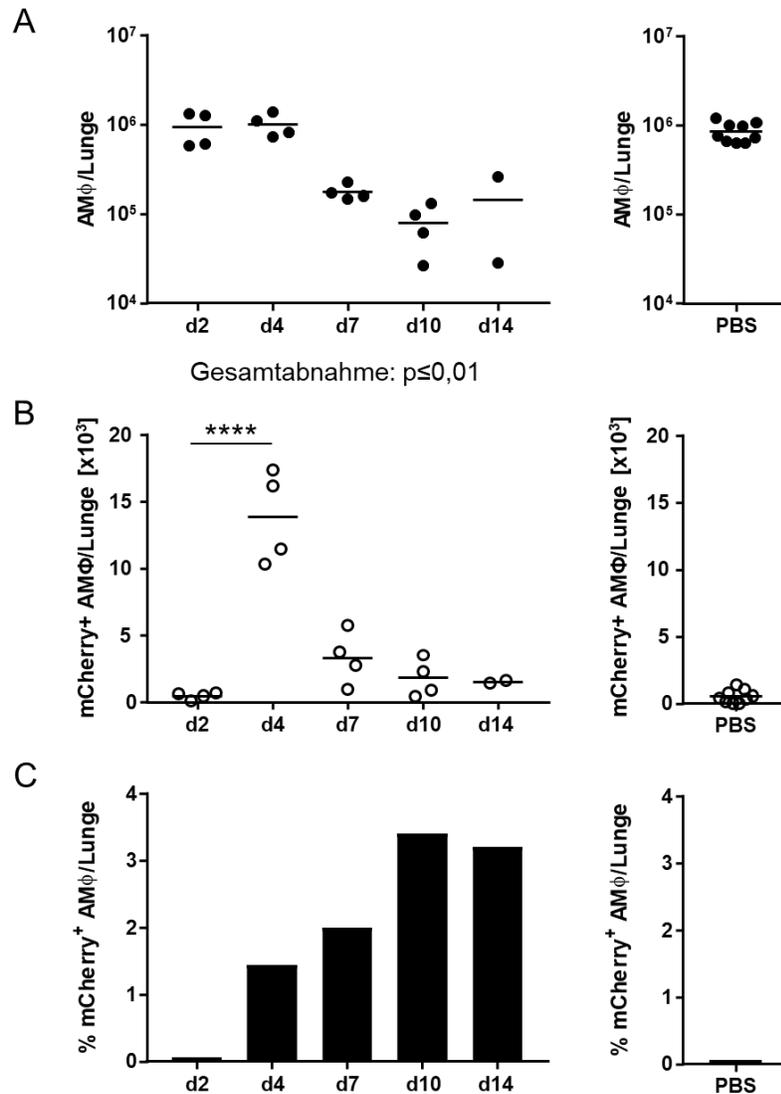


Abb. 18: Transiente Depletion von AMΦ nach PVM-Infektion. C57BL/6-Mäuse wurden intranasal mit PBS mock-infiziert oder mit 1000 Pfu rPVM-mCherry infiziert. Die AMΦ wurden mittels Antikörpern spezifisch für folgende

Oberflächenmoleküle identifiziert: CD45.2, SiglecF und CD11c. (A,B,C) An den Tagen 2, 4, 7, 10 und 14 p.i. wurden die Mäuse getötet, die Lungen lavagiert (BAL) und das verbleibende Gewebe, sowie die Zellen aus der BAL für die durchflusszytometrische Analyse vorbereitet. Es wurden Einzelzellsuspensionen hergestellt und die Zellen mittels Fluorochrom-gekoppelter Antikörper gefärbt und die Anzahl mCherry⁺ AMΦ durchflusszytometrisch bestimmt. Nach erfolgter durchflusszytometrischer Messung wurden die Zellzahlen aus dem Lungeninterstitium und der BAL für die Auswertung vereinigt. (A) Darstellung der Gesamtzellzahlen der AMΦ und (B) der mCherry⁺ AMΦ. Jeder Datenpunkt repräsentiert die Anzahl AMΦ einer Maus. Die Datenpunkte stammen aus zwei oder mehr unabhängigen Versuchen. Statistische Auswertungen wurden durchgeführt, wenn die zu vergleichenden Gruppen mehr als 3 Datenpunkte hatten. Statistische Auswertung: Gesamtabnahme: One-Way-ANOVA mit multiple comparison und Bonferroni-Test gegen Tag 2 p.i. (C) Dargestellt ist der Anteil mCherry⁺ AMΦ an der Gesamtzahl der AMΦ.

3.1.7 Die Depletion der AMΦ scheint überwiegend unabhängig von Lymphozytenpopulationen.

Im Folgenden sollte untersucht werden, durch welchen Mechanismus AMΦ depletiert werden. Eine Hypothese war, dass Lymphozyten, vor allem CD8⁺ T-Zellen und/oder NK-Zellen, für die Depletion verantwortlich sind, indem sie infizierte AMΦ eliminieren. Dazu wurden Mäuse mit Defizienzen für T-Zellen (B6.TCRβ^{-/-}), für B- und T-Zellen (B6.Rag1^{-/-}), sowie einer zusätzlichen Defizienz für NK-Zellen (B6.Rag1.Cy^{-/-}) mit 300 Pfu PVM 15 infiziert und die absolute Anzahl der AMΦ/Lunge bestimmt.

Innerhalb der verschiedenen Mauslinien führte die Infektion von wildtypischen Kontrolltieren, von B6.TCRβ^{-/-} sowie von B6.Rag1.Cy^{-/-}-Mäusen zu einer signifikanten Reduktion der absoluten Zellzahl an AMΦ im Lungengewebe im bis Tag 10 p.i.. In den Kontrolltieren konnte wieder eine Abnahme um rund $6,7 \cdot 10^5$ Zellen von $8 \cdot 10^5$ Zellen/Lunge auf $1,2 \cdot 10^5$ Zellen/Lunge festgestellt werden, wobei sich die AMΦ-Population nach Tag 10 p.i. wieder annähernd normalisierte. Im Lungengewebe von B6.TCRβ^{-/-}-Mäusen wurde ebenfalls eine Reduktion um $5,9 \cdot 10^5$ AMΦ/Lunge bis Tag 7 p.i. auf $3 \cdot 10^5$ Zellen/Lunge beobachtet, welche jedoch weniger stark ausgeprägt war. Bis Tag 14 p.i. konnte keine vollständige Rekonstitution der Zellpopulation im Vergleich zu Tag 2 p.i. beobachtet werden ($3,6 \cdot 10^5$ Zellen/Lunge vs. $8,9 \cdot 10^5$ Zellen/Lunge). In der Lunge von B6.Rag1.Cy^{-/-}-Mäusen verringerte sich die Anzahl der AMΦ bis Tag 10 p.i. von $1,2 \cdot 10^6$ Zellen/Lunge bis auf $3 \cdot 10^5$ Zellen/Lunge, jedoch zeitlich verzögert im Vergleich zur Anzahl der AMΦ in C57BL/6-Mäusen. B6.Rag1^{-/-}-Mäuse zeigten ebenfalls eine Abnahme der AMΦ im Lungengewebe, die jedoch nicht statistisch signifikant war. Auch schienen diese Mäuse bereits zu Beginn weniger AMΦ zu besitzen (Abb. 19). Die AMΦ-Zellzahl an Tag 14 p.i. wurde nicht bestimmt, da die meisten B6.Rag1^{-/-}- und

B6.Rag1.C γ ^{-/-}-Mäuse bis zu diesem Zeitpunkt die Versuchsabbruchkriterien erreichten. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den immunsupprimierten Mauslinien im Vergleich zu den wildtypischen Kontrolltieren in der Lunge an den Tagen 2, 7, 10 und 14 p.i. festgestellt werden.

Zusammenfassend konnte ermittelt werden, dass, unabhängig von den verschiedenen Immundefizienzen, die absolute Zahl der AM Φ während einer Infektion abnahm und nur in den wildtypischen Kontrollmäusen in dieser Versuchsdurchführung wieder rekonstituiert wurden. Dieses Ergebnis deutet damit eher auf eine direkte Korrelation der AM Φ -Depletion und der Virusvermehrung hin.

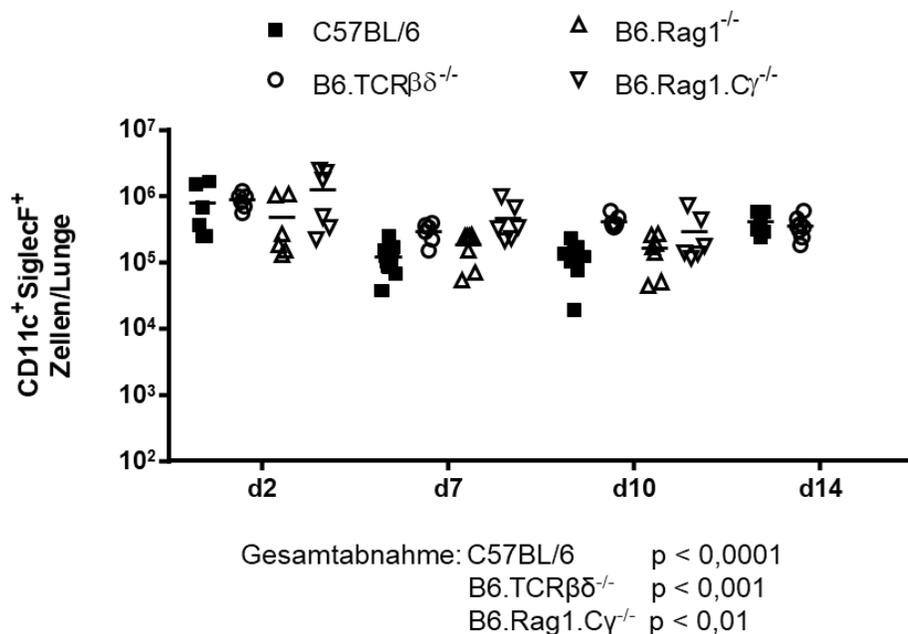


Abb. 19: Depletion von AM Φ nach PVM-Infektion in immundefizienten Mäusen. C57BL/6-Mäuse, B6.TCR $\beta\delta$ ^{-/-}, B6.Rag1^{-/-} und B6.Rag1.C γ ^{-/-}-Mäuse wurden mit 300 Pfu PVM 15 intranasal infiziert. An den Tagen 2, 7, 10 und 14 pi wurden die Mäuse getötet. Die Lungen wurden lavagiert (BAL) und das Lungenparenchym, sowie die BAL-Zellen für die durchflusszytometrische Analyse vorbereitet. Es wurden Einzelzellsuspensionen hergestellt und die Zellen mittels Fluoreszenz-gekoppelter Antikörper gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. AM Φ wurden durch folgende Oberflächenmoleküle identifiziert: CD45.2, SiglecF und CD11c. Für die Bestimmung der Gesamtzahl der AM Φ wurden die absoluten Zellzahlen aus dem Lungenparenchym mit den absoluten Zellzahlen aus der BAL addiert. Jeder Datenpunkt repräsentiert die Zellen je einer einzelnen Maus. Die Datenpunkte stammen aus zwei oder mehr unabhängigen Versuchen. Statistische Auswertungen wurden durchgeführt, wenn die zu vergleichenden Gruppen mehr als 3 Datenpunkte hatten. Statistische Auswertung (Gesamtabnahme): 2-Way ANOVA mit Bonferroni-Test gegen Tag 2 p.i., (*) p < 0.05, (**) p < 0.01, (***) p < 0.001, (****) p < 0.0001.

3.2 Pathogenese und Immunantwort in immunsupprimierten Mäusen nach PVM-Infektion

3.2.1 B-Lymphozyten tragen zur partiellen Viruskontrolle in T-Zell-defizienten Mäusen bei.

Im vorangegangenen Abschnitt wurde der spatiotemporale Verlauf der zellulären Immunantwort im Verhältnis zum Infektionsverlauf in immunkompetenten Mäusen charakterisiert. In diesem Abschnitt wurde nun analysiert, welche Bedeutung die jeweiligen zellulären Komponenten des Immunsystems für die Pathogenese einer PVM-Infektion in Mäusen haben. Dazu wurden transgene Mauslinien mit spezifischen Defizienzen von Kompartimenten der zellulären Immunität, d.h. mit Defizienz des T-Zellkompartiments (B6.TCR β ^{-/-}), des T- und B-Zellkompartiments (B6.Rag1^{-/-}) und des T-, B- und NK-Zellkompartiments (B6.Rag1.C γ ^{-/-}), infiziert und die Pathogenese untersucht. Es war bereits bekannt, dass eine Infektion mit einer für immunkompetente Tiere subletalen-Dosis PVM 15 keine klinischen Symptome bei T-Zell-defizienten B6.TCR β ^{-/-}-Mäusen verursacht, in diesen Tieren aber bis 24 Tage nach der Infektion replikationsfähiges Virus nachweisbar war. In $\alpha\beta$ -T-Zell-defizienten Mäusen konnte sogar bis Tag 49 p.i. replikationsfähiges Virus nachgewiesen werden (Frey et al., 2008). In dieser vorangegangenen Studie wurde jedoch die temporale Entwicklung der Viruslast (Tag 1-14) von PVM 15 nicht untersucht. Eine solche Verlaufsstudie wurde im Folgenden ergänzt, sowie um die Pathogenese und die Entwicklung der Viruslast in den Lungen von B6.Rag1^{-/-}- und B6.Rag1.C γ ^{-/-}-Mäusen erweitert.

Als Kontrolle dienten immunkompetente C57BL/6-Mäuse. Alle Tiere wurden mit je 300 Pfu PVM 15 pro Maus infiziert und das Körpergewicht über einen Zeitraum von 14 Tagen oder bis zum Erreichen der zuvor beschriebenen Abbruchkriterien (Kap. 2.2.3.1) untersucht. Zur Bestimmung der Viruslast im Lungengewebe wurden an den Tagen 2, 4, 7, 14 bzw. bei Erreichen der Abbruchkriterien Mäuse getötet und replikationsfähige Viren mittels Plaque-Assay bestimmt.

Immunkompetente C57BL/6-Mäuse wiesen nach Infektion mit 300 Pfu PVM den für diese Dosis typischen symptomatischen Verlauf auf: das relative Körpergewicht der

Mäuse blieb bis Tag 6 p.i. stabil, gefolgt von einer Gewichtsabnahme bis Tag 8 p.i. um rund 13% des Ausgangsgewichts. Anschließend erholten sich die Tiere bis Tag 11 p.i. wieder (Abb. 20A), wonach sich das relative Körpergewicht bis zum Versuchsende wieder stabil blieb. Von diesem Verlauf wich die Gewichtsabnahme eines Tieres ab, da es auf Grund des Erreichens der Abbruchkriterien bereits an Tag 11 p.i. getötet werden musste. Die Viruslast stieg stetig bis Tag 7 (Mittelwert: $3,1 \cdot 10^5$ Pfu/Maus/Lunge an Tag 7) an, und fiel dann bis Tag 14 p.i. wieder unter die Detektionsgrenze ab (Abb. 20B). Die Viruseliminierungsphase korrelierte mit der symptomatischen Phase, wie zuvor beschrieben (Frey et al., 2008). T-Zell-defiziente mit der gleichen Dosis PVM infizierte B6.TCR $\beta\delta^{-/-}$ -Mäuse zeigten im Unterschied zu den immunkompetenten Kontrolltieren keine Symptomatik, wie zuvor beschrieben (Frey et al., 2008). Die Viruslast im Lungengewebe erreichte ebenfalls mit $5,8 \cdot 10^5$ Pfu/Lunge den höchsten Wert an Tag 7 p.i.. Im Unterschied zu den Kontrolltieren sank die Viruslast, wie erwartet, nicht unter die Detektionsgrenze; es wurde jedoch eine Reduktion der Viruslast bis Tag 14 p.i. um $4,7 \cdot 10^5$ Pfu/Lunge auf $1,1 \cdot 10^5$ Pfu/Lunge festgestellt (Abb. 20C, D). Dies deutet darauf hin, dass die T-Zell-defizienten Mäuse das Virus teilweise kontrollieren konnten. Anders hingegen verlief die Infektion in Mäusen mit zusätzlichen Defizienzen von funktionellen B-Lymphozyten bzw. B- und NK-Zellen. Hier variierte das Krankheitsbild von asymptomatischen Verläufen bis hin zu Verläufen, bei denen die Tiere beginnend an Tag 11 p.i. gemäß der unter Kap. 2.2.3.1 definierten symptomatischen Kriterien getötet werden mussten (Versuchsabbruch, VA, insgesamt 3 von 7 B6.Rag1 $^{-/-}$ -Mäusen und 2 von 6 B6.Rag1.C $\gamma^{-/-}$ -Mäuse) (Abb. 20E, G). Die Lungen von fatalen Verläufen in B6.Rag1 $^{-/-}$ -Mäusen wiesen dabei eine um das Dreifach gesteigerte Viruslast von $1 \cdot 10^6$ Pfu/Lunge auf $3,6 \cdot 10^6$ Pfu/Lunge auf im Vergleich zu Lungen von Mäusen, die erst Tag 14 p.i. getötet wurden (Abb. 20F). Diese Steigerung war jedoch nicht signifikant. In den Lungen der beiden B6.Rag1.C $\gamma^{-/-}$ -Mäuse, welche aufgrund des Erreichens der Abbruchkriterien getötet werden mussten, war die Viruslast ebenfalls erhöht, jedoch unabhängig vom Krankheitsverlauf. Der Krankheitsverlauf schien ebenfalls weniger zu streuen im Vergleich zu dem in B6.Rag1 $^{-/-}$ -Mäusen.

Das Vorhandensein des B-Zell-Kompartiments repräsentiert den Hauptunterschied zwischen B6.TCR $\beta\delta^{-/-}$ -Mäusen und Rag1-defizienten Mauslinien. Diese Daten indizieren

damit, dass B-Lymphozyten möglicherweise eine schützende Rolle während einer PVM-Infektion in immundefizienten Mäusen spielen.

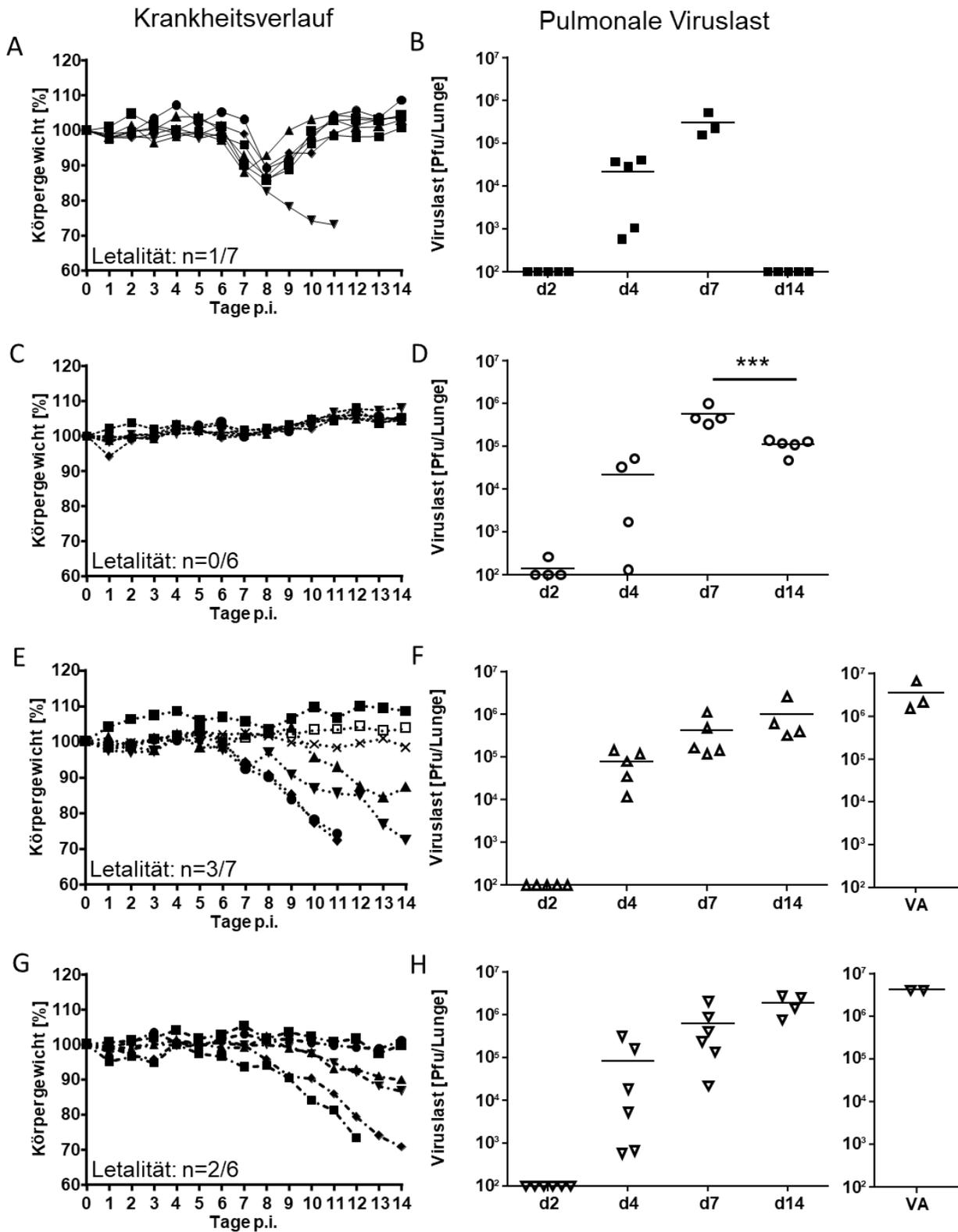


Abb. 20: B-Lymphozyten tragen zur partiellen Viruskontrolle bei milder bis fehlender Symptomatik bei. (A,B) C57BL/6 -, (C,D) B6.TCR $\beta^{\delta^{-}}$ -, (E,F) B6.Rag1 $^{-/-}$ - und (G,H) B6.Rag1.Cy $^{-/-}$ -Mäuse wurden mit 300 Pfu PVM 15 pro Maus intranasal infiziert und das Körpergewicht relativ zu Tag 0 (Krankheitsverlauf) sowie die pulmonale Viruslast für die Tage 2, 4, 7 und 14 bzw. den Zeitpunkt des Versuchsabbruches (VA) mittels Plaque-Assay bestimmt. Für Jeden Zeitpunkt wurden 3 bis 7 Mäusen aus zwei oder mehr unabhängigen Versuchen verwendet. Statistische Auswertung: One-Way ANOVA mit Bonferroni-Posttest: (***) $p < 0,001$.

3.2.2 Die Letalität ist assoziiert mit Kontrollverlust über die Virusvermehrung.

Frey et al. 2008 ermittelten, dass T-Zell-defiziente Mäuse (B6.TCR $\beta^{\delta^{-}}$) nach einer Infektionsdosis von 3500 Pfu sichtbare Krankheitssymptome und 100%ige Letalität entwickelten (Frey et al., 2008). Zur Ermittlung einer Infektionsdosis, bei welcher T-Zell-defiziente Mäuse erstmals klinische Symptome entwickeln, wurden Tiere der zuvor verwendeten transgenen Mauslinien im Vergleich zu C57BL/6-Mäusen mit ansteigenden Dosen PVM 15, d.h. mit 500, 1000 sowie 1500 Pfu pro Maus infiziert.

Nach der Infektion mit 500 Pfu/Maus konnte eine verstärkte Gewichtabnahme in den immunkompetenten Kontrolltieren festgestellt werden. 67% der Tiere (8 von 12) wiesen transiente signifikante Gewichtsverluste beginnend an Tag 6 bis Tag 10 p.i. um 17,2% ihres Ausgangsgewichtes auf. 7 von 8 dieser Tiere hatten an Tag 14 p.i. wieder ihr Ausgangsgewicht erreicht. Außerdem mussten 25% der Mäuse (3 von 12) wegen des Erreichens der Abbruchkriterien getötet werden. Eine Maus zeigte den gesamten Versuchsverlauf keine klinischen Symptome (Abb. 21A). Dies entsprach den Erwartungen, da die Infektionsdosis erhöht wurde. B6.TCR $\beta^{\delta^{-}}$ -Mäuse hingegen zeigten auch bei dieser Infektionsdosis keine klinischen Symptome (Abb. 21B). Bei T- und B-Zell-defizienten B6.Rag1 $^{-/-}$ -Mäusen ging dagegen die Dosiserhöhung mit einer erhöhten Mortalitätsrate (66%, bzw. 6 von 9 Tieren) im Vergleich zur Infektion mit 300 Pfu PVM (43%, Abb. 20E) einher. Die Krankheitsverläufe waren im Vergleich mit den Verläufen nach 300 Pfu PVM außerdem weniger heterogen. Ein Gewichtsverlust setzte bereits nach Tag 5 ein und die ersten Tiere mussten schon an Tag 9 p.i. nach der Infektion getötet werden. Drei Tiere wiesen jedoch auch hier asymptomatische Verläufe auf (Abb. 21C). Dagegen waren Infektionsverläufe bei B6.Rag1.Cy $^{-/-}$ -Mäuse bis Tag 14 p.i. 100% letal (Abb. 21D). Die Heterogenität der Krankheitsverläufe hinsichtlich des

Gewichtsverlustes war hier jedoch im Vergleich zur Infektion mit 300 Pfu PVM stark reduziert. Der Gewichtsverlust setzte bei einigen Tieren bereits Tag 7 p.i., bei anderen erst 2 Tage später ein. Erste Versuchsabbrüche mussten bereits Tag 11 p.i. durchgeführt werden, die letzten Tag 14 p.i.. Die Homogenität der Krankheitsverläufe zeigte sich bereits nach der Infektion dieser transgenen Mauslinie mit 300 Pfu PVM (Abb. 20G).

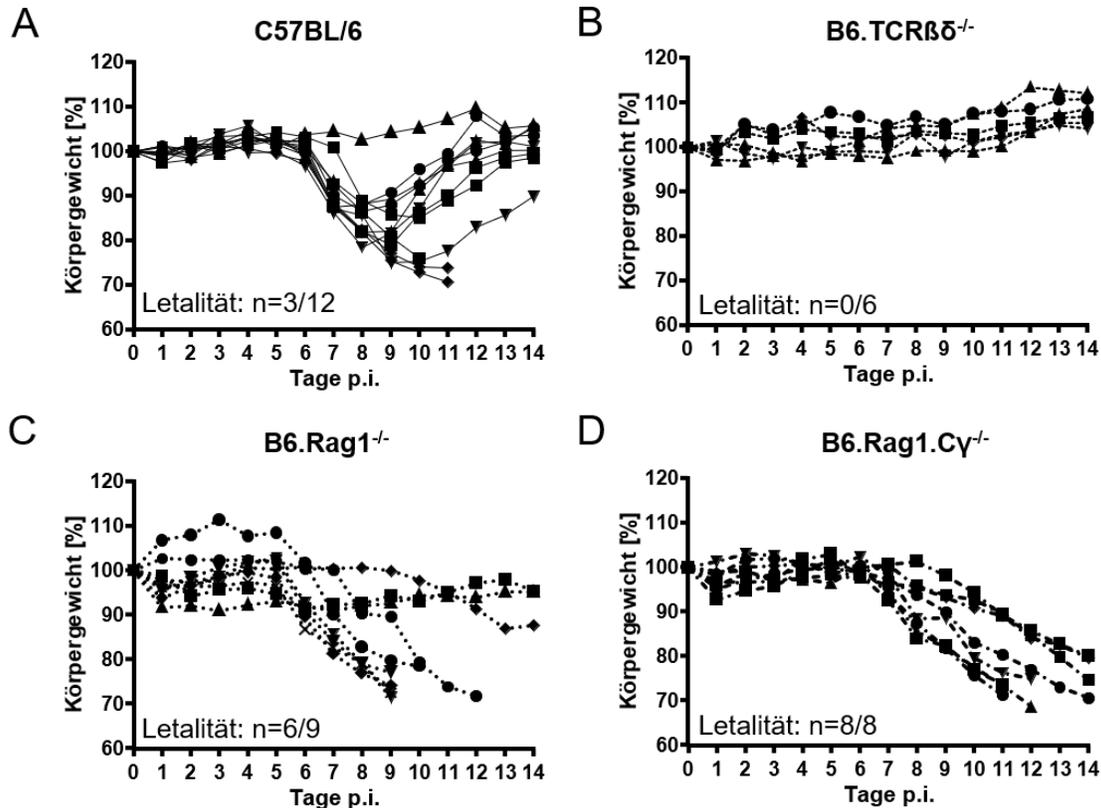


Abb. 21: Morbidität und Mortalität nach Infektion mit 500 Pfu PVM. (A) C57BL/6-, (B) B6.TCRβδ^{-/-}-, (C) B6.Rag1^{-/-}- und (D) B6.Rag1.Cγ^{-/-}-Mäuse wurden mit 500 Pfu PVM 15 intranasal infiziert und das relative Körpergewicht zu dem Gewicht an Tag 0 von insgesamt 6 bis 12 Mäusen pro Gruppe in mehr als zwei unabhängigen Versuchen bestimmt.

Für C57BL/6-Mäuse stellte eine Infektionsdosis von 1000 Pfu/Maus annähernd die LD₅₀ dar, da 45,5% der Tiere überlebten (n=5) und 54,5% die Versuchsabbruchkriterien erreichten (n=6) (Abb. 22A). An Tag 14 p.i. lag die Viruslast in den immunkompetenten Kontrolltieren unter dem Detektionslimit. Dagegen wurden in den Lungen zweier aufgrund der VA-Kriterien getöteten Tiere noch ein geringer Titer von infektiösen PVM-Partikeln nachgewiesen (337 Pfu/Maus bzw. 1,1*10⁴ Pfu/Maus). Diese beiden Tiere

wurden an Tag 8 bzw. 10 p.i. getötet (Abb. 22B). Bei B6.TCR $\beta\delta^{-/-}$ -Mäusen waren die Krankheitsverläufe bestimmt am Gewichtsverlust ähnlich zu jenen von B6.Rag1 $^{-/-}$ -Mäusen nach einer Infektion mit 300 Pfu pro Maus. 60% der T-Zell-defizienten Mäusen (6 von 10 Mäusen) mussten aufgrund des Erreichens der Abbruchkriterien getötet werden, obwohl zwei Mäuse eine leichte Gewichtszunahme an Tag 14 p.i., dem letzten Versuchstag aufwiesen (Abb. 22C). Bei drei der vier überlebenden Mäuse konnte keine Gewichtsabnahme beobachtet werden. Bei einem Tier kam es jedoch zu einer transienten Gewichtsreduktion bis Tag 11 p.i. um rund 12% im Vergleich zum Ausgangsgewicht. Der Verlust der Viruskontrolle wurde hier besonders deutlich, da die Viruslast in den Lungen von Mäusen, die nach Erreichen der Abbruchkriterien getötet werden mussten, im Vergleich zur pulmonalen Viruslast von bis Tag 14 p.i. überlebenden Tieren um das 13fache, nämlich $5,6 \cdot 10^6$ Pfu/Lunge im Vergleich zu $4,1 \cdot 10^5$ Pfu/Lunge, erhöht war (Abb. 22D).

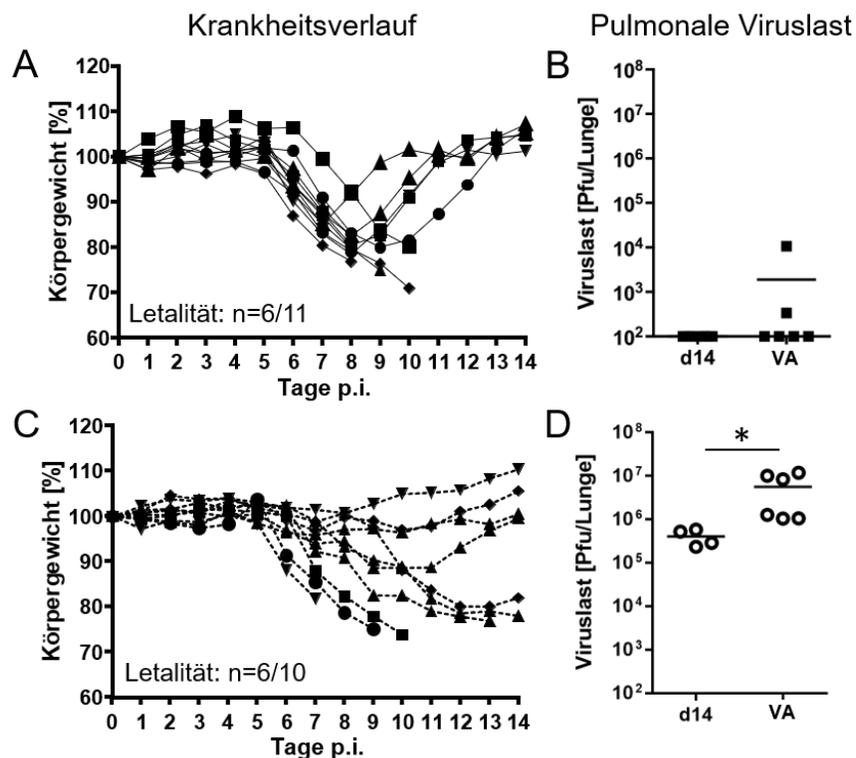


Abb. 22: Morbidität und Mortalität nach Infektion mit 1000 Pfu PVM. (A,B) C57BL/6- und (C,D) B6.TCR $\beta\delta^{-/-}$ -Mäuse wurden mit 1000 Pfu PVM 15 intranasal infiziert und das relative Körpergewicht über 14 Tage oder bis zum Versuchsabbruch (VA) bestimmt. Die Viruslast in der Lunge wurde für Tag 14 p.i. bzw. für den Zeitpunkt des Versuchsabbruches mittels Plaque-Assay analysiert. Es wurden insgesamt 10-11 Mäusen pro Mauslinie in mehr als zwei unabhängigen Versuchen untersucht. Statistische Auswertung: t-Test, (*) $p < 0,05$.

Eine Infektion mit 1500 Pfu PVM 15 pro Tier verlief für immunkompetente C57BL/6-Mäuse zu 100% letal. Der Verlauf der Viruslast war bis Tag 7 p.i. ähnlich zum Verlauf nach einer Infektion mit 300 Pfu/Maus PVM. Zum Zeitpunkt des Versuchsabbruchs konnte jedoch nach einer Infektionsdosis von 1500 Pfu PVM in allen sechs Tieren noch Virus in der Lunge nachgewiesen werden. Die Viruslast war jedoch von Tier zu Tier verschieden und reichte von $1,3 \cdot 10^2$ Pfu/Lunge bis $3,8 \cdot 10^6$ Pfu/Lunge (Abb. 23A, B). Dies ist im Unterschied zu der Beobachtung in Kap 3.2.1 nach einer Infektion mit 300 Pfu PVM. Hier konnte Tag 14 p.i. kein replikationsfähiges Virus mit der verwendeten Analyseverfahren ermittelt werden (Abb. 20B). T-Zell-defiziente B6.TCR $\beta\delta^{-/-}$ -Mäuse hatten ebenfalls eine stark gestiegene Mortalitätsrate (75%, 6 von 8 Tieren) und der Krankheitsverlauf der einzelnen Tiere war auch hier heterogen. So setzte der Gewichtsverlust bereits nach Tag 5 ein, und die meisten Tiere mussten bereits an Tag 9 und 10 p.i. getötet werden. Bei zwei weiteren Tieren verlief der Gewichtsverlust langsamer, so dass sie erst an Tag 13 und 14 p.i. getötet wurden. Bei zwei weiteren Mäusen verlief die Infektion bis zum Versuchsende (Tag 14 p.i.) asymptomatisch oder nur mit einem geringen, augenscheinlich transienten Gewichtsverlust. Die Entwicklung der Viruslast war hier bis Tag 7 p.i. vergleichbar zum Verlauf der Viruslast in der Lunge der immunkompetenten C57BL/6-Mäuse. Auch hier lässt sich auf einen Verlust der Viruskontrolle schließen, da bei letal verlaufenden Infektionen zum Zeitpunkt des Versuchsabbruchs eine pulmonale Viruslast von $8,7 \cdot 10^6$ Pfu/Lunge festgestellt werden konnte, welche damit um das 25fache höher lag als die Viruslast in den Lungen von Mäusen, die bis Tag 14 p.i. überlebten ($3,4 \cdot 10^5$ Pfu/Lunge) (Abb. 23D).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass eine Erhöhung der Infektionsdosis um das 3-5fache auf 1000 Pfu/ Maus notwendig war, um Morbidität und Mortalität bei B6.TCR $\beta\delta^{-/-}$ -Mäusen zu induzieren. Allerdings konnte keine Dosis identifiziert werden, die nur zu symptomatischen, aber nicht-letalen Infektionsverläufen führt. Eine hohe Heterogenität bzgl. der klinischen Symptome und dem Ausgang der Infektion scheint nach Analyse dieser Versuche ein Kennzeichen von Infektionen unter bestimmten Immundefizienzen zu sein. Letale Infektionsverläufe bei den untersuchten Immundefizienzen sind dabei mit einem Verlust der Viruskontrolle assoziiert.

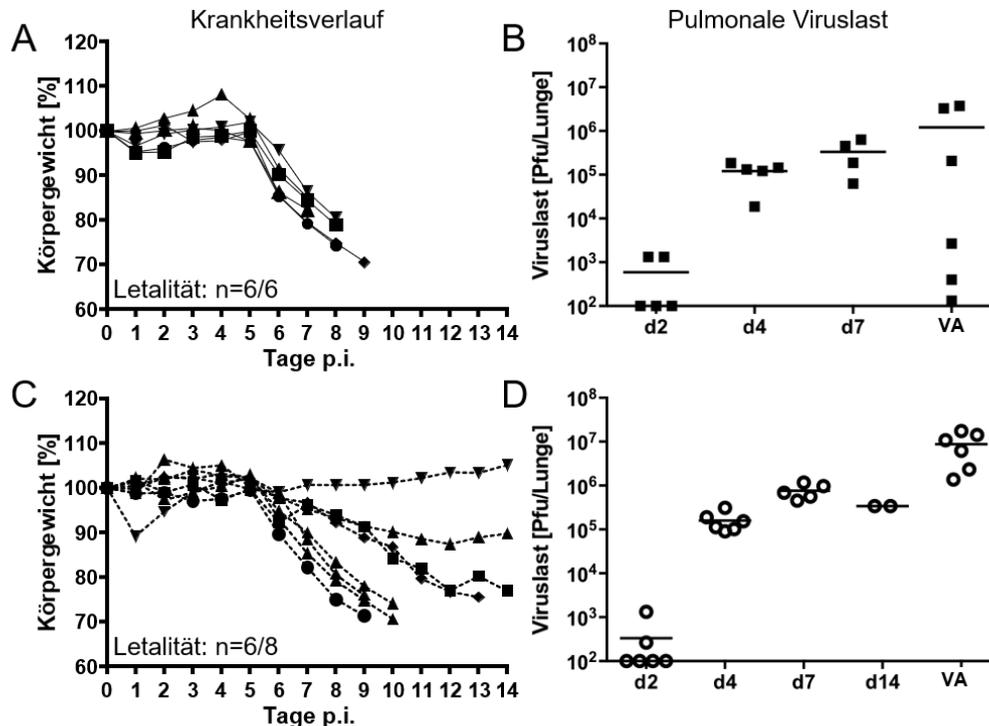


Abb. 23: Morbidität und Mortalität nach Infektion mit 1500 Pfu PVM. (A,B) C57BL/6- und (C,D) B6.TCR $\beta\delta^{-/-}$ -Mäuse wurden mit 1500 Pfu PVM 15 pro Maus intranasal infiziert und das relative Körpergewicht über 14 Tage oder bis zum Versuchsabbruch (VA) bestimmt. Die Viruslast in der Lunge wurde für die Tage 2, 4, 7 und 14 p.i. bzw. für den Zeitpunkt des Versuchsabbruchs (VA) mittels Plaque-Assay analysiert. Es wurden insgesamt 4-8 Mäuse pro Mauslinie pro Zeitpunkt in mehr als zwei unabhängigen Versuchen untersucht. Aufgrund nur zweier überlebender B6.TCR $\beta\delta^{-/-}$ -Mäuse Tag 14p.i. wurde keine statistische Analyse durchgeführt.

3.2.3 B-Lymphozyten werden effizient in das infizierte Lungengewebe von B6.TCR $\beta\delta^{-/-}$ -Mäusen rekrutiert.

In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass B6.TCR $\beta\delta^{-/-}$ -Mäuse nach der Infektion mit bis zu 500 Pfu PVM kein Gewicht als Parameter für klinische Symptome verlieren, das Virus aber nicht eliminieren können, die Virusvermehrung aber teilweise kontrollieren. B-Zellen könnten diese anteilige Viruskontrolle, die voraussichtlich für das Überleben der Tiere verantwortlich ist, vermitteln. Im Folgenden sollte daher zunächst die spatiotemporale Rekrutierung von B-Zellen in die Lunge von PVM-infizierten B6.TCR $\beta\delta^{-/-}$ -Mäusen untersucht werden. Dazu wurden C57BL/6- und B6.TCR $\beta\delta^{-/-}$ -Mäuse mit 300 Pfu PVM 15 infiziert, an den Tagen 2, 7, 10 und 14 p.i. getötet und die Lunge lavagiert (BAL), um das Rekrutierungsmuster

der Zellen direkt in den Atemwegen und Alveolen, sowie im Lungenparenchym zu bestimmen. Zur Bestimmung der B-Zell-Population mittels Durchflusszytometrie wurden vitale Immunzellen als ZombieViolet^{dim} und CD45⁺ identifiziert. Die Immunzellen wurden nun anhand von Größe (FSC) und Granularität (SSC) charakterisiert. Die identifizierten Lymphozyten wurden anschließend mittels der beiden Marker CD3 und Nk-1.1 weiter analysiert. CD3⁻ NK-1.1⁻ Lymphozyten wurden anschließend auf die Expression von B220 untersucht. B-Lymphozyten konnten als B220⁺ Population bestimmt werden (Abb. 24A).

Das Rekrutierungsmuster von B-Zellen in die Lungen (Lungenparenchym und Bronchoalveolarlumen) von T-Zell-defizienten B6.TCRβδ^{-/-}-Mäusen und immunkompetenten Kontrolltieren war vergleichbar (Abb. 24B, C). Dabei konnte ein statistisch signifikanter Anstieg der B-Lymphozyten zwischen Tag 2 und 10 p.i. im Lungenparenchym von immunkompetenten Kontrolltieren von $4,7 \cdot 10^6$ auf $8,3 \cdot 10^6$ B-Zellen pro Lunge und im Lungenparenchym von B6.TCRβδ^{-/-}-Mäusen von $4,8 \cdot 10^6$ auf $9,2 \cdot 10^6$ B-Zellen pro Lunge festgestellt werden (Abb. 24B). Insgesamt befand sich der Großteil der B-Lymphozyten, wie erwartet, im Lungeninterstitium. Es konnte im Vergleich dazu nur ein geringer Teil dieser Zellpopulation im Bronchoalveolarlumen nachgewiesen werden. Hier schien es ebenfalls einen Anstieg der B-Lymphozyten von Tag 2 bis Tag 10 in den immunkompetenten Kontrolltieren und B6.TCRβδ^{-/-}-Mäusen zu geben (Abb. 24C).

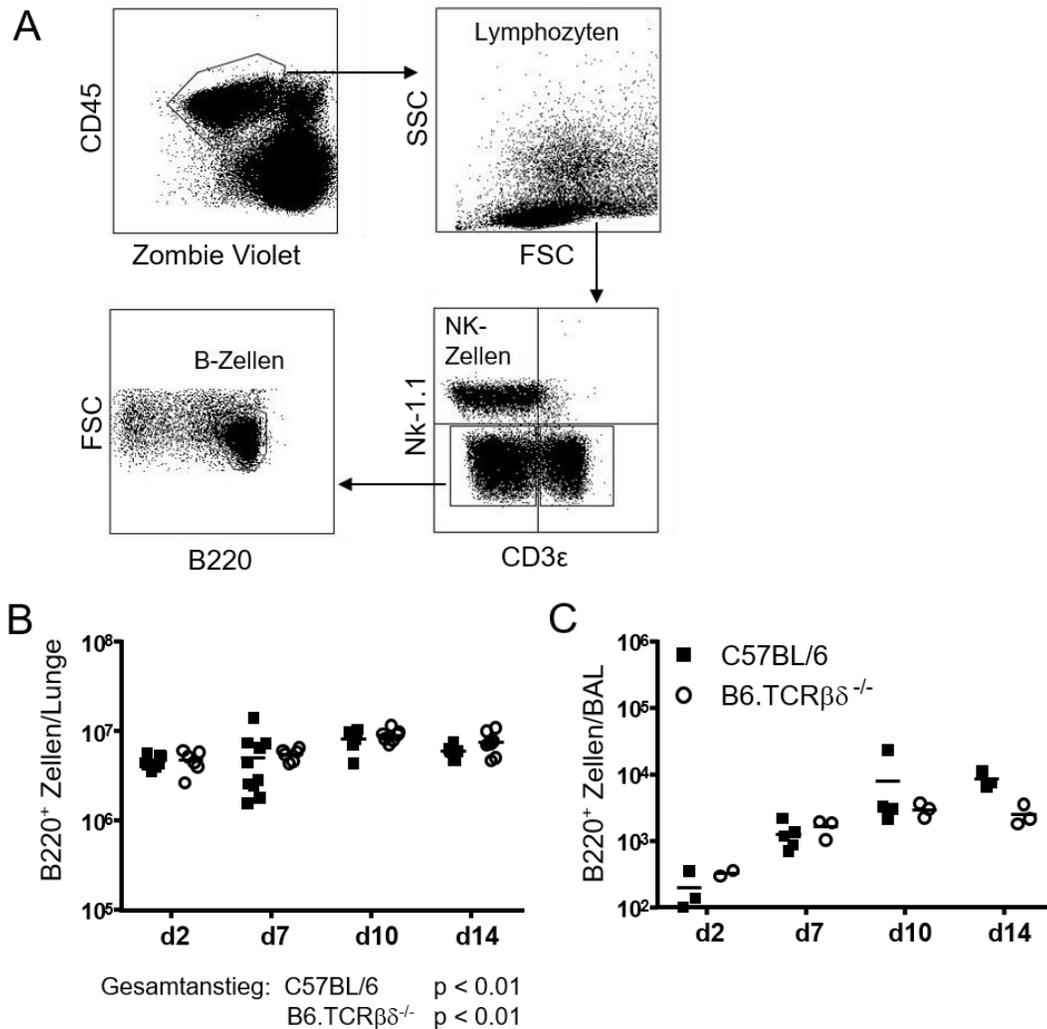


Abb. 24: Rekrutierung von B-Lymphozyten nach subletaler Infektion mit PVM. C57BL/6-Mäuse und B6.TCRβδ^{-/-}-Mäuse wurden mit 300 Pfu PVM 15 infiziert und an den Tag 2, 7, 10 und 14 pi getötet. Die Lungen der Mäuse wurden lavagiert (BAL) und das verbliebene Lungengewebe wurde in eine Einzelzellsuspension aufgearbeitet. BAL-Zellen und Zellen aus dem Lungengewebe wurden anschließend durchflusszytometrisch analysiert. (A) Gating-Strategie zur Identifizierung von B-Lymphozyten mittels durchflusszytometrischer Analyse. Zur Bestimmung der B-Zellen wurden vitale Immunzellen als ZombieViolet^{dim} und CD45⁺ identifiziert. Innerhalb dieser Immunzellpopulation wurden Lymphozyten anhand von Größe (FSC) und Granularität (SSC), und anschließend mittels der Marker B220, Nk-1.1 und CD3ε weiter unterteilt. B-Lymphozyten wurden als Nk-1.1⁻, CD3⁻ und B220⁺ Population bestimmt. Zellen aus dem Lungeninterstitium (B) und Zellen aus dem Bronchoalveolarlumen (C) wurden mit Fluorochromgekoppelten Primärantikörpern gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Für die Färbung wurde das Färbepanel I (Kap. 2.2.5.2) verwendet. Die Datenpunkte stammen aus zwei oder mehr unabhängigen Versuchen (n≥4). Jeder Datenpunkt in der Graphik (B) entspricht einer Maus. Für die Analyse des Bronchoalveolarlumens wurden jeweils die Zellen zweier Mäuse vereinigt. Statistische Auswertung: 2-Way ANOVA mit Bonferroni-Posttest; (***) p < 0.01.

Durch die Methode der Durchflusszytometrie kann nur die absolute Anzahl bestimmter Zellpopulationen, wie hier der B-Lymphozyten, in einem Gewebe bestimmt werden. Um Informationen über die genaue Lokalisation und das Rekrutierungsmuster von B-Zellen

in die Lunge von B6.TCR $\beta\delta^{-/-}$ -Mäusen zu erlangen, wurden Lungen von mit PVM 15 infizierten Mäusen zu den angegebenen Zeitpunkten für immunhistologische Untersuchungen entnommen, mit 4% PFA fixiert und Gefrierschnitte angefertigt, welche anschließend mit Antikörpern gegen B220, IgM, IgA, IgG, CD4 und/oder PVM-G gefärbt wurden. Die Schnitte wurden mithilfe der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie analysiert und rekrutierte Marker-positive Lymphozyten im Vergleich zu infizierten Zellen dokumentiert.

Die spatiotemporale Entwicklung der Infektion und der B-Zell-Rekrutierung in die Lunge von PVM-infizierten C57BL/6- und B6.TCR $\beta\delta^{-/-}$ -Mäusen bestätigte weitestgehend die vorhergehenden durchflusszytometrischen und infektiologischen Untersuchungen. Das PVM-G-Protein konnte vermehrt ab Tag 4 p.i. in beiden Mauslinien in alveolaren Zellen sowie in bronchialen Zellen festgestellt werden (Abb. 25). Die meisten PVM-positiven Zellen wurden Tag 7 p.i. beobachtet, was mit dem unter 3.2.1 ermittelten Viruslastverlauf korreliert. Die Lungen von immunkompetenten Kontrollmäusen wiesen an Tag 14 p.i. kein detektierbares virales G-Protein mehr auf im Unterschied zu Lungenschnitten von B6.TCR $\beta\delta^{-/-}$ -Mäusen. Wie zuvor bereits durchflusszytometrisch bestimmt, konnten B220⁺-Zellen in beiden Mauslinien bereits ab Tag 2 p.i. detektiert werden und sie nahmen im Verlauf der Infektion zu. In immunkompetenten Mäusen kolo-kalisiert sie verstärkt mit CD4⁺ T-Zellen an Tag 14 p.i. perivaskulär. Im Unterschied zu immunkompetenten Mäusen schienen B220⁺-Zellen in den Lungen von B6.TCR $\beta\delta^{-/-}$ -Mäuse direkt mit den infizierten, PVM-G positiven Zellen an Tag 7 zu interagieren (Abb. 25, Kasten). Da pDZ ebenfalls B220 auf ihrer Oberfläche exprimieren, kann allerdings hier eine Interaktion dieses Zelltyps mit den infizierten Epithelzellen nicht ausgeschlossen werden. Zur Unterscheidung wären weitere Färbungen mit CD19 und CD11c notwendig.

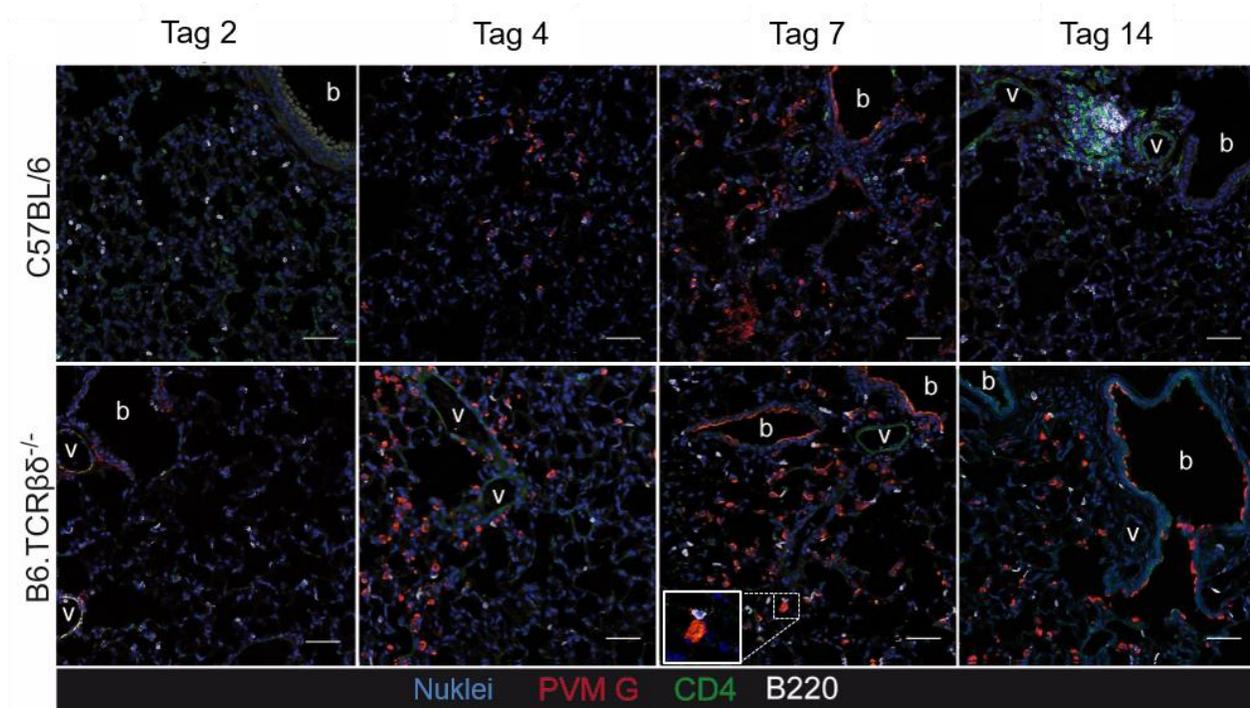


Abb. 25: Spatiotemporale Entwicklung von pulmonaler B- und $CD4^+$ T-Zell-Rekrutierung und PVM-Infektion bei B6.TCR $\beta\delta^{-/-}$ - und Kontroll-Mäusen. C57BL/6-Mäuse und B6.TCR $\beta\delta^{-/-}$ -Mäuse wurden mit 300 Pfu PVM 15 infiziert und an den Tagen 2, 4, 7 und 14 p.i. mittels CO_2 getötet. Die Lungen wurden mit 4% PFA fixiert. Nach Entwässerung und Einbettung in Tissue Tek® O.C.T.™ wurden 8 μm dicke Kryoschnitte der Lungen angefertigt. Lymphozyten und infizierte Zellen wurden mittels spezifischer direkter und indirekter Antikörperfärbung dargestellt: die Lungenschnitte wurden mit Antikörpern gegen PVM G (Sekundärantikörper: anti-Kaninchen IgG AlexaFluor®555, rot), B220 (AlexaFluor®647, weiß) und CD4 (Sekundärantikörper: anti-Ratte IgG AlexaFluor®488, grün) gefärbt. Alle Schnitte wurden zur Darstellung von Zellkernen mit DAPI behandelt. Maßstab=50 μm ; (v) Blutgefäß; (b) Bronchien/Bronchiolen; Kästchen: Vergrößerung der entsprechenden Regionen.

Zur genaueren Charakterisierung der B-Zellen und deren Reifungsstatus wurden Lungenschnitte (Tag 14 p.i.) mit Antikörpern gegen murines B220, IgG, IgM und IgA gefärbt. Die hauptsächlich perivaskulär lokalisierten Zellen im Lungengewebe immunkompetenter Mäuse waren einfach positiv für B220, IgA bzw. IgM (Abb. 26) und IgG (Abb. 27). Dieses Expressionsmuster deutet auf den fortgeschrittenen Reifegrad dieser Zellen in Richtung Plasmablasten und Plasmazellen hin, mit deren typischen Ig-Klassenwechsel vom IgM-Typ zu IgG- und IgA-Antikörpern (Oracki et al., 2010). Im Unterschied dazu exprimierten B-Zellen im Lungengewebe von B6.TCR $\beta\delta^{-/-}$ -Mäusen an Tag 14 p.i. B220 und IgM zur gleichen Zeit auf der Oberfläche (Abb. 26). Des Weiteren wurden B-Zellen identifiziert, die IgM und IgG doppelpositiv waren und ebenfalls perivaskulär lokalisierten (Abb. 27). Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass B-Zellen aus T-Zell-defizienten Mäusen sich bis zu dem bestimmten Zeitpunkt nicht

vollständig zu einfach positiven IgM⁺, IgG⁺ und IgA⁺ B-Zellen entwickeln konnten. Im Vergleich dazu wiesen die Zellen immunkompetenter Kontrolltiere keine Doppelfärbungen auf, als ein Zeichen für die vollständige Reifung der B-Zellen zu IgM⁺, IgG⁺ und IgA⁺ B-Lymphozyten. Es ist möglich, dass die Zellen in einem Stadium zwischen den Prä-Plasmablasten und den Plasmablasten verharren (Oracki et al., 2010) oder die Reifung zu Plasmablasten verzögert ist. Eine Doppelexpression von B-Zell-Rezeptoren auf der Oberfläche von B-Zellen wurde bereits für Patienten mit Hypogammaglobulinämie, verursacht durch verschiedene Immundefizienz-Syndrome, beschrieben. Diese Zellen scheinen in diesem Stadium zu verharren, da z.B. die IgG-Antikörperspiegel in diesen Patienten sehr niedrig bis nicht vorhanden sind, obwohl die B-Zellen neben IgM- auch IgG-Moleküle auf ihrer Oberfläche exprimierten (Fiorilli et al., 1986). IgA-positive Zellen konnte bei beiden Mauslinien nur in geringem Maße detektiert werden (Abb. 26 und Abb. 27).

Zusammenfassend konnte mittels durchflusszytometrischer Analyse und Immunfluoreszenzmikroskopie beobachtet werden, dass B-Zellen in den Lungen von B6.TCRβδ^{-/-}-Mäusen vorkommen und nach einer Infektion zusätzlich rekrutiert werden. Des Weiteren hat die spatiotemporale Untersuchung ergeben, dass die B-Zellen dieser Mäuse an Tag 14 p.i. sich von den B-Zellen immunkompetenter Tiere unterscheiden. Die pulmonalen B-Zellen von C57BL/6-Mäusen könnten an diesem Zeitpunkt bereits IgG-, IgA- bzw. IgM-Antikörper sezernieren, währenddessen in B6.TCRβδ^{-/-}-Mäusen der Reifungsprozess von B-Lymphozyten unvollständig oder verzögert zu sein scheint. Dies wurde durch die gleichzeitige Expression mehrerer Immunglobuline auf der Zelloberfläche angedeutet.

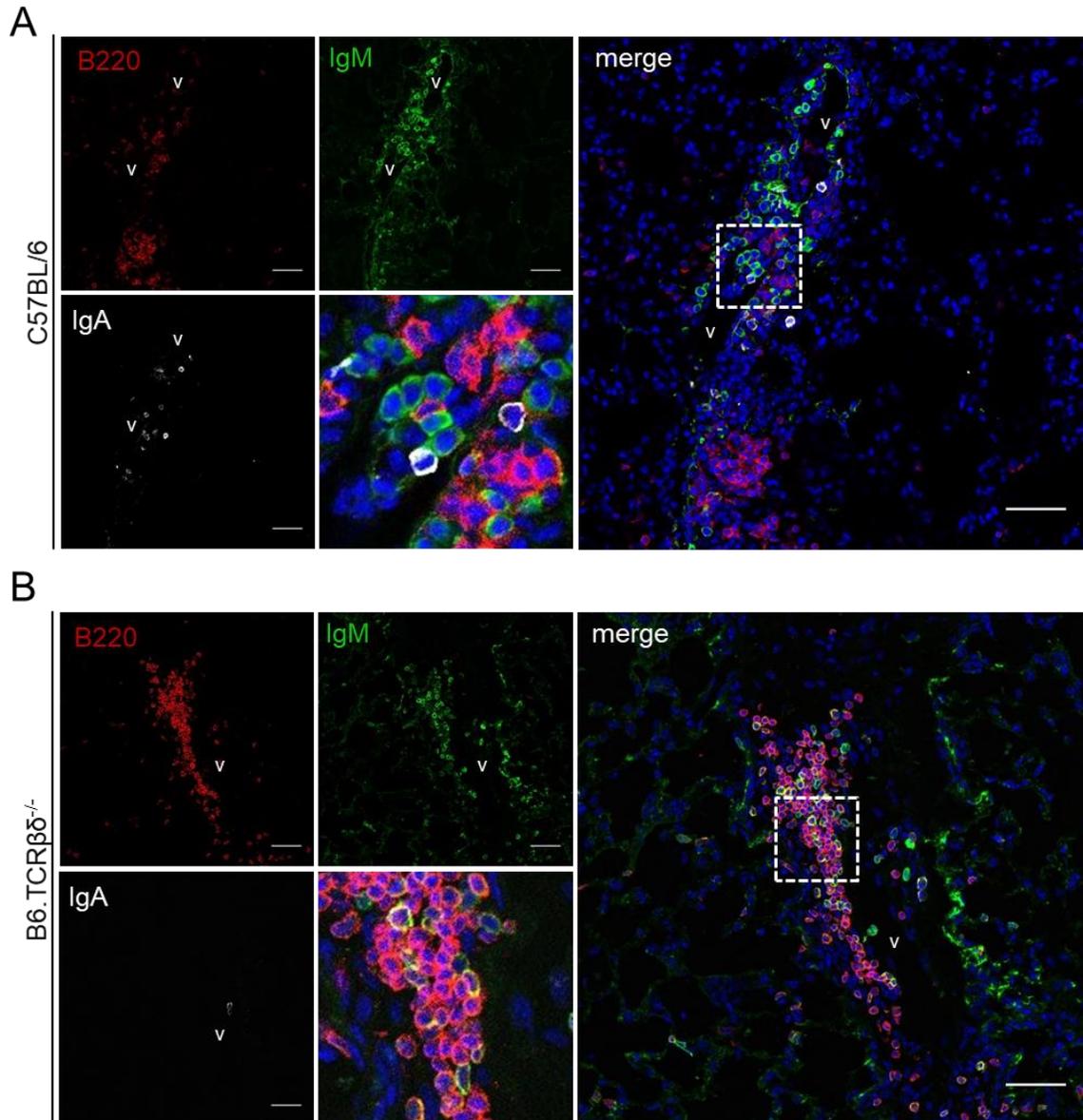


Abb. 26: Pulmonale B-Lymphozyten in $B6.TCR\beta\delta^{-/-}$ -Mäusen sind an Tag 14 nach PVM-Infektion unvollständig differenziert. C57BL/6-Mäuse (A) und $B6.TCR\beta\delta^{-/-}$ -Mäuse (B) wurden mit 300 Pfu PVM 15 infiziert und an Tag 14 p.i. mittels CO_2 getötet. Die Lungen wurden mit 4% PFA fixiert. Nach Entwässerung und Einbettung in Tissue Tek® O.C.T.™ wurden 8 μm dicke Kryoschnitte der Lungen angefertigt. Spezifische Oberflächenmarker von Plasmablasten und Plasmazellen wurden mittels direkter und indirekter Antikörperfärbung dargestellt. Lungenschnitte wurden mit Antikörpern gegen B220 (AlexaFluor®647, rot), IgM (AlexaFluor®488, grün) und IgA (Sekundärantikörper: anti-Ratte IgG AlexaFluor®555, weiß) gefärbt. Alle Lungenschnitte wurden zur Darstellung von Zellkernen mit DAPI behandelt. Maßstab=50 μm ; (v) Blutgefäß; (b) Bronchien/Bronchiolen; (A,B) Kästchen: Vergrößerung der entsprechenden Regionen.

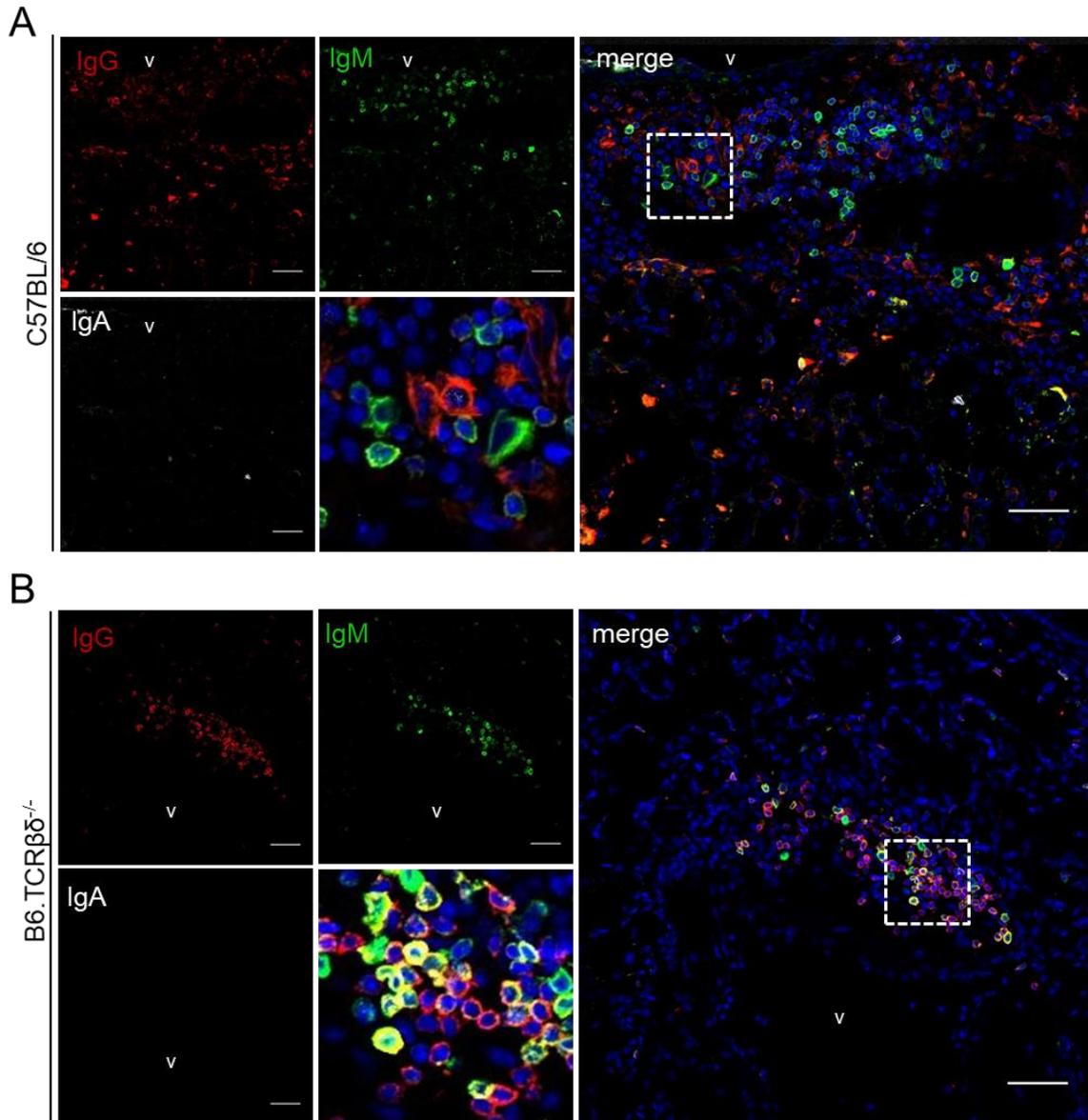


Abb. 27: Viele B-Lymphozyten in der Lunge von $B6.TCR\beta\delta^{-/-}$ -Mäusen sind an Tag 14 p.i. IgM und IgG doppelpositiv. C57BL/6-Mäuse (A) und $B6.TCR\beta\delta^{-/-}$ -Mäuse (B) wurden mit 300 Pfu PVM 15 infiziert und an Tag 14 p.i. mittels CO_2 getötet. Die Lungen wurden mit 4% PFA fixiert. Nach Entwässerung und Einbettung in Tissue Tek® O.C.T.™ wurden 8 μm dicke Kryoschnitte der Lungen angefertigt. Spezifische Oberflächenmarker von Plasmablasten und Plasmazellen wurden mittels direkter und indirekter Antikörperfärbung dargestellt. Lungenschnitte wurden mit Antikörpern gegen IgM (AlexaFluor®488, grün), IgA (Sekundärantikörper: anti-Ratte IgG DyLight™649, weiß) und IgG (AlexaFluor®555, rot) gefärbt. Alle Lungenschnitte wurden zur Darstellung von Zellkernen mit DAPI behandelt. Maßstab=50 μm ; (v) Blutgefäß; (b) Bronchien/Bronchiolen; (A,B) Kästchen: Vergrößerung der entsprechenden Regionen.

3.2.4 Neutralisationsaktivität und PVM-spezifische IgM-Antikörper im Serum von B6.TCR $\beta\delta^{-/-}$ -Mäusen

Die immunhistologischen Ergebnisse lieferten bereits Hinweise bzgl. einer protektiven Antikörpersynthese bei C57BL/6- und eventuell bei B6.TCR $\beta\delta^{-/-}$ -Mäusen. Zur genaueren Analyse der Funktionalität der pulmonalen B-Lymphozyten wurde Serum und BAL-Flüssigkeit PVM- bzw., als Kontrolle, PBS-infizierter Mäuse mittels Plaque-Reduktions-Neutralisierungstest (PRNT₅₀) und Enzym-gekoppelter Immunosorbent-Assay (ELISA) untersucht. Der PVM-spezifische PRNT₅₀ wurde wie unter Kap. 2.2.2.6 beschrieben durchgeführt. Für die Auswertung wurde das Reziprok der höchsten Verdünnungsstufe verwendet, in welcher die in den Proben vorhandenen Antikörper noch mindestens 50% der Viruspartikel neutralisiert haben. Um die Konzentration an PVM-spezifischen IgM- und IgG-Antikörper im Serum und in der BAL-Flüssigkeit an Tag 14p.i., dem Tag der höchsten gemessenen Neutralisationskapazität, zu ermitteln, wurden PVM-spezifische ELISAs wie unter Kap. 2.2.5.3 beschrieben etabliert. Zur Auswertung wurde der reziproke Wert der höchsten Verdünnung angegeben, deren Optische Dichte (OD) über der des Leerwertes (PBS) lag.

Der Neutralisationstiter in Serum bzw. BAL-Flüssigkeit von C57BL/6 –Kontrollmäusen war an Tag 14 p.i. höher mit Log₂ 12,8 bzw. 6,67 im Vergleich zur PBS-infizierten Kontrolle mit Log₂ 4,3 bzw. 2,3. Dieses Ergebnis spiegelt die unter 3.2.3 ermittelten Beobachtungen der Rekrutierung von B-Lymphozyten über einen Zeitraum von 14 Tagen nach einer Infektion in das Lungengewebe wieder. Für Tag 7 p.i. konnte kein signifikanter Unterschied der Neutralisationskapazität in Serum und BAL-Flüssigkeit zur PBS-infizierten Kontrolle ermittelt werden. Die Seren von B6.TCR $\beta\delta^{-/-}$ -Mäusen an Tag 14 p.i. nach einer PVM-Infektion enthielten ebenfalls eine signifikante Neutralisationskapazität im Vergleich zu Seren PBS-infizierter Kontrolltiere (Titer von Log₂ 6,55 vs. Log₂ 3,3). Allerdings konnte in der BAL-Flüssigkeit von diesen Tieren kein statistisch signifikanter Unterschied zu PBS-infizierten Mäusen nachgewiesen werden. Nicht überraschend lag der PVM-spezifische Neutralisationstiter an Tag 14 p.i im Serum von B6.TCR $\beta\delta^{-/-}$ -Mäusen mit Log₂ 6,57 signifikant niedriger als im Serum von C57BL/6-Mäusen (Log₂ 12,82). In Bezug zu den unter 3.2.3 geführten immunhistologischen Untersuchungen kann die verringerte Neutralisationskapazität auf den unvollständigen

Reifungsstatus der B-Zellen der T-Zelldefizienten Mäuse zurückgeführt werden (Abb. 27.). Insgesamt war die virusspezifische Neutralisationskapazität in der BAL-Flüssigkeit beider Mauslinien deutlich geringer als im Serum, was eventuell auf die starke Verdünnung der Proteinkonzentration während der Perfusion des Lungengewebes mit PBS zurückzuführen ist. Dies könnte insgesamt die Detektionssensitivität des Tests verringern (Abb. 28).

Der Serumtiter virusspezifischer IgM-Antikörper an Tag 14 p.i. war bei beiden Mauslinien, B6.TCR $\beta\delta^{-/-}$ -Mäusen und immunkompetenten Kontrolltieren, mit einem Anstieg von Log₂ 6,98 (nach Mock-Infektion) auf Log₂ 9,82 bzw. Log₂ 9,11 signifikant erhöht (Abb. 28C). Dabei war kein Unterschied im IgM-Antikörpertiter zwischen den immunkompetenten und den T-Zell-defizienten Tieren zu ermitteln. Beide Mauslinien schienen damit die gleiche Menge an virusspezifischen IgM-Antikörpern zu produzieren. Des Weiteren stieg der IgM-Antikörperspiegel in der BAL-Flüssigkeit infizierter immunkompetenter Mäuse signifikant um das 5fache im Vergleich zu mock-infizierten Tieren an, jedoch nicht bei B6.TCR $\beta\delta^{-/-}$ -Mäusen (Abb. 28D). Im Hinblick auf IgG-Antikörper im Serum und in der BAL-Flüssigkeit PVM-infizierter B6.TCR $\beta\delta^{-/-}$ -Mäuse konnte an Tag 14 p.i. kein Anstieg gegenüber PBS-infizierten Kontrolltieren festgestellt werden. Der IgG-Antikörperspiegel im Serum immunkompetenter C57BL/6-Mäuse stieg indes signifikant von Log₂ 7,65 nach Mock-Infektion auf Log₂ 10,92 nach einer PVM-Infektion an. Ein signifikanter Anstieg des PVM-spezifischen IgG-Antikörperspiegels war ebenfalls in der BAL-Flüssigkeit von Log₂ 0,33 auf Log₂ 5,0 zu beobachten (Abb. 28E, F).

Zusammenfassend kann geschlussfolgert werden, dass B6.TCR $\beta\delta^{-/-}$ -Mäuse innerhalb von 14 Tagen eine virusneutralisierende Aktivität entwickeln, die im Serum nachweisbar ist. Allerdings ist diese Aktivität geringer als bei immunkompetenten Tieren. B6.TCR $\beta\delta^{-/-}$ -Mäuse bilden in diesem Zeitraum PVM-spezifische Antikörper vom IgM-Typ in einem T-Zell unabhängigen Mechanismus, und zwar im gleichen Ausmaß wie immunkompetente Tiere, jedoch nicht vom IgG-Typ. Das Fehlen der IgG-Antikörper könnte eine Reflektion des zuvor beobachteten Reifungsstadiums sein. Das Fehlen einer IgG-Antikörperantwort könnte außerdem die Unterschiede in der Virus-Neutralisationsaktivität zu den immunkompetenten Mäusen begründen.

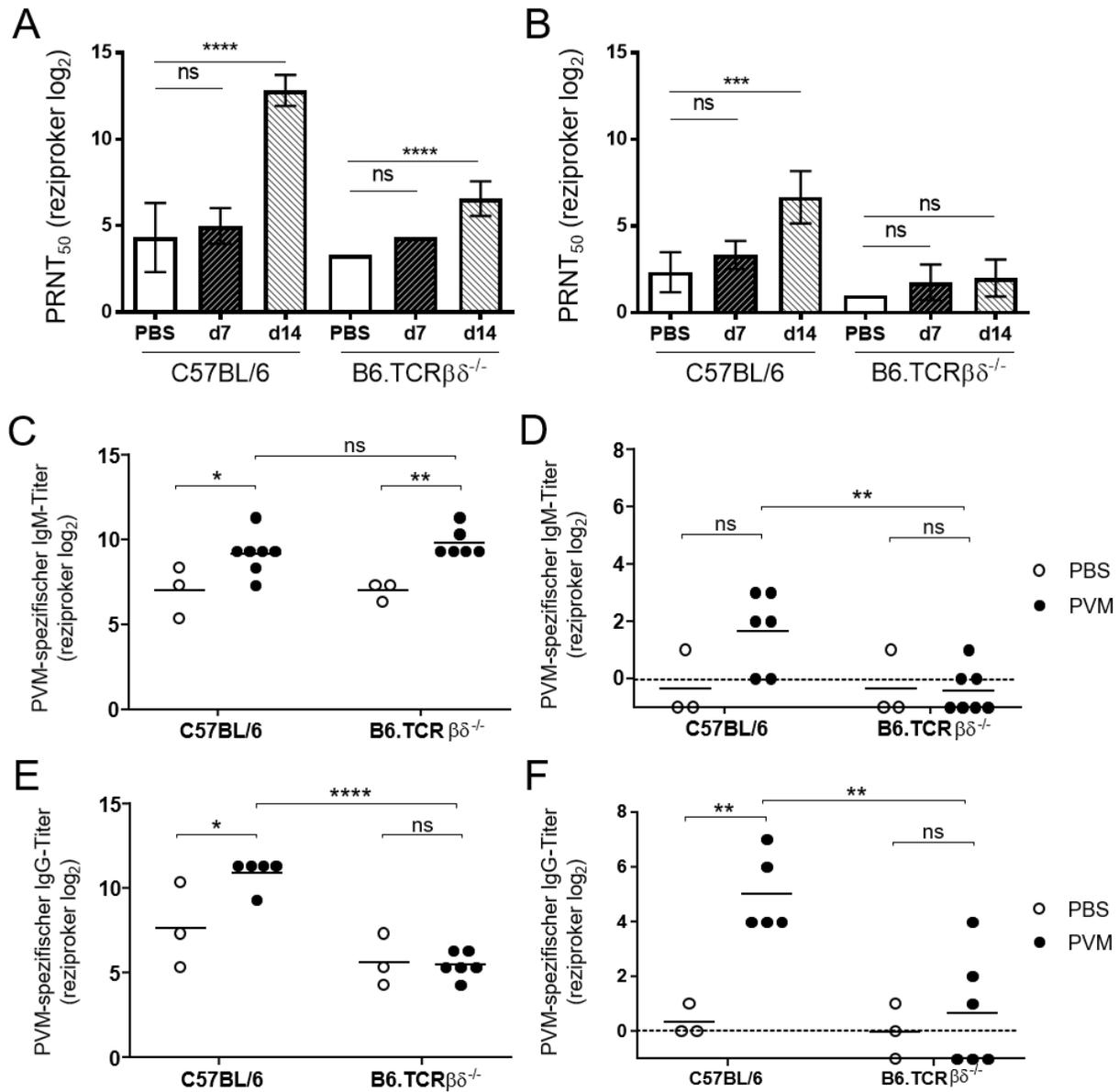


Abb. 28: PVM-spezifische Neutralisationskapazität und IgM-Antikörper bei B6.TCRβδ^{-/-}-Mäusen. C57BL/6-Mäuse und B6.TCRβδ^{-/-}-Mäuse wurden mit 300 Pfu PVM 15 bzw. PBS infiziert. An den Tagen 7 und 14 p.i. wurden die Mäuse getötet und Serum und BAL-Flüssigkeit entnommen. (A,B) Die Neutralisationskapazität in Serum (A) und BAL-Flüssigkeit (B) wurde mittels PRNT₅₀ analysiert. PVM-spezifische IgM- (C,D) und IgG-Antikörper (E,F) in Serum und BAL-Flüssigkeit (in 4-fach Verdünnungen) an Tag 14 p.i. wurden mittels PVM-spezifischem ELISA bestimmt. Die Y-Achse stellt unter (A,B) den reziproken Wert der höchsten Verdünnungsstufe, in welcher die in den Proben vorhandenen Antikörper noch mindestens 50% der Viruspartikel neutralisiert haben, und in (C-F) den reziproken Wert der höchsten Verdünnung, deren Optische Dichte (OD) über der des Leerwertes (PBS) lag, dar. Die Datenpunkte stammen aus 2 oder mehr unabhängigen Experimenten. Jeder Datenpunkt entspricht dabei dem jeweiligen Antikörpertiter der Probe eines individuellen Tieres. Das Detektionslimit des ELISA ist durch eine gepunktete Linie dargestellt. Statistische Auswertung: (A,B) Multiple Comparison mit Dunnett-Test gegen die jeweilige PBS -Kontrolle, (C-F) t-Test: (ns) nicht signifikant, (*) p < 0.05, (**) p < 0.01, (***) p < 0.001, (****) p < 0.0001

3.2.5 Adoptiver B-Zell-Transfer in B6.Rag1^{-/-}-Mäuse verändert die Krankheitsverläufe nach PVM-Infektion.

In den vorherigen Experimenten konnte ein protektiver Effekt von B-Zellen, wahrscheinlich auf Basis einer Induktion von IgM-Antikörpern gezeigt werden. Daher sollte im letzten Schritt untersucht werden, ob das klinische Ergebnis einer PVM-Infektion durch den adoptiven Transfer von B-Lymphozyten in B6.Rag1^{-/-}-Mäuse abgemildert werden kann.

Dazu wurden B-Zellen aus der Milz von im Alter und Geschlecht mit den Empfängertieren übereinstimmenden kongenen Spendertieren mittels negativer Zellisolation angereichert (Kap. 2.2.4.3) und die Reinheit der Präparationen mittels durchflusszytometrischer Analyse überprüft. Die Zell-Präparationen wurden verwendet, wenn sie nach der Isolation zumindest zu 95% aus B-Zellen bestanden. Die immundefizienten Empfängertiere wurden mit $5 \cdot 10^6$ bzw. $1 \cdot 10^7$ B-Zellen, oder PBS als Kontrolle, über die Schwanzvene transplantiert und einen Tag später mit 300 Pfu PVM 15 oder PBS infiziert. Der Krankheitsverlauf jeder einzelnen Maus wurde durch tägliches Bestimmen des Körpergewichts beobachtet. An Tag 14 p.i. bzw. bei Erreichen der Versuchsabbruchkriterien wurden die Mäuse getötet und die Viruslast in der Lunge sowie die B-Zellrekrutierung in das Knochenmark, in die Milz und die Lunge bestimmt (Abb. 29).

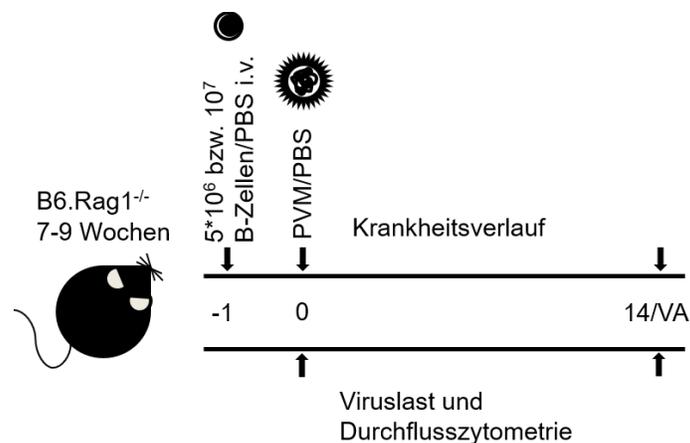


Abb. 29: Adoptiver Transfer von B-Zellen in B6.Rag1^{-/-} Mäuse; schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. Einen Tag vor der Infektion mit 300 Pfu PVM 15 i.n. wurden B6.Rag1^{-/-} -Mäuse mit 5*10⁶ bzw. 1*10⁷ isolierter PVM-naiver B-Zellen aus Milzen kongener Spendertiere transplantiert und anschließend der Krankheitsverlauf anhand des Körpergewichts dokumentiert. An Tag 14 p.i. bzw. wenn die Abbruchkriterien (VA, Kap. 2.2.3.1) erreicht wurden, wurden die Mäuse getötet, die Viruslast im Lungengewebe bestimmt und Anzahl der B-Zellen im Knochenmark, in der Milz und in der Lunge analysiert.

Die Krankheitsverläufe PBS-transplantiertes und PVM infizierter B6.Rag1^{-/-}-Mäuse unterschied sich nicht von denen nicht-transplantiertes B6.Rag1^{-/-} -Tiere in Kap.3.2.1,

Abb. 20. Die Mortalität betrug 71% (5 von 7 Mäusen). Davon hatten 2 Tiere erst an Tag 14 p.i. mehr als 20% des Körpergewichts verloren. Die restlichen bis Tag 14 p.i. überlebenden Mäuse verloren nur gering aber stetig Gewicht. B6.Rag1^{-/-}-Mäuse ohne jedweden Gewichtsverlust wurden nicht beobachtet. Von 12 mit 5*10⁶ B-Zellen transplantierten Versuchstieren entwickelten drei keinerlei Symptome (25%). Währenddessen begannen neun B6.Rag1^{-/-} -Mäuse ab Tag 6 p.i. Gewicht zu verlieren, von denen die meisten innerhalb von 8-10 Tagen p.i. getötet werden mussten. Eine Maus verlor erst ab Tag 9 p.i. Gewicht und wurde an Tag 12 p.i. getötet. Die Diversität der Gewichtsverläufe war jedoch damit im Vergleich zu PBS-transplantierten (und nicht-transplantierten) B6.Rag1^{-/-}-Mäusen deutlich geringer (Abb. 30A). Eine Transplantation von 10⁷ B-Zellen schien nicht das klinische Ergebnis zu verbessern. Drei von vier Empfängertieren mussten zwischen Tag 8-10 p.i. getötet werden. Nur ein Tier überlebte bis zum Versuchende, verlor aber leicht Körpergewicht (Abb. 30C).

Der adoptive Transfer von B-Zellen schien die pulmonale Viruslast infizierter Empfängertiere nicht oder nur leicht zu beeinflussen, da diesbezüglich kein Unterschied zwischen PBS-transplantierten Kontrolltieren und den B-Zell-Empfängermäusen zu beobachten war. Es schien aber, dass die überlebenden Tiere nach der Transplantation von 5*10⁶ bzw. 10⁷ B-Zellen eine geringere Viruslast aufwiesen (6*10⁵ Pfu/Lunge bzw. 2,5*10⁵ Pfu/Lunge) im Vergleich zu den Tieren, die die Abbruchkriterien erreichten (2,6*10⁶ Pfu/Lunge bzw. 2*10⁶ Pfu/Lunge) (Abb. 30B, D). Dies müsste jedoch durch Erhöhung der Tierzahl pro Versuchsgruppe bestätigt werden.

Mit diesem experimentellen Versuchsaufbau konnte der Krankheitsverlauf nicht vollständig umgekehrt werden. Allerdings überlebten einige B-Zell-transplantierte Mäuse

ohne klinische Symptome zu zeigen, die Heterogenität der Krankheitsverläufe typisch für B6.Rag1^{-/-}-Mäuse wurde reduziert.

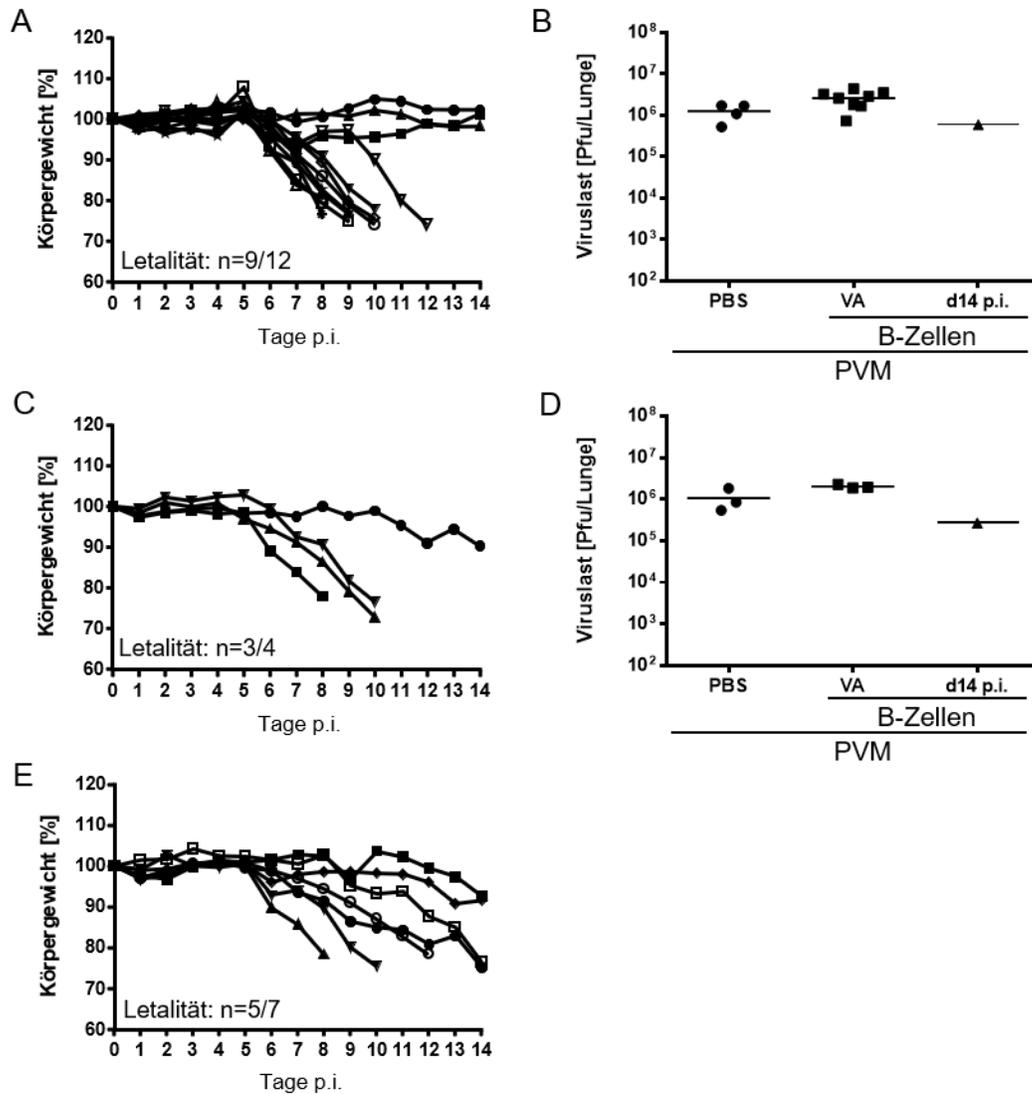


Abb. 30: Adoptiver B-Zell-Transfer in B6.Rag1^{-/-} Mäuse verändert den Krankheitsverlauf nach PVM-Infektion. B6.Rag1^{-/-} -Mäuse wurden mit $5 \cdot 10^6$ (A,B) oder $1 \cdot 10^7$ (C,D) kongenen B-Zellen vor einer Infektion transplantiert. Kontrolltiere erhielten das gleiche Volumen PBS (E). Einen Tag später wurden die Mäuse mit 300 Pfu PVM 15 infiziert. Das Körpergewicht relativ zu Tag 0 als Parameter für den Krankheitsverlauf wurde täglich (A,C,E) und die pulmonale Viruslast wurde für Tag 14 p.i. bzw. den Zeitpunkt des Versuchsabbruchs (B, D) bestimmt. Die Daten repräsentieren zwei oder mehr unabhängige Versuche. In (E) sind die PBS-transplantierten Kontrollgruppen aus (A) und (C) vereinigt dargestellt

3.2.6 Adoptiv transferierte B-Lymphozyten werden in lymphatische Organe und in infiziertes Lungengewebe rekrutiert.

Zur Analyse der Rekrutierung der transplantierten B-Zellen in verschiedene Organe der B6.Rag1^{-/-}-Rezipienten, wurden die Milz, das Knochenmark und der linke Lungenflügel der bereits unter 3.2.5 transplantierten und infizierten Tiere nach Erreichen der Versuchsabbruchkriterien bzw. Tag 14 p.i. entnommen und die Zellen für die durchflusszytometrische Analyse isoliert und mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern gegen B220, CD19, IgM und CD138 gefärbt.

Wie erwartet, konnten bei PBS-transplantierten B6.Rag1^{-/-}-Kontrollmäusen CD19⁺ und B220⁺ Pro-B-Zellen in den hier untersuchten Organen, Knochenmark, Milz und Lunge, nachgewiesen werden. Es konnten jedoch keine reifen B-Zellen mit IgM-Expression auf ihrer Oberfläche identifiziert werden, da sie durch das Fehlen des *Rag1*-Gens und Rag1-Proteins nicht vollständig reifen können. Anhand der membrangebundenen IgM-Moleküle (mIgM) auf der Oberfläche von B-Zellen der wildtypischen Spendertiere konnten diese in der durchflusszytometrischen Untersuchung von den Pro-B-Zellen der Rezipienten unterschieden werden. Reife IgM⁺ B-Zellen konnten an Tag 14 p.i. bzw. bei Erreichen der Abbruchkriterien im Knochenmark, der Milz und der Lunge von B6.Rag1^{-/-}-Mäusen, transplantiert mit $5 \cdot 10^6$ (Abb. 31A) bzw. $1 \cdot 10^7$ B-Zellen (Abb. 31B), nachgewiesen werden. Die Rekrutierung und Lokalisation von transplantierten B-Zellen aus C57BL/6-Spendertieren können somit in den B6.Rag1^{-/-}-Empfängertieren untersucht werden.

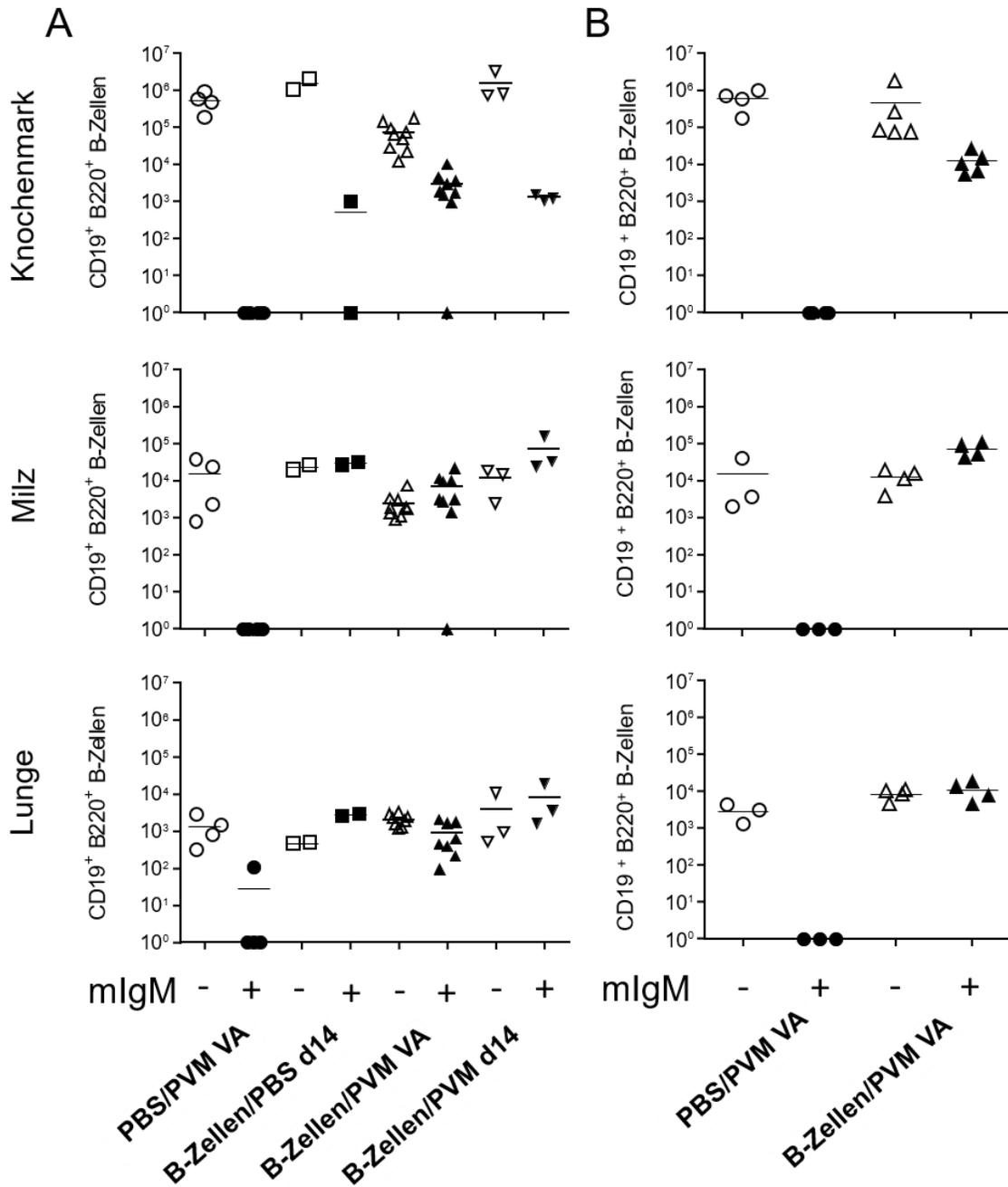


Abb. 31: Adoptiv transferierte B-Lymphozyten werden in lymphatische Organe und in infiziertes Lungengewebe rekrutiert. B6.Rag1^{-/-}-Mäuse wurden mit $5 \cdot 10^6$ (A) oder $1 \cdot 10^7$ (B) kongenen B-Zellen an Tag -1 transplantiert. Kontrolltiere erhielten das gleiche Volumen PBS (gleiche Tiere wie in unter Kap. 3.2.5, **Abb. 30**). Einen Tag später wurden die Mäuse mit 300 Pfu PVM 15 infiziert bzw. mit PBS mockinfiziert und die absolute Zellzahl an CD19⁺B220⁺ IgM⁺ bzw. IgM⁻ B-Zellen im Knochenmark, der Milz und in der Lunge an Tag 14 p.i. oder bei Erreichen der Abbruchkriterien (VA) mittels durchflusszytometrischer Analyse bestimmt. (mIgM) membrangebundenes IgM

Nach der Transplantation von $5 \cdot 10^6$ B-Lymphozyten aus C57BL/6-Mäusen konnten IgM^+ (Abb. 32A) und $\text{IgM}^+ \text{CD138}^+$ B-Zellen im Knochenmark, der Milz und der Lunge nachgewiesen werden (Abb. 32B). Dabei wurde bei Mäusen, die bis Tag 14 p.i. ohne sichtbare Symptome überlebten, eine höhere Anzahl IgM^+ B-Zellen in der Milz detektiert ($7,6 \cdot 10^4$ Zellen/Lunge) im Vergleich zu den Mäusen, die vorher die Abbruchkriterien erreichten ($7,2 \cdot 10^3$ Zellen/Lunge), was auf einen ersten Mechanismus zum Schutz vor schweren Verläufen hinweisen könnte (Abb. 32A, Milz). In der Lunge wiesen überlebende Tiere ebenfalls eine erhöhte Rekrutierung von IgM^+ B-Zellen auf im Vergleich zu den Mäusen, die vorzeitig getötet werden mussten ($8,5 \cdot 10^3$ vs. $9,3 \cdot 10^2$ Zellen/Lunge). Dieser Unterschied war ebenfalls statistisch signifikant. Insgesamt waren, im Unterschied zur Anzahl $\text{IgM}^+ \text{CD138}^+$ Plasmazellen in der Milz von überlebenden Mäusen, in der Lunge durchschnittlich weniger CD138^+ Plasmazellen nachzuweisen ($4,2 \cdot 10^2$ vs. $2,1 \cdot 10^1$ Zellen/Lunge).

Zusammenfassend kann geschlussfolgert werden, dass transplantierte B-Zellen aus C57BL/6-Spendertieren in $\text{B6.Rag1}^{-/-}$ -Mäusen zu CD138^+ Plasmazellen reifen können und in lymphatische Organe und an den Ort der Infektion rekrutiert werden. Es gibt somit erste Indizien, dass B-Zellen zu einem Schutz vor einer letalen PVM-Infektion beitragen könnten.

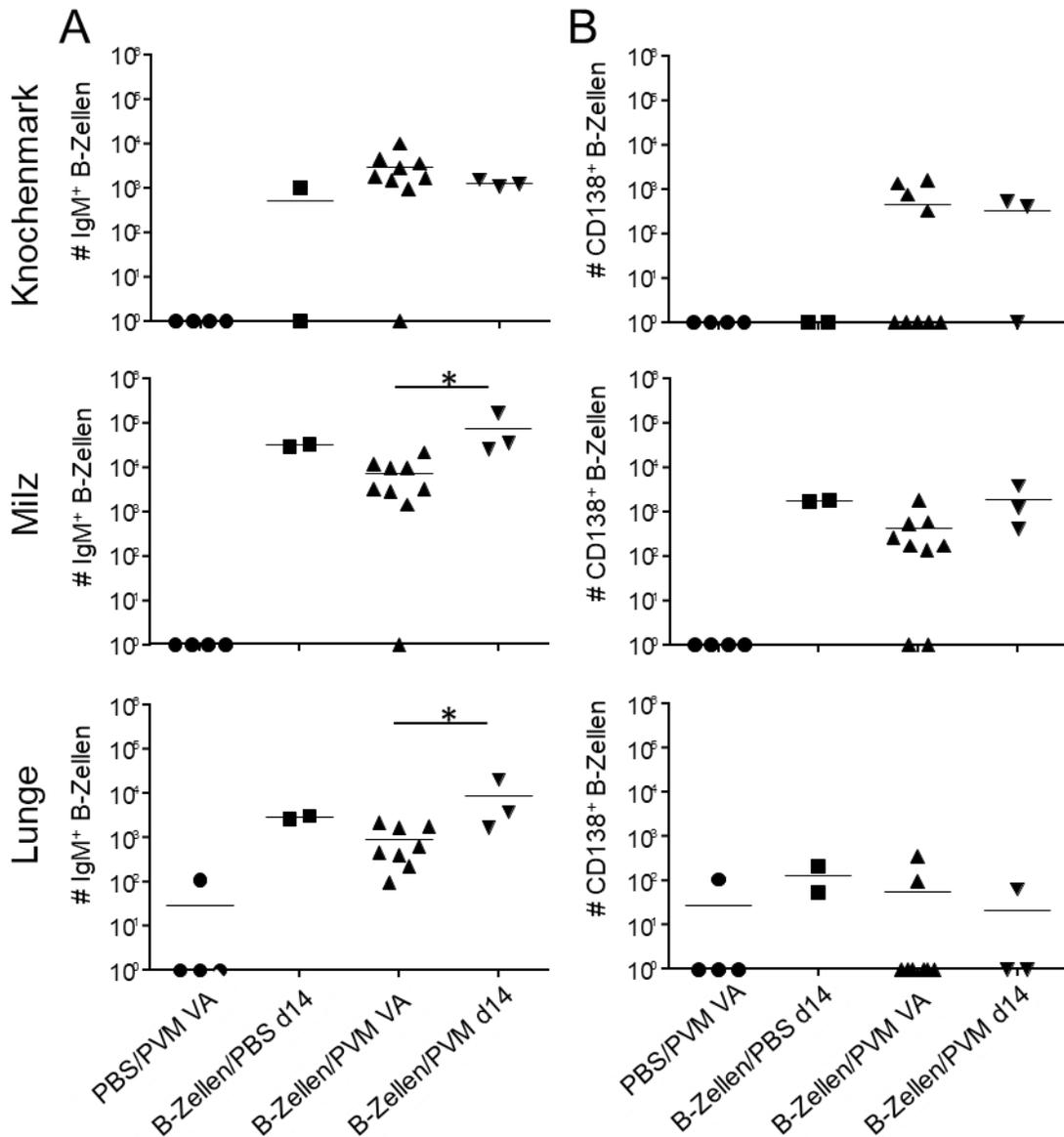


Abb. 32: Rekonstituierte B-Lymphozyten werden in lymphatische Organe und in infiziertes Lungengewebe rekrutiert. B6.Rag1^{-/-} Mäuse wurden mit $5 \cdot 10^6$ (A,B) kongenen B-Zellen an Tag -1 transplantiert. Kontrolltiere erhielten das gleiche Volumen PBS (gleiche Tiere wie in unter Kap. 3.2.5, Abb. 30). Einen Tag später wurden die Mäuse mit 300 Pfu PVM 15 oder PBS inokuliert und die absolute Zellzahl an CD19⁺B220⁺IgM⁺ B-Zellen im Knochenmark, der Milz und in der Lunge an Tag 14 p.i. oder bei Erreichen der Abbruchkriterien (VA) mittels durchflusszytometrischer Analyse bestimmt (A). Die absolute Zellzahl CD138⁺ Plasmazellen innerhalb der IgM⁺ B-Zellpopulation wurde ebenfalls untersucht (B). Zur verbesserten Übersicht entsprechen die unter (A,B) dargestellte Datenpunkte den Datenpunkten aus Abb. 31 jedoch ohne die Darstellung der IgM B-Zellpopulationen. Statistische Auswertung: t-Test (*) $p < 0.05$

Auch nach der Transplantation von $1 \cdot 10^7$ B-Zellen aus C57BL/6- Spendertieren konnten IgM⁺ B-Zellen im Knochenmark, der Milz und der Lunge nachgewiesen werden (Abb. 33A). Unter diesen reifen B-Zellen waren auch Zellen, die CD138 als Marker für

Plasmazellen auf ihrer Oberfläche exprimierten. Hier konnten jedoch keine bis Tag 14 p.i. überlebenden Tiere analysiert und verglichen werden, da alle Mäuse bis auf ein Tier vorzeitig die Abbruchkriterien erreichten.

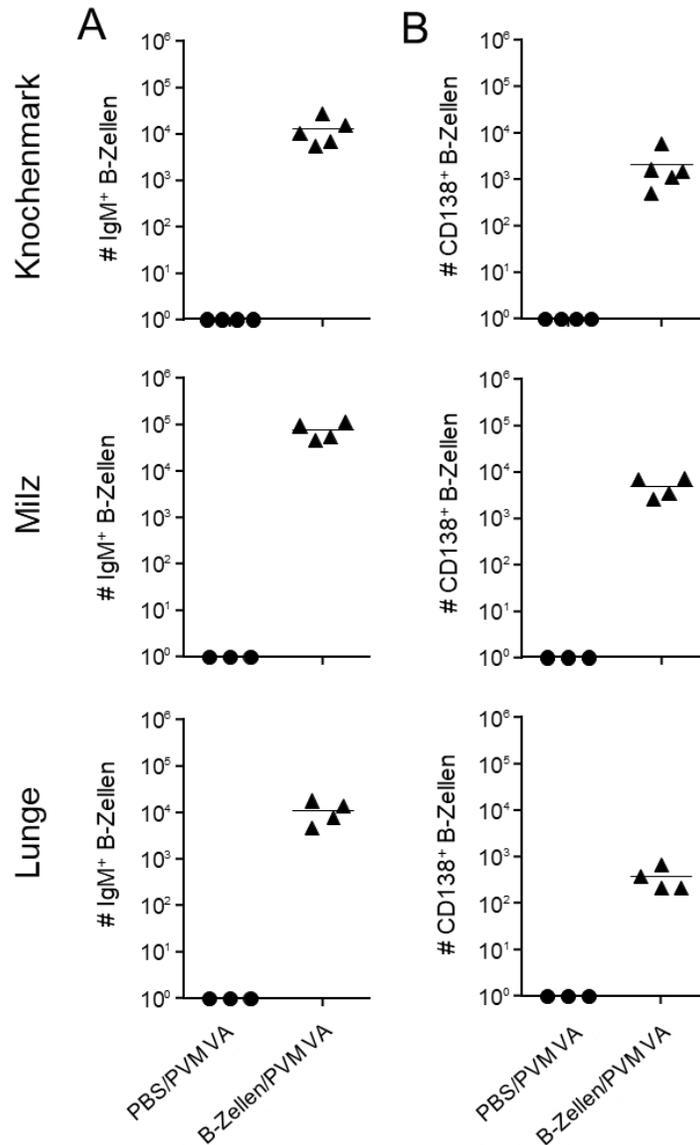


Abb. 33: Adoptiv transferierte B-Lymphozyten werden in lymphatische Organe und in infiziertes Lungengewebe rekrutiert. B6.Rag1^{-/-}-Mäuse wurden mit 1*10⁷ (A,B) kongenen B-Zellen an Tag -1 transplantiert. Kontrolltiere erhielten das gleiche Volumen PBS (gleiche Tiere wie in unter Kap. 3.2.5, Abb. 30.). Einen Tag später wurden die Mäuse mit 300 Pfu PVM 15 oder PBS inokuliert und die absolute Zellzahl an CD19⁺B220⁺IgM⁺ B-Zellen im Knochenmark, der Milz und in der Lunge an Tag 14 p.i. oder bei Erreichen der Abbruchkriterien (VA) mittels durchflusszytometrischer Analyse bestimmt (A). Die absolute Zellzahl CD138⁺ Plasmazellen innerhalb der IgM⁺ B-Zellpopulation wurde ebenfalls untersucht (B). Zur verbesserten Übersicht entsprechen die unter (A) dargestellte Datenpunkte den Datenpunkten aus Abb. 31 jedoch ohne die Darstellung der IgM B-Zellpopulationen.

3.2.7 NK-Zellen werden in immundefizienten Mäusen verstärkt in infiziertes Lungengewebe rekrutiert.

Neben der adaptiven Immunantwort, wie T- und B-Lymphozyten, spielen die zellulären Komponenten der angeborenen Immunantwort eine entscheidende Rolle. Mittels direkter Antikörper-Färbung und durchflusszytometrischer Untersuchung wurden NK-Zellen im Lungenparenchym und im Lungenlumen quantitativ während einer PVM-Infektion bestimmt. Die Zellen wurden nach Analyse vitaler Immunzellen (ZombieViolet^{dim} CD45⁺) als CD3⁻ B220⁻ und NK-1.1⁺ identifiziert und in Abb. 34 graphisch aufgetragen.

Im Lungenparenchym konnte ein signifikanter Anstieg an NK-Zellen in T- und B-Zell-defizienten B6.Rag1^{-/-}-Mäusen und in B6.TCRβδ^{-/-}-Mäusen bis Tag 10 p.i. nachgewiesen werden. Im Lungenparenchym von B6.TCRβδ^{-/-}-Mäusen stieg die absolute NK-Zellzahl von Tag 2 p.i. bis Tag 10 p.i. um 4,5 *10⁶ Zellen auf 7,3 *10⁶ NK-Zellen/Lunge an, bzw. bei B6.Rag1^{-/-}-Mäusen von 2,6*10⁶ NK-Zellen auf 5,8*10⁶ NK-Zellen pro Lunge. Im Bronchoalveolarlumen der B6.TCRβδ^{-/-}-Mäuse stieg die Anzahl der NK-Zellen um 3*10⁴ auf 3,7*10⁴Zellen und in den B6.Rag1^{-/-}-Mäuse um 4,4*10⁴ Zellen auf 4,7*10⁴ NK-Zellen. An Tag 10 und 14 p.i. gab es eine signifikant höhere Anzahl von NK-Zellen (5,2*10⁶ Zellen) im Lungeninterstitium von B6.TCRβδ^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu immunkompetenten Kontrollmäusen. B6.Rag1^{-/-}-Mäuse wiesen ebenfalls im Lungengewebe signifikant mehr NK-Zellen an Tag 7 und 10 p.i. auf (Abb. 34A). Im Bronchoalveolarlumen konnte ein Anstieg der NK-Zellen in allen drei Mauslinien festgestellt werden. Zwischen den immundefizienten Mäusen und den immunkompetenten Kontrolltieren konnte an Tag 10 p.i. ein Unterschied in der absoluten Zahl NK-Zellen ermittelt werden (Abb. 34B). Es wurde aufgrund einer zu geringen Anzahl an Datenpunkten auf eine statistische Analyse verzichtet.

NK-Zellen könnten damit zur Pathologie beitragen, da bei NK-Zell-defizienten Mäusen (B6.Rag1.Cγ^{-/-}) nach einer Infektion mit 300 Pfu PVM 15 zwar letale Krankheitsverläufe auftreten, diese jedoch im Vergleich zu B6.Rag1^{-/-}-Mäusen weniger variabel verliefen (Abb. 20).

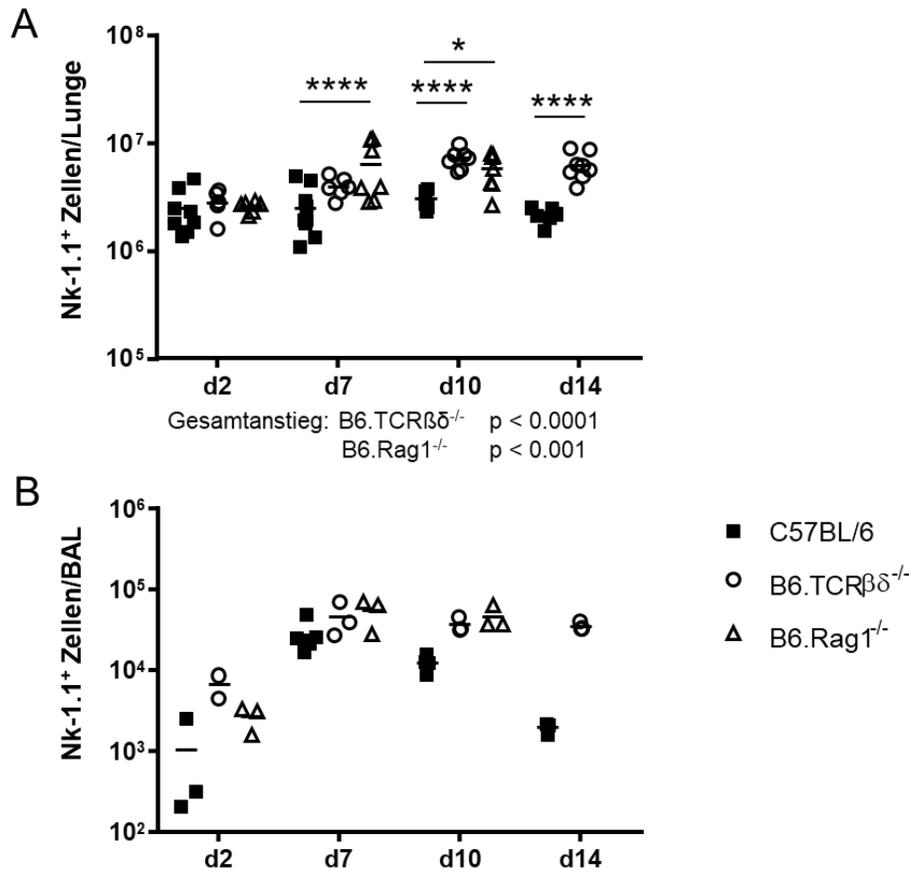


Abb. 34: Rekrutierung von NK-Zellen nach Infektion mit PVM. C57BL/6-Mäuse, B6.TCRβδ^{-/-}-Mäuse und B6.Rag1^{-/-}-Mäuse wurden mit 300 Pfu PVM 15 infiziert. Gruppen von Tieren wurden an den Tagen 2, 7, 10 und 14 p.i. mittels CO₂ getötet und Zellen aus dem Bronchoalveolarlumen (B) und dem verbliebenen Interstitium (A) isoliert. Die Einzelzellsuspensionen wurden anschließend mit direkt markierten Antikörpern gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Für die Färbung wurde das Färbepanel 1 (siehe Material und Methoden) verwendet. Es wurden 6 bis 10 Mäusen pro Tag aus mehr als zwei unabhängigen Versuchen verwendet. Für die Analyse der BAL wurden jeweils die Zellen zweier Mäuse vereinigt. Statistische Auswertungen wurden durchgeführt, wenn die zu vergleichenden Gruppen mehr als 3 Datenpunkte hatten. Statistische Auswertung: 2-Way ANOVA mit Bonferroni-Posttest; (ns) nicht signifikant, (*) p < 0.05, (**) p < 0.01, (***) p < 0.001, (****) p < 0.0001

3.2.8 Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in die Lunge von immunsupprimierten Tieren nach Pneumovirusinfektion

Zusätzlich sollte untersucht werden, ob das Fehlen von Kompartimenten der adaptiven Immunantwort Auswirkungen auf die Rekrutierung von weiteren Zellen der angeborenen Immunität hat. Daher wurde hier die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in die Lunge infizierter immunkompetenter und immundefizienter Mäuse wie zuvor beschrieben durchflusszytometrisch analysiert. Nach der Identifikation vitaler

Immunzellen (ZombieViolet^{dim} und CD45⁺) und dem Ausschluss von eosinophilen Granulozyten (SiglecF⁺) und AMΦ (CD11c⁺ SiglecF⁺) wurden neutrophile Granulozyten als Ly-6G⁺ Zellen identifiziert.

Das chronologische Rekrutierungsmuster neutrophiler Granulozyten in die Lunge infizierter C57BL/6-Mäuse war größtenteils vergleichbar mit vorherigen Beobachtungen (Kap. 3.1.3). Die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in die Lunge infizierter B6.TCRβδ^{-/-}-Mäuse unterschied sich nicht von dem Rekrutierungsmuster bei den immunkompetenten Kontrollmäusen. Eine Ausnahme bildet allerdings Tag 14, an dem deutlich mehr neutrophile Granulozyten im Bronchoalveolarlumen infizierter B6.TCRβδ^{-/-}-Mäuse detektiert wurden (Abb. 35B). Dafür waren die Zellzahlen von neutrophilen Granulozyten in der Lunge infizierter B6.Rag1^{-/-}-Mäuse über den gesamten Infektionsverlauf signifikant erhöht: Im Vergleich zu den C57BL/6-Kontrolltieren war die absolute Zellzahl neutrophiler Granulozyten im Lungenparenchym um das 3,2fache auf $2,8 \cdot 10^6$ Zellen an Tag 10 p.i. erhöht. Auch im Bronchoalveolarlumen an Tag 7 p.i. konnte eine erhöhte Anzahl neutrophiler Granulozyten im Vergleich zur Kontrolle um fast $2 \cdot 10^4$ Zellen nachgewiesen werden. Auch in der Lunge von B6.Rag.Cγ^{-/-}-Mäusen wurden an manchen Zeitpunkten mehr neutrophile Granulozyten detektiert: an Tag 10 p.i. konnten im Lungenparenchym $9,2 \cdot 10^5$ Zellen/Lunge und im Bronchoalveolarlumen $1,7 \cdot 10^4$ Zellen/Lunge mehr nachgewiesen werden als in den Lungen immunkompetenter Kontrolltiere ($8,8 \cdot 10^5$ Zellen/Lunge bzw. $8,5 \cdot 10^3$ Zellen/Lunge). Auch hier war die absolute Zellzahl neutrophiler Granulozyten bereits Tag 2 p.i um das 3,8fache erhöht im Vergleich zu den Kontrolltieren (Abb. 35A, B).

Neutrophile Granulozyten scheinen in Mäusen mit einem Defizit in T- und B-Zellen vermehrt zum Ort der Infektion rekrutiert zu werden.

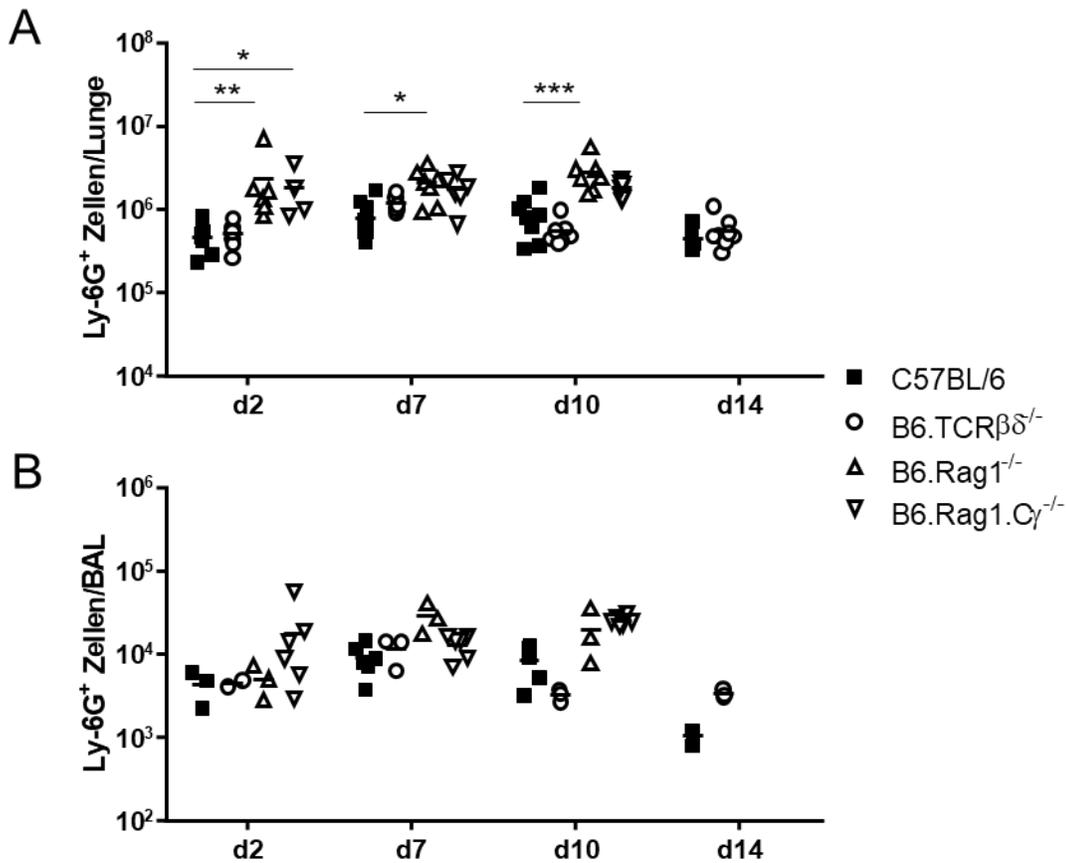


Abb. 35: Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten nach Infektion mit PVM. C57BL/6-Mäuse, B6.TCRβδ^{-/-}-Mäuse, B6.Rag1^{-/-}-Mäuse und B6.Rag1.Cγ^{-/-}-Mäuse wurden mit 300 Pfu PVM 15 infiziert. Gruppen von Tieren wurden an den Tagen 2, 7, 10 und 14 p.i. mittels CO₂ getötet und Zellen aus dem Bronchoalveolarlumen (B) und dem verbliebenen Interstitium (A) isoliert. Die Einzelzellsuspensionen wurden anschließend mit direkt markierten Antikörpern gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Für die Färbung wurde das Färbepanel II (siehe Material und Methoden) verwendet. Es wurden 6 bis 10 Mäuse pro Tag aus mehr als zwei unabhängigen Versuchen verwendet. Für die Analyse der BAL wurden jeweils die Zellen zweier Mäuse vereinigt. Statistische Auswertungen wurden durchgeführt, wenn die zu vergleichenden Gruppen mehr als 3 Datenpunkte hatten. Statistische Auswertung: 2-Way ANOVA mit Bonferroni-Posttest; ns nicht signifikant, (*) p < 0.05, (**) p < 0.01, (***) p < 0.001, (****) p < 0.0001

3.2.9 B6.Rag1^{-/-}-Mäuse zeigen eine signifikant gesteigerte Rekrutierung eosinophiler Granulozyten im Lungengewebe und im Bronchoalveolarlumen.

Eosinophile Granulozyten wurden nach der Infektion mit rPVM-GFP in immunkompetenten Mäusen am Ende der Infektion in die Lunge rekrutiert (Kap. 3.1.3). Im Folgenden sollte nun die Rekrutierung dieses Zelltyps in Mäusen mit definierten

Immundefizienzen ermittelt werden. Nach der Identifikation vitaler Immunzellen (ZombieViolet^{dim} und CD45⁺) und dem Ausschluss von AMΦ (CD11c⁺ SiglecF⁺) wurden eosinophile Granulozyten als SiglecF⁺ identifiziert.

Die Zellzahl und das Rekrutierungsmuster von eosinophilen Granulozyten in die Lunge PVM infizierter C57BL/6-Mäuse waren vergleichbar zu dem zuvor beschriebenen Muster nach Infektion mit rPVM-GFP (Kap. 3.1.3). Die Anzahl eosinophiler Granulozyten nahm von Tag 7 zu Tag 10 p.i. um das 4fache im Lungenparenchym zu (Abb. 36A). Dagegen blieb die Zellzahl eosinophiler Granulozyten im Lungenparenchym PVM-infizierter B6.TCRβδ^{-/-} - und B6.Rag1.Cγ^{-/-} -Mäusen eher konstant, so dass die Zellzahl bei B6.TCRβδ^{-/-} -Tieren an den Tagen 10 und 14 deutlich niedriger ($3,8 \cdot 10^5$ Zellen) war als bei immunkompetenten Tieren ($8,2 \cdot 10^5$ Zellen). Auffallend war, dass die Anzahl eosinophiler Granulozyten in der Lunge von B6.Rag1.Cγ^{-/-} -Mäusen im Vergleich zu Kontrolltieren prinzipiell eher reduziert schien, z.B. $3,2 \cdot 10^5$ vs. $8,2 \cdot 10^5$ Zellen an Tag 10 p.i. im Lungeninterstitium. Während der Infektion nahm die Zellzahl im Bronchoalveolarlumen über den Zeitverlauf sogar ab (Abb. 36B). Nur in der Lunge von B6.Rag1^{-/-} -Mäusen konnte eine signifikante Zunahme der Zahl an eosinophilen Granulozyten von Tag 2 zu Tag 7 p.i. im Lungeninterstitium und von Tag 2 bis Tag 10 p.i. z.B. von $2,1 \cdot 10^3$ Zellen auf $9,7 \cdot 10^3$ Zellen im Bronchoalveolarlumen festgestellt werden. Dabei war die Gesamtzellzahl im Bronchoalveolarlumen sogar um $1 \cdot 10^6$ Zellen im Vergleich zu der Zahl rekrutierter eosinophiler Granulozyten bei Kontrolltieren an den Tagen 10 und 14 p.i. deutlich höher (Abb. 36).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass eosinophile Granulozyten in C57BL/6-Mäusen nach PVM Infektion gegen Ende des Krankheitsverlaufes rekrutiert werden und dass Tiere defizient in T-Zellen keine Rekrutierung im Vergleich zu immunkompetenten Kontrolltieren aufweisen. Interessanterweise scheinen immunsupprimierte Mäuse, ohne T- und B-Zellen, eine gesteigerte Rekrutierung dieses Zelltyps aufzuweisen. Fehlen zusätzlich NK-Zellen, verringert sich die Anzahl der eosinophilen Granulozyten im Gewebe erheblich.

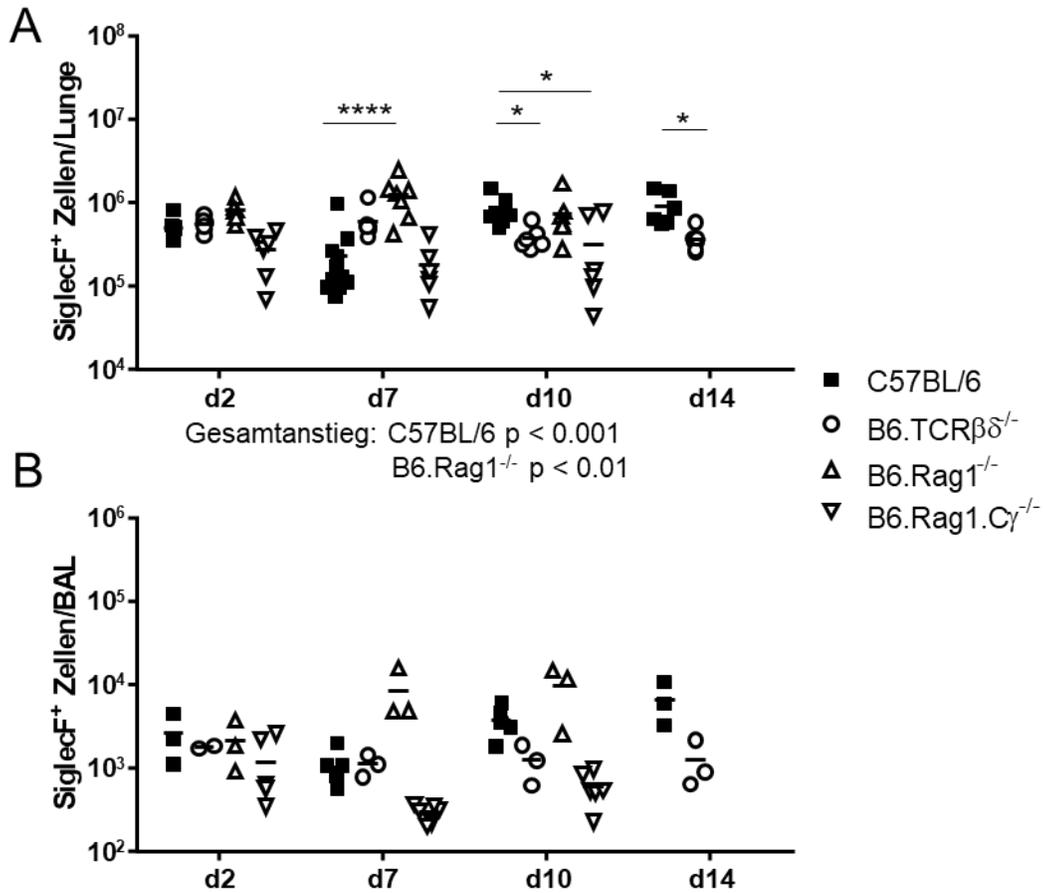


Abb. 36: Rekrutierung von eosinophilen Granulozyten nach Infektion mit PVM. C57BL/6-Mäuse, B6.TCRβδ^{-/-}-Mäuse, B6.Rag1^{-/-}-Mäuse und B6.Rag1.Cγ^{-/-}-Mäuse wurden mit 300 Pfu PVM 15 infiziert. Gruppen von Tieren wurden an den Tagen 2, 7, 10 und 14 p.i. mittels CO₂ getötet und Zellen aus dem Lungenlumen (B) und dem verbliebenen Interstitium (A) isoliert. Die Einzelzellsuspensionen wurden anschließend mit direkt markierten Antikörpern gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Für die Färbung wurde das Färbepanel II (siehe Material und Methoden) verwendet. Es wurden 6 bis 10 Mäusen pro Tag aus mehr als zwei unabhängigen Versuchen verwendet. Für die Analyse der BAL wurden jeweils die Zellen zweier Mäuse vereinigt. Statistische Auswertung: 2-Way ANOVA mit Bonferroni-Posttest; ns nicht signifikant, (*) p < 0.05, (**) p < 0.01, (***) p < 0.001, (****) p < 0.0001.

4. DISKUSSION

4.1 Spatiotemporale Entwicklung von Immunantworten im PVM-Infektionsmodell

Durch die Untersuchung des Rekrutierungsmusters der Zellen der angeborenen und adaptiven Immunantwort im Vergleich zur Virusvermehrung und der auftretenden Pathologie konnten interessante Einblicke in die Immunpathogenese nach einer subletalen Pneumovirusinfektion im murinen Wirt gewonnen werden. Die jeweiligen Verläufe sind in Abb. 37 zusammengefasst und werden in den folgenden Kapiteln diskutiert: CD8⁺ T-Zellen und CD4⁺ T-Helferzellen wurden nach einer PVM-Infektion in das Lungengewebe und das Bronchoalveolarlumen mit einem Höhepunkt an Tag 10 p.i. bzw. Tag 14 p.i. rekrutiert. B-Lymphozyten waren bereits im Lungenparenchym nicht infizierter Mäuse messbar. Ihre Anzahl stieg über einen Zeitraum von 10 Tagen nach der Infektion im Lungenparenchym signifikant an. Auch im Bronchoalveolarlumen konnte eine zusätzliche Rekrutierung gemessen werden. Die Zellen der angeborenen Immunantwort, NK-Zellen, neutrophile und eosinophile Granulozyten wurden nach der Infektion in das infizierte Gewebe rekrutiert. Natürliche Killerzellen erreichten ihre höchste Anzahl in der Lunge am Tag der höchsten Viruslast. Neutrophile Granulozyten zeigten die höchste Rekrutierung im Bronchoalveolarlumen an Tag 10 p.i. und im Lungeninterstitium ebenfalls bereits Tag 7 p.i.. Eosinophile Granulozyten waren bereits vor der eigentlichen Infektion im Gewebe lokalisiert. Ihre absolute Anzahl erhöhte sich ebenfalls nach einer PVM-Infektion (ab Tag 10 p.i.). Die Population der Alveolarmakrophagen (AMΦ) war durch eine transiente Depletion im gesamten Lungengewebe gekennzeichnet. Es konnten neben infizierten Lungenepithelzellen außerdem infizierte AMΦ identifiziert werden. Die Rekrutierung der Zellen der angeborenen Immunantwort (NK-Zellen, neutrophile Granulozyten) verläuft eher parallel oder verzögert zur Entwicklung der Viruslast, als dass sie ihr vorangeht und einer ersten Viruslastkontrolle dienen könnte. Sie erfolgt verzögert und überlappt mit der beginnenden adaptiven Immunantwort (Abb. 37).

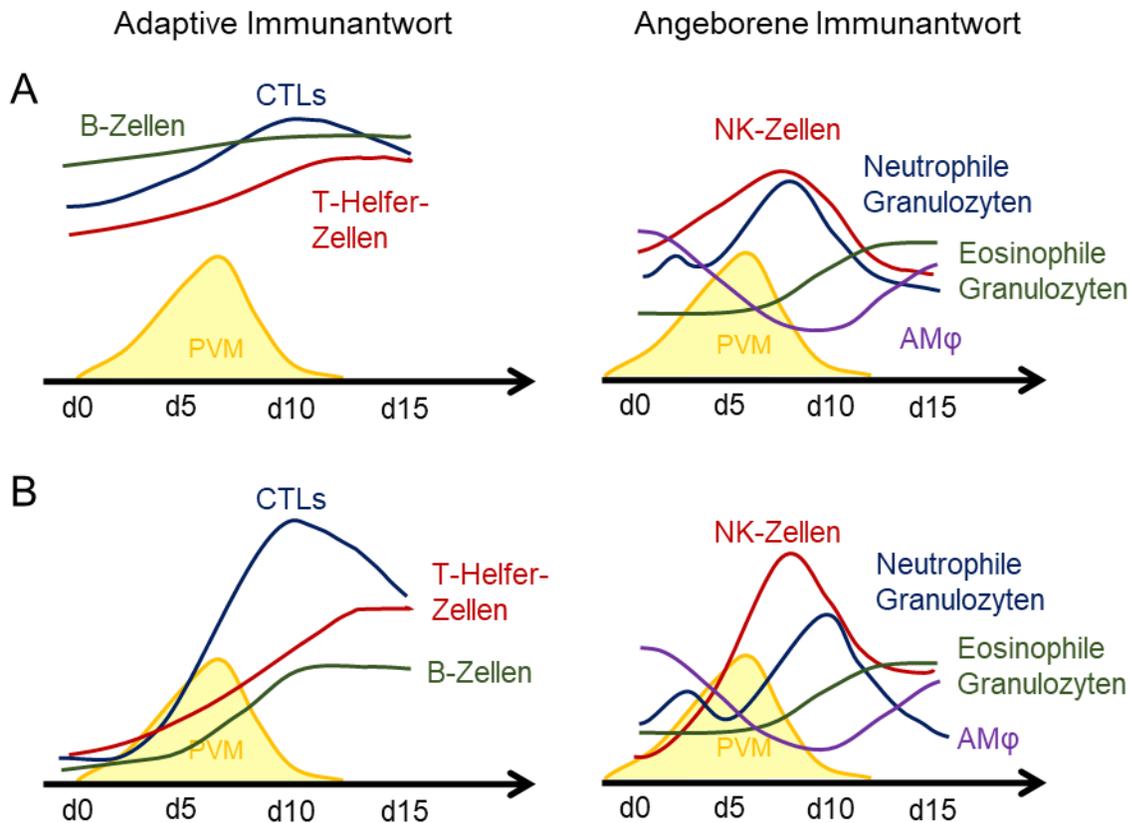


Abb. 37: Schematische Darstellung des zeitlichen Verlaufs einer PVM-Infektion und resultierender angeborener und adaptiver Immunantwort. Rekrutierungsmuster der Zellen der adaptiven Immunantwort, hier der zytotoxischen T-Zellen und der T-Helfer-Zellen sowie der B-Zellen und der Zellen der angeborenen Immunantwort im Vergleich zur Viruslast (gelb) während einer Infektion im Lungeninterstitium (A) und im Bronchoalveolarlumen (B).

4.1.1 Spatiotemporales Rekrutierungsmuster von T-Zellpopulationen in die Lunge nach PVM-Infektion

Ein Ziel dieser Arbeit war die räumliche und zeitliche Charakterisierung der Immunantwort im Lungengewebe nach einer Pneumovirusinfektion im murinen Wirt. Im Fokus lagen dabei die Zellen der adaptiven und der angeborenen Immunantwort. Zu ersteren zählt unter anderem die T-Zell-Antwort, speziell $CD8^+$ zytotoxische T-Zellen und $CD4^+$ T-Helferzellen. In dieser Arbeit wurden C57BL/6-Mäuse mit rPVM-GFP infiziert, um zusätzlich infizierte Zellen in der Fluoreszenz-Mikroskopie nachweisen zu können. Aufgrund der Attenuierung dieses Virus musste eine ca. dreifach höhere Dosis (1000 Pfu/Maus) eingesetzt werden als bei einer Infektion mit dem Referenzstamm PVM 15, um eine vergleichbare Pathogenese zu erzeugen (Frey et al., 2008; Krempl et al.,

2007). Die Mäuse verloren bis zu 20% ihres Ausgangsgewichts und erholten sich anschließend wieder. Unter diesen Bedingungen konnte ein signifikanter Anstieg der absoluten Zellzahl im Bronchoalveolarlumen als auch im Lungenparenchym für CD8⁺ T-Zellen und CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zu PBS-infizierten Kontrolltieren ermittelt werden (Abb. 10). CD8⁺ T-Zellen wurden beginnend Tag 2 bis Tag 10 p.i. in das Lungenparenchym rekrutiert, wonach die Zellzahl bis Tag 14 p.i. stabil blieb. Im Bronchoalveolarlumen stieg die Anzahl ab Tag 7 bis Tag 10 p.i. ebenfalls an. Dabei machte dieser Zelltyp an Tag 10 p.i. mit 80% im Lungenparenchym bzw. 90% im Bronchoalveolarlumen den überwiegenden Anteil an CD3⁺ T-Zellinfiltraten aus. Immunhistologisch konnten einige wenige CD8⁺ T-Zellen bereits zu Beginn der Infektion in den Alveolen identifiziert werden. Im weiteren Verlauf stieg ihre Anzahl bis Tag 10 p.i. in den Alveolen auf ein Vielfaches an. Dabei waren sie eher gleichmäßig über das Lungengewebe und nicht nur in infizierten Arealen zu finden. Nach Tag 10 p.i. konnte immunhistologisch, aber nicht in den quantitativen (durchflusszytometrischen) Untersuchungen, eine Abnahme dieses Zelltyps beobachtet werden. CD4⁺ T-Zellen wurden ab Tag 10 bis 14 p.i. in das Lungenparenchym und das Bronchoalveolarlumen rekrutiert. Trotzdem sank ihr prozentualer Anteil an CD3⁺ Zellinfiltraten ab Tag 7 p.i. bis Tag 10 p.i. auf 20% im Lungengewebe bzw. 10% im Bronchoalveolarlumen. CD4⁺ Th-Zellen veränderten im Verlauf der Infektion ihre Lokalisation im Lungengewebe. Erst waren sie perivaskulär angeordnet. An späteren Zeitpunkten waren sie zusätzlich peribronchial lokalisiert (Abb. 11). Über die Art der CD4⁺ T-Zellen kann jedoch nach diesen Untersuchungen noch keine Aussage getroffen werden. Dazu müssten die Zellen über Linien-definierende Transkriptionsfaktoren und sezernierte Cytokine charakterisiert werden.

In einer früheren Studie wurde bereits gezeigt, dass die Anzahl rekrutierter CD3⁺ T-Zellen im Bronchoalveolarlumen bis Tag 11 nach der Infektion mit PVM 15 ansteigt. Innerhalb dieser Zellpopulation ist die Erhöhung der Frequenz der CD8⁺-T-Zellen an Tag 8 p.i. auf fast 100% der Gesamtanzahl der CD3⁺ T-Zellen und die langsame Abnahme dieser T-Zell-Population sehr bemerkenswert (Frey et al., 2008). In der vorliegenden Promotionsarbeit konnten diese Ergebnisse reproduziert und sogar auf die Untersuchung der Rekrutierung von CD4⁺T-Zellen ausgeweitet werden. Die

vorliegenden Ergebnisse sind ebenfalls vergleichbar mit den Befunden von Scheer et al. 2014, die ebenfalls einen Anstieg der absoluten Zellzahl an CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen im Bronchoalveolarlumen bis Tag 10 p.i. nach einer subletalen Infektion von C57BL/6-Mäusen mit PVM 15 feststellten. Dabei war der Anstieg in den Zellzahlen der CD8⁺ T-Zellen ähnlich (Scheer et al., 2014). Damit werden also T-Zellen während der Infektion mit einer nicht letalen Dosis PVM 15 bis Tag 10 p.i. verstärkt in das Lungengewebe und die Atemwege rekrutiert.

In einer weiteren Untersuchung wurden Mäuse mit einem anderen PVM-Stamm infiziert, PVM J3666. Dieser Stamm unterscheidet sich nicht von PVM 15 (ATCC) und dessen Derivat rPVM-GFP, die in der vorliegenden Promotionsarbeit verwendet wurden, bezüglich der Virulenz (Krempf and Collins, 2004). Mit einer niedrigen Infektionsdosis PVM J3666 pro Tier konnte eine subletale Infektion generiert werden, deren Gewichtsverlauf ähnlich aussah wie bei der Infektion mit rPVM-GFP oder PVM 15. Vandersarren et al. 2017 kamen nach einer solchen subletalen Infektion mit PVM J3666 zu dem Ergebnis, dass es während einer PVM-Infektion zu einer starken Rekrutierung von CD8⁺ T-Zellen von Tag 8 p.i. bis Tag 14 p.i. mit anschließender Abnahme kommt. Auch CD4⁺ T-Zellen nehmen bis Tag 14 p.i. im Lungengewebe zu (Vandersarren et al., 2017). Im Vergleich zu den in dieser Arbeit generierten Daten wurde der Höhepunkt der CD8⁺ T-Zell-Rekrutierung erst vier Tage später (Tag 14 p.i.) erreicht. Dieser Unterschied in der Rekrutierung könnte durch die Verwendung eines anderen Virusstamms erklärt werden, da diese Untersuchungen PVM J3666 verwendeten und dieses Virus durch die Passage in Mäusen generiert wurde. Die Kinetik der CD4⁺ T-Zell-Rekrutierung dieser Veröffentlichung jedoch entsprach in etwa dem Rekrutierungsmuster nach einer Infektion mit rPVM-GFP. Auch eine bereits früher durchgeführte Studie zeigte eine Expansion der CD8⁺ T-Zellen in der Lunge von Tag 8-12 p.i., allerdings nur als relativer Anteil an der Gesamtzahl aller Lymphozyten im Bronchoalveolarlumen (van Helden et al., 2012).

Die spatiotemporale Entwicklung einer PVM-spezifischen CD8⁺ T-Zellantwort wurde in einer Untersuchung aus dem Jahr 2013 mittels der Infektion mit PVM-GFPgp33 analysiert. Hier wurde der GFP-ORF um die Sequenz für gp33, das immundominante H-2D^b-restringierte Epitop von LCMV, als immunologischer Marker für eine

virusspezifische Immunantwort erweitert. Durch adoptiven Transfer von angereicherten, gp33-spezifischen CD8⁺ T-Zellen ließ sich so die Rekrutierung dieser artifiziellen PVM-spezifischen CD8⁺ T-Zellen untersuchen. Die dort erhaltenen Ergebnisse sind vergleichbar zu den Ergebnissen dieser Arbeit. Allerdings wurde in dieser Promotionsarbeit das gesamte Spektrum der CD8⁺ T-Zellen analysiert und nicht nur die Rekrutierung transplantiert zytotoxischer T-Zellen, die das gp33-Epitop von LCMV erkennen. Virus-spezifische (gp33-spezifische) zytotoxische T-Zellen konnten an Tag 8 und 9 p.i. in infizierten Bereichen der Lunge ermittelt werden. An Tag 10 p.i. traten die zytotoxischen T-Zellen gehäuft in vermutlich ehemals infizierten Arealen des Gewebes auf. Nach der vollständigen Viruselimination waren die Zellen über das gesamte Lungenparenchym verteilt. Virus-spezifische zytotoxische T-Zellen wurden nach Tag 9 weiterhin rekrutiert, auch wenn der größte Teil virusinfizierter Zellen bereits eliminiert war (Frey et al., 2013). Die räumlich-zeitliche Verteilung von CD4⁺ -Zellen wurde in der zitierten Untersuchung jedoch nicht charakterisiert. Erste Daten dazu wurden während dieser Promotion generiert.

Im Vergleich zur T-Zell-Rekrutierung nach einer PVM-Infektion, steigt auch die Anzahl CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen im Bronchoalveolarlumen von Mäusen nach einer RSV-Infektion bis Tag 9 und 10 p.i. an (Openshaw, 1989). Der relative Anteil an CD8⁺ T-Zellen im Bronchoalveolarlumen nach einer RSV-Infektion im Mausmodell war von Beginn an höher und fiel dann, im Vergleich zum weiteren Anstieg in PVM-infizierten Mäusen, ab. Dabei stieg jedoch der relative Anteil virusspezifischer CD8⁺ T-Zellen ab Tag 6 p.i. an (van Helden et al., 2012). Diese Studie zeigte jedoch nur relative Anteile und keine absoluten Zellzahlen.

4.1.2 Spatiotemporales Rekrutierungsmuster von B-Lymphozyten in die Lunge nach PVM-Infektion

B-Zellen konnten bereits im Lungenparenchym und zu einem geringen Teil im Bronchoalveolarlumen von Mock-infizierten Kontrollmäusen ermittelt werden. Während einer subletalen Infektion mit PVM 15 kam es bis Tag 10 p.i. zu einer eher geringen aber signifikanten Zunahme der absoluten Anzahl der B-Lymphozyten im Lungeninterstitium.

Auch im Bronchoalveolarlumen konnte ein Anstieg festgestellt werden. Diese B220⁺ Zellen konnten nach einer Infektion von C57BL/6-Mäusen mit rPVM-GFP ebenfalls mittels der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie visuell dargestellt werden. Zu Beginn der Infektion waren B220⁺ Zellen, entsprechend den zuvor genannten durchflusszytometrisch ermittelten Befunden, eher gleichmäßig im gesamten Lungengewebe verteilt. Ab Tag 10 p.i. jedoch konnten sie vermehrt perivaskulär und anschließend auch peribronchial nachgewiesen werden, was mit der Zunahme dieses Zelltyps in der quantitativen Analyse korreliert (Abb.12). Dies könnte für eine zu diesem Zeitpunkt stattfindende Rekrutierung in das Lungengewebe sprechen. Auffallender Weise entspricht dieser Zeitpunkt auch der Zunahme an CD4⁺ T-Zellen, die außerdem dann zusammen mit B220⁺ Zellen perivaskulär lokalisierten. An Tag 14 p.i. konnten B220⁺ Zellen zusammen mit CD4⁺ T-Zellen eher peribronchial identifiziert werden. Dies könnten erste Anzeichen der Bildung tertiärer lymphoider Organe wie eines induzierten Bronchus-assoziierten lymphoiden Gewebes (iBALT) darstellen. iBALT entwickeln sich oft perivaskulär zu pulmonalen Blutgefäßen nach einer entzündlichen Reaktion im Lungengewebe, ausgelöst z.B. durch Infektionen oder allergische Reaktionen. Wie in sekundären lymphoiden Organen bestehen diese neu generierten Bereiche aus einer T-Zell-Zone und einer B-Zell-Zone. Im B-Zell-Follikel können sich sogar germinale Zentren bilden, in denen die B-Zell-Proliferation sowie die somatische Hypermutation und der Ig-Klassenwechsel stattfindet (Hwang et al., 2016).

Für das PVM-Mausmodell gibt es meines Wissens nach noch keine Daten über die Rekrutierung von B-Zellen während einer Infektion. Auch über die eventuelle Bildung von Bronchus-assoziiertem lymphoidem Gewebe wurde bisher noch keine Aussage getroffen. Dies wird im Kapitel 4.2.2 näher diskutiert. Es wurden allerdings Messungen der Antikörperkonzentrationen in verschiedenen Untersuchungen durchgeführt. Für das RSV-Mausmodell liegen nach meinem Wissen ebenfalls noch keine Daten über die B-Zell-Rekrutierung oder die Bildung von iBALT vor.

Pneumovirusinfektionen werden häufig mit Infektionen von Influenzaviren verglichen. Für Influenzavirus-Infektionen liegen bereits Daten zur Induktion bzw. Bildung von iBALT vor. Dabei werden ab Tag 6 p.i. vermehrt B-Zellen in das Lungengewebe rekrutiert, die mit T-Zellen die typische Struktur eines lymphoiden Gewebes aufbauen, also

abgrenzbare T- und B-Zell-Zonen. Auch germinale Zentren können immunhistologisch nachgewiesen werden. Die Bildung von iBALT ist außerdem abhängig von der frühen Induktion von IL-1 und dessen Signalweg (Neyt et al., 2016). Eine experimentelle intranasale Infektion mit dem modifizierten Vaccinia-Virus Ankara im Mausmodell führt ebenfalls zur Ausbildung von hoch strukturiertem iBALT, die die effiziente Aktivierung der T-Zell-Antwort fördern. (Fleige et al., 2014; Halle et al., 2009). In dieser Arbeit konnten ebenfalls perivaskuläre und peribronchiale Strukturen, bestehend aus dicht gepackten Aggregaten von CD4⁺ und B220⁺ B-Zellen, die jedoch keine abgrenzbaren B- und T-Zell-Zonen aufwiesen, vom umliegenden Gewebe abgegrenzt werden.

Zur Bestätigung der Bildung von iBALT müssten spätere Zeitpunkte, wie z.B. Tag 21 und 28 p.i., im Hinblick auf die Formation von T- und B-Zell-Zonen, sowie germinalen Zentren immunhistologisch untersucht werden. Dies könnte wichtige Informationen zur Antikörpersynthese und zur eventuellen Impfstoffentwicklung liefern.

4.1.3 Verzögerte Rekrutierung von NK-Zellen in das Lungengewebe nach PVM-Infektion

In dieser Arbeit wurde das Rekrutierungsmuster von NK-Zellen im Lungeninterstitium und im Bronchoalveolarlumen ausschließlich mittels Durchflusszytometrie untersucht. Mittels Fluoreszenzmikroskopie konnten diese Zellen allerdings nicht erfolgreich dargestellt werden. Der für durchflusszytometrische Analysen verwendete Antikörper war aufgrund seines Ursprungs (Maus anti-Maus NK-1.1) für die Färbung von Mausgewebe ungeeignet (eigene Beobachtungen, (Lu and Partridge, 1998)), da die verwendeten gegen murine Immunglobuline gerichteten Sekundärantikörper gewebeeigene Immunglobuline oder andere Komponenten binden und so zu falsch-positiven Ergebnissen führen können. Ein alternativ verwendeter polyklonaler Antikörper spezifisch für den murinen NK-Zellrezeptor NKp46, sowie dessen Isotypkontrolle zeigten im Gewebe jedoch hohe unspezifische Bindungseigenschaften (eigene Beobachtung, nicht dargestellt), aufgrund dessen dieser nicht zur Darstellung der NK-Zellen verwendet wurde.

Die durchflusszytometrischen Untersuchungen ergaben einen Anstieg der absoluten Zahl der NK-Zellen im Lungengewebe und dem Bronchoalveolarlumen. Die absolute Zellzahl mit $3 \cdot 10^6$ Zellen/Lunge im Lungenparenchym bzw. $8,1 \cdot 10^4$ Zellen im Bronchoalveolarlumen erreichte an Tag 7 p.i. ihren Höhepunkt und nahm anschließend wieder ab. Damit entsprach die hier ermittelte Kinetik der NK-Zellrekrutierung den für PVM 15 oder PVM J3666 in der Literatur während dieser Promotionsarbeit beschriebenen Beobachtungen:

In einer Untersuchung von 2014 wurde gezeigt, dass NK-Zellen im Bronchoalveolarlumen nach einer subletalen Infektion mit PVM 15 in C57BL/6-Mäusen ebenfalls bis Tag 7 p.i. stark ansteigt und anschließend wieder abfällt (Scheer et al., 2014). Auch die absolute Zellzahl entsprach mit rund 10^5 Zellen im Bronchoalveolarlumen den Werten der vorliegenden Arbeit. Die Rekrutierung von NK-Zellen ins Lungenparenchym wurde von Scheer et al. jedoch nicht untersucht.

Das in der vorliegenden Arbeit ermittelte NK-Zell-Rekrutierungsmuster ist außerdem vergleichbar mit der NK-Zell-Rekrutierung nach einer subletalen PVM-Infektion mit PVM J3666 in BALB/c-Mäusen. Der Anstieg der NK-Zellen wurde auch hier relativ spät während der Infektion mit einem Höhepunkt an Tag 7-8 in die Lunge ermittelt. Allerdings konnten nach einer Infektion mit PVM 15 eine vierfach höhere Anzahl von NK-Zellen im Bronchoalveolarlumen festgestellt werden, als nach einer Infektion mit PVM J3666 (van Helden et al., 2012). Das verwendete Virus könnte einen Einfluss auf die Gesamtzahl der rekrutierten NK-Zellen haben, aber auch, und das ist wahrscheinlicher, der verwendete Mausstamm. Während dieser Promotion wurde mit C57BL/6-Mäusen gearbeitet, währenddessen van Helden et al. auf BALB/c-Mäuse zurückgriffen, deren isolierte Primärzellen z.B. weniger Typ I IFN bilden (Heinze et al., 2011). Auch sind diese Mäuse susceptibler gegenüber einer Infektion mit PVM 15, da mit geringeren Dosen Symptome induziert werden können und der Höhepunkt der Virusvermehrung zu einem früheren Zeitpunkt erreicht wird (Watkiss et al., 2013).

Im Unterschied zur hier ermittelten Rekrutierungskinetik von NK-Zellen nach einer PVM-Infektion weisen BALB/c-Mäuse, infiziert mit $2 \cdot 10^5$ Pfu RSV, die höchste relative Anzahl der NK-Zellen gemessen an der Gesamtzahl der Lymphozyten bereits Tag 4 p.i. (Pribul

et al., 2008). Wird die Infektionsdosis um das 25fache gesteigert, wird der Höhepunkt bereits Tag 2 p.i. mit einem relativen Anteil von 60% von der Gesamtzahl der Lymphozyten erreicht (van Helden et al., 2012). Auch in einer weiteren Studie im RSV-Mausmodell nach einer Infektionsdosis von $1 \cdot 10^6$ Pfu RSV konnte der höchste relative Anteil an NK-Zellen bereits früh während einer Infektion festgestellt werden (d3) (Li et al., 2012). Im RSV-Infektionsmodell in BALB/c-Mäusen tritt die Rekrutierung der NK-Zellen bereits sehr früh während der Infektion auf und scheint zudem noch dosisabhängig zu sein. Die eventuelle dosisabhängige Rekrutierung nach einer Infektion mit PVM 15 wurde in dieser Arbeit jedoch nicht untersucht. Van Helden et al. allerdings konnten nach der Infektion mit PVM J3666 erste Hinweise für eine solche feststellen, da nach einer hohen Infektionsdosis bereits Tag 4 p.i. NK-Zellen im Bronchoalveolarlumen zu finden waren im Vergleich zu einer subletalen Infektionsdosis (van Helden et al., 2012).

Eine Influenzavirus-Infektion in Mäusen weist ein ähnliches Rekrutierungsmuster auf wie eine RSV in Mäusen. Die höchste absolute Anzahl an NK-Zellen konnte Tag 3 p.i. mit rund 10^4 Zellen pro BAL festgestellt werden (van Helden et al., 2012). Während einer Influenza-Virus-Infektion in C57BL/6-Mäusen kommt es ebenfalls zu einem Anstieg von NK-Zellen bis Tag 4 p.i. im Lungengewebe (Zhou et al., 2013). Auch das PVM-verwandte humane Metapneumovirus (HMPV) führt ebenfalls zu einem Anstieg von NK-Zellen während einer akuten Infektion. Mit 10^6 Zellen/Lunge erreicht die Rekrutierung an Tag 3 p.i. im Unterschied zur PVM-Infektion bereits ihren Höhepunkt (Wen et al., 2014).

Die oben aufgeführten Viren wie RSV, Influenzaviren und HMPV zeigen das typische NK-Zell-Rekrutierungsmuster mit einem schon früh während der Infektion auftretenden Höhepunkt der Rekrutierung an Tag 4 p.i. (Abbas et al., 2015; Culley, 2009). Nach einer PVM-Infektion im murinen Wirt hingegen scheint es zu einer verzögerten Rekrutierung dieses Zelltyps zu kommen.

Im Laufe dieser Dissertation wurde die funktionelle Analyse der NK-Zellen nicht durchgeführt. Es gibt jedoch einige Hinweise auf die Bedeutung der NK-Zellen für die Pathogenese nach verschiedenen viralen Infektionen in der Literatur. Eine RSV-Infektion in Mäusen verursachte eine schwere Immunpathogenese und unterstützte die

Akkumulierung und Aktivierung von IFN γ -sezernierenden NK-Zellen. Die Depletion dieser Zellen hingegen führt zu einer Verringerung der Krankheitssymptome und weniger sezerniertem IFN γ im Bronchoalveolarlumen. NK-Zellen verschlechtern also die Pathogenese (Li et al., 2012). Auch im Influenzavirus-Infektionsmodell scheinen NK-Zellen an der Entwicklung einer Pathologie beteiligt zu sein. Werden diese Zellen durch verschiedene Antikörper depletiert, verringert sich die Mortalität nach der Infektion. NK-Zellen tragen somit zu einer verstärkten Symptomatik nach einer schweren Influenzavirus-Infektion bei (Zhou et al., 2013). Eine Verringerung der Mortalität nach der Depletion der NK-Zellen wurde allerdings nur nach einer hohen Influenzavirus-Infektion beobachtet. Eine RSV-Infektion in Mäusen verläuft indes nicht letal, es kommt aber zur Verbesserung der klinischen Symptome (Li et al., 2012; Zhou et al., 2013). Im Unterschied zur RSV- bzw. Influenzavirus-Infektionen im Mausmodell tragen diese Zellen jedoch nicht zur Pathogenese nach einer Infektion mit HMPV bei, da NK-Zell-depletierte Mäuse keine Veränderungen in der Pathogenese aufweisen (Wen et al., 2014). Für PVM ist bekannt, dass NK-Zellen nach einer Infektion einen aktivierten Phänotyp aufweisen und ebenfalls IFN γ produzieren (Watkiss et al., 2013), jedoch nicht in wie weit diese Zellen einen Beitrag zur Pathogenese leisten.

4.1.4 Spatiotemporales Rekrutierungsmuster verschiedener Granulozytenpopulationen in die Lunge nach PVM-Infektion

4.1.4.1 Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten wurden bis Tag 7 p.i. in das Lungenparenchym und ins Bronchoalveolarlumen bis Tag 10 p.i. rekrutiert. Im Lungenparenchym nahm die Anzahl neutrophiler Granulozyten nach Tag 7 p.i. wieder ab, währenddessen sie im Bronchoalveolarlumen weiter bis Tag 10 p.i. zunahm. Anscheinend verlagerte sich ihre Lokalisation aus dem Interstitium in das Alveolarlumen. Nach Tag 10 p.i. verringerte sich auch dort die Anzahl der neutrophilen Granulozyten. Bemerkenswert ist außerdem die Verringerung der absoluten Anzahl dieser Zellen an Tag 4 p.i. im Bronchoalveolarlumen. Bzgl. der Lokalisation im Gewebe verteilten sich die Zellen an Tag 7 p.i. jedoch nicht nur in Regionen der Lunge mit infizierten Zellen, sondern auch in Arealen ohne GFP-

positive Zellen. An Tag 10 p.i. konnten keine GFP-positiven Zellen mehr in der Lunge identifiziert werden, neutrophile Granulozyten hingegen waren noch immer im Alveolarlumen lokalisiert. Das gesamte Rekrutierungsmuster der neutrophilen Granulozyten in die Lunge wurde so nicht erwartet. Neutrophile Granulozyten wiesen, wie zuvor bei den NK-Zellen diskutiert, ihre höchste absolute Anzahl im Lungengewebe zum Zeitpunkt der höchsten Konzentration an viralem Antigen auf, im Bronchoalveolarlumen sogar, wenn eigentlich kein virales Antigen mehr detektierbar ist.

Umfangreiche Kinetiken über die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in das Lungengewebe nach einer PVM-Infektion liegen nach meinem Wissen noch nicht vor. Jedoch gibt es einige Hinweise in der Literatur, wie diese Rekrutierung aussehen könnte. Watkiss et al. 2013 konnten nur eine geringe Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in das Alveolarlumen von PVM 15-infizierten C57BL/6-Mäusen zu einem frühen Zeitpunkt (Tag 5 p.i.) feststellen (Watkiss et al., 2013). Bis zu diesem Zeitpunkt entsprechen die Ergebnisse damit den Daten der vorliegenden Arbeit, die aber temporal über einen Zeitraum von 14 Tagen weiter geht. Ähnlich mit dem Rekrutierungsmuster der neutrophilen Granulozyten in dieser Arbeit war der Influx dieser Granulozyten in das Bronchoalveolarlumen nach einer subletalen PVM J3666-Infektion. Hier konnte Tag 7 p.i. der höchste relative Anteil, gemessen an der Gesamtzellzahl im Bronchoalveolarlumen, festgestellt werden. Die relative Anzahl der neutrophilen Granulozyten stieg bis zu diesem Zeitpunkt an und fiel anschließend wieder ab (Glineur et al., 2014). In der vorliegenden Promotionsarbeit wurde die höchste Rekrutierung für Tag 10 p.i., und damit zu einem späteren Zeitpunkt, festgestellt. Dieser Unterschied könnte von der Tatsache herrühren, dass Glineur et al. BALB/c-Mäuse verwendeten. Eine Untersuchung der absoluten Anzahl an neutrophilen Granulozyten aus diesem Jahr zeigt hingegen den Anstieg dieser Zellen im Bronchoalveolarlumen nach einer subletalen PVM J3666-Infektion, allerdings nur von Tag 7 bis Tag 10 p.i., d.h., eine vollständige Kinetik wurde nicht dargestellt (Lynch et al., 2018). Die beiden untersuchten Tage haben jedoch Ähnlichkeiten im Hinblick auf das Rekrutierungsmuster neutrophiler Granulozyten nach einer subletalen PVM 15-Infektion.

Im Unterschied zu einer nicht-letalen PVM-Infektion führte eine Infektion mit 200 Pfu/Maus PVM J3666 bereits Tag 6 p.i. zu einer hohen Sterblichkeit der Tiere sowie zu

einer Infiltration von neutrophilen Granulozyten in das Bronchoalveolarlumen an Tag 3 p.i. mit rund $1,1 \cdot 10^6$ Zellen pro ml. Die Anzahl der polymorphkernigen Zellen nahm dann bis Tag 6 p.i. kontinuierlich ab. Durch die hohe Mortalität wurde die Rekrutierung der neutrophilen Granulozyten nur bis Tag 6 p.i. analysiert (Domachowske et al., 2000b). Dieses Ergebnis spiegelt jedoch nicht das Rekrutierungsmuster während einer subletalen Infektion mit PVM wieder. Die Untersuchung der Rekrutierung der neutrophilen Granulozyten nach einer letalen PVM 15-Infektion war jedoch nicht Bestandteil dieser Promotion.

Auch die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten nach einer RSV-Infektion im BALB/c-Mausmodell scheint dosisabhängig zu sein. Eine Infektion mit 10^5 Pfu RSV pro Maus führte in der Lunge im Vergleich zur Anzahl in mock-infizierten Mäusen zu einer Erhöhung der Anzahl neutrophiler Granulozyten bis Tag 6 p.i.. Anschließend normalisierte sich die Anzahl der neutrophilen Granulozyten bis Tag 21 p.i. wieder (Schwarze et al., 1997). Eine höhere RSV-Infektionsdosis (10^7 Pfu) führt in BALB/c-Mäusen dagegen zu einer frühen Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in das Bronchoalveolarlumen an Tag 2 p.i. (Stoppelenburg et al., 2013).

Die Bedeutung von neutrophilen Granulozyten für die Pathogenese wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. In der Literatur lassen sich aber einige Hinweise darauf finden. Nach der Depletion von neutrophilen Granulozyten mittels eines Antikörpers konnte kein Unterschied in der klinischen Symptomatik oder der Viruslast bei zwei verschiedenen Mauslinien nach einer letalen PVM-Infektion (PVM J3666) festgestellt werden. Die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten schien damit die Pathogenese und die Viruseliminierung nicht zu beeinflussen (Cortjens et al., 2016b). Allerdings wurde in dieser Studie nicht auf die Bedeutung der neutrophilen Granulozyten während einer subletalen Infektion mit PVM eingegangen. Außerdem wurde für die Versuche der in Mäusen-passagierte Stamm PVM J3666 verwendet. Eine subletale PVM-Infektion nach einer Depletion könnte daher ein anderes Ergebnis liefern. Die Studie von Cortjens et al. steht im Kontrast zu einer milden oder schweren Influenzavirus-Infektion. Nach vorangegangener Depletion der neutrophilen Granulozyten kam es hier zu einer gesteigerten Mortalität und Lungenschäden mit höheren viralen Lasten. Während einer

Influenzavirus-Infektion schienen neutrophile Granulozyten schützende Eigenschaften aufzuweisen (Brandes et al., 2013; Tate et al., 2011).

Weiterführend müsste für die Analyse der Bedeutung der neutrophilen Granulozyten Untersuchungen in Mäusen nach einer subletalen PVM-Infektion durchgeführt werden, einschließlich der vorangegangenen Depletion von neutrophilen Granulozyten durch geeignete Antikörper.

4.1.4.2 Eosinophile Granulozyten

Die Bedeutung der eosinophilen Granulozyten für die Pathogenese wird in der Pneumovirus-Forschung kontrovers diskutiert (Rosenberg et al., 2009; Rosenberg et al., 2013). Bereits in Mock-infizierten Mäusen konnten eosinophile Granulozyten in der Lunge nachgewiesen werden. Nach der Infektion blieb die absolute Zahl bis Tag 7 p.i. relativ konstant und stieg erst an späteren Zeitpunkten, Tag 10 und speziell Tag 14 p.i., signifikant an. Dieser Sachverhalt konnte durch die immunhistologische Darstellung in Lungengewebeschnitten für Tag 14 p.i. durch das Vorhandensein von eosinophilen Granulozyten an Blutgefäßen und in deren näheren Umgebung bestätigt werden. Eosinophile Granulozyten werden nach einer subletalen PVM-Infektion scheinbar erst in der Genesungsphase vermehrt in das Lungenparenchym rekrutiert.

Auch in anderen Untersuchungen konnte nur ein geringer oder kein Influx von eosinophilen Granulozyten nach subletaler Dosis PVM 15 an frühen Zeitpunkten während der Infektion festgestellt werden, z.B. in BALB/c (30 Pfu/Maus) und C57BL/6-Mäusen (300 Pfu/Maus) (Watkiss et al., 2013). Trotz der Verwendung des gleichen Virusstamms (PVM 15) wurde der symptomatische Infektionsverlauf hier nur bis Tag 7 p.i. beobachtet nicht über einen Zeitraum von 14 Tagen. Die Zellrekrutierung wurde sogar nur für die Tage 3 und 5 p.i. untersucht, und nicht wie in der vorliegenden Promotionsarbeit über einen Zeitraum von 14 Tagen. Somit konnte auch keine Aussage über einen Zusammenhang von Pathogenese und eventueller Rekrutierung von eosinophilen Granulozyten getroffen werden. Eine weitere Studie, ebenfalls unter Verwendung einer subletalen Dosis PVM 15, untersuchte die Infiltration von eosinophilen Granulozyten in das Bronchoalveolarlumen bis Tag 10 p.i. Die Ergebnisse waren vergleichbar mit den in dieser Arbeit generierten Daten. Die Autoren

beobachteten ebenfalls keine erhöhte Rekrutierung von eosinophilen Granulozyten in das Bronchoalveolarlumen (Scheer et al., 2014). Eine subletale Infektion mit PVM 15 in C57BL/6-Mäusen führt also nicht zu einer vermehrten Rekrutierung von eosinophilen Granulozyten in das Lungelumen früh während einer Infektion, sondern erst in der Phase der Regeneration. Diese Beobachtungen scheinen unabhängig vom verwendeten PVM-Stamm zu sein. Auch nach einer subletalen Dosis PVM J3666 konnte keine gesteigerte Rekrutierung bis Tag 10 p.i. in das Lungengewebe nachgewiesen werden. Es kam sogar zu einer leichten Abnahme dieses Zelltyps bis Tag 7 p.i. (Lynch et al., 2018).

Im Unterschied zu diesen Ergebnissen haben Domachowske et al. festgestellt, dass BALB/c-Mäuse, infiziert mit einer letalen Dosis PVM J3666, an Tag 3 p.i. eine erhöhte Rekrutierung an eosinophilen Granulozyten und später von neutrophilen Granulozyten aufweisen (Domachowske et al., 2000a). Die Bedeutung des verwendeten Mausstamms scheint dabei keine Rolle zu spielen, da die Infektion mit PVM J3666 in C57BL/6-Mäusen ebenfalls letal verläuft und eosinophile Granulozyten früh in der Infektion in das Lungengewebe rekrutiert werden (Domachowske et al., 2000b; Percopo et al., 2014). Mäuse, welche mit einer letalen Dosis PVM J3666 infiziert wurden, überlebten meist nicht bis Tag 10 bzw. 14 p.i. Die verwendete Infektionsdosis scheint somit für die frühe Rekrutierung von eosinophilen Granulozyten von essentieller Bedeutung zu sein und nicht der verwendete Virusstamm oder die Mauslinie. Da für diese Dissertation PVM 15 in einer subletalen Dosis verwendet wurde, können so die Ergebnisse voneinander abweichen.

In einer darauffolgenden Untersuchung der gleichen Autoren konnte jedoch in unbehandelten C57BL/6-Mäusen keine gesteigerte Rekrutierung der eosinophilen Granulozyten nach einer letalen PVM-Infektion an Tag 4 p.i. festgestellt werden (Percopo et al., 2014), was den vorangegangenen Untersuchungen dieser Autoren widerspricht (Domachowske et al., 2000b), jedoch den Beobachtungen während der experimentellen Durchführung dieser Promotion entspricht. Die Rekrutierung in wildtypischen Kontrolltieren ist vergleichbar mit den Daten aus dieser Dissertation. Jedoch wurde keine vollständige Kinetik der Rekrutierung eosinophiler Granulozyten in den PVM J3666-infizierten Mäusen abgebildet.

Die gleiche Gruppe ermittelte 2009, dass RSV und PVM humane (aus Blut) bzw. murine eosinophile Granulozyten (aus Knochenmark) *ex vivo* produktiv infizieren können, was zu einer Abgabe proinflammatorischen Mediatoren führt. Laut den Autoren scheinen eosinophile Granulozyten Ziele für virale Infektionen zu sein und verschiedene, komplexe Beiträge zur Pathogenese und Auflösung einer pneumoviralen Infektion zu haben (Dyer et al., 2009). Über das Auftreten infizierter eosinophiler Granulozyten *in vivo* konnte bis zu diesem Zeitpunkt nach meinem Wissen noch keine Aussage getroffen werden.

Im Unterschied zur in dieser Arbeit durchgeführten subletalen PVM-Infektion führte eine subletale RSV-Infektion (10^5 Pfu) in BALB/c-Mäusen zu einem Influx von eosinophilen Granulozyten bereits an Tag 6 p.i. im Vergleich zu Kontrollmäusen in das gesamte Lungengewebe. Bis Tag 21 p.i. sank die Anzahl wieder (Schwarze et al., 1997). Es wurden jedoch nur Tag 6 und Tag 21 untersucht.

Eosinophile Granulozyten wurden erstmals als potentieller Pathogenesefaktor vermutet, nachdem in den 60er Jahren des vergangenen Jahrhunderts eine Impfstudie nicht die gewünschten Ergebnisse in Kleinkindern erbrachte. Es wurden Kleinkinder und Säuglinge mit FI-RSV immunisiert. Nach einer darauffolgenden natürlichen Infektion mit RSV konnte jedoch kein ausreichender Schutz festgestellt werden. Mehr vakzinierte Säuglinge als Placebo-Empfänger entwickelten schwere respiratorische Symptome wie Pneumonien, von dieser Studiengruppe starben zwei Säuglinge. *Post Mortem* Untersuchungen zeigten nur einen kleinen Anstieg an Eosinophil-Infiltrationen, die zur Annahme führten, dass eosinophile Granulozyten einen großen Einfluss auf die Pathogenese haben (Kapikian et al., 1961; Kim et al., 1969). In neueren Untersuchungen des Autopsiematerials konnte die Akkumulation von eosinophilen Granulozyten jedoch nicht bestätigt werden (Prince et al., 2001). Eosinophile Granulozyten können jedoch vor einer RSV-Infektion *in vivo* schützen. Sie unterstützen die Viruseliminierung und sind so wahrscheinlich in der Lage die virus-induzierte Lungendysfunktion zu limitieren (Phipps et al., 2007). Eine pulmonale Eosinophilie hat laut den Autoren im Modell der *Vaccine-enhanced RSV-Disease* zwei wesentliche Funktionen. Zum einen ist sie assoziiert mit RSV-induzierter Entzündung der Atemwege und zum anderen begünstigt sie Faktoren, die zur Reduzierung der Viruslast beitragen.

In IL-5 und Eotaxin-defizienten Mäusen konnte im Modell der *Vaccine-enhanced RSV-Disease* keine Eosinophilie aber, ein erhöhter Virustiter in der Lunge festgestellt werden (Su et al., 2015).

Nach einer subletalen PVM-Infektion könnten eosinophile Granulozyten eine positive Rolle während der Geweberegenerierung der Lunge haben, da sie erst spät (Tag 10 und 14 p.i.) verstärkt in die Lunge rekrutiert werden. Belege für diese Möglichkeit zeigen Daten aus anderen Gewebetypen. Auch hier dienen eosinophile Granulozyten zur Regenerierung, z.B. in der Leber und im Muskelgewebe. Diese Regenerierung war außerdem abhängig von IL-4 (Goh et al., 2013; Heredia et al., 2013). Weitere Hinweise für die Bedeutung der eosinophilen Granulozyten für die Wiederherstellung nach einer RSV-Infektion liefern verschiedene Studien mit erkrankten Kindern und Säuglingen. Kinder mit einer RSV-Infektion haben eine höhere Anzahl eosinophiler Granulozyten im Blut während der Wiederherstellungsphase als zum Zeitpunkt der Einlieferung (Kawasaki et al., 2006). Sie werden außerdem während der akuten Phase aktiviert und scheinen zur Wiederherstellung beizutragen (Lindemans et al., 2006). CCL5, ECP und Eotaxin waren erhöht während dem Übergang von der akuten Phase der Infektion zur Regenerierung nach der Infektion. Dies korrelierte außerdem mit der Anzahl der eosinophilen Granulozyten im Respirationstrakt (Bermejo-Martin et al., 2007; Kawasaki et al., 2006; Smyth et al., 1997).

Um die exakte Funktion eosinophiler Granulozyten während einer nicht-letalen PVM-Infektion zu ermitteln, müssen noch weitere Untersuchungen, wie z.B. Depletionsversuche und Messungen verschiedener Mediatoren (ECP, Eotaxin, etc.) über einen längeren Zeitraum nach der Infektion durchgeführt werden.

4.1.5 Transiente Depletion von AM Φ während einer PVM-Infektion

AM Φ sind ortsansässige Immunzellen im Alveolarlumen der Lunge, die die Lungenhomöostase aufrechterhalten und als erste Abwehr gegenüber Pathogenen fungieren (Hussell and Bell, 2014). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass AM Φ während einer subletalen Pneumovirus-Infektion *in vivo* infiziert werden und es im Verlauf der Infektion zu einer transienten Depletion um bis zu 90% kommt. Die

Gesamtzahl der AM Φ in der Lunge nach einer PVM-Infektion (rPVM-GFP, rPVM-mCherry und PVM 15) nahm bis Tag 10 p.i. stetig ab. Die Anzahl infizierter Zellen (mCherry⁺) indes nahm bis Tag 4 p.i. zu. Nach Elimination der Viruspartikel (nach Tag 7 p.i.) erholte sich die Population der AM Φ wieder. In der gesamten Untersuchung konnten andere Makrophagen ausgeschlossen werden, da AM Φ eindeutig durch ihre Oberflächenexpression von SiglecF und CD11c identifiziert wurden. Auch bei immundefizienten Mäusen (B6.TCR β ^{-/-}, B6.Rag1^{-/-} und B6.Rag1.C γ ^{-/-}) wurde die absolute Zahl der AM Φ im Lungengewebe ohne einen signifikanten Unterschied zu wildtypischen Kontrolltieren reduziert. Unabhängig von den verschiedenen Immundefizienzen nahm die Anzahl der AM Φ während einer Infektion ab. Eine Rekonstitution konnte nur in den wildtypischen Kontrolltieren beobachtet werden. Ein zugrundeliegender Immunmechanismus für die Depletion der AM Φ konnte durch diese Versuche nicht bestimmt werden. Die Ergebnisse deuten jedoch eher auf eine direkte Korrelation der AM Φ -Depletion und der Virusvermehrung hin. Wären die AM Φ in diesen immundefizienten Tieren nicht depletiert worden, würde das bedeuten, dass die Virusvermehrung keinen Einfluss auf die AM Φ hätte. Diese Hypothese wurde in dieser Arbeit jedoch nicht weiter untersucht.

Ähnliche Ergebnisse zu den in dieser Arbeit ermittelten Resultaten lieferte 2016 Dyer et al. Allerdings wurde für die Infektion ein anderer PVM-Stamm, PVM J3666, in letalen Dosen verwendet. Mittels eines rekombinanten PVM J3666 (rK2-PVM) konnten infizierte AM Φ *in vivo* nachgewiesen werden. In diesen infizierten Makrophagen fand aktive Virusreplikation statt und es wurden infektiöse virale Partikel produziert. Auch konnte ein Verlust der AM Φ in der Lunge festgestellt werden. Allerdings wurde nur bis Tag 7 p.i. untersucht, da eine letale Infektionsdosis verwendet wurde und die Mäuse vorher getötet werden mussten (Dyer et al., 2015). Ob die Population der AM Φ das Potential zur Regeneration hatte, wie nach einer subletalen PVM-Infektion, konnte in diesem Infektionsmodell nicht ermittelt werden.

Während einer subletalen RSV-Infektion im BALB/c-Mausmodell scheint es eine ähnliche Kinetik in der Anzahl der AM Φ zu geben, wie nach der Verwendung von PVM 15. Nach solch einer Infektion wurde festgestellt, dass sich der relative Anteil der AM Φ an der Gesamtzahl der Zellen im Bronchoalveolarlumen im Laufe der Infektion (bis Tag

8 p.i.) reduziert (Pribul et al., 2008). Relative Angaben sind jedoch meist schwierig zu deuten, da sie die absolute Zahl von Zellen und deren Kinetiken nicht eindeutig widerspiegeln. Im Unterschied zu Pribul et al. wurden in einer nachfolgenden Studie BALB/c-Mäuse mit einer 50fach höheren Dosis eines anderen RSV-Stammes (hRSV Long) infiziert. Hier konnte eine starke Reduzierung der AM Φ im Gewebe bereits 6 h nach der Infektion festgestellt werden, jedoch auch einen anderen Gewichtsverlauf. Die Tiere nahmen bis Tag 2 p.i. rund 15% des Ausgangsgewichtes ab und erholten sich anschließend wieder. Auch scheint die Verringerung der absoluten Zahl von AM Φ im Bronchoalveolarlumen nach RSV-Infektion durch den Prozess der Nekrose vermittelt zu werden, nicht durch Apoptose (Kolli et al., 2014). Aufgrund der Verwendung verschiedener RSV-Stämme (Long, A2) ist die Dosis-Effekt-Beziehung nicht vergleichbar. Zusammenfassend kann jedoch gesagt werden, dass eine RSV-Infektion im Mausmodell, wie PVM 15 in Mäusen, die Anzahl der AM Φ reduziert. Ob diese Depletion allerdings transient war, wurde in diesen Untersuchungen nicht ermittelt.

Als Beispiel einer weiteren respiratorischen Virusinfektion, neben PVM und RSV, wurden in Studien anderer Arbeitsgruppen Mäuse mit Inflenzaviren infiziert und die Anzahl der AM Φ über den zeitlichen Verlauf von 14 Tagen nach einer Infektion analysiert. Es wurde ermittelt, dass nach einer Inflenzavirus-Infektion in den ersten 7 Tagen die Anzahl AM Φ um 90% im Bronchoalveolarlumen und im Lungenparenchym reduziert wurde. Zwei Wochen nach der Infektion konnte eine vollständige bzw. eine gesteigerte Wiederherstellung der AM Φ in der BAL beobachtet werden. Eine Inflenzavirus-Infektion führt also zu einer transienten AM Φ -Depletion (Ghoneim et al., 2013). Neben Inflenzaviren infiziert auch das *Middle East respiratory syndrome* Coronavirus AM Φ in Rhesusaffen und Seidenäffchen (Yu et al., 2017). AM Φ scheinen somit nicht nur Zielzellen für PVM zu sein, sondern auch für einige andere respiratorische Viren, in deren Folge es zu einer transienten Depletion dieser Zellen kommt.

Funktionelle Untersuchungen zur Bedeutung von AM Φ lagen außerhalb der Zielsetzung dieser Promotionsarbeit und würden ein selbständiges Projekt darstellen. Außerdem existieren bereits Untersuchungen, bei denen AM Φ vor der eigentlichen Infektion depletiert wurden. Im PVM-Mausmodell kam es nach der AM Φ -Depletion zu einer

Erhöhung der Viruslast im Lungengewebe, aber nicht zu einer gesteigerten Mortalität. Dabei fiel auf, dass bei AM Φ -depletierten Mäusen mehr NK-Zellen rekrutiert wurden und dass das IFN γ -Level in der Lunge anstieg. Für IFN γ konnte in diesem Zusammenhang ein positiver immunmodulatorischer Effekt ermittelt werden (Rigaux et al., 2012). Interessanter Weise wurde auch in der vorliegenden Promotionsarbeit eine Infiltration von NK-Zellen in das Lungengewebe beobachtet, deren Kinetik mit Höhepunkt der Rekrutierung an Tag 7 (siehe Kap. 4.1.3) der PVM-induzierten Depletion von AM Φ (niedrigste Zellzahl an Tag 10 p.i., Kap. 3.1.4) folgt. Die Ergebnisse von Rigaux und Kollegen (Rigaux et al., 2012) könnten daher auf einen Zusammenhang von AM Φ und verzögerter NK-Zell-Rekrutierung schließen lassen. Dieser Sachverhalt müsste allerdings durch weitere Versuche belegt werden.

Auch im RSV-Mausmodell wurde die Bedeutung der AM Φ für die Pathogenese untersucht. AM Φ -depletierte und RSV-infizierte Mäuse zeigen eine erhöhte Virusvermehrung, eine gesteigerte Symptomatik und Entzündungsreaktion mit erhöhter Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und inflammatorischen dendritischen Zellen (Kolli et al., 2014). Im Lungengewebe von *New Zealand black* (NZB)-Mäusen, welche ein konstitutives Defizit in ihrer Makrophagenfunktion aufweisen, konnten Atemwegsverschlüsse und apoptotische Zellreste nachgewiesen werden. Ein Fehlen von AM Φ in diesen NZB-Mäusen scheint außerdem für die gesteigerten Krankheitssymptome essentiell zu sein. Denn wurden AM Φ in BALB/c-Mäusen vor einer RSV-Infektion depletiert, führt dies ebenfalls zu Atemwegsverschlüssen. Aufgrund dieser Ergebnisse schlussfolgern die Autoren, dass An- bzw. Abwesenheit von AM Φ ein kritischer Faktor für die Schwere einer RSV-Bronchiolitis darstellt (Reed et al., 2008). Dieser Sachverhalt könnte auch auf eine PVM-Infektion zutreffen, müsste jedoch durch weitere Versuche, u.a. durch Depletion und Rekonstitution von AM Φ belegt werden.

4.1.6 Vergleich der Pneumovirus-induzierten Immunantwort im murinen PVM-Infektionsmodell zum Verlauf der Immunantwort im Menschen

Vergleicht man die natürliche RSV-Infektion im Menschen mit Daten, die mit Hilfe von experimentellen Tiermodellen gewonnen wurden, werden Gemeinsamkeiten und Unterschiede sichtbar.

Mehrere Studien weisen darauf hin, dass neutrophile Granulozyten der vorherrschende Zelltyp in den oberen und unteren Atemwegen von Säuglingen nach einer RSV-Infektion darstellen. Eosinophile Granulozyten hingegen treten nur zu einem geringen Prozentsatz auf (Everard et al., 1994; McNamara et al., 2003; Smith et al., 2001). CD8⁺ T-Zellen stellen außerdem nicht die dominante Zellpopulation im Bronchoalveolarlumen dar. (Everard et al., 1994). In nachfolgenden Untersuchungen wurde die CD8⁺T-Zell-Antwort in BAL-Proben und im Blut von Säuglingen mit einer schweren primären RSV-Infektion genauer analysiert. RSV-spezifische CD8⁺T-Zellen mit einem aktivierten Effektorphänotyp konnten nachgewiesen werden. Die höchste Anzahl RSV-spezifischer T-Zellen und auch der CD8⁺ Effektor-T-Zellen konnte im Blut an den Tagen 9-12 nach dem Auftreten der ersten Symptome, d.h. in der Erholungsphase, festgestellt werden. Die Autoren vermuten, dass es keine Korrelation zwischen RSV-spezifischer T-Zellanzahl und der Schwere der Krankheit zu geben scheint, aber über die Zellzahl am Infektionsort konnten sie diesbezüglich keine Rückschlüsse ziehen (Heidema et al., 2007). Eine Primärinfektion mit RSV von Säuglingen resultiert häufig in einer stationären Behandlung und Überwachung in der Klinik. Unter diesen Bedingungen war die absolute Zahl an CD8⁺ und CD4⁺, sowie CD19⁺ Lymphozyten und NK-Zellen im peripheren Blut direkt nach der Einlieferung ins Krankenhaus niedriger bei Patienten mit RSV-Infektion im Vergleich zu nicht infizierten Kontrollpatienten. Auch wurden verschiedene proinflammatorische Cytokine untersucht, die in infizierten Individuen geringere Werte aufweisen, als in nicht infizierten Kontrollen (Larranaga et al., 2009). Eine Verlaufsstudie wurde allerdings nicht durchgeführt. Erste Hinweise für die Zellkinetik im peripheren Blut nach einer RSV-Infektion lieferte eine nachfolgende Studie. Hier wurden Säuglinge in Hinblick auf neutrophile Granulozyten und CD8⁺ T-Zellen im peripheren Blut in Verbindung mit der Viruslast und dem Schweregrad der Erkrankung über einen längeren Zeitraum nach der Einweisung in die Klinik untersucht. Es wurde ermittelt, dass die

primäre T-Zell-Antwort substantielle CD8⁺T-Zell-Aktivierung zeigt, welche ihren Höhepunkt während der Genesungsphase hat. Eine starke Antwort der neutrophilen Granulozyten ging aber der T-Zell-Aktivierung voraus. Der Verlauf der Rekrutierung neutrophiler Granulozyten folgte dem Höhepunkt der klinischen Symptome und der Viruslast mit einer 2-3tägigen Verzögerung. Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass die CD8⁺T-Zell-Antwort nicht zur Krankheit beiträgt, wenn sie am schwersten ist (Lukens et al., 2010). Auch im in dieser Dissertation untersuchten PVM-Mausmodell geht der starken CD8⁺-T-Zellantwort eine verstärkte Infiltration von neutrophilen Granulozyten in das Lungengewebe voraus, die zumindest im Bronchoalveolarlumen, 2-3 Tage nach dem Höhepunkt der Virusvermehrung auftritt (Abb. 13). Im Unterschied zur RSV-Infektion im Menschen tragen bei Mäusen nachweislich CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen zur Immunpathogenese nach einer PVM-Infektion bei (Frey et al., 2008). Eosinophile Granulozyten konnten ebenfalls nur zu einem geringen Teil im Blut identifiziert werden, hauptsächlich in der Wiederherstellungsphase nach der Infektion (Lukens et al., 2010). Über deren Rolle im Lungengewebe konnten jedoch keine Rückschlüsse gezogen werden. In PVM-infizierten Mäusen jedoch trat eine verstärkte Infiltration von eosinophilen Granulozyten erst Tag 10 und 14 p.i., also in der Genesungsphase, auf, was sich mit den Daten aus dem peripheren Blut von RSV-Infizierten Patienten deckt (Bermejo-Martin et al., 2007; Kawasaki et al., 2006; Lindemans et al., 2006; Smyth et al., 1997).

Ebenfalls wurden die Anzahl und der Reifegrad von B-Lymphozyten in Patienten mit einer RSV-induzierten Bronchiolitis untersucht. Im peripheren Blut von hospitalisierten RSV-infizierten Säuglingen konnte kein Anstieg der absoluten Anzahl CD19⁺ B-Zellen, besonders von reifen CD19⁺ CD5⁺ B-Zellen bei Krankenhausaufnahme, also dem Tag mit den stärksten Krankheitssymptomen, im Vergleich zur Genesungsphase eine Woche später festgestellt werden (Raes et al., 1997). Im Unterschied zur B-Zell-Zahl im peripheren Blut von RSV-infizierten Patienten wurde im Lungengewebe von PVM-infizierten Mäusen eine verstärkte Infiltration von B-Lymphozyten in der Genesungsphase ermittelt (Abb.12). *Post mortem*-Untersuchungen an Lungengewebe von Säuglingen nach einer RSV-Infektion wiesen jedoch vermehrt Lymphozyten-Infiltrate auf. So konnten CD20⁺ B-Zellen ebenfalls perivaskulär, peribronchial und

alveolar nachgewiesen werden (Reed et al., 2009). Dies ist vergleichbar mit der Lokalisation der B-Zellen in Lungen PVM-infizierter Mäuse Tag 10 und 14 p.i.. In humanem Lungengewebe konnte ebenfalls vermutlich Bronchus-assoziiertes lymphoides Gewebe zwischen Bronchiolen und ihren begleitenden Blutgefäßen identifiziert werden, in dem CD20⁺ B-Lymphozyten deutlich dominierten. Aber auch CD3⁺ T-Zellen konnten in diesen Arealen nachgewiesen werden (Johnson et al., 2007). Die Strukturen, die in dieser Promotionsarbeit an Tag 14 nach einer PVM-Infektion beobachtet wurden, weisen ähnliche Merkmale auf, die jedoch wie unter Kap. 4.1.2 beschrieben, näher untersucht werden müssten.

Seit einigen Jahren wird vermehrt ein humanes Infektionsmodell für Untersuchungen der RSV-Infektion eingesetzt. Für diese Studien werden Probanden mit RSV infiziert und der Krankheitsverlauf, sowie die zelluläre und humorale Immunantwort analysiert. Diese experimentelle Infektion verursacht Entzündungen der oberen und unteren Atemwege. Es konnte eine Infiltration von CD8⁺ T-Zellen in die unteren Atemwege beobachtet werden. Pulmonale virus-spezifische T-Zellen wiesen außerdem einen *Resident-Memory*-Phänotyp (Trm) auf und akkumulierten zu hohen Frequenzen ohne weiterführende Proliferation. Tritt dieser Zelltyp schon gehäuft vor der eigentlichen RSV-Infektion auf korreliert dies mit reduzierten Symptomen und Viruslast, als Zeichen dafür, dass CD8⁺ Trm-Zellen einen Schutz gegenüber schweren RSV-Infektionen bilden (Jozwik et al., 2015). Die Abnahme der relativen Anzahl an CD8⁺T-Gedächtniszellen korreliert mit der Zunahme des Alters der Patienten. Dies könnte die erhöhte Anfälligkeit dieser Personengruppe für RSV-Infektionen erklären (de Bree et al., 2005). Die Infiltration des humanen Lungengewebes mit CD8⁺ T-Zellen ist ähnlich zur Infiltration des murinen Lungengewebes mit diesen Zellen, trotz dessen, dass gesunde Erwachsene bereits eine Primärinfektion mit RSV in ihrer Kindheit durchlaufen hatten und die experimentelle Infektion einer Sekundärinfektion entsprach. Welche spezifischen Phänotypen diese Zellen im murinen Infektionsmodell aufweisen, wurde während dieser Promotion jedoch nicht untersucht, könnten aber wichtige Einblicke in deren Funktionalität liefern.

Über die Bedeutung der AMΦ während einer RSV-Infektion beim Menschen gibt es nur limitierte Daten, die sich vor allem auf Patienten mit kompromittiertem Immunsystem

beziehen. *In vitro* Studien Ende der 80er bis Anfang der 90er Jahre stellten fest, dass isolierte AM Φ von gesunden Freiwilligen mit RSV infiziert werden können und diese dann infektiöse Viruspartikel produzieren (Midulla et al., 1989; Panuska et al., 1990). 1992 wurden erstmals BAL-Zellen von sechs RSV-infizierten Transplantationspatienten untersucht. Es wurde ermittelt, dass nicht nur Zellen des Lungenepithels infiziert waren, sondern auch AM Φ . AM Φ bei RSV-infizierten Transplantationspatienten wiesen außerdem eine hohe Stimulationsaktivität gegenüber T-Zellen auf, da sie MHC-II sowie IL-1 β auf ihrer Oberfläche exprimierten (Panuska et al., 1992). Neben Transplantationspatienten wurden ebenfalls Kinder und Säuglinge mit akuter Infektion der unteren Atemwege, verursacht durch RSV, im Hinblick auf deren AM Φ untersucht. AM Φ , isoliert aus dem Bronchoalveolarlumen infizierter Kinder, schieden virale Partikel aus und ko-exprimierten, wie bereits für Transplantationspatienten beschrieben, HLA-DR, IL-1 β und TNF α . AM Φ wurden also auch hier *in vivo* mit RSV infiziert und exprimierten immunmodulatorische Moleküle (Midulla et al., 1993). Humane AM Φ können im Menschen mit RSV infiziert werden und sie sind in der Lage, effektiv T-Zellen direkt am Ort der Infektion zu stimulieren. Ob sich die Anzahl dieses Zelltyps während einer RSV-Infektion im Menschen, wie im murinen RSV- bzw. PVM-Infektionsmodell, verändert, lässt sich allerdings nur schwer direkt untersuchen.

Abschließend kann gesagt werden, dass die Immunantwort im PVM-Mausmodell im Hinblick auf die Infiltration von Granulozyten und CD8⁺-T-Lymphozyten, sowie B-Lymphozyten trotz aller Unterschiede einige Gemeinsamkeiten zur Immunreaktion im Menschen nach einer RSV-Infektion aufweist.

4.2. Pneumovirus-Infektionen unter Immunsuppression

4.2.1. Krankheitsverlauf und Virusvermehrung in Mäusen mit definierter Immunsuppression

RSV-Infektionen bei immunsupprimierten Patienten sind schwer zu untersuchen, denn sie werden meist erst spät detektiert und verlaufen sehr oft tödlich (Boeckh, 2008). Nach einer HSZT unterliegt die Rekonstitution der zuvor depletierten Kompartimente verschiedenen Kinetiken (Kalwak et al., 2002). Des Weiteren können zusätzliche Komplikationen auftreten, wie z.B. Graft-versus-Host-Disease (GvHD) (Krenger et al., 2011). D.h., die Konstitution des Immunsystems ist nach einer HSZT zu komplex, um den Beitrag der einzelnen Immunkompartimente zu einer Pneumovirus-induzierten Pathogenese zu ermitteln. In dieser Arbeit wurde daher mit Modellen einer definierten Immunsuppression gearbeitet, nicht unter Bedingungen einer sekundären Immunsuppression. Die hier verwendeten Tiermodelle stellen zunächst eine Vereinfachung dar. Für die folgenden Untersuchungen wurden C57BL/6-, T-Zell-defiziente B6.TCR $\beta\delta^{-/-}$ - sowie T- und B-Zell-defiziente B6.Rag1 $^{-/-}$ - Mäuse verwendet. Außerdem wurden Mäuse mit einer zusätzlichen Defizienz der NK-Zellen, B6.Rag1.Cy $^{-/-}$ -Mäuse, untersucht.

C57BL/6-Kontrollmäuse zeigten nach einer subletalen PVM 15-Infektion den typischen Krankheitsverlauf mit Gewichtsverlust und ansteigender Viruslast bis Tag 7 p.i. und anschließender vollständiger Viruseliminierung. B6.TCR $\beta\delta^{-/-}$ -Mäuse, wie zuvor beschrieben (Frey et al., 2008), entwickelten keine Krankheitssymptome. Nach der Analyse der Viruslastentwicklung in der Lunge konnte jedoch ermittelt werden, dass es diesen Tieren trotzdem möglich ist, die Virusvermehrung anteilig zu kontrollieren. Nach einer anfänglichen Zunahme der Viruslast bis Tag 7 p.i., die vergleichbar war zur Viruslastentwicklung in der Lunge von C57BL/6-Mäusen, wurde die Viruslast bis Tag 14 p.i. signifikant um ein 4faches reduziert. Dabei entsprach die Viruslast in der Lunge der B6.TCR $\beta\delta^{-/-}$ -Mäuse ca. den Werten, die Frey und Kollegen bis Tag 11 bestimmt hatten (Frey et al., 2008). Im Unterschied dazu konnte bei Mäusen mit zusätzlichen Defizienzen des B-Zell-, bzw. des B- und NK-Zellkompartimentes ein anderes Bild nach

einer für immunkompetente und B6.TCR $\beta\delta^{-/-}$ -Mäuse subletalen PVM-Infektion ermittelt werden. Die klinischen Symptome bei B6.Rag1 $^{-/-}$ - und B6.Rag1.Cy $^{-/-}$ -Mäusen reichten von asymptomatischen Verläufen bis zu schwerwiegenden, letalen Verläufen. Dies deutete darauf hin, dass B-Lymphozyten bei T-Zell-defizienten Mäusen wahrscheinlich vor schweren Krankheitsverläufen schützen, da ihr Vorhandensein den einzigen Unterschied darstellt. Die Rolle von B-Zellen wird im folgenden Kapitel (4.2.2) separat diskutiert. Etwas weniger schwere Krankheitsverläufe konnten bei B6.Rag1.Cy $^{-/-}$ -Mäusen im Vergleich zu B6.Rag1 $^{-/-}$ -Tieren festgestellt werden. Die Gewichtsabnahme verlief langsamer und die Infektion im Schnitt später letal. Dies wurde bei einer höheren Infektionsdosis noch deutlicher: die Infektion verlief für B6.Rag1 $^{-/-}$ -Mäuse nach einer Infektion mit 500 Pfu PVM 15 bereits bis Tag 9 p.i. zu fast 100% letal, für B6.Rag1.Cy $^{-/-}$ -Mäuse erst zwei Tage später. Ursächlich dafür könnte die Tatsache sein, dass in B6.Rag1.Cy $^{-/-}$ -Mäusen keine NK-Zellen gebildet werden und deren zytotoxische Eigenschaften so nicht zum Tragen kommen. Erste Hinweise auf diesen Mechanismus könnte das Rekrutierungsmuster von NK-Zellen in die Lunge von B6.Rag1 $^{-/-}$ -Mäusen liefern. Hier kam es zu einem signifikanten Anstieg der NK-Zellpopulation bis Tag 10 p.i. im Vergleich zu den C57BL/6-Kontrollmäusen sowohl im Lungengewebe als auch im Bronchoalveolarlumen. Eosinophile Granulozyten könnten in B6.Rag1 $^{-/-}$ -Mäusen ebenfalls zur erhöhten Pathologie beitragen, da sie bereits Tag 7 p.i. vermehrt in das Lungengewebe rekrutiert werden. Bei B6.TCR $\beta\delta^{-/-}$ -Mäusen konnte ebenfalls ein Anstieg der absoluten Zahl der NK-Zellen sogar bis Tag 14 p.i. festgestellt werden. Es kam jedoch aufgrund der vorhandenen B-Zellen vermutlich nicht zu schweren Krankheitsverläufen bei diesen Tieren.

Die letalen Infektionsverläufe bei immunsupprimierten Tieren waren mit einem Kontrollverlust über die Virusvermehrung assoziiert. Des Weiteren war es nicht möglich, eine subletale Infektionsdosis für die immundefizienten Mauslinien zu ermitteln, die ausschließlich eine transiente Morbidität induzierte. Nach Erhöhung der Infektionsdosis auf 500 Pfu, entwickelten B6.TCR $\beta\delta^{-/-}$ -Mäuse ebenfalls keine Symptome, wohingegen C57BL/6-Mäuse teilweise stark an Körpergewicht verloren und die Infektion für 25% der Tiere letal verlief. Wurde die Infektionsdosis weiter auf 1000 Pfu erhöht, entwickelten einige T-Zell-defiziente Tiere erstmals Symptome mit ebenfalls sehr variablen

Gewichtsverläufen, wobei es auch asymptomatische bzw. milde Verläufe gab. Für 60% der Tiere war die Infektion letal. Dabei waren diese letalen Verläufe mit einer deutlich erhöhten pulmonalen Viruslast im Vergleich zu überlebenden Mäusen ($5,6 \cdot 10^6$ Pfu/Lunge vs. $3,3 \cdot 10^5$ Pfu/Lunge) verbunden. Bei B6.Rag1^{-/-}- und B6.Rag1.Cγ^{-/-}-Mäusen konnte bereits nach einer Infektion mit 300 Pfu PVM 15 ein Anstieg der pulmonalen Viruslasten am Versuchsabbruch im Vergleich zu überlebenden Tieren festgestellt werden, wenn auch statistisch nicht signifikant.

Wie durch Frey et al. 2008 beschrieben, zeigten T-Zell-defiziente Mäuse nach einer für immunkompetente Vergleichstiere subletalen PVM-Infektion keine Krankheitssymptome oder Zeichen von pathologischen Vorgängen im Lungengewebe. Auch konnte das Virus nicht, wie bei den Kontrolltieren, innerhalb der ersten 11 Tage nach der Infektion eliminiert werden. Dies entspricht in etwa den Ergebnissen aus dieser Dissertation an Tag 14 p.i.. Bei T-Zell-defizienten Mäusen konnte noch bis Tag 24 p.i. Virus im Lungengewebe nachgewiesen werden. Bei αβ-T-Zell-defizienten Mäusen konnte eine Verringerung der Viruslast bis Tag 34 bzw. 49 im Vergleich zu Tag 11 p.i. festgestellt werden, was ebenfalls für eine anteilige Viruskontrolle spricht (Frey et al., 2008). Nach einer Infektion mit einer hohen Virusdosis (3500 bzw. 5000 Pfu/Maus) PVM 15 entwickelten auch diese Tiere eine hohe Sterblichkeitsrate. Je höher die initiale Infektionsdosis, desto schneller wurden die Abbruchkriterien erreicht und desto höher war die Mortalitätsrate, unabhängig von den T-Lymphozyten (Frey et al., 2008). Nach einer niedrigeren Infektionsdosis (1000 Pfu bzw. 1500 Pfu) konnten im Unterschied dazu in dieser Promotion hoch variable symptomatische Verläufe beobachtet werden, die nicht zu 100% tödlich verliefen. B6.Rag1^{-/-}-Mäuse zeigten ebenfalls nach einer für C57BL/6-Mäuse zu 100% letalen Infektion mit PVM J3666 eine starke Gewichtsabnahme, die sich jedoch nicht von der in Kontrollmäusen unterschied. Jedoch hatten die T- und B-Zell-defizienten Mäuse eine erhöhte Viruslast im Vergleich zu C57BL/6-Mäusen (Maltby et al., 2018), was wahrscheinlich ebenfalls auf einen Verlust der Viruskontrolle ähnlich zur PVM 15 -Infektion schließen lässt.

Vergleichbar mit dem Gewichtsverlauf von B6.TCRβδ^{-/-}-Mäusen nach einer subletalen PVM-Infektion ((Frey et al., 2008), diese Promotion) sind die Daten aus einer Untersuchung von 1991 im RSV-Mausmodell. Hier wurden CD4⁺ T-Zellen und CD8⁺ T-

Zellen in BALB/c-Mäusen depletiert, das B-Zell-Kompartiment blieb jedoch intakt. Nach dieser Behandlung und darauffolgender Infektion mit RSV konnte die Viruslast in der Lunge über einen Zeitraum von 50 Tagen ermittelt werden, aber ohne erkennbaren Gewichtsverlust der Mäuse oder Krankheitssymptome. Es kam jedoch auch hier zu einer anteiligen Viruskontrolle, da die Viruslast über den untersuchten Zeitraum in der Lunge und im oberen Respirationstrakt abnahm (Graham et al., 1991b). Wurden Mäuse mit einem Antikörper, gerichtet gegen die schwere μ -Kette, behandelt, konnte kein Unterschied zwischen der Viruslast bei behandelten und nicht-behandelten Mäusen nach einer RSV-Infektion festgestellt werden. Interessant war jedoch die Tatsache, dass Anti- μ -Antikörper-behandelte Mäuse schwerere Krankheitssymptome entwickelten (Graham et al., 1991a). B-Lymphozyten scheinen somit ebenfalls schützende Eigenschaften während einer RSV-Infektion im Mausmodell zu generieren, die vergleichbar sind mit den in dieser Dissertation generierten Ergebnissen im PVM-Mausmodell. Ein weiteres semipermissives Infektionsmodell ist das RSV-Baumwollratten-Modell. Diese Tiere sind susceptibler für diese Infektion, denn eine geringere Infektionsdosis reicht aus, Symptome zu generieren (Prince et al., 1978). Wurden Baumwollratten mit Cyclophosphamid vor der Infektion behandelt, kam es zu einer verstärkten Lungenpathologie und einer höheren pulmonalen Viruslast verglichen mit Cyclophosphamid-unbehandelten Kontrolltieren. Auch wurde Virus in einigen Tieren extrapulmonal nachgewiesen (Wong et al., 1985). Cyclophosphamid wirkt auf Zellen mit hoher Teilungsrate, z.B. hämatopoetische Zellen, das heißt, neben T-Zellen können auch B-Zellen und Leukozyten betroffen sein. Die Autoren dieser Untersuchung konnte die genaue Lymphozyten-Population, die durch das Cyclophosphamid supprimiert wurde, nicht bestimmen. Da die Tiere jedoch negativ für IgM-, IgG- und IgA-Antikörper waren, kann geschlussfolgert werden, dass auch B-Zellen depletiert wurden. Heutige Untersuchungen zeigen außerdem, dass dieses Medikament die Anzahl und die Funktionalität von T-, B-Zellen und Leukozyten beeinflusst (Sabbele et al., 1988; Salem et al., 2012). Dieses Depletions-Infektionsmodell hat Ähnlichkeiten zu einer PVM-Infektion in B6.Rag1^{-/-}-Mäusen, da T- und B-Zellen von der Cyclophosphamid-Behandlung betroffen sind und es zu einer persistierenden Infektion und schweren Lungenpathologien kommt. Das Virus konnte nicht kontrolliert werden, ähnlich zu einer

PVM-Infektion in B6.Rag1^{-/-}-Mäusen. Über veränderte Mortalitätsraten sowie auftretende Krankheitssymptome wurde in dieser Studie jedoch keine Aussage getroffen.

Auch bei anderen Virusinfektionen spielt der Status des Immunsystems eine wichtige Rolle für die Entwicklung der Pathogenese. Mit Influenza- und Sendai-Virus-infizierte Nacktmäuse wiesen ebenfalls, wie B6.TCRβδ^{-/-}-Mäuse, eine zeitlich verlängerte Virusvermehrung auf. Auch konnte Virus in anderen Organen neben der Lunge festgestellt werden (Fishaut et al., 1980; Sullivan et al., 1976; Wyde et al., 1977). Eine Untersuchung aus dem Jahr 2005 zeigte, dass T-Zell-defiziente Mäuse nach einer Influenzavirus-Infektion keine Krankheitssymptome entwickeln und Virus produzieren, während in C57BL/6-Kontrollmäusen an Tag 11 p.i. keine Viruslast mehr nachweisbar war. Im Unterschied dazu verloren B-Zell-defiziente Mäuse kontinuierlich Körpergewicht, obwohl die Viruslast ähnlich hoch war wie in T-Zell-defizienten Tieren (Lee et al., 2005). Eine T-Zell-Defizienz wirkt sich somit ähnlich auf die Pathogenese und die pulmonale Viruslast nach einer Influenzavirus-Infektion aus wie eine subletale PVM-Infektion. Auch scheinen B-Zellen eine vor schweren Krankheitsverläufen schützende Rolle zu spielen.

Die Variabilität der Krankheitssymptome, von asymptomatischen Verläufen bis hin zu tödlichen Infektionen der unteren Atemwege, in immunsupprimierten Patienten ähneln den Krankheitsverläufen von PVM-Infektionen bei immundefizienten Mauslinien. Als Beispiel dafür dient ein RSV-Ausbruch in einer hämatologischen Abteilung (Geis et al., 2013; Lehnert et al., 2013). In dieser Untersuchung konnte festgestellt werden, dass einige HSZT-Patienten nach einer Infektion sowohl milde-asymptomatische Verläufe mit langer Virusausscheidung aufwiesen, als auch schwere Verläufe mit teilweise tödlichen Ausgängen. Eine Korrelation von Immunstatus und Verlauf wurde aber bisher nicht durchgeführt. Einige Patienten litten zusätzlich unter verschiedenen Begleiterkrankungen wie schweren Leukämien, GvHD und anderen Infektionen, sodass die Sterblichkeit nicht allein auf die RSV-Infektion zurückgeführt werden kann (Geis et al., 2013; Lehnert et al., 2013). Der Mechanismus für die Entwicklung der sehr variablen RSV-Infektionsverläufe bei HSZT-Patienten ist nicht bekannt. Ein zytopathogener Effekt durch die Virusvermehrung kann zu diesem Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden. Auch im PVM-Mausmodell kann diese nicht ausgeschlossen werden, da man eine Korrelation zwischen Viruslast und Letalität sieht. Zusätzlich könnten in Mausmodellen

mit definierter Immunsuppression, auch andere Immunzellkompartimente einen Einfluss auf die Pathogenese haben wie NK-Zellen und neutrophile bzw. eosinophile Granulozyten. Letztere waren beispielsweise in B6.Rag1^{-/-}-Mäusen bereits vor dem Einsetzen der Symptome, also Tag 7 p.i. erhöht.

Lymphozytopenie, myoablative Konditionierung und Rauchen gelten als Risikofaktoren für schwer verlaufende RSV-Infektionen nach HSZT. Vor allem die Anzahl der Lymphozyten in immunsupprimierten Patienten ist entscheidend, wie sich der Krankheitsverlauf während einer RSV-Infektion entwickelt und ob es zu schweren Infektionen des unteren Respirationstraktes kommt (Kim et al., 2014). Der Faktor Lymphozytopenie kann jedoch auf eine T- und eine B-Zell-Lymphozytopenie spezifiziert werden, d.h., B- und T-Zellen sind im Blut reduziert. Bezogen auf die Ergebnisse aus dieser Promotion wird deutlich, dass eine T-Zell-Defizienz nicht alleinig für die Entwicklung schwerer Krankheitsverläufe nach einer PVM-Infektion in immunsupprimierten Mäusen verantwortlich ist, sondern auch das Fehlen von B-Lymphozyten. Diese These wurde dadurch gestützt, dass bei RSV-infizierten immunsupprimierten Patienten ein niedriger IgG-Antikörper-Titer signifikant assoziiert war mit fatalen Verläufen (Lehners et al., 2013). D.h., wenn ein niedriger Antikörper-Titer bei immunsupprimierten Patienten mit fatalen Verläufen in Verbindung gebracht werden kann, könnte es ein Hinweis darauf sein, dass auch hier B-Zellen und die Antikörper-Synthese für die Protektion wichtig sind, vergleichbar zu den Ergebnissen in den in dieser Arbeit verwendeten B6.TCRβδ^{-/-}-Mäusen.

Neben sekundären Immundefizienzen stellen auch primäre Immundefizienzen Risikofaktoren für schwere RSV-Infektionen dar. Als Beispiel gilt der Fallbericht eines SCID-Patienten, der eine T- und NK-Zell-Defizienz aufwies. Dieser Patient litt unter einer persistierenden RSV-Infektion, jedoch mit eher milden Krankheitssymptomen, vergleichbar mit der Symptomatik einer PVM-Infektion bei T-Zell-defizienten Mäusen. Der Patient wurde über mehrere Monate mit Palivizumab behandelt, was jedoch nicht zu einer Verringerung der Viruslast führte. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass Palivizumab die Viruslast konstant hielt, da es sich dabei um RSV-spezifische Antikörper gerichtet gegen das F-Protein handelt. Der Patient erhielt anschließend T-Zell-depletiertes Knochenmark, was zu einer Reduzierung der Viruslast führte. Nach der

Transplantation verstärkten sich jedoch die pulmonalen Symptome, was mit der Anzahl gebildeter CD8⁺ T-Zellen aus dem Knochenmark korrelierte. Um die jetzt entstandenen Krankheitssymptome zu verringern wurde der Patient mit immunsuppressiven Medikamenten behandelt. Durch diese Therapie begann die Viruslast wieder anzusteigen (El Saleeby et al., 2004). Der Phänotyp dieses Patienten entspricht, abgesehen von einer zusätzlichen Defizienz der NK-Zellen, am ehesten dem Phänotyp der PVM-infizierten B6.TCRβδ^{-/-}-Mäuse. Die vorhandenen B-Zellen könnten auch hier einen Schutz vor einer schweren Krankheit darzustellen, da der Patient vor der Knochenmarktransplantation nur milde Symptome wie Husten und leichtes Fieber aufwies und bereits über einen Zeitraum von vier Wochen RSV-nachweisbar war. Die RSV-spezifische Antikörperantwort bei diesem Patienten wurde allerdings nicht untersucht, sodass keine Aussagen über eine T-Zell-unabhängige B-Zellantwort getroffen werden können. Auch wurde der Patient mit RSV-spezifischen Antikörpern therapiert, die ebenfalls einen Einfluss auf die Symptomatik und die Viruslast haben können. Dieser Patienten scheint daher eher ein Beispiel für die Immunpathogenese durch T-Zellen zu sein, als für eine Protektion durch B-Zellen.

Auch eine Influenzavirus-Infektion bei immunsupprimierten Patienten resultiert, wie bei immunsupprimierten Patienten nach einer RSV-Infektion, in einer höheren Hospitalisierungsrate, längerer Virusausscheidung sowie Komplikationen, die eine Betreuung in einer Intensivstation und künstliche Beatmung notwendig machen können. Die Patienten zeigten nach einer Röntgenuntersuchung mehr Auffälligkeiten in der Lunge als in nicht immunsupprimierte Patienten (Memoli et al., 2014). Nicht nur immunsupprimierte Erwachsene sondern auch Kinder und junge Erwachsene, die an Leukämien oder an soliden Tumoren litten und gleichzeitig Chemotherapien erhielten, hatten länger unter Krankheitssymptomen und Virusproduktion zu leiden, wenn sie mit Influenzavirus A infiziert waren (Fishaut et al., 1980). Nach einer PVM-Infektion im Maus-Modell kommt es ebenfalls zu einer verlängerten Virusproduktion und schweren Krankheitssymptomen.

4.2.2. B-Lymphozyten vermitteln Schutz während einer akuten PVM-Infektion von T-Zell-defizienten Mäusen

Wie bereits zuvor erwähnt schienen B-Lymphozyten während einer PVM-Infektion bei B6.TCR $\beta\delta^{-/-}$ -Mäusen protektiv zu sein. Diese Annahme wurde weiter dadurch bestätigt, dass zum einen genauso viele B-Lymphozyten bei B6.TCR $\beta\delta^{-/-}$ -Mäusen in die Lunge rekrutiert wurden wie bei immunkompetenten Mäusen. Wie in C57BL/6-Mäusen war der Anstieg der Anzahl von B-Zellen von Tag 2 p.i. bis Tag 10 p.i. signifikant, was einen ersten Hinweis für eine aktive Rekrutierung dieses Zelltyps in das Lungengewebe darstellt. Zum anderen konnte im Serum dieser Tiere eine PVM-neutralisierende Aktivität sowie virusspezifische IgM-Antikörpersynthese nachgewiesen werden. Die an Tag 14 p.i. auftretende PVM-neutralisierende Aktivität in B6.TCR $\beta\delta^{-/-}$ -Mäusen korrelierte außerdem zeitlich mit der auftretenden PVM-spezifischer IgM-Antikörper-Antwort im Serum der infizierten T-Zell-defizienten Mäuse. Dies könnte für die gefundene Neutralisationsaktivität verantwortlich sein. Diese Antikörper könnten ausreichen die Virusvermehrung einzugrenzen, die Viruslast zu stabilisieren und dadurch die Entwicklung von pathologischen Symptomen zu verhindern.

Die Induktion PVM-spezifischer IgM-Antikörper geschieht T-Zell-unabhängig. T-Zell-defiziente Mäuse schienen außerdem keine Virus-spezifischen IgG-Antikörper in dem untersuchten Zeitraum von 14 Tagen zu bilden. Dies könnte auf einen unreifen Phänotyp der B-Zellen, eventuell bedingt durch eine verzögerte Reifung der B-Zellen, zurückzuführen sein. Erste Hinweise darauf lieferte die immunhistologische Untersuchung des Lungengewebes (Abb. 26 und Abb. 27). B-Zellen in Lungen T-Zell-defizienter Mäuse scheinen einen nicht vollständig differenzierten Status zu haben. Sie exprimierten neben IgM- zeitgleich auch IgG- und zu einem geringen Teil IgM- und IgA-Moleküle auf ihrer Zelloberfläche (Abb. 27). Bei C57BL/6-Mäusen dagegen wurden vor allem einzelpositive Zellen für IgG-, IgM- und zu einem kleinen Teil IgA-Moleküle identifiziert.

Im Unterschied zu B6.TCR $\beta\delta^{-/-}$ -Mäusen produzierten C57BL/6-Mäuse PVM-spezifische IgM- und IgG-Antikörper, die dann im Serum und in der Bronchoalveolären Lavage nachweisbar waren. IgA-Antikörper konnten während dieser Arbeit nicht bestimmt

werden. Wahrscheinlich wurde die Konzentration dieser Antikörper in der Lavageflüssigkeit so weit verdünnt, dass durch diese Methode keine Titerbestimmung mehr möglich war. Auch könnte der Zeitpunkt der Untersuchung, also Tag 14 p.i., zu früh gewählt worden sein um einen IgA-Anstieg im Lungenlumen bestimmen zu können. Vandersarren et al. beobachteten im PVM J3666-Infektionsmodell, dass der Titer PVM-spezifischer IgG-Antikörper im Serum immunkompetenter Mäuse nach Tag 8 bis Tag 14 p.i. deutlich ansteigt (Vandersarren et al., 2017). Auch PVM-spezifische IgA- und IgG-Antikörper konnten ab Tag 14 p.i. direkt in der Lunge nachgewiesen werden (Watkiss et al., 2013). Dieser zeitliche Anstieg von PVM-spezifischen IgG-Antikörpern im Serum und in der Lunge immunkompetenter Mäuse konnte während dieser Arbeit ebenfalls festgestellt werden. Um zu bestimmen, ob es sich während einer PVM-Infektion in B6.TCR $\beta\delta^{-/-}$ -Mäusen um einen T-Zell-abhängigen Defekt des Isotypenwechsels oder um eine Verzögerung der Reifung handelt, wären Untersuchungen über einen längeren Zeitraum notwendig.

Um die Bedeutung von B-Zellen bei B6.TCR $\beta\delta^{-/-}$ -Mäusen weiter zu unterstreichen, wurden B6.Rag1 $^{-/-}$ -Mäuse mit B-Zellen aus der Milz naiver C57BL/6-Mäuse transplantiert und einen Tag später mit einer subletalen Dosis PVM infiziert. Der adoptive B-Zell-Transfer in B6.Rag1 $^{-/-}$ -Mäuse konnte jedoch den Krankheitsverlauf nach einer PVM-Infektion nicht vollständig verhindern. So überlebten einige B-Zell-transplantierte Mäuse ohne klinische Symptome zu zeigen. Somit könnte eine Verhinderung der Symptomatik durch den Transfer von B-Zellen möglich sein. Die nicht überlebenden Tiere wiesen weniger stark streuende Gewichtsverläufe auf, was auf eine Reduktion der Heterogenität der Krankheitsverläufe wie in Kap. 3.2.1 beschrieben, schließen lässt. Auch die pulmonale Viruslast nach B-Zelltransplantation unterschied sich nicht von der PBS-transplantierten Kontrolltiere. CD19 $^{+}$ B220 $^{+}$ IgM $^{+}$ transplantierte B-Lymphozyten wurden jedoch in verschiedenen Organen, wie dem Knochenmark, der Milz und der Lunge nachgewiesen. Bei überlebenden Mäusen konnte außerdem eine signifikant höhere Anzahl transplantiertiger IgM $^{+}$ B-Lymphozyten in der Milz im Vergleich zu den Zellzahlen nicht überlebender Mäuse nachgewiesen werden. In der Milz überlebender Mäuse konnte ebenfalls ein Anstieg IgM $^{+}$ CD138 $^{+}$ Plasmazellen festgestellt werden, der jedoch statistisch nicht signifikant war. Die transplantierten B-Zellen sind

also in der Lage, in lymphatische Organe sowie in den Infektionsort zu migrieren und zu Plasmazellen zu reifen. Dies könnten erste Hinweise darstellen, dass die Transplantation von reifen B-Zellen in T- und B-Zell-defiziente Mäuse zu einem Schutz vor schweren RSV-Infektionen beitragen.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Transplantationsversuche waren so aufgestellt, dass die B-Zell-Transplantation einen Tag vor der eigentlichen Infektion stattfand. Dies führte zu der Möglichkeit, dass die Zellen in dieser kurzen Zeitspanne nicht ihre optimale Nische erreichen konnten. In diesen Nischen können B-Zellen, unter anderem durch verschiedene Zytokine wie BAFF, überleben und zu Plasmazellen differenzieren (Pieper et al., 2013). Allerdings war das Protokoll an anderen Studien zu T-Zell-unabhängigen B-Zellantworten gegen Virusinfektionen ausgerichtet (z.B. PyV (Szomolanyi-Tsuda and Welsh, 1996)). In diesen Studien konnten B-Zell-transplantierte SCID-Mäuse vor einer schweren Polyomavirus-induzierten akuten myeloproliferativen Krankheit bewahrt werden (Szomolanyi-Tsuda and Welsh, 1996). Es gibt jedoch auch Studien, in welchen die Infektion erst ein bis zwei Wochen nach dem B-Zelltransfer durchgeführt wurde (Klenovsek et al., 2007). Eventuell haben sich die B-Zellen in diesen Experimenten in ihrer spezifischen Nische, also in B-Zell-Follikeln in lymphoiden Organen organisiert und können somit auf eine Infektion reagieren. Auch in der Milz T-Zell-defizienter Tiere finden sich B-Zell-Follikel (Nolte et al., 2004; Szomolanyi-Tsuda et al., 1998) jedoch können sich in diese Tiere z.B. nach einer PyV-Infektion keine germinalen Zentren ausbilden (Szomolanyi-Tsuda et al., 1998). Die in der vorliegenden Promotionsarbeit transferierten B-Zellen konnten mittels quantitativer Analyse in verschiedenen Organen, also in der Milz, im Knochenmark und in der Lunge, zwei Wochen nach der Transplantation nachgewiesen werden, sodass die Möglichkeit besteht, die Mäuse auch zu einem späteren Zeitpunkt nach der Transplantation zu infizieren und neben der quantitativen Analyse noch mikroskopische Untersuchungen der betreffenden Gewebe durchgeführt werden können.

Neben PVM gibt es weitere Virus-Infektionen, bei denen eine schützende Antikörperantwort T-Zell-unabhängig gebildet wird. Dazu zählen wie bereits erwähnt Polyomaviren (PyV). Wurden SCID-Mäuse, defizient für T- und B-Zellen, mit PyV infiziert, entwickelten sie tödliche Krankheitsverläufe (Szomolanyi-Tsuda et al., 1994). Im

Unterschied dazu entwickelten T-Zell-defiziente Mäuse keine Krankheitssymptome nach einer solchen Infektion. Zugleich konnten bei T-Zell-defizienten Mäusen virusspezifische Antikörper nachgewiesen werden, die somit von B-Zellen T-Zell-unabhängig sezerniert wurden, Viren eliminierten und die Entwicklung der typischen Krankheitssymptome verhindern konnten. Die Seren von B6.TCR $\beta\delta^{-/-}$ -Mäusen enthielten außerdem nicht nur PyV-spezifische IgM-Antikörper, sondern auch PyV-spezifische IgG2a-Antikörper (Szomolanyi-Tsuda and Welsh, 1996). T-Zell-unabhängige Antigene haben eine sich wiederholende organisierte Struktur, die wahrscheinlich für die Induktion von spezifischen Antikörpern durch B-Zellrezeptor-Quervernetzung notwendig ist. Am Beispiel einer PyV-Infektion konnte so durch Virus-ähnliche Partikel oder lebendes PyV, die eine sich wiederholende Struktur aufweisen, virusspezifische IgM-Antikörper generiert werden. Für die T-Zell-unabhängige Bildung von antigenspezifischem IgG waren allerdings weitere Signale notwendig, die hier durch unverändertes Virus generiert wurden. Weitere Faktoren könnten eine hohe Antigendichte während der Infektion sowie Signale der angeborenen Immunantwort sein (Szomolanyi-Tsuda et al., 1998). Am Beispiel einer PVM-Infektion in T-Zell-defizienten Mäusen könnten PVM-Partikel mit ihren Oberflächenproteinen als repetitive Struktur B-Zellrezeptoren kreuzvernetzen und zur Bildung virusspezifischer IgM-Antikörper führen. In dieser Arbeit waren keine PVM-spezifischen IgG-Antikörper nachweisbar, was eventuell auf eine zu geringe Antikörperkonzentration oder das Fehlen bestimmter Signale der angeborenen Immunantwort zurückzuführen ist. Dies kann jedoch nur durch weiterführende Experimente untermauert werden. T-Zell-defiziente Mäuse entwickelten außerdem nach einer PyV-Infektion langanhaltende antivirale Serum-IgG-Anworten, jedoch war eine hohe Viruslast über einen langen Zeitraum sowie Signale der angeborenen Immunität, z.B. durch die Aktivierung von Toll-like-Rezeptoren für die Aufrechterhaltung der IgG-Antikörpertiter notwendig (Raval et al., 2013). PVM könnte ein T-Zell-unabhängiges Antigen vom Typ II darstellen, da es eine hoch repetitive Oberflächenstruktur besitzt und durch virale Komponenten Toll-like-Rezeptoren aktiviert werden könnten. Welcher Antigen-Typ PVM darstellt, müsste durch die Analyse späterer Zeitpunkte hinsichtlich der Antikörperproduktion näher untersucht werden. Auch müsste die Bedeutung der möglichen Aktivierung der TLR genauer analysiert werden. Bisher ist bekannt, dass TLR4 keinen Einfluss auf eine PVM-Infektion hat (Faisca et al., 2006). Der Verlust von

TLR7 hingegen führt zu einer Verzögerung der Viruseliminierung und zu späteren Auftreten der Symptome nach einer PVM-Infektion (Davidson et al., 2011). Da B-Zellen zusätzlich zum B-Zell-Rezeptor ebenfalls TLR7 in Endosomen exprimieren (Hornung et al., 2002) und phagozytische Eigenschaften besitzen (Gao et al., 2012), wäre die T-Zell-unabhängige Produktion anderer Antikörperklassen wie IgA- und IgG-Antikörper in T-Zell-defizienten Mäusen nach einer PVM-Infektion möglich.

Rotaviren, Vesikular-Somatitis-Viren (VSV), Enteroviren und Influenzaviren sind ebenfalls in der Lage T-Zell-unabhängig virusspezifische Antikörper zu induzieren (Charan and Zinkernagel, 1986; Franco and Greenberg, 1997; Lee et al., 2005; Wang et al., 2012). Damit ist dies kein einmaliges Merkmal einer PVM-Infektion. B6.TCR $\beta\delta^{-/-}$ -Mäusen wiesen nach einer Rotavirus-Infektion eine verzögerte Viruselimination auf. Sie produzierten Rotavirus-spezifische IgA-Antikörper im Dünndarm, hatten jedoch einen niedrigeren Spiegel dieser Antikörper als C57BL/6-Kontrollmäuse. Dies schützte sie trotzdem vor einer Reinfektion (Franco and Greenberg, 1997). Damit ist es also möglich, auch bei einer lokalen Infektion IgA-Antikörper T-Zell-unabhängig zu induzieren. Im hier untersuchten PVM-Modell konnten keine IgA-Antikörper, weder in den Kontrolltieren noch in den T-Zell-defizienten Mäusen nachgewiesen werden, was wahrscheinlich auf die hohe Verdünnung der BAL-Flüssigkeit oder auf eine erst beginnende IgA-Reaktion zurückzuführen ist. Für letzteres lieferten die vereinzelt auftretenden IgA⁺ Zellen in Lungengewebeschnitten immunkompetenter Mäuse an Tag 14 nach einer PVM-Infektion erste Hinweise (Abb. 26). In einer weiteren Studie unter Verwendung von CD4-T-Zell-defizienten Mäusen konnte nachgewiesen werden, dass diese ähnlich anfällig für eine Infektion mit Enteroviren waren wie C57BL/6-Kontrollmäuse. Dabei waren CD4-T-Zell-defiziente Mäuse in der Lage, neutralisierende Antikörper des IgM- und IgG-Isotyps zu bilden. B-Zell-defiziente Mäuse hingegen waren sehr suszeptibel für diese Infektion. B-Zellen scheinen somit während einer Enterovirus-Infektion schützende Eigenschaften zu haben (Wang et al., 2012).

Auch eine Influenzavirus-Infektion führt zu einer schützenden T-Zell-unabhängigen Antikörperantwort. Werden CD4-T-Zell- und B-Zell-defiziente Mäuse mit Influenzavirus A infiziert erhöht sich die Mortalitätsrate auf 80% im Vergleich zu wildtypischen BALB/c-Mäusen und CD4-T-Zell-depletierten BALB/c-Mäusen. Die geringe Mortalitätsrate der

CD4-T-Zell-depletierten Mäuse lässt auf einen schützenden Effekt der B-Zellen bei diesen Tieren schließen, was durch eine Rekonstitution der B-Zellen in CD4-T-Zell- und B-Zell-defiziente Mäusen bestätigt werden konnte (Mozdzanowska et al., 2000). Weiter trugen B-Zellen zur Viruskontrolle durch die Bildung Influenzavirus-spezifischer Antikörper bei. Die T-Zell-abhängige Antwort war dabei therapeutisch effektiver als die T-Zell-unabhängige Antwort (Mozdzanowska et al., 2005). B-Zellen waren dabei sogar notwendig für die Viruseliminierung und die Genesung der Mäuse nach einer Infektion durch die Bildung virusspezifischer Antikörper aller Antikörperklassen. CD40^{-/-}, CD4-T-Zell-defiziente und TCRβδ^{-/-}-Mäuse produzieren Influenzavirus-spezifische IgM-, IgG- und IgA-Antikörper, allerdings mit reduzierten Titern im Vergleich zu C57BL/6-Mäusen (Lee et al., 2005). Da Influenzaviren einen vergleichbaren Organtropismus haben, könnte somit auch während einer PVM-Infektion T-Zell-unabhängig IgG- und IgA-Antikörper gebildet werden.

Nach einer VSV-Infektion bei Mäusen wurden IgM-Antikörper sezerniert, die aber nicht über einen längeren Zeitraum nachgewiesen werden konnten (Charan and Zinkernagel, 1986). Bei T-Zell-defizienten Mäusen konnte nach einer VSV-Infektion ebenfalls IgM- und mit einem geringeren Titer auch IgG-Antikörper nachgewiesen werden. Diese IgG-Produktion geschieht dabei IFNγ-abhängig (Maloy et al., 1998).

Während all dieser Infektionen waren B-Zellen in der Lage, virusspezifische Antikörper T-Zell-unabhängig zu produzieren und häufig sogar einen Ig-Klassenwechsel zu vollziehen. Bei PVM-Infektionen von T-Zell-defizienten Tieren wurde jedoch kein signifikanter Anstieg an IgG-Antikörpern in Serum oder BAL-Flüssigkeit nachgewiesen. Da die B-Zellen der T-Zell-defizienten Mäuse jedoch in der Immunfluoreszenz-Mikroskopie membrangebundene IgG-Antikörper aufwiesen, ist es möglich, dass hier eine verzögerte Reifung der B-Zellen vorlag und die IgG-Antikörper erst an späteren Zeitpunkten nachweisbar werden.

Während der gesamten Lebenszeit werden Menschen wiederholt mit RSV infiziert. Für eine Untersuchung zur Antikörperantwort während einer RSV-Infektion wurden freiwillige Erwachsene mit RSV infiziert und der Anstieg der Antikörperkonzentrationen nach der Infektion im Serum und in Nasopharyngeal-aspiraten bestimmt. Dabei trat eine defekte IgA-Gedächtnisbildung auf, die mit wiederholten RSV-Infektionen korreliert. Mukosale

IgA-Antikörper scheinen im Menschen eine schützende Funktion gegen wiederkehrende RSV-Infektionen zu haben (Habibi et al., 2015). Bei Erwachsenen korrelierte außerdem die Dauer der Virusausscheidung mit dem Vorhandensein von RSV-spezifischen Plasmazellen. Die kontinuierliche Stimulation mit viralem Antigen schien für die B-Zell-Stimulation verantwortlich zu sein (Lee et al., 2010b). Ähnliches könnte für die T-Zell-defizienten Mäuse aus dieser Dissertation zutreffen, da diese ebenfalls lange Virus sezernieren. Dazu müssten allerdings die Antikörperkonzentrationen zu späteren Zeitpunkten als Tag 14 p.i. untersucht werden.

Auch im Blut von RSV-infizierten Säuglingen findet man verschiedene Populationen von B-Lymphozyten, dazu zählen reife B-Zellen sowie deren Vorstufen. Direkt im Lungengewebe finden sich CD20⁺ B-Zellen sowie IgM⁺, IgG⁺, und IgA⁺ Plasmazellen (Raes et al., 1997; Reed et al., 2009; Roman et al., 1997). In Lungen von Säuglingen mit einer RSV-Infektion der unteren Atemwege wurden neben IgA-, IgG- und IgM-Antikörpern auch hohe Konzentrationen von BAFF und APRIL, produziert vom Epithelgewebe der infizierten Lunge, nachgewiesen, jedoch weniger T-Zell-abhängige Zytokine (Jensen et al., 1997; Reed et al., 2009). BAFF und APRIL sind Überlebensfaktoren für B-Zellen, die außerdem den T-Zell-unabhängigen Isotypenwechsel von IgM- zu IgG- und IgA-Antikörpern unterstützen (Mackay et al., 2007). Die Antikörperantwort bei Neugeborenen könnte somit ebenfalls T-Zell-unabhängig erfolgen.

Die Mehrfachexpression von Molekülen verschiedener Ig-Isotypen auf B-Zellen T-Zell-defizienter Mäuse erscheint ähnlich zu Beobachtungen bei Patienten mit Hypogammaglobulinämie. Die B-Lymphozyten der untersuchten Patienten hatten einen unreifen Phänotyp, da sie mehrere Ig-Isotypen gleichzeitig auf ihrer Oberfläche exprimierten (Fiorilli et al., 1986). B-Zellen von gesunden Erwachsenen hingegen exprimierten nur zu einem geringen Teil zwei Ig-Isotypen auf ihrer Oberfläche. Allerdings kann auch bei Neugeborenen ein höherer Anteil an Doppel-Ig-Isotypen exprimierenden B-Zellen als bei Erwachsenen vorkommen (Gathings et al., 1977). Auch B-Zellen immunkompetenter Mäuse zeigen während ihrer Differenzierung mehrere Ig-Isotypen auf ihrer Zelloberfläche (eigene Beobachtung, (Abney et al., 1978; Greaves, 1971)). Plasmazellen hingegen exprimieren keine membrangebundenen IgA- und IgG-Moleküle

(Oracki et al., 2010). Im Unterschied dazu konnte nachgewiesen werden, dass IgM-sezernierende Plasmazellen auch IgM-Moleküle auf Oberfläche exprimieren können (z.B. (Racine et al., 2011)). In den Hypogammaglobulinämie-Patienten kam es zu einer Arretierung der Reifung der B-Zellen, da keine IgA- und IgG-Antikörper nachzuweisen waren, jedoch B-Zellen IgG-Moleküle auf ihrer Oberfläche exprimierten. Im Unterschied dazu konnte für verschiedene Virusinfektionen gezeigt werden, dass T-Zell-defizienten Mäuse T-Zell-unabhängig verschiedene Antikörperklassen bilden können. Somit kann gemutmaßt werden, dass es nach einer PVM-Infektion zu einer Verzögerung der Reifung der B-Zellen kommt und dadurch bis Tag 14 p.i. noch keine weiteren Antikörperklassen nachgewiesen werden können. Dafür spricht auch die Tatsache, dass es in diesen Mäusen zu einer gleichzeitigen Expression verschiedener Ig-Isotypen auf B-Lymphozyten kommt. Da jedoch ein eventuell auftretender Ausdifferenzierungsstopp nicht ausgeschlossen werden kann, wären Untersuchungen zur Oberflächenexpression verschiedener Ig-Moleküle und zur Antikörperproduktion zu späteren Zeitpunkten notwendig.

4.2.3 Rekrutierung von Zellen des angeborenen Immunsystems in immundefizienten Mäusen nach einer subletalen PVM-Infektion

Neben den Zellen der adaptiven Immunantwort, wie T- und B-Zellen, wurde auch die Rekrutierung von Granulozyten und NK-Zellen in die Lunge von Mäusen mit definierten Immundefizienzen nach einer PVM-Infektion untersucht.

NK-Zellen wurden verstärkt in das Lungengewebe immunsupprimierter Mäuse rekrutiert. In dieser Arbeit wurde ermittelt, dass T-Zell-defiziente und T- und B-Zell-defiziente Mäuse eine erhöhte Rekrutierung dieses Zelltyps in das Lungenparenchym und das Bronchoalveolarlumen bis Tag 10 p.i. im Vergleich zu C57BL/6-Mäusen aufwiesen. Aufgrund ihrer vielfältigen Funktionen, wie der Sezernierung von IFN γ oder der zytotoxischen Eliminierung infizierter Zellen (Vivier et al., 2008) weisen NK-Zellen grundsätzlich die Befähigung auf, das Fehlen von T-Zellen während viraler Infektionen auszugleichen (z.B. (Nandakumar et al., 2008)). Deswegen kann gemutmaßt werden, dass bei B6.Rag1^{-/-}-Mäusen NK-Zellen das Fehlen der T-Zellen kompensieren könnten.

ob sie allerdings zur Immunpathogenese beitragen oder warum die Tiere so variable Krankheitsverläufe aufweisen kann nur mit weiteren Untersuchungen analysiert werden.

Die Rekrutierung von Granulozyten variierte bei Mauslinien mit verschiedenen spezifischen Immundefizienzen. Im Vergleich zur Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in C57BL/6- und B6.TCR $\beta\delta^{-/-}$ -Mäusen zeigten B6.Rag1 $^{-/-}$ -Mäuse und B6.Rag1.C $\gamma^{-/-}$ -Mäusen bereits eine starke Infiltration dieses Zelltyps in das Lungenparenchym an Tag 2 p.i. und im Verlauf der Infektion auch in das Bronchoalveolarlumen, die nicht transient verlief und bis Tag 10 p.i. deutlich über der der Kontrolltiere lag. Im Lungengewebe von C57BL/6- und B6.TCR $\beta\delta^{-/-}$ -Mäuse hingegen stieg die absolute Zahl neutrophiler Granulozyten bis Tag 7 p.i. an um anschließend annähernd auf das Ausgangsniveau zu sinken.

Die Anzahl der eosinophilen Granulozyten im Lungenparenchym und auch im Bronchoalveolarlumen von Kontrollmäusen, wie bereits Kap. 3.1.3 beschrieben, stieg ab Tag 10 p.i. signifikant an. In der Lunge von B6.Rag1 $^{-/-}$ -Mäusen konnte eine signifikante Infiltration von eosinophilen Granulozyten bereits Tag 7 p.i. beobachtet werden. Diese ist sogar stärker als bei den Kontrollmäusen, den B6.TCR $\beta\delta^{-/-}$ - und bei den B6.Rag1.C $\gamma^{-/-}$ -Mäusen. Welche Funktion die rekrutierten Zellen ausüben, kann durch diese Versuche jedoch nicht geklärt werden. Es wäre möglich, dass diese Immunzellpopulation unter diesen Bedingungen zur Immunpathogenese beiträgt.

Immunologisch ist jedoch bekannt, dass IL-5, produziert von NK-Zellen, zur Rekrutierung von eosinophilen Granulozyten während einer allergischen Entzündung führt (Walker et al., 1998). Dieser Sachverhalt könnte die gesteigerte Rekrutierung von eosinophilen Granulozyten in die Lunge von B6.Rag1 $^{-/-}$ -Mäusen während einer subletalen Infektion mit PVM erklären. Hier kommt es im Lungenparenchym und dem Bronchoalveolarlumen zu einer gesteigerten Infiltration von NK-Zellen, die eventuell zu einer gesteigerten Rekrutierung von eosinophilen Granulozyten führt. Mäuse mit einer zusätzlichen Defizienz der NK-Zellen zeigen indes keine, sondern sogar eine verringerte Rekrutierung an eosinophilen Granulozyten.

Über das Rekrutierungsmuster von NK-Zellen, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten während einer PVM-Infektion unter Immunsuppression liegen nach meinen Erkenntnissen noch keine Informationen vor.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzung	Bedeutung
AMΦ	Alveolarmakrophage
APRIL	<i>A proliferation-inducing ligand</i>
ATCC	American Type Culture Collection
ATV	<i>Adjusted Trypsin Versene</i>
AMPV	Aviäres Metapneumovirus
BAFF	<i>B-cell activating factor</i>
BALF	Bronchoalveoläre Lavage-Flüssigkeit
BALT	<i>bronchus associated lymphoid tissue</i>
bp	Basenpaar
BRSV	Bovines Respiratorisches Synzytial-Virus
BSA	Bovines Serumalbumin
BSS	<i>Balanced Salt Solution</i>
bzw.	beziehungsweise
CTL	Zytotoxische T-Lymphozyten
DABT	3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid-Triphosphat
DZ	Dendritische Zelle
ECP	Eosinophile kationische Protein
EDTA	Ethylendiamintetraessidsäure
EDN	<i>Eosinophil-derived neurotoxin</i>
EMEM	<i>Eagle's Minimal Essential Medium</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
EPO	<i>Eosinophil peroxidase</i>

FI-RSV	Formalin-inaktiviertes Respiratorisches Synzytial-Virus
FKS	Fetales Kälberserum
FOB	Follikuläre B-Zelle
GE	Genende
GFP/EGFP	Grün fluoreszierendes Protein
GS	Genstart
GvHD	<i>Graft-versus-Host-Disease</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HMPV	Humanes Metapneumovirus
HRSV	Humanes Respiratorisches Synzytial-Virus
IFN	Interferon
kb	Kilobasen
MEM	<i>Minimum Essential Media</i>
MMP	Matrix-Metalloprotease
MOI	<i>Multiplicity of Infection</i>
MPO	Myeloperoxidase
MZB	Marginalzonen-B-Zelle
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NO	Stickstoffmonoxid
NS1	Nichtstrukturprotein 1
NS2	Nichtstrukturprotein 2
ORF	Offener Leserahmen
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PBS	Phosphate gepufferte Saline
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PFA	Paraformaldehyd
p.i.	<i>post infection</i>
PRNT ⁵⁰	<i>50% Plaque Reduktion Neutralization Test</i>
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i>
PR3	Proteinase 3

PVM	Pneumonievirus der Maus
Rig-I	<i>retinoic acid inducible gene I</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
RSV	Respiratorisches Synzytial-Virus
SCID	<i>Severe combined immunodeficiencies</i>
SHM	Somatische Hypermutation
Standardabw.	Standardabweichung
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TGF- β	<i>Transforming growth factor β</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor α
T _{reg}	Regulatorische T-Zelle
Tris	Tris-Hydroxymethylaminomethan
VA	Versuchsabbruch
wt	Wildtyp

LITERATURVERZEICHNIS

- Abbas, A.K., A.H. Lichtman, and S. Pillai. 2015. Cellular and molecular immunology. Elsevier Saunders, Philadelphia, PA. VIII, 535 S. pp.
- Abney, E.R., M.D. Cooper, J.F. Kearney, A.R. Lawton, and R.M. Parkhouse. 1978. Sequential expression of immunoglobulin on developing mouse B lymphocytes: a systematic survey that suggests a model for the generation of immunoglobulin isotype diversity. *Journal of immunology* 120:2041-2049.
- Aceves, S.S., and D.H. Broide. 2008. Airway fibrosis and angiogenesis due to eosinophil trafficking in chronic asthma. *Curr Mol Med* 8:350-358.
- Adamko, D.J., B.L. Yost, G.J. Gleich, A.D. Fryer, and D.B. Jacoby. 1999. Ovalbumin sensitization changes the inflammatory response to subsequent parainfluenza infection. Eosinophils mediate airway hyperresponsiveness, m(2) muscarinic receptor dysfunction, and antiviral effects. *The Journal of experimental medicine* 190:1465-1478.
- Afonso, C.L., G.K. Amarasinghe, K. Banyai, Y. Bao, C.F. Basler, S. Bavari, N. Bejerman, K.R. Blasdell, F.X. Briand, T. Briese, A. Bukreyev, C.H. Calisher, K. Chandran, J. Cheng, A.N. Clawson, P.L. Collins, R.G. Dietzgen, O. Dolnik, L.L. Domier, R. Durrwald, J.M. Dye, A.J. Easton, H. Ebihara, S.L. Farkas, J. Freitas-Astua, P. Formenty, R.A. Fouchier, Y. Fu, E. Ghedin, M.M. Goodin, R. Hewson, M. Horie, T.H. Hyndman, D. Jiang, E.W. Kitajima, G.P. Kobinger, H. Kondo, G. Kurath, R.A. Lamb, S. Lenardon, E.M. Leroy, C.X. Li, X.D. Lin, L. Liu, B. Longdon, S. Marton, A. Maisner, E. Muhlberger, S.V. Netesov, N. Nowotny, J.L. Patterson, S.L. Payne, J.T. Paweska, R.E. Randall, B.K. Rima, P. Rota, D. Rubbenstroth, M. Schwemmle, M. Shi, S.J. Smither, M.D. Stenglein, D.M. Stone, A. Takada, C. Terregino, R.B. Tesh, J.H. Tian, K. Tomonaga, N. Tordo, J.S. Towner, N. Vasilakis, M. Verbeek, V.E. Volchkov, V. Wahl-Jensen, J.A. Walsh, P.J. Walker, D. Wang, L.F. Wang, T. Wetzell, A.E. Whitfield, J.T. Xie, K.Y. Yuen, Y.Z. Zhang, and J.H. Kuhn. 2016. Taxonomy of the order Mononegavirales: update 2016. *Arch Virol* 161:2351-2360.
- Amarasinghe, G.K., Y. Bao, C.F. Basler, S. Bavari, M. Beer, N. Bejerman, K.R. Blasdell, A. Bochnowski, T. Briese, A. Bukreyev, C.H. Calisher, K. Chandran, P.L. Collins, R.G. Dietzgen, O. Dolnik, R. Durrwald, J.M. Dye, A.J. Easton, H. Ebihara, Q. Fang, P. Formenty, R.A.M. Fouchier, E. Ghedin, R.M. Harding, R. Hewson, C.M. Higgins, J. Hong, M. Horie, A.P. James, D. Jiang, G.P. Kobinger, H. Kondo, G. Kurath, R.A. Lamb, B. Lee, E.M. Leroy, M. Li, A. Maisner, E. Muhlberger, S.V. Netesov, N. Nowotny, J.L. Patterson, S.L. Payne, J.T. Paweska, M.N. Pearson, R.E. Randall, P.A. Revill, B.K. Rima, P. Rota, D. Rubbenstroth, M. Schwemmle, S.J. Smither, Q. Song, D.M. Stone, A. Takada, C. Terregino, R.B. Tesh, K. Tomonaga, N. Tordo, J.S. Towner, N. Vasilakis, V.E. Volchkov, V. Wahl-Jensen, P.J. Walker, B. Wang, D. Wang, F. Wang, L.F. Wang, J.H. Werren, A.E. Whitfield, Z. Yan, G. Ye, and J.H. Kuhn. 2017. Taxonomy of the order Mononegavirales: update 2017. *Arch Virol* 162:2493-2504.

- Barr, J., P. Chambers, P. Harriott, C.R. Pringle, and A.J. Easton. 1994. Sequence of the phosphoprotein gene of pneumonia virus of mice: expression of multiple proteins from two overlapping reading frames. *Journal of virology* 68:5330-5334.
- Bass, D.A. 1975. Behavior of eosinophil leukocytes in acute inflammation. II. Eosinophil dynamics during acute inflammation. *The Journal of clinical investigation* 56:870-879.
- Batista, F.D., and N.E. Harwood. 2009. The who, how and where of antigen presentation to B cells. *Nat Rev Immunol* 9:15-27.
- Baumgarth, N., O.C. Herman, G.C. Jager, L.E. Brown, L.A. Herzenberg, and J. Chen. 2000. B-1 and B-2 cell-derived immunoglobulin M antibodies are nonredundant components of the protective response to influenza virus infection. *The Journal of experimental medicine* 192:271-280.
- Bem, R.A., A.P. Bos, M. Bots, A.M. Wolbink, S.M. van Ham, J.P. Medema, R. Lutter, and J.B. van Woensel. 2008. Activation of the granzyme pathway in children with severe respiratory syncytial virus infection. *Pediatric research* 63:650-655.
- Bem, R.A., J.B. van Woensel, R. Lutter, J.B. Domachowske, J.P. Medema, H.F. Rosenberg, and A.P. Bos. 2010. Granzyme A- and B-cluster deficiency delays acute lung injury in pneumovirus-infected mice. *Journal of immunology* 184:931-938.
- Bera, M.M., B. Lu, T.R. Martin, S. Cui, L.M. Rhein, C. Gerard, and N.P. Gerard. 2011. Th17 cytokines are critical for respiratory syncytial virus-associated airway hyperresponsiveness through regulation by complement C3a and tachykinins. *Journal of immunology* 187:4245-4255.
- Bermejo-Martin, J.F., M.C. Garcia-Arevalo, R.O. De Lejarazu, J. Ardura, J.M. Eiros, A. Alonso, V. Matias, M. Pino, D. Bernardo, E. Arranz, and A. Blanco-Quiros. 2007. Predominance of Th2 cytokines, CXC chemokines and innate immunity mediators at the mucosal level during severe respiratory syncytial virus infection in children. *European cytokine network* 18:162-167.
- Blount, R.E., Jr., J.A. Morris, and R.E. Savage. 1956. Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza. *Proc Soc Exp Biol Med* 92:544-549.
- Boeckh, M. 2008. The challenge of respiratory virus infections in hematopoietic cell transplant recipients. *British journal of haematology* 143:455-467.
- Brandes, M., F. Klauschen, S. Kuchen, and R.N. Germain. 2013. A systems analysis identifies a feedforward inflammatory circuit leading to lethal influenza infection. *Cell* 154:197-212.
- Brint, M.E., J.M. Hughes, A. Shah, C.R. Miller, L.G. Harrison, E.A. Meals, J. Blanch, C.R. Thompson, S.A. Cormier, and J.P. DeVincenzo. 2017. Prolonged viral replication and longitudinal viral dynamic differences among respiratory syncytial virus infected infants. *Pediatric research* 82:872-880.
- Buchholz, U.J., S. Finke, and K.K. Conzelmann. 1999. Generation of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) from cDNA: BRSV NS2 is not essential for virus replication in tissue culture, and the human RSV leader region acts as a functional BRSV genome promoter. *Journal of virology* 73:251-259.
- Buchholz, U.J., J.M. Ward, E.W. Lamirande, B. Heinze, C.D. Kreml, and P.L. Collins. 2009. Deletion of nonstructural proteins NS1 and NS2 from pneumonia virus of mice attenuates viral replication and reduces pulmonary cytokine expression and disease. *Journal of virology* 83:1969-1980.

- Cannon, M.J., P.J. Openshaw, and B.A. Askonas. 1988. Cytotoxic T cells clear virus but augment lung pathology in mice infected with respiratory syncytial virus. *The Journal of experimental medicine* 168:1163-1168.
- Castilow, E.M., K.L. Legge, and S.M. Varga. 2008. Cutting edge: Eosinophils do not contribute to respiratory syncytial virus vaccine-enhanced disease. *Journal of immunology* 181:6692-6696.
- Chang, J., and T.J. Braciale. 2002. Respiratory syncytial virus infection suppresses lung CD8+ T-cell effector activity and peripheral CD8+ T-cell memory in the respiratory tract. *Nat Med* 8:54-60.
- Chanock, R., B. Roizman, and R. Myers. 1957. Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). I. Isolation, properties and characterization. *Am J Hyg* 66:281-290.
- Charan, S., and R.M. Zinkernagel. 1986. Antibody mediated suppression of secondary IgM response in nude mice against vesicular stomatitis virus. *Journal of immunology* 136:3057-3061.
- Chemaly, R.F., D.P. Shah, and M.J. Boeckh. 2014. Management of respiratory viral infections in hematopoietic cell transplant recipients and patients with hematologic malignancies. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 59 Suppl 5:S344-351.
- Cherukuri, A., K. Patton, R.A. Gasser, Jr., F. Zuo, J. Woo, M.T. Esser, and R.S. Tang. 2013. Adults 65 years old and older have reduced numbers of functional memory T cells to respiratory syncytial virus fusion protein. *Clinical and vaccine immunology : CVI* 20:239-247.
- Chiu, C., and P.J. Openshaw. 2015. Antiviral B cell and T cell immunity in the lungs. *Nat Immunol* 16:18-26.
- Christiaansen, A.F., C.J. Knudson, K.A. Weiss, and S.M. Varga. 2014. The CD4 T cell response to respiratory syncytial virus infection. *Immunol Res* 59:109-117.
- Claassen, E.A., P.A. van der Kant, Z.S. Rychnavska, G.M. van Bleek, A.J. Easton, and R.G. van der Most. 2005. Activation and inactivation of antiviral CD8 T cell responses during murine pneumovirus infection. *Journal of immunology* 175:6597-6604.
- Collins, P.L., and J.E. Crowe. 2007. Respiratory Syncytial Virus and Metapneumovirus. In *Fields Virology*. P.M. Knipe, P.M. Howly, D.E. Griffin, R.A. Lamb, M.A. Martin, B. Roizman, and S.E. Straus, editors. Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer Business, Philadelphia, PA. 1601-1646.
- Collins, P.L., and B.S. Graham. 2008. Viral and host factors in human respiratory syncytial virus pathogenesis. *Journal of virology* 82:2040-2055.
- Collins, P.L., and J.A. Melero. 2011. Progress in understanding and controlling respiratory syncytial virus: still crazy after all these years. *Virus Res* 162:80-99.
- Cook, M.J. 1965. *The Anatomy of the Laboratory Mouse*. Academic Press, M.R.C. Laboratory Animals Centre Carshalton, Surrey, England.
- Cortjens, B., O.J. de Boer, R. de Jong, A.F. Antonis, Y.S. Sabogal Pineros, R. Lutter, J.B. van Woensel, and R.A. Bem. 2016a. Neutrophil extracellular traps cause airway obstruction during respiratory syncytial virus disease. *J Pathol* 238:401-411.

- Cortjens, B., R. Lutter, L. Boon, R.A. Bem, and J.B. van Woensel. 2016b. Pneumovirus-Induced Lung Disease in Mice Is Independent of Neutrophil-Driven Inflammation. *PLoS one* 11:e0168779.
- Culley, F.J. 2009. Natural killer cells in infection and inflammation of the lung. *Immunology* 128:151-163.
- Davidson, S., G. Kaiko, Z. Loh, A. Lalwani, V. Zhang, K. Spann, S.Y. Foo, N. Hansbro, S. Uematsu, S. Akira, K.I. Matthaei, H.F. Rosenberg, P.S. Foster, and S. Phipps. 2011. Plasmacytoid dendritic cells promote host defense against acute pneumovirus infection via the TLR7-MyD88-dependent signaling pathway. *Journal of immunology* 186:5938-5948.
- Davoine, F., M. Cao, Y. Wu, F. Ajamian, R. Ilarraza, A.I. Kokaji, R. Moqbel, and D.J. Adamko. 2008. Virus-induced eosinophil mediator release requires antigen-presenting and CD4+ T cells. *The Journal of allergy and clinical immunology* 122:69-77, 77.e61-62.
- de Bree, G.J., J. Heidema, E.M. van Leeuwen, G.M. van Bleek, R.E. Jonkers, H.M. Jansen, R.A. van Lier, and T.A. Out. 2005. Respiratory syncytial virus-specific CD8+ memory T cell responses in elderly persons. *The Journal of infectious diseases* 191:1710-1718.
- Defrance, T., M. Taillardet, and L. Genestier. 2011. T cell-independent B cell memory. *Curr Opin Immunol* 23:330-336.
- Detoraki, A., F. Granata, S. Staibano, F.W. Rossi, G. Marone, and A. Genovese. 2010. Angiogenesis and lymphangiogenesis in bronchial asthma. *Allergy* 65:946-958.
- Dibben, O., L.C. Thorpe, and A.J. Easton. 2008. Roles of the PVM M2-1, M2-2 and P gene ORF 2 (P-2) proteins in viral replication. *Virus Res* 131:47-53.
- Dimova-Yaneva, D., D. Russell, M. Main, R.J. Brooker, and P.J. Helms. 2004. Eosinophil activation and cysteinyl leukotriene production in infants with respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Clin Exp Allergy* 34:555-558.
- Dodd, J., S. Riffault, J.S. Kodituwakku, A.C. Hayday, and P.J. Openshaw. 2009. Pulmonary V gamma 4+ gamma delta T cells have proinflammatory and antiviral effects in viral lung disease. *Journal of immunology* 182:1174-1181.
- Domachowske, J.B., C.A. Bonville, K.D. Dyer, A.J. Easton, and H.F. Rosenberg. 2000a. Pulmonary eosinophilia and production of MIP-1alpha are prominent responses to infection with pneumonia virus of mice. *Cell Immunol* 200:98-104.
- Domachowske, J.B., C.A. Bonville, J.L. Gao, P.M. Murphy, A.J. Easton, and H.F. Rosenberg. 2000b. The chemokine macrophage-inflammatory protein-1 alpha and its receptor CCR1 control pulmonary inflammation and antiviral host defense in paramyxovirus infection. *Journal of immunology* 165:2677-2682.
- Domachowske, J.B., K.D. Dyer, C.A. Bonville, and H.F. Rosenberg. 1998. Recombinant human eosinophil-derived neurotoxin/RNase 2 functions as an effective antiviral agent against respiratory syncytial virus. *The Journal of infectious diseases* 177:1458-1464.
- Dyer, K.D., R.A. Drummond, T.A. Rice, C.M. Percopo, T.A. Brenner, D.A. Barisas, K.A. Karpe, M.L. Moore, and H.F. Rosenberg. 2015. Priming of the Respiratory Tract with Immunobiotic *Lactobacillus plantarum* Limits Infection of Alveolar Macrophages with Recombinant Pneumonia Virus of Mice (rK2-PVM). *Journal of virology* 90:979-991.

- Dyer, K.D., C.M. Percopo, E.R. Fischer, S.J. Gabryszewski, and H.F. Rosenberg. 2009. Pneumoviruses infect eosinophils and elicit MyD88-dependent release of chemoattractant cytokines and interleukin-6. *Blood* 114:2649-2656.
- Easton, A.J., J.B. Domachowske, and H.F. Rosenberg. 2004. Animal pneumoviruses: molecular genetics and pathogenesis. *Clinical microbiology reviews* 17:390-412.
- Eaton, M.D., G. Meiklejohn, and W. van Herick. 1944. Studies on the Etiology of Primary Atypical Pneumonia : A Filterable Agent Transmissible to Cotton Rats, Hamsters, and Chick Embryos. *The Journal of experimental medicine* 79:649-668.
- Edelson, J.D., D.K. MacFadden, M. Klein, and A.S. Rebeck. 1985. Autofluorescence of alveolar macrophages: problems and potential solutions. *Medical hypotheses* 17:403-407.
- El Saleeby, C.M., J. Suzich, M.E. Conley, and J.P. DeVincenzo. 2004. Quantitative effects of palivizumab and donor-derived T cells on chronic respiratory syncytial virus infection, lung disease, and fusion glycoprotein amino acid sequences in a patient before and after bone marrow transplantation. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 39:e17-20.
- Everard, M.L., A. Swarbrick, M. Wright, J. McIntyre, C. Dunkley, P.D. James, H.F. Sewell, and A.D. Milner. 1994. Analysis of cells obtained by bronchial lavage of infants with respiratory syncytial virus infection. *Archives of disease in childhood* 71:428-432.
- Faisca, P., D.B. Tran Anh, A. Thomas, and D. Desmecht. 2006. Suppression of pattern-recognition receptor TLR4 sensing does not alter lung responses to pneumovirus infection. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 8:621-627.
- Falsey, A.R., and E.E. Walsh. 1998. Relationship of serum antibody to risk of respiratory syncytial virus infection in elderly adults. *The Journal of infectious diseases* 177:463-466.
- Fiorilli, M., M. Crescenzi, M. Carbonari, L. Tedesco, G. Russo, C. Gaetano, and F. Aiuti. 1986. Phenotypically immature IgG-bearing B cells in patients with hypogammaglobulinemia. *J Clin Immunol* 6:21-25.
- Fishaut, M., D. Tubergen, and K. McIntosh. 1980. Cellular response to respiratory viruses with particular reference to children with disorders of cell-mediated immunity. *J Pediatr* 96:179-186.
- Fleige, H., S. Ravens, G.L. Moschovakis, J. Bolter, S. Willenzon, G. Sutter, S. Haussler, U. Kalinke, I. Prinz, and R. Forster. 2014. IL-17-induced CXCL12 recruits B cells and induces follicle formation in BALT in the absence of differentiated FDCs. *The Journal of experimental medicine* 211:643-651.
- Franco, M.A., and H.B. Greenberg. 1997. Immunity to rotavirus in T cell deficient mice. *Virology* 238:169-179.
- Frey, S., C.D. Kreml, A. Schmitt-Graff, and S. Ehl. 2008. Role of T cells in virus control and disease after infection with pneumonia virus of mice. *Journal of virology* 82:11619-11627.
- Frey, S., H. Pircher, M. Follo, P. Collins, C. Kreml, and S. Ehl. 2013. In situ evolution of virus-specific cytotoxic T cell responses in the lung. *Journal of virology* 87:11267-11275.
- Fulton, R.B., D.K. Meyerholz, and S.M. Varga. 2010. Foxp3+ CD4 regulatory T cells limit pulmonary immunopathology by modulating the CD8 T cell response during respiratory syncytial virus infection. *Journal of immunology* 185:2382-2392.

- Funchal, G.A., N. Jaeger, R.S. Czepielewski, M.S. Machado, S.P. Muraro, R.T. Stein, C.B. Bonorino, and B.N. Porto. 2015. Respiratory syncytial virus fusion protein promotes TLR-4-dependent neutrophil extracellular trap formation by human neutrophils. *PloS one* 10:e0124082.
- Gao, J., X. Ma, W. Gu, M. Fu, J. An, Y. Xing, T. Gao, W. Li, and Y. Liu. 2012. Novel functions of murine B1 cells: active phagocytic and microbicidal abilities. *Eur J Immunol* 42:982-992.
- Garbi, N., and B.N. Lambrecht. 2017. Location, function, and ontogeny of pulmonary macrophages during the steady state. *Pflugers Arch* 469:561-572.
- Gathings, W.E., A.R. Lawton, and M.D. Cooper. 1977. Immunofluorescent studies of the development of pre-B cells, B lymphocytes and immunoglobulin isotype diversity in humans. *Eur J Immunol* 7:804-810.
- Geis, S., C. Prifert, B. Weissbrich, N. Lehnert, G. Egerer, C. Eisenbach, U. Buchholz, E. Aichinger, P. Dreger, K. Neben, U. Burkhardt, A.D. Ho, H.G. Krausslich, K. Heeg, and P. Schnitzler. 2013. Molecular characterization of a respiratory syncytial virus outbreak in a hematology unit in Heidelberg, Germany. *Journal of clinical microbiology* 51:155-162.
- Ghoneim, H.E., P.G. Thomas, and J.A. McCullers. 2013. Depletion of alveolar macrophages during influenza infection facilitates bacterial superinfections. *Journal of immunology* 191:1250-1259.
- Glezen, W.P., L.H. Taber, A.L. Frank, and J.A. Kasel. 1986. Risk of primary infection and reinfection with respiratory syncytial virus. *Am J Dis Child* 140:543-546.
- Glineur, S.F., A.B. Bowen, C.M. Percopo, K.E. Garcia-Crespo, K.D. Dyer, S.I. Ochkur, N.A. Lee, J.J. Lee, J.B. Domachowske, and H.F. Rosenberg. 2014. Sustained inflammation and differential expression of interferons type I and III in PVM-infected interferon-gamma (IFN γ) gene-deleted mice. *Virology* 468-470:140-149.
- Goh, Y.P., N.C. Henderson, J.E. Heredia, A. Red Eagle, J.I. Odegaard, N. Lehwald, K.D. Nguyen, D. Sheppard, L. Mukundan, R.M. Locksley, and A. Chawla. 2013. Eosinophils secrete IL-4 to facilitate liver regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:9914-9919.
- Goritzka, M., S. Makris, F. Kausar, L.R. Durant, C. Pereira, Y. Kumagai, F.J. Culley, M. Mack, S. Akira, and C. Johansson. 2015. Alveolar macrophage-derived type I interferons orchestrate innate immunity to RSV through recruitment of antiviral monocytes. *The Journal of experimental medicine* 212:699-714.
- Graham, B.S., L.A. Bunton, J. Rowland, P.F. Wright, and D.T. Karzon. 1991a. Respiratory syncytial virus infection in anti-mu-treated mice. *Journal of virology* 65:4936-4942.
- Graham, B.S., L.A. Bunton, P.F. Wright, and D.T. Karzon. 1991b. Role of T lymphocyte subsets in the pathogenesis of primary infection and rechallenge with respiratory syncytial virus in mice. *The Journal of clinical investigation* 88:1026-1033.
- Graham, B.S., M.D. Perkins, P.F. Wright, and D.T. Karzon. 1988. Primary respiratory syncytial virus infection in mice. *Journal of medical virology* 26:153-162.
- Greaves, M.F. 1971. The expression of immunoglobulin determinants on the surface of antigen-binding lymphoid cells in mice. I. An analysis of light and heavy chain restrictions on individual cells. *Eur J Immunol* 1:186-194.

- Habibi, M.S., and C. Chiu. 2017. Controlled human infection with RSV: The opportunities of experimental challenge. *Vaccine* 35:489-495.
- Habibi, M.S., A. Jozwik, S. Makris, J. Dunning, A. Paras, J.P. DeVincenzo, C.A. de Haan, J. Wrammert, P.J. Openshaw, C. Chiu, and I. Mechanisms of Severe Acute Influenza Consortium. 2015. Impaired Antibody-mediated Protection and Defective IgA B-Cell Memory in Experimental Infection of Adults with Respiratory Syncytial Virus. *Am J Respir Crit Care Med* 191:1040-1049.
- Halfhide, C.P., B.F. Flanagan, S.P. Brearey, J.A. Hunt, A.M. Fonseca, P.S. McNamara, D. Howarth, S. Edwards, and R.L. Smyth. 2011. Respiratory syncytial virus binds and undergoes transcription in neutrophils from the blood and airways of infants with severe bronchiolitis. *The Journal of infectious diseases* 204:451-458.
- Hall, C.B., K.R. Powell, N.E. MacDonald, C.L. Gala, M.E. Menegus, S.C. Suffin, and H.J. Cohen. 1986. Respiratory syncytial viral infection in children with compromised immune function. *The New England journal of medicine* 315:77-81.
- Halle, S., H.C. Dujardin, N. Bakocevic, H. Fleige, H. Danzer, S. Willenzon, Y. Suezer, G. Hammerling, N. Garbi, G. Sutter, T. Worbs, and R. Forster. 2009. Induced bronchus-associated lymphoid tissue serves as a general priming site for T cells and is maintained by dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* 206:2593-2601.
- Harrison, A.M., C.A. Bonville, H.F. Rosenberg, and J.B. Domachowske. 1999. Respiratory syncytial virus-induced chemokine expression in the lower airways: eosinophil recruitment and degranulation. *Am J Respir Crit Care Med* 159:1918-1924.
- Hasenberg, M., S. Stegemann-Koniszewski, and M. Gunzer. 2013. Cellular immune reactions in the lung. *Immunol Rev* 251:189-214.
- Heidema, J., M.V. Lukens, W.W. van Maren, M.E. van Dijk, H.G. Otten, A.J. van Vught, D.B. van der Werff, S.J. van Gestel, M.G. Semple, R.L. Smyth, J.L. Kimpen, and G.M. van Bleek. 2007. CD8+ T cell responses in bronchoalveolar lavage fluid and peripheral blood mononuclear cells of infants with severe primary respiratory syncytial virus infections. *Journal of immunology* 179:8410-8417.
- Heidema, J., J.W. Rossen, M.V. Lukens, M.S. Ketel, E. Scheltens, M.E. Kranendonk, W.W. van Maren, A.M. van Loon, H.G. Otten, J.L. Kimpen, and G.M. van Bleek. 2008. Dynamics of human respiratory virus-specific CD8+ T cell responses in blood and airways during episodes of common cold. *Journal of immunology* 181:5551-5559.
- Heinze, B., S. Frey, M. Mordstein, A. Schmitt-Graff, S. Ehl, U.J. Buchholz, P.L. Collins, P. Staeheli, and C.D. Kreml. 2011. Both nonstructural proteins NS1 and NS2 of pneumonia virus of mice are inhibitors of the interferon type I and type III responses in vivo. *Journal of virology* 85:4071-4084.
- Heredia, J.E., L. Mukundan, F.M. Chen, A.A. Mueller, R.C. Deo, R.M. Locksley, T.A. Rando, and A. Chawla. 2013. Type 2 innate signals stimulate fibro/adipogenic progenitors to facilitate muscle regeneration. *Cell* 153:376-388.
- Hillis, W.D., M.R. Cooper, F.B. Bang, A.K. Dey, and K.V. Shah. 1971. Respiratory syncytial virus infection in children in West Bengal. *The Indian journal of medical research* 59:1354-1364.
- Hirsch, H.H., R. Martino, K.N. Ward, M. Boeckh, H. Einsele, and P. Ljungman. 2013. Fourth European Conference on Infections in Leukaemia (ECIL-4): guidelines for

- diagnosis and treatment of human respiratory syncytial virus, parainfluenza virus, metapneumovirus, rhinovirus, and coronavirus. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 56:258-266.
- Hogan, S.P., H.F. Rosenberg, R. Moqbel, S. Phipps, P.S. Foster, P. Lacy, A.B. Kay, and M.E. Rothenberg. 2008. Eosinophils: biological properties and role in health and disease. *Clin Exp Allergy* 38:709-750.
- Hornung, V., S. Rothenfusser, S. Britsch, A. Krug, B. Jahrsdorfer, T. Giese, S. Endres, and G. Hartmann. 2002. Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *Journal of immunology* 168:4531-4537.
- Horsfall, F.L., and R.G. Hahn. 1939. A pneumonia virus of Swiss mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med* 40:684-686.
- Horsfall, F.L., and R.G. Hahn. 1940. A LATENT VIRUS IN NORMAL MICE CAPABLE OF PRODUCING PNEUMONIA IN ITS NATURAL HOST. *The Journal of experimental medicine* 71:391-408.
- Hussell, T., and T.J. Bell. 2014. Alveolar macrophages: plasticity in a tissue-specific context. *Nat Rev Immunol* 14:81-93.
- Hussell, T., and P.J. Openshaw. 1998. Intracellular IFN-gamma expression in natural killer cells precedes lung CD8+ T cell recruitment during respiratory syncytial virus infection. *The Journal of general virology* 79 (Pt 11):2593-2601.
- Hwang, J.Y., T.D. Randall, and A. Silva-Sanchez. 2016. Inducible Bronchus-Associated Lymphoid Tissue: Taming Inflammation in the Lung. *Front Immunol* 7:258.
- Jacobsen, E.A., S.I. Ochkur, R.S. Pero, A.G. Taranova, C.A. Protheroe, D.C. Colbert, N.A. Lee, and J.J. Lee. 2008. Allergic pulmonary inflammation in mice is dependent on eosinophil-induced recruitment of effector T cells. *The Journal of experimental medicine* 205:699-710.
- Jacobsen, E.A., K.R. Zellner, D. Colbert, N.A. Lee, and J.J. Lee. 2011. Eosinophils regulate dendritic cells and Th2 pulmonary immune responses following allergen provocation. *Journal of immunology* 187:6059-6068.
- Jensen, I.P., E. Thisted, G. Glikmann, N. Obel, P.E. Kofoed, M. Sambo, N.H. Valerius, and C.H. Mordhorst. 1997. Secretory IgM and IgA antibodies to respiratory syncytial virus in nasopharyngeal aspirates: a diagnostic supplement to antigen detection. *Clinical and diagnostic virology* 8:219-226.
- Johnson, J.E., R.A. Gonzales, S.J. Olson, P.F. Wright, and B.S. Graham. 2007. The histopathology of fatal untreated human respiratory syncytial virus infection. *Mod Pathol* 20:108-119.
- Jonsson, F., D.A. Mancardi, M. Albanesi, and P. Bruhns. 2013. Neutrophils in local and systemic antibody-dependent inflammatory and anaphylactic reactions. *J Leukoc Biol* 94:643-656.
- Jozwik, A., M.S. Habibi, A. Paras, J. Zhu, A. Guvenel, J. Dhariwal, M. Almond, E.H. Wong, A. Sykes, M. Maybeno, J. Del Rosario, M.B. Trujillo-Torralbo, P. Mallia, J. Sidney, B. Peters, O.M. Kon, A. Sette, S.L. Johnston, P.J. Openshaw, and C. Chiu. 2015. RSV-specific airway resident memory CD8+ T cells and differential disease severity after experimental human infection. *Nat Commun* 6:10224.
- Kaiko, G.E., S. Phipps, P. Angkasekwinai, C. Dong, and P.S. Foster. 2010. NK cell deficiency predisposes to viral-induced Th2-type allergic inflammation via epithelial-derived IL-25. *Journal of immunology* 185:4681-4690.

- Kalwak, K., E. Gorczynska, J. Toporski, D. Turkiewicz, M. Slociak, M. Ussowicz, E. Latos-Grazynska, M. Krol, J. Boguslawska-Jaworska, and A. Chybicka. 2002. Immune reconstitution after haematopoietic cell transplantation in children: immunophenotype analysis with regard to factors affecting the speed of recovery. *British journal of haematology* 118:74-89.
- Kapikian, A.Z., J.A. Bell, F.M. Mastrotta, K.M. Johnson, R.J. Huebner, and R.M. Chanock. 1961. An outbreak of febrile illness and pneumonia associated with respiratory syncytial virus infection. *Am J Hyg* 74:234-248.
- Kawasaki, Y., M. Hosoya, H. Kanno, and H. Suzuki. 2006. Serum regulated upon activation, normal T cell expressed and presumably secreted concentrations and eosinophils in respiratory syncytial virus infection. *Pediatrics international : official journal of the Japan Pediatric Society* 48:257-260.
- Kerrin, A., P. Fitch, C. Errington, D. Kerr, L. Waxman, K. Riding, J. McCormack, F. Mehendele, H. McSorley, K. MacKenzie, S. Wronski, A. Braun, R. Levin, U. Theilen, and J. Schwarze. 2017. Differential lower airway dendritic cell patterns may reveal distinct endotypes of RSV bronchiolitis. *Thorax* 72:620-627.
- Kim, H.H., M.H. Lee, and J.S. Lee. 2007. Eosinophil cationic protein and chemokines in nasopharyngeal secretions of infants with respiratory syncytial virus (RSV) bronchiolitis and non-RSV bronchiolitis. *Journal of Korean medical science* 22:37-42.
- Kim, H.W., J.O. Arrobio, C.D. Brandt, B.C. Jeffries, G. Pyles, J.L. Reid, R.M. Chanock, and R.H. Parrott. 1973. Epidemiology of respiratory syncytial virus infection in Washington, D.C. I. Importance of the virus in different respiratory tract disease syndromes and temporal distribution of infection. *American journal of epidemiology* 98:216-225.
- Kim, H.W., J.G. Canchola, C.D. Brandt, G. Pyles, R.M. Chanock, K. Jensen, and R.H. Parrott. 1969. Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine. *American journal of epidemiology* 89:422-434.
- Kim, Y.J., K.A. Guthrie, A. Waghmare, E.E. Walsh, A.R. Falsey, J. Kuypers, A. Cent, J.A. Englund, and M. Boeckh. 2014. Respiratory syncytial virus in hematopoietic cell transplant recipients: factors determining progression to lower respiratory tract disease. *The Journal of infectious diseases* 209:1195-1204.
- Klenovsek, K., F. Weisel, A. Schneider, U. Appelt, S. Jonjic, M. Messerle, B. Bradel-Tretheway, T.H. Winkler, and M. Mach. 2007. Protection from CMV infection in immunodeficient hosts by adoptive transfer of memory B cells. *Blood* 110:3472-3479.
- Kohlmeier, J.E., and D.L. Woodland. 2009. Immunity to respiratory viruses. *Annu Rev Immunol* 27:61-82.
- Kolli, D., M.R. Gupta, E. Sbrana, T.S. Velayutham, H. Chao, A. Casola, and R.P. Garofalo. 2014. Alveolar macrophages contribute to the pathogenesis of human metapneumovirus infection while protecting against respiratory syncytial virus infection. *Am J Respir Cell Mol Biol* 51:502-515.
- Krempl, C.D., and P.L. Collins. 2004. Reevaluation of the virulence of prototypic strain 15 of pneumonia virus of mice. *Journal of virology* 78:13362-13365.
- Krempl, C.D., E.W. Lamirande, and P.L. Collins. 2005. Complete sequence of the RNA genome of pneumonia virus of mice (PVM). *Virus genes* 30:237-249.

- Krempl, C.D., A. Wnekowicz, E.W. Lamirande, G. Nayebagha, P.L. Collins, and U.J. Buchholz. 2007. Identification of a novel virulence factor in recombinant pneumonia virus of mice. *Journal of virology* 81:9490-9501.
- Krenger, W., B.R. Blazar, and G.A. Hollander. 2011. Thymic T-cell development in allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 117:6768-6776.
- Larranaga, C.L., S.L. Ampuero, V.F. Luchsinger, F.A. Carrion, N.V. Aguilar, P.R. Morales, M.A. Palomino, L.F. Tapia, and L.F. Avendano. 2009. Impaired immune response in severe human lower tract respiratory infection by respiratory syncytial virus. *Pediatr Infect Dis J* 28:867-873.
- Lee, B.O., J. Rangel-Moreno, J.E. Moyron-Quiroz, L. Hartson, M. Makris, F. Sprague, F.E. Lund, and T.D. Randall. 2005. CD4 T cell-independent antibody response promotes resolution of primary influenza infection and helps to prevent reinfection. *Journal of immunology* 175:5827-5838.
- Lee, D.C., J.A. Harker, J.S. Tregoning, S.F. Atabani, C. Johansson, J. Schwarze, and P.J. Openshaw. 2010a. CD25+ natural regulatory T cells are critical in limiting innate and adaptive immunity and resolving disease following respiratory syncytial virus infection. *Journal of virology* 84:8790-8798.
- Lee, F.E., A.R. Falsey, J.L. Halliley, I. Sanz, and E.E. Walsh. 2010b. Circulating antibody-secreting cells during acute respiratory syncytial virus infection in adults. *The Journal of infectious diseases* 202:1659-1666.
- Lehners, N., P. Schnitzler, S. Geis, J. Puthenparambil, M.A. Benz, B. Alber, T. Luft, P. Dreger, C. Eisenbach, C. Kunz, A. Benner, U. Buchholz, E. Aichinger, U. Frank, K. Heeg, A.D. Ho, and G. Egerer. 2013. Risk factors and containment of respiratory syncytial virus outbreak in a hematology and transplant unit. *Bone marrow transplantation* 48:1548-1553.
- Li, F., H. Zhu, R. Sun, H. Wei, and Z. Tian. 2012. Natural killer cells are involved in acute lung immune injury caused by respiratory syncytial virus infection. *Journal of virology* 86:2251-2258.
- Li, Z., C.J. Woo, M.D. Iglesias-Ussel, D. Ronai, and M.D. Scharff. 2004. The generation of antibody diversity through somatic hypermutation and class switch recombination. *Genes Dev* 18:1-11.
- Lindemans, C.A., J.L. Kimpen, B. Luijk, J. Heidema, D. Kanters, C.K. van der Ent, and L. Koenderman. 2006. Systemic eosinophil response induced by respiratory syncytial virus. *Clinical and experimental immunology* 144:409-417.
- Löffler, G. 2007. Biochemie und Pathobiochemie. Springer, Heidelberg. XXI, 1263 S. pp.
- Long, X., J. Xie, K. Zhao, W. Li, W. Tang, S. Chen, N. Zang, L. Ren, Y. Deng, X. Xie, L. Wang, Z. Fu, and E. Liu. 2016. NK cells contribute to persistent airway inflammation and AHR during the later stage of RSV infection in mice. *Med Microbiol Immunol* 205:459-470.
- Lu, Q.L., and T.A. Partridge. 1998. A new blocking method for application of murine monoclonal antibody to mouse tissue sections. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 46:977-984.
- Lukens, M.V., A.C. van de Pol, F.E. Coenjaerts, N.J. Jansen, V.M. Kamp, J.L. Kimpen, J.W. Rossen, L.H. Ulfman, C.E. Tacke, M.C. Viveen, L. Koenderman, T.F. Wolfs, and G.M. van Bleek. 2010. A systemic neutrophil response precedes robust CD8(+) T-cell activation during natural respiratory syncytial virus infection in infants. *Journal of virology* 84:2374-2383.

- Lüllmann-Rauch, R. 2015. Taschenbuch Histologie. Thieme, Stuttgart [u.a.]. XVIII, 726 S. pp.
- Lynch, J.P., R.B. Werder, Z. Loh, M.A.A. Sikder, B. Curren, V. Zhang, M.J. Rogers, K. Lane, J. Simpson, S.B. Mazzone, K. Spann, J. Hayball, K. Diener, M.L. Everard, C.C. Blyth, C. Forstner, P.G. Dennis, N. Murtaza, M. Morrison, O.C. P, P. Zhang, A. Haque, G.R. Hill, P.D. Sly, J.W. Upham, and S. Phipps. 2018. Plasmacytoid dendritic cells protect from viral bronchiolitis and asthma through semaphorin 4a-mediated T reg expansion. *The Journal of experimental medicine* 215:537-557.
- Mackay, F., P.A. Silveira, and R. Brink. 2007. B cells and the BAFF/APRIL axis: fast-forward on autoimmunity and signaling. *Curr Opin Immunol* 19:327-336.
- MacLennan, I.C., K.M. Toellner, A.F. Cunningham, K. Serre, D.M. Sze, E. Zuniga, M.C. Cook, and C.G. Vinuesa. 2003. Extrafollicular antibody responses. *Immunol Rev* 194:8-18.
- Makris, S., M. Bajorek, F.J. Culley, M. Goritzka, and C. Johansson. 2016. Alveolar Macrophages Can Control Respiratory Syncytial Virus Infection in the Absence of Type I Interferons. *Journal of innate immunity* 8:452-463.
- Maloy, K.J., B. Odermatt, H. Hengartner, and R.M. Zinkernagel. 1998. Interferon gamma-producing gammadelta T cell-dependent antibody isotype switching in the absence of germinal center formation during virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:1160-1165.
- Maltby, S., A.J. Lochrin, B. Bartlett, H.L. Tay, J. Weaver, I.J. Poulton, M.W. Plank, H.F. Rosenberg, N.A. Sims, and P.S. Foster. 2018. Osteoblasts Are Rapidly Ablated by Virus-Induced Systemic Inflammation following Lymphocytic Choriomeningitis Virus or Pneumonia Virus of Mice Infection in Mice. *Journal of immunology* 200:632-642.
- Martin, L., A. van Meegern, S. Doemming, and T. Schuerholz. 2015. Antimicrobial Peptides in Human Sepsis. *Front Immunol* 6:404.
- Mathias, C.B. 2015. Natural killer cells in the development of asthma. *Current allergy and asthma reports* 15:500.
- Mazur, N.I., D. Higgins, M.C. Nunes, J.A. Melero, A.C. Langedijk, N. Horsley, U.J. Buchholz, P.J. Openshaw, J.S. McLellan, J.A. Englund, A. Mejias, R.A. Karron, E.A. Simoes, I. Knezevic, O. Ramilo, P.A. Piedra, H.Y. Chu, A.R. Falsey, H. Nair, L. Kragten-Tabatabaie, A. Greenough, E. Baraldi, N.G. Papadopoulos, J. Vekemans, F.P. Polack, M. Powell, A. Satav, E.E. Walsh, R.T. Stein, B.S. Graham, and L.J. Bont. 2018. The respiratory syncytial virus vaccine landscape: lessons from the graveyard and promising candidates. *The Lancet infectious diseases* 18:e295-e311.
- McBrien, C.N., and A. Menzies-Gow. 2017. The Biology of Eosinophils and Their Role in Asthma. *Frontiers in medicine* 4:93.
- McNamara, P.S., P. Ritson, A. Selby, C.A. Hart, and R.L. Smyth. 2003. Bronchoalveolar lavage cellularity in infants with severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Archives of disease in childhood* 88:922-926.
- Memoli, M.J., R. Athota, S. Reed, L. Czajkowski, T. Bristol, K. Proudfoot, R. Hagey, J. Voell, C. Fiorentino, A. Ademposi, S. Shoham, and J.K. Taubenberger. 2014. The natural history of influenza infection in the severely immunocompromised vs nonimmunocompromised hosts. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 58:214-224.

- Midulla, F., Y.T. Huang, I.A. Gilbert, N.M. Cirino, E.R. McFadden, Jr., and J.R. Panuska. 1989. Respiratory syncytial virus infection of human cord and adult blood monocytes and alveolar macrophages. *Am Rev Respir Dis* 140:771-777.
- Midulla, F., A. Villani, J.R. Panuska, I. Dab, J.K. Kolls, R. Merolla, and R. Ronchetti. 1993. Respiratory syncytial virus lung infection in infants: immunoregulatory role of infected alveolar macrophages. *The Journal of infectious diseases* 168:1515-1519.
- Moll, K.-J., and M. Moll. 2006. Anatomie. Elsevier, Urban & Fischer, München [u.a.]. XIV, 784 S. pp.
- Moyron-Quiroz, J.E., J. Rangel-Moreno, L. Hartson, K. Kusser, M.P. Tighe, K.D. Klonowski, L. Lefrancois, L.S. Cauley, A.G. Harmsen, F.E. Lund, and T.D. Randall. 2006. Persistence and responsiveness of immunologic memory in the absence of secondary lymphoid organs. *Immunity* 25:643-654.
- Mozdzanowska, K., M. Furchner, D. Zharikova, J. Feng, and W. Gerhard. 2005. Roles of CD4+ T-cell-independent and -dependent antibody responses in the control of influenza virus infection: evidence for noncognate CD4+ T-cell activities that enhance the therapeutic activity of antiviral antibodies. *Journal of virology* 79:5943-5951.
- Mozdzanowska, K., K. Maiese, and W. Gerhard. 2000. Th cell-deficient mice control influenza virus infection more effectively than Th- and B cell-deficient mice: evidence for a Th-independent contribution by B cells to virus clearance. *Journal of immunology* 164:2635-2643.
- Mufson, M.A., H.D. Levine, R.E. Wasil, H.E. Mocega-Gonzalez, and H.E. Krause. 1973. Epidemiology of respiratory syncytial virus infection among infants and children in Chicago. *American journal of epidemiology* 98:88-95.
- Mukherjee, S., D.M. Lindell, A.A. Berlin, S.B. Morris, T.P. Shanley, M.B. Hershenson, and N.W. Lukacs. 2011. IL-17-induced pulmonary pathogenesis during respiratory viral infection and exacerbation of allergic disease. *The American journal of pathology* 179:248-258.
- Murata, Y., and A.R. Falsey. 2007. Respiratory syncytial virus infection in adults. *Antiviral therapy* 12:659-670.
- Nandakumar, S., S.N. Woolard, D. Yuan, B.T. Rouse, and U. Kumaraguru. 2008. Natural killer cells as novel helpers in anti-herpes simplex virus immune response. *Journal of virology* 82:10820-10831.
- Neuzil, K.M. 2016. Progress toward a Respiratory Syncytial Virus Vaccine. *Clinical and vaccine immunology : CVI* 23:186-188.
- Neyt, K., C.H. GeurtsvanKessel, K. Deswarte, H. Hammad, and B.N. Lambrecht. 2016. Early IL-1 Signaling Promotes iBALT Induction after Influenza Virus Infection. *Front Immunol* 7:312.
- Neyt, K., and B.N. Lambrecht. 2013. The role of lung dendritic cell subsets in immunity to respiratory viruses. *Immunol Rev* 255:57-67.
- Nizet, V., and M.E. Rothenberg. 2008. Mitochondrial missile defense. *Nat Med* 14:910-912.
- Nolte, M.A., R. Arens, M. Kraus, M.H. van Oers, G. Kraal, R.A. van Lier, and R.E. Mebius. 2004. B cells are crucial for both development and maintenance of the splenic marginal zone. *Journal of immunology* 172:3620-3627.

- Nutt, S.L., P.D. Hodgkin, D.M. Tarlinton, and L.M. Corcoran. 2015. The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat Rev Immunol* 15:160-171.
- Olmeda, B., M. Martinez-Calle, and J. Perez-Gil. 2017. Pulmonary surfactant metabolism in the alveolar airspace: Biogenesis, extracellular conversions, recycling. *Ann Anat* 209:78-92.
- Olson, M.R., and S.M. Varga. 2008. Pulmonary immunity and immunopathology: lessons from respiratory syncytial virus. *Expert Rev Vaccines* 7:1239-1255.
- Openshaw, P.J. 1989. Flow cytometric analysis of pulmonary lymphocytes from mice infected with respiratory syncytial virus. *Clinical and experimental immunology* 75:324-328.
- Openshaw, P.J., and C. Chiu. 2013. Protective and dysregulated T cell immunity in RSV infection. *Curr Opin Virol* 3:468-474.
- Openshaw, P.J.M., C. Chiu, F.J. Culley, and C. Johansson. 2017. Protective and Harmful Immunity to RSV Infection. *Annu Rev Immunol* 35:501-532.
- Oracki, S.A., J.A. Walker, M.L. Hibbs, L.M. Corcoran, and D.M. Tarlinton. 2010. Plasma cell development and survival. *Immunol Rev* 237:140-159.
- Panuska, J.R., N.M. Cirino, F. Midulla, J.E. Despot, E.R. McFadden, Jr., and Y.T. Huang. 1990. Productive infection of isolated human alveolar macrophages by respiratory syncytial virus. *The Journal of clinical investigation* 86:113-119.
- Panuska, J.R., M.I. Hertz, H. Taraf, A. Villani, and N.M. Cirino. 1992. Respiratory syncytial virus infection of alveolar macrophages in adult transplant patients. *Am Rev Respir Dis* 145:934-939.
- Pegorier, S., L.A. Wagner, G.J. Gleich, and M. Pretolani. 2006. Eosinophil-derived cationic proteins activate the synthesis of remodeling factors by airway epithelial cells. *Journal of immunology* 177:4861-4869.
- Percopo, C.M., K.D. Dyer, S.I. Ochkur, J.L. Luo, E.R. Fischer, J.J. Lee, N.A. Lee, J.B. Domachowske, and H.F. Rosenberg. 2014. Activated mouse eosinophils protect against lethal respiratory virus infection. *Blood* 123:743-752.
- Percopo, C.M., Z. Qiu, S. Phipps, P.S. Foster, J.B. Domachowske, and H.F. Rosenberg. 2009. Pulmonary eosinophils and their role in immunopathologic responses to formalin-inactivated pneumonia virus of mice. *Journal of immunology* 183:604-612.
- Perry, A.K., G. Chen, D. Zheng, H. Tang, and G. Cheng. 2005. The host type I interferon response to viral and bacterial infections. *Cell research* 15:407-422.
- Phipps, S., C.E. Lam, S. Mahalingam, M. Newhouse, R. Ramirez, H.F. Rosenberg, P.S. Foster, and K.I. Matthaei. 2007. Eosinophils contribute to innate antiviral immunity and promote clearance of respiratory syncytial virus. *Blood* 110:1578-1586.
- Pieper, K., B. Grimbacher, and H. Eibel. 2013. B-cell biology and development. *The Journal of allergy and clinical immunology* 131:959-971.
- Pribul, P.K., J. Harker, B. Wang, H. Wang, J.S. Tregoning, J. Schwarze, and P.J. Openshaw. 2008. Alveolar macrophages are a major determinant of early responses to viral lung infection but do not influence subsequent disease development. *Journal of virology* 82:4441-4448.
- Prince, G.A., S.J. Curtis, K.C. Yim, and D.D. Porter. 2001. Vaccine-enhanced respiratory syncytial virus disease in cotton rats following immunization with Lot 100 or a newly prepared reference vaccine. *The Journal of general virology* 82:2881-2888.

- Prince, G.A., V.G. Hemming, R.L. Horswood, P.A. Baron, and R.M. Chanock. 1987. Effectiveness of topically administered neutralizing antibodies in experimental immunotherapy of respiratory syncytial virus infection in cotton rats. *Journal of virology* 61:1851-1854.
- Prince, G.A., A.B. Jenson, R.L. Horswood, E. Camargo, and R.M. Chanock. 1978. The pathogenesis of respiratory syncytial virus infection in cotton rats. *The American journal of pathology* 93:771-791.
- Racine, R., M. McLaughlin, D.D. Jones, S.T. Wittmer, K.C. MacNamara, D.L. Woodland, and G.M. Winslow. 2011. IgM production by bone marrow plasmablasts contributes to long-term protection against intracellular bacterial infection. *Journal of immunology* 186:1011-1021.
- Raes, M., V. Peeters, P. Alliet, P. Gillis, J. Kortleven, K. Magerman, and J.L. Rummens. 1997. Peripheral blood T and B lymphocyte subpopulations in infants with acute respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology* 8:97-102.
- Ramirez, G.A., M.R. Yacoub, M. Ripa, D. Mannina, A. Cariddi, N. Saporiti, F. Ciceri, A. Castagna, G. Colombo, and L. Dagna. 2018. Eosinophils from Physiology to Disease: A Comprehensive Review. *BioMed research international* 2018:9095275.
- Raval, F.M., R. Mishra, R.L. Garcea, R.M. Welsh, and E. Szomolanyi-Tsuda. 2013. Long-lasting T cell-independent IgG responses require MyD88-mediated pathways and are maintained by high levels of virus persistence. *mBio* 4:e00812-00813.
- Ravin, K.A., and M. Loy. 2016. The Eosinophil in Infection. *Clinical reviews in allergy & immunology* 50:214-227.
- Reed, J.L., Y.A. Brewah, T. Delaney, T. Welliver, T. Burwell, E. Benjamin, E. Kuta, A. Kozhich, L. McKinney, J. Suzich, P.A. Kiener, L. Avendano, L. Velozo, A. Humbles, R.C. Welliver, Sr., and A.J. Coyle. 2008. Macrophage impairment underlies airway occlusion in primary respiratory syncytial virus bronchiolitis. *The Journal of infectious diseases* 198:1783-1793.
- Reed, J.L., T.P. Welliver, G.P. Sims, L. McKinney, L. Velozo, L. Avendano, K. Hintz, J. Luma, A.J. Coyle, and R.C. Welliver, Sr. 2009. Innate immune signals modulate antiviral and polyreactive antibody responses during severe respiratory syncytial virus infection. *The Journal of infectious diseases* 199:1128-1138.
- Rigaux, P., K.E. Killoran, Z. Qiu, and H.F. Rosenberg. 2012. Depletion of alveolar macrophages prolongs survival in response to acute pneumovirus infection. *Virology* 422:338-345.
- Rima, B., P. Collins, A. Easton, R. Fouchier, G. Kurath, R.A. Lamb, B. Lee, A. Maisner, P. Rota, L. Wang, and C. Ictv Report. 2017. ICTV Virus Taxonomy Profile: Pneumoviridae. *The Journal of general virology* 98:2912-2913.
- Roman, M., W.J. Calhoun, K.L. Hinton, L.F. Avendano, V. Simon, A.M. Escobar, A. Gaggero, and P.V. Diaz. 1997. Respiratory syncytial virus infection in infants is associated with predominant Th-2-like response. *Am J Respir Crit Care Med* 156:190-195.
- Rosenberg, H.F., and J.B. Domachowske. 1999. Eosinophils, ribonucleases and host defense: solving the puzzle. *Immunol Res* 20:261-274.

- Rosenberg, H.F., and J.B. Domachowske. 2008. Pneumonia virus of mice: severe respiratory infection in a natural host. *Immunol Lett* 118:6-12.
- Rosenberg, H.F., K.D. Dyer, and J.B. Domachowske. 2009. Respiratory viruses and eosinophils: exploring the connections. *Antiviral research* 83:1-9.
- Rosenberg, H.F., K.D. Dyer, and P.S. Foster. 2013. Eosinophils: changing perspectives in health and disease. *Nat Rev Immunol* 13:9-22.
- Russell, C.D., S.A. Unger, M. Walton, and J. Schwarze. 2017. The Human Immune Response to Respiratory Syncytial Virus Infection. *Clinical microbiology reviews* 30:481-502.
- Sabbele, N.R., A. Van Oudenaren, and R. Benner. 1988. The effect of cyclophosphamide on B cells and 'background' immunoglobulin-secreting cells in mice. *Immunopharmacology* 15:21-30.
- Sakai, J., and M. Akkoyunlu. 2017. The Role of BAFF System Molecules in Host Response to Pathogens. *Clinical microbiology reviews* 30:991-1014.
- Salem, M.L., A.A. Al-Khami, S.A. El-Nagaar, A.A. Zidan, I.M. Al-Sharkawi, C. Marcela Diaz-Montero, and D.J. Cole. 2012. Kinetics of rebounding of lymphoid and myeloid cells in mouse peripheral blood, spleen and bone marrow after treatment with cyclophosphamide. *Cell Immunol* 276:67-74.
- Scheer, S., C. Kreml, C. Kallfass, S. Frey, T. Jakob, G. Mouahid, H. Mone, A. Schmitt-Graff, P. Staeheli, and M.C. Lamers. 2014. S. mansonii bolsters anti-viral immunity in the murine respiratory tract. *PLoS one* 9:e112469.
- Schiebler, T.H., and H.-W. Korf. 2007. Anatomie. Steinkopff, [Heidelberg]. XVII, 916 S. pp.
- Schwarze, J., E. Hamelmann, K.L. Bradley, K. Takeda, and E.W. Gelfand. 1997. Respiratory syncytial virus infection results in airway hyperresponsiveness and enhanced airway sensitization to allergen. *The Journal of clinical investigation* 100:226-233.
- Shah, J.N., and R.F. Chemaly. 2011. Management of RSV infections in adult recipients of hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 117:2755-2763.
- Shamri, R., J.J. Xenakis, and L.A. Spencer. 2011. Eosinophils in innate immunity: an evolving story. *Cell Tissue Res* 343:57-83.
- Shi, T., D.A. McAllister, K.L. O'Brien, E.A.F. Simoes, S.A. Madhi, B.D. Gessner, F.P. Polack, E. Balsells, S. Acacio, C. Aguayo, I. Alassani, A. Ali, M. Antonio, S. Awasthi, J.O. Awori, E. Azziz-Baumgartner, H.C. Baggett, V.L. Baillie, A. Balmaseda, A. Barahona, S. Basnet, Q. Bassat, W. Basualdo, G. Bigogo, L. Bont, R.F. Breiman, W.A. Brooks, S. Broor, N. Bruce, D. Bruden, P. Buchy, S. Campbell, P. Carosone-Link, M. Chadha, J. Chipeta, M. Chou, W. Clara, C. Cohen, E. de Cuellar, D.A. Dang, B. Dash-Yandag, M. Deloria-Knoll, M. Dherani, T. Eap, B.E. Ebruke, M. Echavarría, C.C. de Freitas Lazaro Emediato, R.A. Fasce, D.R. Feikin, L. Feng, A. Gentile, A. Gordon, D. Goswami, S. Goyet, M. Groome, N. Halasa, S. Hirve, N. Homaira, S.R.C. Howie, J. Jara, I. Jroundi, C.B. Kartasmita, N. Khuri-Bulos, K.L. Kotloff, A. Krishnan, R. Libster, O. Lopez, M.G. Lucero, F. Lucion, S.P. Lupisan, D.N. Marcone, J.P. McCracken, M. Mejia, J.C. Moisi, J.M. Montgomery, D.P. Moore, C. Moraleta, J. Moyes, P. Munywoki, K. Mutyara, M.P. Nicol, D.J. Nokes, P. Nymadawa, M.T. da Costa Oliveira, H. Oshitani, N. Pandey, G. Paranhos-Baccala, L.N. Phillips, V.S. Picot, M. Rahman, M. Rakoto-Andrianarivelo, Z.A. Rasmussen, B.A. Rath, A. Robinson, C. Romero,

- G. Russomando, V. Salimi, P. Sawatwong, N. Scheltema, B. Schweiger, J.A.G. Scott, P. Seidenberg, K. Shen, R. Singleton, V. Sotomayor, T.A. Strand, A. Sutanto, M. Sylla, M.D. Tapia, S. Thamthitawat, E.D. Thomas, R. Tokarz, C. Turner, M. Venter, S. Waicharoen, J. Wang, W. Watthanaworawit, L.M. Yoshida, H. Yu, H.J. Zar, H. Campbell, and H. Nair. 2017. Global, regional, and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children in 2015: a systematic review and modelling study. *Lancet* 390:946-958.
- Shinoff, J.J., K.L. O'Brien, B. Thumar, J.B. Shaw, R. Reid, W. Hua, M. Santosham, and R.A. Karron. 2008. Young infants can develop protective levels of neutralizing antibody after infection with respiratory syncytial virus. *The Journal of infectious diseases* 198:1007-1015.
- Siber, G.R., D. Leombruno, J. Leszczynski, J. McIver, D. Bodkin, R. Gonin, C.M. Thompson, E.E. Walsh, P.A. Piedra, V.G. Hemming, and et al. 1994. Comparison of antibody concentrations and protective activity of respiratory syncytial virus immune globulin and conventional immune globulin. *The Journal of infectious diseases* 169:1368-1373.
- Smith, P.K., R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson, and D.C. Klenk. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry* 150:76-85.
- Smith, P.K., S.Z. Wang, K.D. Dowling, and K.D. Forsyth. 2001. Leucocyte populations in respiratory syncytial virus-induced bronchiolitis. *Journal of paediatrics and child health* 37:146-151.
- Smyth, R.L., J.N. Fletcher, H.M. Thomas, and C.A. Hart. 1997. Immunological responses to respiratory syncytial virus infection in infancy. *Archives of disease in childhood* 76:210-214.
- Spolski, R., L. Wang, C.K. Wan, C.A. Bonville, J.B. Domachowske, H.P. Kim, Z. Yu, and W.J. Leonard. 2012. IL-21 promotes the pathologic immune response to pneumovirus infection. *Journal of immunology* 188:1924-1932.
- Stoppelenburg, A.J., V. Salimi, M. Hennis, M. Plantinga, R. Huis in 't Veld, J. Walk, J. Meerding, F. Coenjaerts, L. Bont, and M. Boes. 2013. Local IL-17A potentiates early neutrophil recruitment to the respiratory tract during severe RSV infection. *PloS one* 8:e78461.
- Su, Y.C., D. Townsend, L.J. Herrero, A. Zaid, M.S. Rolph, M.E. Gahan, M.A. Nelson, P.A. Rudd, K.I. Matthaiei, P.S. Foster, L. Dent, R.A. Tripp, J. Lee, L. Simson, and S. Mahalingam. 2015. Dual proinflammatory and antiviral properties of pulmonary eosinophils in respiratory syncytial virus vaccine-enhanced disease. *Journal of virology* 89:1564-1578.
- Sullivan, J.L., R.E. Mayner, D.W. Barry, and F.A. Ennis. 1976. Influenza virus infection in nude mice. *The Journal of infectious diseases* 133:91-94.
- Sun, S., J.H. Schiller, and A.F. Gazdar. 2007. Lung cancer in never smokers--a different disease. *Nat Rev Cancer* 7:778-790.
- Szomolanyi-Tsuda, E., P.L. Dundon, I. Joris, L.D. Shultz, B.A. Woda, and R.M. Welsh. 1994. Acute, lethal, natural killer cell-resistant myeloproliferative disease induced by polyomavirus in severe combined immunodeficient mice. *The American journal of pathology* 144:359-371.

- Szomolanyi-Tsuda, E., Q.P. Le, R.L. Garcea, and R.M. Welsh. 1998. T-Cell-independent immunoglobulin G responses in vivo are elicited by live-virus infection but not by immunization with viral proteins or virus-like particles. *Journal of virology* 72:6665-6670.
- Szomolanyi-Tsuda, E., and R.M. Welsh. 1996. T cell-independent antibody-mediated clearance of polyoma virus in T cell-deficient mice. *The Journal of experimental medicine* 183:403-411.
- Tate, M.D., L.J. Ioannidis, B. Croker, L.E. Brown, A.G. Brooks, and P.C. Reading. 2011. The role of neutrophils during mild and severe influenza virus infections of mice. *PLoS one* 6:e17618.
- Todd, R., B.R. Donoff, T. Chiang, M.Y. Chou, A. Elovic, G.T. Gallagher, and D.T. Wong. 1991. The eosinophil as a cellular source of transforming growth factor alpha in healing cutaneous wounds. *The American journal of pathology* 138:1307-1313.
- Vallbracht, S., H. Unsold, and S. Ehl. 2006. Functional impairment of cytotoxic T cells in the lung airways following respiratory virus infections. *Eur J Immunol* 36:1434-1442.
- Van Epps, D.E., and A.D. Bankhurst. 1978. Human eosinophils: surface receptors and antibody-dependent cytotoxicity. *J Lab Clin Med* 91:612-617.
- van Helden, M.J., P.J. van Kooten, C.P. Bekker, A. Grone, D.J. Topham, A.J. Easton, C.J. Boog, D.H. Busch, D.M. Zaiss, and A.J. Sijts. 2012. Pre-existing virus-specific CD8(+) T-cells provide protection against pneumovirus-induced disease in mice. *Vaccine* 30:6382-6388.
- Vandersarren, L., C. Bosteels, M. Vanheerswynghels, J.J. Moon, A.J. Easton, G. Van Isterdael, S. Janssens, B.N. Lambrecht, and M.J. van Helden. 2017. Epitope mapping and kinetics of CD4 T cell immunity to pneumonia virus of mice in the C57BL/6 strain. *Sci Rep* 7:3472.
- Vivier, E., E. Tomasello, M. Baratin, T. Walzer, and S. Ugolini. 2008. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol* 9:503-510.
- Walker, C., J. Checkel, S. Cammisuli, P.J. Leibson, and G.J. Gleich. 1998. IL-5 production by NK cells contributes to eosinophil infiltration in a mouse model of allergic inflammation. *Journal of immunology* 161:1962-1969.
- Walsh, E.E., D.R. Peterson, and A.R. Falsey. 2004. Risk factors for severe respiratory syncytial virus infection in elderly persons. *The Journal of infectious diseases* 189:233-238.
- Wang, H., J.E. Coligan, and H.C. Morse, 3rd. 2016. Emerging Functions of Natural IgM and Its Fc Receptor FcμR in Immune Homeostasis. *Front Immunol* 7:99.
- Wang, L.C., C.M. Kao, P. Ling, I.J. Su, T.M. Chang, and S.H. Chen. 2012. CD4 T-cell-independent antibody response reduces enterovirus 71 lethality in mice by decreasing tissue viral loads. *Clin Dev Immunol* 2012:580696.
- Watkiss, E.R., P. Shrivastava, N. Arsic, S. Gomis, and S. van Drunen Littel-van den Hurk. 2013. Innate and adaptive immune response to pneumonia virus of mice in a resistant and a susceptible mouse strain. *Viruses* 5:295-320.
- Weiler, J.M., R.E. Edens, C.S. Bell, and G.J. Gleich. 1995. Eosinophil granule cationic proteins regulate the classical pathway of complement. *Immunology* 84:213-219.
- Weir, E.C., D.G. Brownstein, A.L. Smith, and E.A. Johnson. 1988. Respiratory disease and wasting in athymic mice infected with pneumonia virus of mice. *Lab Anim Sci* 38:133-137.

- Welliver, T.P., R.P. Garofalo, Y. Hosakote, K.H. Hintz, L. Avendano, K. Sanchez, L. Velozo, H. Jafri, S. Chavez-Bueno, P.L. Ogra, L. McKinney, J.L. Reed, and R.C. Welliver, Sr. 2007. Severe human lower respiratory tract illness caused by respiratory syncytial virus and influenza virus is characterized by the absence of pulmonary cytotoxic lymphocyte responses. *The Journal of infectious diseases* 195:1126-1136.
- Wen, S.C., S.J. Tollefson, M. Johnson, P. Gilchuk, K.L. Boyd, B. Shepherd, S. Joyce, and J.V. Williams. 2014. Acute clearance of human metapneumovirus occurs independently of natural killer cells. *Journal of virology* 88:10963-10969.
- Wong, D.T., M. Rosenband, K. Hovey, and P.L. Ogra. 1985. Respiratory syncytial virus infection in immunosuppressed animals: implications in human infection. *Journal of medical virology* 17:359-370.
- Wyde, P.R., R.B. Couch, B.F. Mackler, T.R. Cate, and B.M. Levy. 1977. Effects of low- and high-passage influenza virus infection in normal and nude mice. *Infection and immunity* 15:221-229.
- Yousefi, S., J.A. Gold, N. Andina, J.J. Lee, A.M. Kelly, E. Kozlowski, I. Schmid, A. Straumann, J. Reichenbach, G.J. Gleich, and H.U. Simon. 2008. Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense. *Nat Med* 14:949-953.
- Yu, P., Y. Xu, W. Deng, L. Bao, L. Huang, Y. Xu, Y. Yao, and C. Qin. 2017. Comparative pathology of rhesus macaque and common marmoset animal models with Middle East respiratory syndrome coronavirus. *PloS one* 12:e0172093.
- Yui, I., A. Hoshi, Y. Shigeta, T. Takami, and T. Nakayama. 2003. Detection of human respiratory syncytial virus sequences in peripheral blood mononuclear cells. *Journal of medical virology* 70:481-489.
- Yusuf, S., G. Piedimonte, A. Auais, G. Demmler, S. Krishnan, P. Van Caesele, R. Singleton, S. Broor, S. Parveen, L. Avendano, J. Parra, S. Chavez-Bueno, T. Murguia De Sierra, E.A. Simoes, S. Shaha, and R. Welliver. 2007. The relationship of meteorological conditions to the epidemic activity of respiratory syncytial virus. *Epidemiol Infect* 135:1077-1090.
- Zhou, G., S.W. Juang, and K.P. Kane. 2013. NK cells exacerbate the pathology of influenza virus infection in mice. *Eur J Immunol* 43:929-938.

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Schematische Darstellung des unteren Respirationstrakts (verändert und übersetzt nach (Sun et al., 2007))..	8
Abb. 2: Zusammenfassung der antiviralen T- und B-Zell-Antwort in der Lunge.....	12
Abb. 3: Aufbau und Genom des respiratorischen Synzytial-Virus.....	15
Abb. 4: Repräsentatives Beispiel einer durchflusszytometrischen Analyse von Splenozyten vor und nach der B-Zell spezifischen Anreicherung mittels MagniSort® Mouse B cell Enrichment Kit.....	66
Abb. 5: Der Bicinchoninsäure-Test: Kombination der Biuret-Reaktion mit der BCA-Komplexierung von Cu ⁺ -Ionen (Smith et al., 1985).....	72
Abb. 6: BSA-Standardkurve in basischem Lysepuffer..	73
Abb. 7: Kontrolle der Plasmid-DNA von pPVM1 und des DNA-Fragments mCherry nach der Aufreinigung mit dem PCR Purification Kit der Firma Qiagen.	76
Abb. 8: Analytische Restriktionsverdauung von pPVM-mCherry (mChe)..	78
Abb. 9: Verlauf einer PVM-Infektion in C57BL/6-Mäusen..	84
Abb. 10: T-Zellantwort nach PVM-Infektion im Interstitium der Lunge und im Bronchoalveolarlumen.....	86
Abb. 11: Rekrutierung von T-Zellpopulationen während einer PVM-Infektion.....	89
Abb. 12: Rekrutierung von B-Lymphozyten in das perivaskuläre Gewebe und Co-Lokalisierung mit T-Helferzellen.	91
Abb. 13: Rekrutierung von natürlichen Killerzellen und neutrophilen Granulozyten während einer PVM-Infektion in die Lunge.	94
Abb. 14: Rekrutierung von eosinophilen Granulozyten während einer PVM-Infektion..	95
Abb. 15: Transiente Depletion von AM Φ während einer PVM-Infektion.	97
Abb. 16: Charakterisierung des neu generierten Virus rPVM-mCherry in Zellkulturen und in vivo.	100
Abb. 17: Gating-Strategie zur Identifizierung von AM Φ im Lungengewebe mittels durchflusszytometrischer Analyse.	102
Abb. 18: Transiente Depletion von AM Φ nach PVM-Infektion.	103

Abb. 19: Depletion von AM Φ nach PVM-Infektion in immundefizienten Mäusen.....	105
Abb. 20: B-Lymphozyten tragen zur partiellen Viruskontrolle bei milder bis fehlender Symptomatik bei.	109
Abb. 21: Morbidität und Mortalität nach Infektion mit 500 Pfu PVM.	110
Abb. 22: Morbidität und Mortalität nach Infektion mit 1000 Pfu PVM.	111
Abb. 23: Morbidität und Mortalität nach Infektion mit 1500 Pfu PVM.	113
Abb. 24: Rekrutierung von B-Lymphozyten nach subletaler Infektion mit PVM..	115
Abb. 25: Spatiotemporale Entwicklung von pulmonaler B- und CD4 ⁺ T-Zell-Rekrutierung und PVM-Infektion bei B6.TCR $\beta\delta^{-/-}$ - und Kontroll-Mäusen.....	117
Abb. 26: Pulmonale B-Lymphozyten in B6.TCR $\beta\delta^{-/-}$ -Mäusen sind an Tag 14 nach PVM-Infektion unvollständig differenziert.	119
Abb. 27: Viele B-Lymphozyten in der Lunge von B6.TCR $\beta\delta^{-/-}$ -Mäusen sind an Tag 14 p.i. IgM und IgG doppelpositiv.	120
Abb. 28: PVM-spezifische Neutralisationskapazität und IgM-Antikörper bei B6.TCR $\beta\delta^{-/-}$ -Mäusen.....	123
Abb. 29: Adoptiver Transfer von B-Zellen in B6.Rag1 ^{-/-} Mäuse; schematische Darstellung des Versuchsaufbaus..	125
Abb. 30: Adoptiver B-Zell-Transfer in B6.Rag1 ^{-/-} Mäuse verändert den Krankheitsverlauf nach PVM-Infektion.	126
Abb. 31: Adoptiv transferierte B-Lymphozyten werden in lymphatische Organe und in infiziertes Lungengewebe rekrutiert.....	128
Abb. 32: Rekonstituierte B-Lymphozyten werden in lymphatische Organe und in infiziertes Lungengewebe rekrutiert.....	130
Abb. 33: Adoptiv transferierte B-Lymphozyten werden in lymphatische Organe und in infiziertes Lungengewebe rekrutiert.....	131
Abb. 34: Rekrutierung von NK-Zellen nach Infektion mit PVM.....	133
Abb. 35: Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten nach Infektion mit PVM.....	135
Abb. 36: Rekrutierung von eosinophilen Granulozyten nach Infektion mit PVM..	137
Abb. 37: Schematische Darstellung des zeitlichen Verlaufs einer PVM-Infektion und resultierender angeborener und adaptiven Immunantwort..	139

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1: Liste der verwendeten Geräte und deren Hersteller.....	40
Tab. 2: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien und deren Hersteller.....	42
Tab. 3: Liste der verwendeten Chemikalien und deren Hersteller.....	43
Tab. 4: Zusammensetzung der verwendeten Medien und Puffer.....	45
Tab. 5: Verwendete Narkosemittel und deren Hersteller.....	49
Tab. 6: Verwendete Mauslinien und deren genetische und phänotypische Eigenschaften	50
Tab. 7: Verwendete Viren und ihre Eigenschaften.....	50
Tab. 8: Verwendete Zelllinien/Bakterienstämme und deren Ursprung	50
Tab. 9: Materialien und Lösungen für die Histologie	51
Tab. 10: Verwendete Antikörper für die Durchflusszytometrie	52
Tab. 11: Verwendete Primär-Antikörper für die Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie	53
Tab. 12: Verwendete Sekundär-Antikörper für die Konfokale Laser-Scanning- Mikroskopie	54
Tab. 13: Verwendete HRP- bzw. Biotin-konjugierte Antikörper für Plaque-Assay und ELISA.	54
Tab. 14: Verwendete Primer und deren Hersteller.....	55
Tab. 15: Verwendete Plasmide und deren Hersteller.....	55
Tab. 16: verwendete Enzyme und deren Hersteller	55
Tab. 17: Verwendete Kits und deren Hersteller.....	56
Tab. 18: Verwendete Software und deren Hersteller	57
Tab. 19: Skala für die visuelle symptomatische Bewertung mit Versuchs- Abbruchkriterien	62
Tab. 20: Verwendete Antikörperkombinationen zur Darstellung von Immunzellen	68
Tab. 21: Verwendete Färbepanels für die Durchflusszytometrie.....	70

Tab. 22: PCR-Ansatz und Cyclor-Programm für die Vervielfältigung des mCherry-Gens inclusive GS, GE und die Agel-Schnittstelle.....	74
Tab. 23: Präparativer Enzymverdau des rPVM1-Plasmids und des mCherry-Fragments für die Ligation.....	75
Tab. 24: Ansätze für die Ligation des mCherry-Gens in das rPVM1-Plasmid.....	76
Tab. 25: Analytischer Enzymverdau zur Kontrolle von pPVM-mCherry.....	77
Tab. 26: Ansatz für die Sequenzierung des mCherry-Gens mittels Sanger-Sequenzierung.....	79
Tab. 27: Ansatz für die Transfektion von BSRT7/5-Zellen für die Virusherstellung.....	80
Tab. 28: Ansatz und Cyclor-Programm für die RT-PCR zellulärer RNA nach rPVM-mCherry-Infektion.....	81

DANKSAGUNG

Hiermit möchte ich mich bei allen Leuten bedanken, die mit bei der Anfertigung dieser Arbeit geholfen und mich unterstützt haben.

Allen aus der Arbeitsgruppe Dr. Christine Krempl und vor allem Christine Krempl selbst gilt mein besonderer Dank. Durch ihre Unterstützung und die sehr gute Betreuung als Doktormutter konnte ich meine Arbeit zu einem erfolgreichen Ende führen. Theresa Kreuzahler, Akinbami Adenugba, Johannes Siewert und Christine haben das Arbeiten schön und angenehm gemacht, mich tatkräftig unterstützt und oft auch die Laune verbessert. Ich danke außerdem meinen beiden Betreuern Manfred Lutz und Markus Sauer, die mich durch ihr Wissen und ihre Erfahrung während der Durchführung meiner Arbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Nora Müller, die mit ihrer Hilfe meine mikroskopischen Arbeiten zum Erfolg gebracht hat, sowie den Kollegen und Freunden aus dem Institut für Virologie und Immunbiologie.

Für die tatkräftige Unterstützung bei meinen *in vivo* Versuchen möchte ich mich außerdem ganz herzlich bei Dr. Sabine Kranz und allen Tierpflegern des Instituts für Virologie und Immunbiologie bedanken.

Meiner Familie, besonders meinen Eltern, danke ich von ganzem Herzen. All die Jahre haben sie mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden, auch wenn es manches Mal schwer war.

PUBLIKATIONEN

“B cell-dependent protection during acute pneumovirus infection in immunodeficient mice”

Autoren: Lisa Prager und Christine D. Krempf

in Arbeit

