

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Institut für Virologie und Immunbiologie



Einfluss der Immunkompetenz auf die Etablierung und den Verlauf persistierender viraler Infektionen des zentralen Nervensystems (im Tiermodell Maus/Masernvirus)

Dissertation

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians Universität Würzburg

vorgelegt von

Dajana Reuter

geboren in Marienberg

Würzburg 2012

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter: Prof. Dr. Jürgen Schneider-Schaulies

Gutachter: Prof. Dr. Georg Krohne

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Erklärung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich diese Dissertation selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe.

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

Ich habe früher, außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlichen Grad, keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den 29.03.2012

Dajana Reuter

für meine Eltern und Dominik

in liebevoller Erinnerung an meinen Opa

„Je genauer Du planst, desto härter trifft Dich der Zufall.“

Peter Rühmkorf (1929 - 2008)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Die Masern	1
1.1.1	Epidemiologie, Historie und Vakzinierung	1
1.1.2	Akute Masernvirusinfektion und unmittelbare Komplikationen	2
1.1.3	ZNS-Komplikationen nach Infektion mit dem Masernvirus.....	3
1.2.	Das Masernvirus	8
1.2.1	Taxonomie und Morphologie	8
1.2.2	Genomaufbau sowie Virusreplikation und –transkription	8
1.2.3	Zelluläre Rezeptoren des Masernvirus sowie Virusausbreitung im Gehirn.....	10
1.2.4	Infektionszyklus des Masernvirus.....	13
1.3	Immunantwort und Immunsuppression infolge einer Infektion mit MV	14
1.4	Die Rolle der Immunantwort gegen das Masernvirus im Gehirn	16
1.5	Mechanismen, die zur Persistenz des Masernvirus beitragen	17
1.6	Die wichtigsten Tiermodelle in dieser Arbeit.....	18
1.6.1	Mausmodell der persistierenden ZNS-Infektion in C57BL/6	18
1.6.2	Die DEREK-Maus – Depletion regulatorischer Foxp3 ⁺ T-Zellen <i>in vivo</i>	19
1.7	Die Bedeutung regulatorischer T-Zellen bei viralen Infektionen.....	20
1.8	Zielsetzung dieser Arbeit	21
2	Material.....	22
2.1	Chemikalien.....	22
2.2	Fertige Lösungen und Reaktionssysteme.....	23
2.3	Puffer und sonstige Lösungen.....	23
2.3.1	Puffer für die Immunhistochemie.....	23
2.3.2	Puffer für die ELISA-Analysen	23
2.3.3	Puffer für die ELISPOT-Analysen.....	24
2.3.4	Sonstige Puffer und Lösungen.....	24
2.4	Kulturmedien und Medienzusätze.....	25

2.5	Biologisches Material	25
2.5.1	Zelllinie.....	25
2.5.2	Virusstämme	25
2.5.3	Mausstämme.....	26
2.6	Primer (Oligonukleotide).....	26
2.7	Antikörper	27
2.7.1	Antikörper zur Expansion von T _{reg}	27
2.7.2	FACS-Antikörper und Pentamer	27
2.7.3	Antikörper für Immunhistochemie	27
2.7.4	ELISA-Antikörper.....	27
2.7.5	ELISPOT-Antikörper	28
2.8	Peptide für die ELISPOT-Analysen.....	28
2.9	Geräte.....	28
2.10	Verbrauchsmaterial	29
2.11	Software	30
3	Methoden	31
3.1	Zellbiologische Methoden	31
3.1.1	Zellkultur	31
3.1.2	Zellzahlbestimmung.....	31
3.2	Virologische Methoden	31
3.2.1	Virusvermehrung und -präparation verschiedener Masernvirusstämme.....	31
3.2.2	Virustiterbestimmung mittels Plaquetitration	32
3.2.3	Virusaufreinigung mittels Ultrazentrifugation und Proteinbestimmung	32
3.3	Tierexperimentelle Methoden.....	33
3.3.1	Intrazerebrale Infektion von Mäusen	33
3.3.2	Intraperitoneale Injektion von MV ^{Edm} , D665 und DT	33
3.3.3	Blutentnahme aus Mäusen und Serumgewinnung.....	33
3.3.4	PFA-Perfusion von Mäusen und anschließende Präparation der Hirne	34
3.3.5	Mausektion ohne vorangegangene Perfusion der Tiere	34
3.3.6	Isolation von Lymphozyten aus ZNS von Mäusen.....	35
3.3.7	Herstellung einer Milz- bzw. Lymphknotenzellsuspension	36
3.4	Histologische Methoden.....	36
3.4.1	Anfertigung histologischer Schnitte von Mäusehirnen.....	36
3.4.2	Immunhistochemische Färbung histologischer Schnitte.....	36

3.5	Molekularbiologische Methoden.....	37
3.5.1	Isolation genomischer DNA.....	37
3.5.2	Polymerase-Kettenreaktion zur Genotypisierung	37
3.5.3	Aufreinigung mittels Agarosegelelektrophorese.....	38
3.6	Immunologische Methoden.....	39
3.6.1	FACS-Analyse (Durchflusszytometrie).....	39
3.6.2	ELISA	39
3.6.3	IFN- γ -ELISPOT-Assay	41
4	Ergebnisse.....	42
4.1	Charakterisierung der zerebralen MV-Infektion im Mausmodell.....	42
4.2	Einwanderung von MV-spezifischen, zytotoxischen T-Zellen ins Gehirn MV-infizierter Mäuse.....	47
4.2.1	Nachweis zytotoxischer T-Zellen im Gehirn MV-infizierter Mäuse.....	47
4.2.2	Etablierung eines IFN- γ -ELISPOT-Assay zum Nachweis MV-spezifischer Zellen	53
4.2.3	MV-H ₂₂₋₃₀ ⁻ und MV-H ₄₄₆₋₄₅₄ ⁻ -spezifische, IFN- γ -produzierende Zellen im Gehirn, der Milz und den ZLK nach i.c. Infektion	55
4.2.4	Etablierung einer Pentamer-Färbung zum Nachweis MV-spezifischer T-Zellen.....	58
4.2.5	D ^b MV-H ₂₂₋₃₀ -spezifische T-Zellen im Gehirn, der Milz und den ZLK nach i.c. Infektion	60
4.3	Einwanderung von regulatorischen T-Zellen ins Gehirn MV-infizierter Mäuse	64
4.3.1	i.c. Infektion von C57BL/6 mit rMV ^{Edtag} eGFP-CAMH hat keinen Einfluss auf die Verteilung der T _{reg} in der Milz und den ZLK.....	64
4.3.2	Einwanderung von T _{reg} nach i.c. Infektion mit rMV ^{Edtag} CAMH in DEREg-Mäusen	64
4.4	Einfluss der Expansion regulatorischer T-Zellen auf die MV-Infektion.....	71
4.4.1	Expansion von T _{reg} in C57BL/6 mit Hilfe des superagonistischen Antikörpers D665	71
4.4.2	T _{reg} -Expansion verstärkt die persistierende ZNS-Infektion.....	71
4.5	Einfluss der Depletion regulatorischer T-Zellen auf die MV-Infektion	75
4.5.1	Depletion von T _{reg} in DEREg-Mäusen	75
4.5.2	T _{reg} -Depletion verringert die persistierende ZNS-Infektion.....	78
4.5.3	T _{reg} -Depletion resultiert in einem erhöhten Anteil D ^b MV-H ₂₂₋₃₀ -spezifischer T-Zellen im Gehirn nach i.c. Infektion	79
4.5.4	T _{reg} -Depletion in Kombination mit postinfektiöser Immunisierung.....	81
4.6	Der antivirale Effekt vonIDO während der persistierenden ZNS-Infektion	83
5	Diskussion.....	86
5.1	Tiermodelle für die ZNS-Infektion mit dem Masernvirus.....	86
5.2	Adaptive Immunantwort gegen das Masernvirus im Gehirn	90

5.3	Regulation der antiviralen Aktivität im Gehirn	99
5.4	Therapieansätze gegen die persistierende ZNS-Infektion mit MV	105
6	<i>Zusammenfassung</i>	107
7	<i>Summary</i>	108
8	<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	109
9	<i>Literaturverzeichnis</i>	113
10	<i>Posterpräsentationen, Vorträge und Publikationen</i>	134
11	<i>Lebenslauf</i>	136

1 Einleitung

1.1 Die Masern

1.1.1 Epidemiologie, Historie und Vakzinierung

„Infektionen mit dem Masernvirus sind trotz eines weitgehend erhältlichen wirksamen Impfstoffes immer noch für zehn Prozent aller weltweiten Todesfälle von Kindern unter fünf Jahren verantwortlich und liegen als Todesursache insgesamt auf dem achten Platz“ (Janeway *et al.*, 2002). Obwohl laut der *World Health Organization* (WHO) die Zahl der in Folge von Masern verstorbenen Menschen zwischen den Jahren 2000 und 2008 um 78% sank, starben im Jahr 2008 weltweit immer noch 164.000 Menschen, zumeist Kinder unter 5 Jahren, an Masern – das sind 450 pro Tag. Mehr als 95% dieser Todesfälle traten in einkommensschwachen Ländern auf. In Anbetracht der Tatsache, dass – bevor es einen Impfstoff gab (Einführung 1963) – mehr als 90% der Weltbevölkerung im Alter von bis zu 10 Jahren mit dem Masernvirus (MV) infiziert waren, ist es ein großer Erfolg, dass 2008 bereits über 83% der Kinder mindestens eine Impfdosis bis zu ihrem ersten Geburtstag erhielten. Trotz allem muss die Impfquote weiter gesteigert werden, da MV einerseits einen Kontagionsindex von 0,95 hat, d.h. 95% der Menschen, die mit an Masern erkrankten Personen zusammentreffen, werden selber krank, vorausgesetzt sie sind nicht immunisiert; und andererseits sind infizierte Personen 3-4 Tage vor und nach dem charakteristischem Hautausschlag ansteckend, was eine zunächst unbemerkte Virusausbreitung begünstigt (www.who.int/en/; (2009; Rall, 2003)).

Da der Mensch der einzige natürliche Wirt des Masernvirus ist, benötigt es kontinuierlich Personen, die infiziert werden können, damit das Virus in einer Population aufrecht erhalten werden kann. Mathematische Analysen haben ergeben, dass eine Populationsgröße von 250.000 bis 500.000 von Nöten ist, damit Masern sich als endemische – d.h. andauernd auftretende – Krankheit manifestieren kann (Black, 1966; Keeling, 1997). Andererseits ist es eben aufgrund der Tatsache, dass der Mensch der einzige natürliche Wirt von MV ist, möglich, MV auszurotten. Eine entsprechende Kampagne wurde 1984 von der WHO ins Leben gerufen (Mitchell and Balfour, 1985). Derzeit wird davon ausgegangen, dass eine Ausrottung des Virus bis 2020 realisierbar ist. Damit wären die Masern nach den Pocken, der Rinderpest und der Kinderlähmung (Polio) die vierte Krankheit, die erfolgreich eliminiert werden würde (Bellini and Rota, 2011). Jedoch gibt es immer wieder Rückschläge: z.B. gab es seit 2009 in 28 Ländern Afrikas südlich der Sahara weitläufige Masernausbrüche mit über 200.000 Krankheitsfällen und ca. 1.400 Toten. Der Grund dafür ist eine nicht flächendeckende Impfung, welche aufgrund rückläufiger finanzieller Unterstützung (US \$ 150 Millionen im Jahr 2007 *versus* US \$ 35 Millionen im Jahr 2010) zurück geht.

Die Masern sind eine relativ neue Krankheit, die sich vermutlich aus den Morbilliviren des Tierreichs entwickelt hat. Phylogenetisch gesehen ist das Masernvirus am engsten mit dem Rinderpestvirus

verwandt; deshalb vermutet man, dass das MV in einer Zeit entstand, in der Rinder und Menschen sehr nahe zusammen gelebt haben. MV etablierte sich unter den Menschen in Europa wahrscheinlich vor ca. 5.000 Jahren, als die Populationsgröße groß genug war, um eine Ausbreitung des Virus aufrecht zu erhalten. Erste Epidemien in der menschlichen Bevölkerung wurden bereits im Mittelalter dokumentiert. Als Kinderkrankheit wurden die Masern erstmalig 1224 erwähnt. Im 16. Jahrhundert wurde das Virus im Zuge der europäischen Eroberung auch nach Amerika verschleppt, wo es Millionen Opfer in der amerikanisch-indianischen Bevölkerung forderte (McNeill, 1976).

Die erste Isolation von MV in Zellkultur wurde 1954 von John Enders und Thomas Peebles erfolgreich durchgeführt – sie beimpften primäre humane Nierenzellen mit dem Blut von David Edmonston, einem an Masern erkrankten Jungen (Enders and Peebles, 1954). Kurz darauf erfolgte die Entwicklung des ersten Impfstoffes gegen Masern (Enders *et al.*, 1960). Aufgrund dessen, dass es sich bei Masern um einen Lebendimpfstoff handelt, kann erst frühestens im Alter von 9 Monaten geimpft werden, da andererseits das Impfvirus durch die maternalen Antikörper neutralisiert wird, welche wiederum jedoch die Säuglinge vor einer Maserninfektion schützen (Albrecht *et al.*, 1977). Im Allgemeinen wird eine erste Masernimpfung im Alter von 12-15 Monaten empfohlen, die möglicherweise lebenslange Immunität verleiht. Eine zweite Impfung sollte im Abstand von mindestens 4 Wochen, spätestens aber im Alter von 6 Jahren folgen, um eventuelle „Impflücken“ zu schließen (Cutts *et al.*, 1999).

1.1.2 Akute Masernvirusinfektion und unmittelbare Komplikationen

Die Masern sind im Volksmund typischerweise eine Kinderkrankheit; infizieren sich jedoch Erwachsene, verläuft die Krankheit oft schwerwiegender als bei Kindern. Die Infektion erfolgt durch Tröpfcheninfektion von Mund-, Nasen- und Rachenschleimhaut sowie der Augenbindehaut oder durch direkten Kontakt. Charakteristisch für die Masern ist eine 10-14 Tage dauernde Inkubationszeit, die von einem 2-3 tägigen Prodromalstadium abgelöst wird, in dem Fieber, Unwohlsein, Appetitlosigkeit, Husten, Schnupfen, Lichtscheue und Bindehautentzündung auftreten. In manchen Fällen kann man auch kleine, weiße Läsionen – die sogenannten Koplikflecken – an der Wangenschleimhaut im Mund beobachten; jedoch zählen diese Flecken eher zu den atypischen Erscheinungen der Masern (Koplik, 1962; Modrow *et al.*, 2003; Cherry, 2004).

Anschließend treten im Exanthemstadium erneutes Fieber, respiratorische Symptome, Immunsuppression und unmittelbare Komplikationen auf. Der typische makulo-papulöse (fleckig-knotige) Hautausschlag (Exanthem), der 3-4 Tage anhält, tritt zuerst im Gesicht und hinter den Ohren auf und verbreitet sich dann über den Rumpf bis hin zu den Gliedmaßen. Mit Auftreten des

Hautausschlag fängt der Patient an sich zu erholen, vorausgesetzt es treten keine Komplikationen auf (Moss and Griffin, 2006).

Eine antivirale Therapie gegen eine akute MV-Infektion ist derzeit nicht verfügbar, deshalb ist nur eine symptomatische Behandlung der Krankheit möglich, die sich nach dem Krankheitsstadium richtet und eventuelle Fieber- und Hustenmittel einschließt. Desweiteren wird die Gabe von Antibiotika empfohlen, wenn zusätzlich eine bakterielle Infektion besteht (Weissbrich *et al.*, 2003).

Zu den unmittelbaren Komplikationen der Masern gehören vor allem Lungenentzündung (ist für die meisten Masern-vermittelten Todesfälle verantwortlich), Durchfall, Mundfäule, Kehlkopfentzündung, Mittelohrentzündung und Bindehautentzündung (begünstigt durch Vitamin-A-Mangel, kann zu Blindheit führen). Desweiteren können bereits vorliegende, latente virale und bakterielle Infektionen wieder ausbrechen (Christensen *et al.*, 1953; Sandford-Smith and Whittle, 1979; Suga *et al.*, 1992; Moss and Griffin, 2006).

Mit Entwicklung der ersten Impfstoffe traten Mitte der 1960er Jahre Fälle mit atypischen Masern auf, welche seither jedoch nicht mehr vorgekommen sind. In diesen Fällen wurden Personen mit Formalin-inaktiviertem MV geimpft – der Schutz dieser Impfung hielt jedoch nicht lange an und eine darauf folgende Infektion mit wildtypischem MV verursachte einen schwerwiegenderen Krankheitsverlauf als normale Masern mit einem zentripetalen („zum Mittelpunkt hinführend“) Hautausschlag, länger andauerndem Fieber und schwerer Lungenentzündung (Fulginiti *et al.*, 1967; Nader *et al.*, 1968). In Tierversuchen mit Rhesus-Affen, die mit Formalin-inaktiviertem MV geimpft wurden, wurde ein vergleichbarer Krankheitsverlauf beobachtet, der mit einer reduzierten zytotoxischen T-Zell-Antwort einher ging (Polack *et al.*, 1999).

1.1.3 ZNS-Komplikationen nach Infektion mit dem Masernvirus

Zu den weitaus gefährlicheren Komplikationen der Masern gehören die jedoch selten auftretenden ZNS-Erkrankungen. Im Jahr 1790 beschrieb der englische Chirurg James Lucas zum ersten Mal einen Fall einer nach Maserninfektion auftretenden Enzephalitis einer jungen Frau, die eine Paraparese (Lähmung) entwickelte, nachdem der Hautausschlag verschwand (Lucas, 1790). Heute wird zwischen 3 Formen einer nach Masern auftretenden Enzephalitis unterschieden: die akute postinfektiöse Masern-Enzephalitis (*acute post infectious measles encephalitis*, APME), die Einschlusskörperchenenzephalitis (*measles inclusion body encephalitis*, MIBE) und die subakute sklerosierende Panenzephalitis (*subacute sclerosing panencephalitis*, SSPE).

Die akute postinfektiöse Masern-Enzephalitis (*acute post infectious measles encephalitis*, APME) tritt in 1 von 1.000 bis 2.000 Fällen einer Maserninfektion auf (vor allem bei Kindern älter als 2 Jahre) und hat eine Sterblichkeitsrate von ca. 20% (Weissbrich *et al.*, 2003; Modrow *et al.*, 2003). Im Gegensatz zu MIBE und SSPE handelt es sich hierbei um eine akute ZNS-Infektion, die sich innerhalb von 8 Tagen nach dem Erscheinen des Hautausschlages entwickelt. Gelegentlich tritt APME auch während des Prodromalstadiums auf oder spätestens 3 Wochen nach Auftreten des Hautausschlages (Griffin *et al.*, 1989a). Neurologische Symptome treten recht schnell auf – meistens mit dem Wiederauftreten des Fiebers – die vor allem Kopfschmerzen, Bewusstseinsstörungen und Bewegungsstörungen (Paraparesen) umfassen. Im Allgemeinen bilden sich diese Störungen innerhalb von 2-3 Tagen zurück, aber es ist auch möglich, dass komatöse Zustände über mehrere Wochen anhalten. Über 10-40% der APME-Fälle verlaufen verheerend – die meisten Überlebenden haben mit langanhaltenden neurologischen Spätfolgen zu kämpfen, insbesondere Verhaltens- und Entwicklungsstörungen, Taubheit und anhaltende Bewegungsstörungen (Meyer and Byers, 1952; Johnson *et al.*, 1984). Interessanterweise wurden – im Gegensatz zu MIBE- und SSPE-Patienten – in APME-Patienten nur mit Hilfe sehr sensitiver Verfahren geringste Mengen Masern-spezifischer RNA im ZNS nachgewiesen (Nakayama *et al.*, 1995), was vermuten lässt, dass die beobachteten klinischen Symptome vermutlich das Ergebnis einer viral induzierten, pathogenen Immunreaktion im Gehirn sind, die zusätzlich autoimmune Eigenschaften hat (Entmarkung der Myelinscheiden). In diesem Prozess sind möglicherweise infizierte Leukozyten beteiligt, die sich an mikrovaskuläre Endothelzellen im Gehirn heften oder direkt infizierte Endothelzellen im Gehirn (Esolen *et al.*, 1995; Liebert, 1997; Andres *et al.*, 2003; Dittmar *et al.*, 2008).

Eine Therapie der APME ist wie bei der akuten MV-Infektion nicht möglich. Nur eine symptomatische Behandlung sowie krampflösende Medikamente können das Krankheitsbild mindern (Moench and Johnson, 1989).

Die Einschlusskörperchenenzephalitis (*measles inclusion body encephalitis*, MIBE) wurde erstmalig 1973 beschrieben (Breitfeld *et al.*, 1973); sie wird in diversen Artikeln auch als *subacute measles encephalitis with immunosuppression*, als *immunosuppressive measles encephalitis*, als *acute measles encephalitis of the delayed type* oder als *atypical measles encephalitis* bezeichnet. Wie diese Namen schon vermuten lassen, tritt diese Krankheit nur bei Patienten mit Immundefekten auf (Modrow *et al.*, 2003), wobei nur die zelluläre, nicht aber die humorale Immunantwort betroffen ist, was sich bei Kindern mit Hypogammaglobulinämie (Mangel an Antikörpern) zeigte, die nicht an einem erhöhten MIBE-Risiko litten (Weissbrich *et al.*, 2003). Die Krankheit tritt ca. 6 bis 10 Monate nach der akuten Masernvirusinfektion auf und endet bei einem oft sehr schnellen Krankheitsverlauf bei 75% der Patienten tödlich. Die Überlebenden haben mit permanenten neurologischen Defiziten zu kämpfen

(Mustafa *et al.*, 1993). Wie bei SSPE handelt es sich bei MIBE um eine persistierende ZNS-Erkrankung. Charakteristisch für MIBE sind die Einschlusskörperchen in Neuronen und Gliazellen, die der Krankheit ihren Namen geben. In diesen Inklusionen befinden sich virale Nukleokapside (Komplexe aus RNA-Genom und Proteine), jedoch keine Virushüllen (sogenannte *budding particles*), welche nach dem Tod des Patienten nachgewiesen werden können (Aicardi *et al.*, 1977; Roos *et al.*, 1981). Eine spezifische Therapie der MIBE ist wie bei der APME derzeit noch nicht verfügbar. Aufgrund der geringen Anzahl der Krankheitsfälle konnten noch keine aussagekräftigen Studien durchgeführt werden. Nur ein ausreichender Impfschutz der Kinder und ihrer Umgebung kann den Ausbruch der Krankheit verhindern (Weissbrich *et al.*, 2003).

Die subakute sklerosierende Panenzephalitis (*subacute sclerosing panencephalitis*, SSPE) wurde zum ersten Mal 1933 von Dawson bei einem 16-jährigen Jungen mit fortschreitendem neurologischem Verfall beschrieben, bei dem postmortem histologische Untersuchungen des Gehirns intranukleäre Einschlusskörperchen zeigten, die auf einen viralen Ursprung hinwiesen (Dawson, 1933). Aufgrund seiner Arbeit wurde die Krankheit auch als „Dawson`s inclusion body encephalitis“ bezeichnet. Ähnliche Krankheitsbilder wurden 1939 von Pette und Döring als *nodular panencephalitis* und 1945 von Van Bogaert als *subacute sclerosing leukoencephalitis* beschrieben (Pette and Döring, 1939; van Bogaert, 1945). Als dann jedoch 1950 festgestellt wurde, dass es sich bei allen 3 Beschreibungen um das selbe Krankheitsbild handelte, wurde seitdem der Begriff SSPE verwendet (Greenfield, 1950). Spätere Untersuchungen zeigten, dass die Einschlusskörperchen, die im Gehirn von SSPE-Patienten gefunden wurden, Nukleokapside enthielten, die in ihrer Struktur der der Paramyxoviren ähnelten (Bouteille *et al.*, 1965; Tellez-Negal and Harter, 1966). Erhöhte anti-MV-Antikörper in Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeiten (*cerebrospinal fluid*, CSF) sowie MV-Antigene im Gehirn bewiesen die Beteiligung des Masernvirus an dieser Krankheit (Connolly *et al.*, 1967; Freeman *et al.*, 1967). Die Isolation von MV aus SSPE-Gehirn-Proben mittels *in vitro* Kokultivierungsexperimenten gelang erstmals 1969 (Horta-Barbosa *et al.*, 1969; Payne *et al.*, 1969).

SSPE tritt in 1 von 10.000 Fällen ca. 6-15 Jahre nach einer akuten Masernvirusinfektion auf, wobei es auch schon ein paar Fälle gab, in denen die Krankheit bereits nach 2 Jahren auftrat oder sogar erst nach mehr als 20 bis 30 Jahren (Weissbrich *et al.*, 2003). Es handelt sich hierbei um eine stets tödlich verlaufende, persistierende ZNS-Erkrankung, die überwiegend dann auftritt, wenn die primäre MV-Infektion im Alter von bis zu 2 Jahren erfolgte, wo das Immunsystem des Kindes noch nicht ganz ausgereift ist und wo mütterliche Antikörper eventuell komplett fehlen oder nicht ausreichend vorhanden sind, um das Virus vollständig zu neutralisieren. Ein unreifes Immunsystem in Zusammenspiel mit einer vorübergehenden Immunsuppression infolge anderer Infektionen könnte die Entstehung von SSPE begünstigen (Reuter and Schneider-Schaulies, 2010).

Die Krankheit verläuft recht unterschiedlich, wird aber im Allgemeinen in 4 Phasen eingeteilt. Die erste Phase, die u.a. charakterisiert ist durch psychische Beeinträchtigungen, abnehmende schulische Leistungen, emotionale Instabilität, Persönlichkeitsänderungen, Vergessen und Schlafstörungen, kann über Wochen und Monate andauern und wird häufig noch nicht als Beginn der SSPE erkannt. In der zweiten Phase treten vor allem plötzliche, unwillkürliche Muskelzuckungen auf (5-15 pro min), die sehr charakteristisch für SSPE sind sowie Dyspraxie (lebenslange Koordinations- und Entwicklungsstörungen), Aphasie (Sprachstörung) und visuelle Beeinträchtigungen, die letztendlich bis zu Blindheit führen können. Progressiver zerebraler Verfall leitet die dritte Phase der SSPE ein, die durch abnormale Körperhaltungen, Verlust der Hirnstamm-Funktion und Koma charakterisiert ist. Ungefähr 2/3 der SSPE-Patienten sterben in dieser Phase. In der vierten Phase der Krankheit besitzt der Patient keinerlei kortikale Funktionen mehr, wie z.B. Gedächtnis, Orientierung und Sprache (Jabbour *et al.*, 1969; Weissbrich *et al.*, 2003).

Im allgemeinen verläuft die Krankheit innerhalb von 1-3 Jahren tödlich; es wurden aber auch schon Fälle beschrieben, die sehr viel schneller (Tod innerhalb weniger Monate) oder langsamer (Tod erst nach mehr als 20 Jahren) verliefen (Grunewald *et al.*, 1998).

Im Gegensatz zur normalen akuten MV-Infektion wurde bei SSPE-Patienten nur in Einzelfällen infektiöses Virus aus dem Gehirn isoliert (Ogura *et al.*, 1997). Aufgrund der Tatsache, dass meist weder intakte Virushüllen noch infektiöses Virus detektiert wurden, ist es sehr wahrscheinlich, dass die Infektion sich zellgebunden ausbreitet (Schneider-Schaulies *et al.*, 1999a). Die MV-Proteine N und P wurden in immunhistochemischen Studien von SSPE-Material in allen Proben nachgewiesen, wohingegen die Expression der Hüllproteine nicht bestätigt werden konnte. Molekularbiologische Untersuchungen haben ergeben, dass die Expression der MV-Proteine M, F und H auf Ebene der Transkription und Translation stark beeinträchtigt ist und vielen Veränderungen unterliegt (Carter *et al.*, 1983; Baczko *et al.*, 1986; Cattaneo *et al.*, 1986; Liebert *et al.*, 1986). Sequenzanalysen zeigten eine sehr hohe Mutationsrate innerhalb des gesamten Genoms, wobei die höchste Anzahl der Mutationen im M-Gen gefunden wurde, gefolgt von den F-, H-, P- und N-Genen, die im Allgemeinen die gleiche Mutationsrate aufwiesen, wohingegen das L-Gen die wenigsten Mutationen offenbarte (Cattaneo *et al.*, 1988). Deswegen ist es auch so gut wie unmöglich, infektiöses Virus aus SSPE-Proben zu isolieren.

Immunologisch gesehen ist auffällig, dass bei SSPE-Patienten sehr hohe Antikörper-Titer gegen das H- und N-Protein im Blut und im CSF detektiert werden können (Modrow *et al.*, 2003), die jedoch nicht in der Lage sind, die Virusinfektion zu kontrollieren. Dies führte zu der Annahme, dass anti-MV-Antikörper möglicherweise zur Persistenzentstehung beitragen anstatt sie zu verhindern. Es wurde bereits gezeigt, dass Antikörper, die gegen das H-Protein gerichtet sind, einen inhibitorischen Effekt

auf die virale mRNA und Proteinexpression ausüben können – so wie es in SSPE-Proben gefunden wurde (Fujinami and Oldstone, 1979; Schneider-Schaulies *et al.*, 1992).

Wichtiger als die humorale Immunantwort ist die Zell-vermittelte Immunität, um die Virusinfektion zu kontrollieren. Es wurde bereits gezeigt, dass vor allem B-Zellen und CD4⁺ T-Zellen ins Gehirn von SSPE-Patienten einwandern und dass dort lokal TNF- α und IFN- γ produziert wird (Hofman *et al.*, 1991; Nagano *et al.*, 1991). Außerdem wurden in CSF-Proben von SSPE-Patienten mittels ELISA erhöhte Level von β 2-Mikroglobulin, löslichem IL2-Rezeptor und löslichen CD8 gefunden, die alle auf eine normale zelluläre Immunantwort hinweisen (Mehta *et al.*, 1992). Möglicherweise ist die Masern-spezifische Immunantwort beeinträchtigt, was sich dadurch zeigt, dass anamnetische Hauttests oft negativ in Bezug auf Masernantigene sind (Weissbrich *et al.*, 2003).

Eine spezifische Therapie gegen SSPE gibt es wie bei den anderen ZNS-Erkrankungen von MV noch nicht. Ähnlich zu MIBE ist es aufgrund der sehr geringen Zahl von Patienten schwierig, neue Therapiekonzepte zu testen, die auch aufgrund des sehr unterschiedlichen Krankheitsverlaufes schwer zu verallgemeinern sind. Im Prinzip sollte die Therapie zum einen das Ziel haben, die Virusausbreitung zu verhindern und zum anderen das Immunsystem spezifisch gegen MV zu richten. Das erste eingesetzte Medikament, das einen positiven Effekt auf das Langzeit-Überleben von SSPE-Patienten hatte, war Inosiplex (Isoprinosine®), ein Inosin-Derivat, das die Interferon-Produktion erhöht und natürliche Killerzellen aktiviert (Dyken *et al.*, 1982; Jones *et al.*, 1982; Fukuyama *et al.*, 1987; Gadoth *et al.*, 1989). Diese Art der Therapie schien aber nur in Patienten mit langsam fortschreitendem Krankheitsverlauf effektiv zu sein, nicht jedoch bei schnell progressiven Formen (Huttenlocher and Mattson, 1979; DuRant *et al.*, 1982; DuRant and Dyken, 1983). Später wurde auch eine Kombinationstherapie mit IFN- α erprobt, die in über 50% der SSPE-Fälle einen positiven Effekt zeigte, wenn sie im frühen Stadium der Krankheit angewandt wurde (Yalaz *et al.*, 1992; Gascon *et al.*, 1993; Gascon, 2003; Miyazaki *et al.*, 2005). IFN- α wirkt dabei antiviral, indem es die Replikation von MV hemmt (Panitch *et al.*, 1986; Kuroki *et al.*, 1989). Eine weitere Behandlungsmöglichkeit wurde mit der Kombination aus Ribavirin und IFN- α erprobt, die ebenfalls eine Verbesserung der klinischen Symptome bewirkte (Tomoda *et al.*, 2001; Solomon *et al.*, 2002). Ribavirin ist ein Nukleotid-Analogon, das die RNA-Polymerase hemmt und somit die Replikation von MV hemmt (Hosoya *et al.*, 1989; Takahashi *et al.*, 1998). Auch der Einsatz von siRNA (*small interfering RNA*) wurde bereits *in vitro* erfolgreich erprobt, jedoch stehen noch Untersuchungen am Menschen aus, um dessen Wirksamkeit *in vivo* zu testen (Otaki *et al.*, 2006; Reuter *et al.*, 2006; Zinke *et al.*, 2009).

Bislang gibt es aber nur eine erfolgreiche Methode sich vor SSPE zu schützen: die Impfung gegen Masern. Seit der Einführung eines Impfstoffes im Jahr 1963, sind beispielsweise zeitversetzt ca. 10 Jahre später in den USA auch die SSPE-Fälle zurück gegangen (Janeway *et al.*, 2002).

1.2. Das Masernvirus

1.2.1 Taxonomie und Morphologie

Das Masernvirus (MV) gehört zur Gattung der Morbilliviren, die der Familie der *Paramyxoviridae* zuzuordnen ist, welche wiederum zur Ordnung der Mononegavirales gehört. Die Bezeichnung Mononegavirales macht deutlich, dass alle Vertreter dieser Ordnung ein einzelsträngiges (Mono-), RNA-Genom in negativ-Strang-Orientierung (-nega) besitzen, welches nicht segmentiert ist. Zur Gattung der Morbilliviren gehören neben MV auch das Hundestaupevirus (*canine distemper virus*, CDV), das Rinderpestvirus (*rinderpest virus*, RPV), das Seehund-Staupevirus (*phocine distemper virus*, PDV) und das Pest-der-kleinen-Wiederkäuer-Virus (*Peste des petits ruminants virus*, PPRV). Weitere prominente Vertreter der Paramyxoviren sind u.a. das Mumpsvirus aus der Gattung der Rubulaviren, das Nipahvirus und Hendravirus aus der Gattung der Henipaviren und das Respiratorische Synzytialvirus aus der Gattung der Pneumoviren (Weissbrich *et al.*, 2003; Modrow *et al.*, 2003).

Die Virionen von MV sind sehr pleomorph (mehrgestaltig); im Durchschnitt haben sie eine Größe von 120-250nm und man kennt sowohl filamentöse (fadenförmige), als auch unregelmäßige Formen. Sie sind von einem Rand bestehend aus „Dornen“ (*fringe of spikes*) umgeben, die einen Durchmesser von 5nm und eine Länge von 15nm haben und wahrscheinlich aus den Masernproteinen F und H zusammengesetzt sind (Rima and Duprex, 2011). Das Masernvirus besteht aus einer Lipidhülle, die den viralen Ribonukleoprotein (RNP)-Komplex umgibt. Die Lipidhülle stammt dabei von der Wirtszelle ab. Der RNP-Komplex besteht – wie der Name schon sagt – aus Proteinen und RNA. Er besitzt eine helikale Struktur mit einer Länge von 1µm und einem Durchmesser von 18-21nm, die in der Mitte eine 5nm-breite Aussparung hat. Eine Besonderheit ist, dass das Genom aus einem Vielfachen von 6 Nukleotiden bestehen muss (*rule of six*, (Calain and Roux, 1993)), da jedes N-Protein mit genau 6 Nukleotiden assoziiert ist, was wichtig für die Transkription und das Editieren der viralen mRNA ist (Rima and Duprex, 2011).

1.2.2 Genomaufbau sowie Virusreplikation und –transkription

Das virale Genom von MV umfasst 15.894bp (6 x 2649, *rule of six*), welches für insgesamt 6 Strukturgene kodiert: 3'-N-P-M-F-H-L-5'. Außerdem beinhaltet es nicht-kodierende 3'-*leader* und 5'-*trailer* Sequenzen, die vermutlich spezifische Verpackungssignale sowie virale Promotoren enthalten, die für die Transkription und/oder Replikation benötigt werden (Radecke and Billeter, 1995). Die Lipidhülle beinhaltet die Masernproteine F (Fusionsprotein) und H (Hämagglutinin); der RNP-Komplex umfasst neben dem viralen Genom auch die Masernproteine N (Nukleokapsid), P (Phosphoprotein) und L (*large protein*, Polymerase); beide Komponenten stehen durch das Matrixprotein M in

Verbindung. Neben den 6 Strukturgenen können ausgehend vom P-Gen desweiteren 3 Nicht-Strukturgene (V, C, R) exprimiert werden (Liston and Briedis, 1995).

Der Eintritt des Virus in die Wirtszelle ist abhängig von der Bindung des H-Proteins an einen zellulären Rezeptor (vgl. Seite 10) und der darauffolgenden Virus-Zell-Fusion, die vom F-Protein vermittelt wird. Nach der Fusion beider Membranen wird der RNP-Komplex in das Zytoplasma der Zelle freigegeben. Die Replikation des Maserngenoms findet direkt im Zytoplasma der Wirtszelle statt und ist eng gekoppelt mit der Transkription. Da das MV-Genom negativ-strängig (3'-5'-Orientierung) ist, kann es nicht als mRNA (5'-3'-Orientierung) dienen und somit auch nicht direkt für die Translation (Proteinbiosynthese) verwendet werden. Jedoch ist das Genom mit den Masernproteinen N, P und L komplexiert, wodurch zunächst die Transkription mit Hilfe der RNA-abhängigen RNA-Polymerase (bestehend aus L und P) am 3'-Ende gestartet wird. Die Synthese der mRNA wird immer wieder an den intergenischen Sequenzen unterbrochen, da der Polymerase-Komplex am Ende jeden Gens zum Anfang des folgenden Gens „springt“. Dies führt dazu, dass der Polymerase-Komplex auch vom Genom abfallen kann, wodurch ein sogenannter Transkriptionsgradient entsteht. Der höchste Anteil der mRNA-Transkripte wird vom N-Gen und der niedrigste Anteil wird vom L-Gen synthetisiert. Die so gebildeten mRNAs werden von der viralen Polymerase prozessiert (5'-Cap und 3'-Polyadenylierungssignal) und durch Ribosomen in Proteine umgesetzt.

Sobald ausreichend N-Protein in der Wirtszelle gebildet wurde, startet die Replikation des Maserngenoms, welche ebenfalls von der viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase durchgeführt wird. Dabei lagern sich genügend N-Moleküle an die 3'-*leader* Sequenz an, so dass der Polymerase-Komplex nicht vom Genom abfallen kann. Der so fortlaufend neu synthetisierte RNA-Plusstrang (5'-3'-Orientierung, Antigenom) wird sofort mit weiteren N-Proteinen komplexiert, damit die Synthese bis zum 3'-Ende des Maserngenoms durchläuft. Anschließend wird der Plusstrang wieder in einen Minusstrang (3'-5'-Orientierung, Genom) umgeschrieben, an den ebenfalls sofort N-Proteine gebunden werden.

Schlussendlich werden die neu synthetisierten H- und F-Proteine nach Modifizierung im Golgi-Apparat an die Zelloberfläche transportiert, wo sich auch die M-Proteine an der Zellinnenseite anlagern und mit H und F interagieren. Die M-Proteine assoziieren anschließend noch mit dem neuen RNP-Komplex und neue Viruspartikel werden durch Ausstülpung der Zellmembran (*budding*) freigegeben (Modrow *et al.*, 2003).

1.2.3 Zelluläre Rezeptoren des Masernvirus sowie Virusausbreitung im Gehirn

Wie alle Viren, benutzt auch das Masernvirus zelluläre Rezeptoren, um eine Zelle zu infizieren. Bisher wurden drei Moleküle identifiziert, die den Eintritt von MV in die Zelle vermitteln: Membran-Cofaktor-Protein (CD46), *signaling lymphocyte activation molecule* (SLAM, CD150) und Nectin-4.

Als erstes wurde 1993 CD46, auch bekannt als das Membran-Cofaktor-Protein (MCP), als ein Rezeptor für MV identifiziert (Dorig *et al.*, 1993; Naniche *et al.*, 1993a; Manchester *et al.*, 1994). Bereits im Jahr 1992 generierten Naniche *et al.* einen monoklonalen Antikörper (MCI20.6), der die MV-Infektion von HeLa- und Jurkat-Zellen verhinderte (Naniche *et al.*, 1992); später identifizierten sie das Protein, welches durch MCI20.6 gebunden wird, als CD46. Dieses Molekül gehört zur Familie der RCA (*regulators of complement activity*), die eine durch das Komplement vermittelte unspezifische Zelllyse verhindern. CD46 wird auf nahezu allen humanen kernhaltigen Zellen exprimiert, jedoch nur sehr wenig im Gehirn (Ogata *et al.*, 1997). Es besteht u.a. aus 4 extrazellulären Domänen, die auch als *short consensus repeats* (SCRs) bezeichnet werden, von denen die beiden distalen Domänen SCR1 und SCR2 während der Infektion als Bindestelle für das MV-H-Protein dienen (Manchester *et al.*, 1995; Buchholz *et al.*, 1997; Casasnovas *et al.*, 1999). Nach Bindung des MV-H-Proteins wird CD46 auf der Zelloberfläche relativ schnell herunter reguliert (Naniche *et al.*, 1993b; Firsching *et al.*, 1999). Da CD46 nur als Rezeptor für Vakzine-Stämme des Masernvirus bekannt ist, wurde bald klar, dass es noch mindestens einen weiteren Rezeptor für Wildtyp-Stämme des Masernvirus geben muss (Schneider-Schaulies *et al.*, 1995; Bartz *et al.*, 1998; Hsu *et al.*, 1998; Tanaka *et al.*, 1998).

In den Jahren 2000 und 2001 veröffentlichten unser Labor sowie zwei weitere, dass das Molekül CD150, auch bekannt als *signaling lymphocyte activation molecule* (SLAM), sowohl als Rezeptor für Vakzine-Stämme als auch für WT-Stämme von MV dient (Tatsuo *et al.*, 2000; Erlenhoefer *et al.*, 2001; Hsu *et al.*, 2001). CD150 ist ein kostimulatorisches Molekül, welches unabhängig von CD28 die Proliferation von T-Zellen und die Produktion von IFN- γ vermittelt (Cocks *et al.*, 1995; Aversa *et al.*, 1997; Carballido *et al.*, 1997; Castro *et al.*, 1999). Das Molekül wird auf Zellen des Immunsystems exprimiert, wie z.B. auf aktivierten T- und B-Zellen, auf Memory-Zellen, unreifen Thymozyten sowie auf reifen dendritischen Zellen (Cocks *et al.*, 1995; Polacino *et al.*, 1996; Punnonen *et al.*, 1997; Ohgimoto *et al.*, 2001). CD150 besitzt u.a. zwei glykosylierte Immunglobulin-ähnliche Domänen (V und C2), wobei das MV-H-Protein sich während der Infektion an die V-Domäne anlagert (Ohno *et al.*, 2003). Nach Bindung des MV-H-Proteins wird CD150 – ähnlich wie CD46 – von der Zelloberfläche herunter reguliert, was möglicherweise zur immunsuppressiven Eigenschaft des Virus beitragen könnte (Erlenhoefer *et al.*, 2001; Welstead *et al.*, 2004).

Da CD150 nicht auf Epithel- oder Endothelzellen sowie nicht auf unstimulierten Monozyten und verschiedenen Zelltypen im Gehirn exprimiert wird (McQuaid and Cosby, 2002; de Swart *et al.*, 2007), muss es noch einen weiteren Rezeptor für WT-Stämme des Masernvirus geben. Diese Vermutung wird zudem durch diverse Arbeiten gestützt, in denen u.a. primäre Endothelzellen (Andres *et al.*, 2003), *small airway epithelial cells* (Takeuchi *et al.*, 2003) und die Lungenkarzinom-Zelllinie H358 (Takeda *et al.*, 2007) unabhängig von CD150 mit WT-MV infiziert wurden.

Erst kürzlich wurde Nectin-4 als der epitheliale Rezeptor für MV identifiziert (Noyce *et al.*, 2011; Mühlebach *et al.*, 2011). Nectin-4, auch bekannt als *poliovirus-receptor-like-4* (PVRL4), ist ein Adhärenzverbindungsprotein (*adherens junction protein*) aus der Immunglobulin-Superfamilie, welches vor allem in den Verbindungen zwischen den Epithelzellen vorkommt (Reymond *et al.*, 2001). Dieses Molekül wird außerdem sehr stark auf embryonalen Zellen (Plazenta) exprimiert und in geringen Mengen auch in der Luftröhre, auf der Mundschleimhaut, dem Nasenrachenraum, in den Lungen und in sehr geringen Mengen auch auf neuronalen Zellen der Großhirnrinde (www.proteinatlas.org) (Noyce *et al.*, 2011). In der Maus wird Nectin-4 außerdem im Gehirn, in der Lunge, in den Hoden und im Embryo exprimiert (Reymond *et al.*, 2001), jedoch ist die MV-Infektion über Maus-PVRL-4 weniger effizient, als über das humane Homolog, obwohl beide Moleküle eine 92%ige Übereinstimmung in ihrer Aminosäure-Sequenz aufweisen (Noyce *et al.*, 2011). Da Nectin-4 zudem sehr stark auf Zellen von Lungen-, Brust-, Dickdarm- und Eierstockkrebs exprimiert wird, gilt es nicht nur als Tumorzell-Marker (Fabre-Lafay *et al.*, 2005; Takano *et al.*, 2009; Derycke *et al.*, 2010), sondern ist aufgrund dessen auch in der viralen Tumorthherapie von Interesse (Racaniello, 2011).

Nectin-4 besitzt u.a. drei extrazelluläre Immunglobulin-ähnliche Domänen (eine V- und zwei C2-Domänen), wobei das MV-H-Protein sich während der Infektion an die V-Domäne anlagert. Nach Bindung des MV-H-Proteins wird Nectin-4 – ähnlich wie CD46 und CD150 – von der Zelloberfläche herunter reguliert (Mühlebach *et al.*, 2011).

Aufgrund der Expression dieses MV-Rezeptors auf der basolateralen Seite von Epithelzellen, geht man derzeit davon aus, dass das Virus nach seiner Ausbreitung im Körper im respiratorischen Trakt von Epithelzellen basolateral aufgenommen wird, sich in diesen Zellen vermehrt und anschließend apikal frei gesetzt wird, um weitere Personen durch Tröpfcheninfektion anstecken zu können (vgl. Seite 13, (Leonard *et al.*, 2008)).

Wie bereits erwähnt wird CD46 nur sehr wenig im Gehirn exprimiert (Ogata *et al.*, 1997). CD150 wird auf verschiedenen Zelltypen des Gehirns gar nicht exprimiert (McQuaid and Cosby, 2002). Nectin-4 wird nach derzeitigem Kenntnisstand im Gehirn nur in sehr geringen Mengen exprimiert (Noyce *et al.*, 2011). Außerdem ist noch nicht klar, ob Nectin-4 eine Rolle bei der MV-Infektion von

Endothelzellen spielt. Damit stellt sich die Frage, wie MV überhaupt erst ins Gehirn gelangt und wie es sich dort während einer ZNS-Infektion verbreiten kann (vgl. Seite 3).

Für erstere Frage wird vermutet, dass das Virus aus dem Blutstrom heraus Endothelzellen der Gefäße, die das Gehirn umgeben (\triangleq Blut-Hirn-Schranke), infiziert, die das Virus anschließend an das Gehirn weitergeben; bzw. dass infizierte Leukozyten durch die Endothelzellschicht transmigrieren und das Virus im Gehirn an andere Zellen weitergeben (Kirk *et al.*, 1991; McQuaid *et al.*, 1993; Ludlow *et al.*, 2009). In unserer Arbeitsgruppe wurde bereits *in vitro* gezeigt, dass aufgrund des engen Zell-Zell-Kontaktes MV von infizierten Lymphozyten an polarisierte Endothelzellen weitergegeben und von diesen aus basolateral auch wieder freigegeben werden kann; die Fähigkeit der Lymphozyten zur transendothelialen Migration war nach MV-Infektion jedoch sehr stark eingeschränkt (Dittmar *et al.*, 2008).

Für letztere Fragestellung – wie sich das Virus im Gehirn ausbreiten kann – gibt es Hinweise, dass sich das Virus von Zelle zu Zelle möglicherweise mittels synaptischen Vesikeln verbreitet (Meissner and Koschel, 1995; Allen *et al.*, 1996; Urbanska *et al.*, 1997; Duprex *et al.*, 1999b; Lawrence *et al.*, 2000). Zudem ist bekannt, dass die Expression der viralen Hüllproteine während der persistierenden ZNS-Infektion im Allgemeinen sehr gering oder gar nicht vorhanden ist, wohingegen virale RNP-Komplexe sehr gut nachweisbar sind (Rima *et al.*, 1995; Schneider-Schaulies *et al.*, 1999b); dies lässt vermuten, dass auch Rezeptor-unabhängige Mechanismen bei der Virusausbreitung im Gehirn eine Rolle spielen. Außerdem ist noch nicht ganz klar, ob eventuell CD46 doch als Rezeptor für WT-MV – wenn auch mit geringer Affinität – in Frage kommt oder nicht (Manchester *et al.*, 2000; Ono *et al.*, 2001). Zumindest wurden in Gehirn-Sektionen von SSPE-Patienten normale CD46-Level abseits der Masern-Läsionen aber nicht innerhalb der Läsionen gezeigt, was vermuten lässt, dass die CD46-Expression aufgrund der MV-Infektion herunter reguliert wurde (Ogata *et al.*, 1997; McQuaid and Cosby, 2002).

Neben den bekannten zellulären Rezeptoren für MV wurden bisher weitere Moleküle identifiziert, die eine Rezeptor-vermittelte Virusaufnahme fördern, jedoch nicht selbst als ein Rezeptor für MV dienen. Hierzu gehören u.a. DC-SIGN (*dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin*, CD209) (de Witte *et al.*, 2006), Neurokinin-1 (*substance P receptor*) (Harrowe *et al.*, 1992), Moesin (Dunster *et al.*, 1994), *Toll-like receptor-2* (Bieback *et al.*, 2002) und der Fc γ -Rezeptor II (Ravanel *et al.*, 1997).

1.2.4 Infektionszyklus des Masernvirus

Nach der Entdeckung des epithelialen Rezeptors für MV – Nectin-4 – geht man derzeit von folgendem Modell des Infektionszyklus des Masernvirus aus: nachdem das Virus über die Atemwege per Tröpfcheninfektion aufgenommen wurde, infiziert es dort zunächst Alveolarmakrophagen und DCs mit Hilfe des Rezeptors CD150 (Tatsuo *et al.*, 2000; de Witte *et al.*, 2008; Ferreira *et al.*, 2010; Leonard *et al.*, 2010; Lemon *et al.*, 2011). Diese infizierten Zellen passieren anschließend das respiratorische Epithel (welches zu diesem Zeitpunkt noch nicht infiziert werden kann, da es einerseits kein CD150 exprimiert und andererseits Nectin-4 sich auf der basolateralen – für das Virus also noch nicht zugänglichen – Seite befindet) und transportieren das Virus zu lokalen Lymphknoten, wo es sich intensiv ausbreitet und eine Virämie (Vorhandensein von Virus im Blut) verursacht. Danach repliziert sich das Virus auch in anderen lymphatischen Organen, wie z.B. der Milz und andere Lymphknoten, sowie in der Haut (dort verursacht es den für Masern charakteristischen Hautausschlag), Niere, Lunge und Leber. Infizierte Lymphozyten wandern im Anschluss zurück zum respiratorischen Trakt und das Virus wird an die basolaterale Seite an Zellen des respiratorischen Epithels weitergegeben, in dem es sich ebenfalls vermehrt. Letztendlich wird das Virus auf der apikalen Seite des respiratorischen Epithels in die Lunge freigegeben, wo es durch Husten und Niesen (Tröpfcheninfektion) weitere Personen anstecken kann (Racaniello, 2011).

Die Tatsache, dass für die Virusfreigabe in die Lunge Epithelzellen benötigt werden, wird durch Experimente gestützt, in denen Rhesusaffen mit einem MV infiziert wurden, welches keine Epithelzellen infizieren kann, d.h. dieses Virus ist sozusagen blind in Bezug auf den epithelialen Rezeptor, aber es bindet immer noch an CD150. Die Rhesusaffen entwickelten daraufhin die für Masern typischen Anzeichen wie Hautausschlag, Appetitlosigkeit und Virämie (jedoch in geringerem Ausmaß als bei WT-MV-infizierten Affen), allerdings schieden sie keine infektiösen Viruspartikel aus (Leonard *et al.*, 2008).

1.3 Immunantwort und Immunsuppression infolge einer Infektion mit MV

Einige der im Kapitel 1.1.2 beschriebenen Symptome einer Masernvirusinfektion, wie z.B. Hautausschlag, Fieber und Bindehautentzündung, beruhen auf der körpereigenen adaptiven Immunabwehr gegen das Virus, die jedoch wichtig für die Eliminierung der Infektion sowie für die Etablierung einer lebenslangen Immunität gegen MV ist.

Auch die angeborene Immunität spielt eine Rolle während der MV-Infektion. So wurden bei Kindern mit akuten Masern erhöhte mRNA-Level von IL-1 β , TNF- α und IL-8 in PBMCs sowie erhöhte Serum-Level von IL-1 β und IL-8 im Blut nachgewiesen (Zilliox *et al.*, 2007). Desweiteren spielen die Typ1-Interferone IFN- α und IFN- β eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung von Infektionen mit RNA-Viren, jedoch ist deren Rolle bei MV *in vivo* noch unklar. Dies beruht wahrscheinlich einfach auf der Tatsache, dass die meisten Masernstudien beim Menschen den Immunstatus zum Zeitpunkt des Hautausschlages zeigen, da die Krankheit zumeist erst dann diagnostiziert wird und somit eine eventuelle Produktion von Typ1-Interferonen im Anfangsstadium nicht erfasst wird (Nakayama *et al.*, 1988; Sato *et al.*, 2008b). *In vitro* Studien mit Epithelzellen und von Monozyten abstammenden dendritischen Zellen haben bereits gezeigt, dass die Replikation von MV zur Transkription von IFN- α und IFN- β führt (Tanabe *et al.*, 2003; Moll *et al.*, 2004; Zilliox *et al.*, 2006; Herschke *et al.*, 2007; Sato *et al.*, 2008a). Im Gegenzug ist jedoch auch bekannt, dass MV die Produktion von Typ1-Interferonen in CD4⁺ T-Zellen hemmt (Sato *et al.*, 2008a). Außerdem ist die Interferon-Induktion abhängig vom Virusstamm; WT-MV induziert im Allgemeinen eine schwächere Interferon-Antwort, wohingegen MV-Vakzine eine stärkere Interferon-Antwort auslösen (Naniche *et al.*, 2000).

Wie bereits erwähnt, beruhen einige Symptome der Masernvirusinfektion auf der körpereigenen, adaptiven Immunabwehr gegen das Virus, welche sich zur gleichen Zeit wie die Symptome entwickelt. Zu diesem Zeitpunkt kann man Masern-spezifische Antikörper als auch aktivierte T-Zellen im Blut des Patienten nachweisen (Bech, 1959; van Binnendijk *et al.*, 1990; Mongkolsapaya *et al.*, 1999; Bouche *et al.*, 2002). CD8⁺ T-Zellen treten im Gegensatz zu CD4⁺ T-Zellen nur zum Zeitpunkt des Hautausschlages in einem erhöhten Level auf, wohingegen letztere auch nach der akuten Infektion noch über mehrere Wochen nachweisbar bleiben (Ryon *et al.*, 2002). Untersuchungen haben gezeigt, dass in Bereichen mit MV-infizierten Epithelzellen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in die Haut einwandern und den typischen Hautausschlag verursachen. Ein paar Tage nach dem Hautausschlag kann man bereits kein infektiöses Virus mehr aus den PBMCs isolieren, jedoch bleibt virale RNA noch über Wochen hinweg in PBMCs sowie im Urin und Atemwegssekret nachweisbar (Permar *et al.*, 2001; Pan *et al.*, 2005; Riddell *et al.*, 2007). Es wird vermutet, dass die daraufhin langanhaltende Aktivierung der CD4⁺ T-Zellen dazu beiträgt, dass der Mensch eine lebenslange Immunität gegen das Masernvirus entwickelt (Griffin, 2010). Experimente mit infizierten Makaken haben gezeigt, dass CD8⁺ T-Zellen sehr wichtig für die Viruseliminierung sind (Permar *et al.*, 2003). Dies wurde auch beim Menschen

gezeigt; Kinder mit unzureichender T-Zell-Antwort (wie z.B. Leukämie, HIV-Infektion) sind nicht in der Lage das Virus zu eliminieren und entwickeln stattdessen einen fortschreitenden Krankheitsverlauf, der zum Tod führen kann (Markowitz *et al.*, 1988). Weitere wichtige Komponenten der zellulären Immunantwort sind u.a. die Typ1-Zytokine IFN- γ und IL-2, die von aktivierten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen produziert werden. Nach dem Abklingen des Hautausschlages wird die IFN- γ - und IL-2-Produktion der CD4⁺ T-Zellen auf Typ2-Zytokine umgestellt. Dazu gehören u.a. IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13, welche noch Wochen nach der akuten Infektion nachweisbar sind (Griffin *et al.*, 1989b; Griffin and Ward, 1993; Moss *et al.*, 2002; Ryon *et al.*, 2002).

Im Gegensatz zur zellulären Immunantwort ist die humorale Immunantwort bei der Eliminierung von MV nicht essentiell. Patienten mit Agammaglobulinämie (Fehlen bestimmter Antikörper) zeigen einen normalen Krankheitsverlauf und sind in der Lage das Virus ohne weitere Komplikationen zu beseitigen (Good and Zak, 1956; Burnet, 1968). Masern-spezifische Antikörper können wie bereits erwähnt erst beim Auftreten des Hautausschlages nachgewiesen werden (Bech, 1959). Studien haben gezeigt, dass im Verlauf der akuten Infektion alle Patienten MV-spezifisches IgM bilden und später auch MV-spezifisches IgG vor allem gegen die Proteine N, H, F und z.T. auch gegen M (Norrby and Gollmar, 1972; Stephenson and ter Meulen, 1979; Norrby *et al.*, 1981).

Eine wichtige Eigenschaft des Masernvirus ist dessen Fähigkeit der Immunsuppression. Der österreichische Kinderarzt Clemens von Pirquet beschrieb 1908 als erster dieses Phänomen; er stellte fest, dass eine zuvor positive Tuberkulinreaktion im Verlauf einer Masernerkrankung negativ ausfällt (von Pirquet, 1908). Vor allem in den Ländern der Dritten Welt verlaufen Masernfälle allein aufgrund der einhergehenden Immunsuppression tödlich (Katz, 1995). Im Allgemeinen ist die Masern-induzierte Immunsuppression durch eine ausgeprägte Lymphopenie (Mangel an CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, B-Zellen, Monozyten und Neutrophilen) gekennzeichnet, welche recht schnell überwunden wird (Ryon *et al.*, 2002); sowie durch ein Ungleichgewicht der Zytokine, welches sich in Richtung der T_H2-Antwort verschiebt, was die zelluläre Immunantwort gegenüber Sekundärinfektionen hemmt (Griffin and Ward, 1993) und desweiteren ist die Fähigkeit der PBMCs, als Antwort auf polyklonale oder Antigen-spezifische Stimulation *ex vivo* zu expandieren, stark eingeschränkt (Borrow and Oldstone, 1995; Schneider-Schaulies *et al.*, 2001).

Die Impfung mit Vakzine-Virus vermittelt wie die Infektion mit WT-MV eine langanhaltende Immunität gegen das Virus, verursacht im Gegensatz zu WT-MV aber keine Immunsuppression. Welche Eigenschaften von MV dafür verantwortlich sind, ist jedoch noch nicht geklärt (Griffin, 2010).

1.4 Die Rolle der Immunantwort gegen das Masernvirus im Gehirn

Für die Immunantwort im Gehirn ist es essentiell, dass nicht-erneuerbare Zellpopulationen, wie z.B. Neuronen, infolge der Immunreaktionen nicht oder möglichst wenig beschädigt werden. Abhängig vom Virus und der infizierten Zelle gibt es zytolytische (Verlust der Zelle) als auch nicht-zytolytische (Erhalt der Zelle) Mechanismen, um eine Virusinfektion zu beseitigen. Letztere können jedoch in Bezug auf eine vollständige Viruseliminierung ungenügend sein, was zur Viruspersistenz beitragen kann (vgl. S. 17). Zudem limitieren eine intakte Blut-Hirn-Schranke sowie das Fehlen drainierender Lymphsysteme die Überwachung des Gehirns durch Immunzellen. Außerdem ist die Expression der MHC-Moleküle auf normalen, nicht-aktivierten Hirnzellen sehr gering bzw. gar nicht vorhanden, wodurch eine effektive Antigen-Präsentation gegenüber infiltrierenden T-Zellen nicht möglich ist (Griffin, 2003; Chakraborty *et al.*, 2010).

Wie bereits in Kapitel 1.1.3 angesprochen, ist die Häufigkeit der ZNS-Komplikationen infolge einer Maserninfektion relativ gering. Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass die Neuroinvasivität von MV, d.h. dessen Fähigkeit, ins Gehirn einzudringen, möglicherweise höher ist, als die Neurovirulenz des Virus, d.h. dessen Fähigkeit, Erkrankungen des ZNS hervor zu rufen (Oglesbee and Niewiesk, 2011). Änderungen im Elektroenzephalogramm wurden bei 50% Masern-infizierter Personen gemessen, obwohl sie keine klinischen Symptome einer Masern-bedingten ZNS-Erkrankung aufwiesen (Brooks *et al.*, 1998). Zudem wurde in zwei Studien bei 18% bzw. 19,6% aller obduzierten Personen das MV-N-Gen mittels RT-PCR im Gehirn nachgewiesen, obwohl sie zum Zeitpunkt ihres Todes keinerlei Anzeichen von SSPE aufwiesen. Da einerseits die Krankheitsgeschichte der Personen nicht bekannt war und andererseits das Protokoll der RT-PCR fragwürdig war, sind diese Daten jedoch mit Vorsicht zu behandeln (Katayama *et al.*, 1995; Katayama *et al.*, 1998).

Die Bedeutung der Immunantwort gegen MV im Gehirn ist jedoch erwiesen, wobei vor allem Faktoren, die auf den Patienten selbst beruhen – wie z.B. das Alter und der Immunstatus zum Zeitpunkt der Infektion – eine wichtige Rolle spielen (Oglesbee and Niewiesk, 2011). Studien haben bereits gezeigt, dass neben infiltrierenden B-Zellen und CD4⁺ T-Zellen auch IFN- $\alpha/\beta/\gamma$ sowie TNF- α im Gehirn von SSPE-Patienten nachweisbar sind (Joncas *et al.*, 1976; Hofman *et al.*, 1991; Nagano *et al.*, 1991). Es wäre also denkbar, dass einige dieser Faktoren bereits vor der Etablierung einer Masern-bedingten ZNS-Erkrankung die Ausbreitung des Virus verhindern bzw. eindämmen. Dies am Patienten wissenschaftlich zu belegen ist jedoch verständlicherweise schwierig, da erst nach dessen Tod eine Obduktion und somit Feststellung des Immunstatus im Gehirn möglich ist. Außerdem müsste man im Vorfeld wissen, welcher Patient nach den Untersuchungen noch ZNS-Komplikationen infolge einer Infektion mit dem WT-Masernvirus entwickeln würde und welcher nicht, um die Ergebnisse dementsprechend auswerten zu können.

1.5 Mechanismen, die zur Persistenz des Masernvirus beitragen

Wie bereits im vorhergehenden Kapitel beschrieben, ist die Viruseliminierung im Gehirn nicht immer erfolgreich, was zur Folge hat, dass das Virus in den Zellen des ZNS persistieren kann. So können einige Aspekte der Immunantwort im Gehirn zur Persistenzentstehung beitragen, wie z.B. die Langlebigkeit vieler Hirnzellen (Griffin, 2003).

Im Fall der SSPE wird zudem diskutiert, dass sich die Viruspersistenz schon im sehr frühen Kindesalter etabliert, wenn das Immunsystem des Kindes noch nicht vollständig ausgereift ist und maternale Antikörper evtl. komplett fehlen oder nicht ausreichend vorhanden sind. Paradoxerweise wurden bei SSPE-Patienten extrem hohe Titer von anti-MV-Antikörpern im CSF nachgewiesen, welche jedoch nicht in der Lage sind, die Infektion zu kontrollieren (Modrow *et al.*, 2003). *In vitro*-Studien haben gezeigt, dass neutralisierende anti-MV-Antikörper vor allem in neuronalen Zellen die virale Genexpression beeinflussen können. So wurde beobachtet, dass neutralisierende, monoklonale anti-H-Antikörper die virale Transkription und Proteinsynthese in persistent infizierten Ratten-Gliom- und Maus-Neuroblastom-Zellen, nicht aber in persistent infizierten Vero-Zellen und Lungenfibroblasten komplett herunter regulierten (Barrett *et al.*, 1985; Schneider-Schaulies *et al.*, 1992). Aber auch in infizierten HeLa-Zellen (immortalisierte Epithelzellen eines Zervixkarzinoms) wurde bei Zugabe polyklonaler anti-MV-Antikörper eine Reduktion von M- und P-Proteinen beobachtet (Joseph and Oldstone, 1974; Fujinami and Oldstone, 1980). Dieser Effekt wird als Antikörper-induzierte Antigenmodulation (*antibody-induced antigenic modulation*, AIAM) bezeichnet, welcher die Entstehung einer langsam persistierenden viralen Infektion begünstigen kann (Reuter and Schneider-Schaulies, 2010).

Im CSF von SSPE-Patienten wurden außerdem erhöhte Level von Typ1-Interferonen nachgewiesen, welche möglicherweise ebenfalls zur Persistenzentstehung von MV beitragen. Das durch IFN- α/β -induzierte MxA-Protein übt einen direkten antiviralen Effekt *in vitro* aus und wurde bei SSPE-Patienten in der Nähe von Läsionen in Gliazellen gefunden (Schnorr *et al.*, 1993; Schneider-Schaulies *et al.*, 1994; Lampe *et al.*, 2003; Ogata *et al.*, 2004). *In vitro*-Experimente haben gezeigt, dass im Gegensatz zu Astrozytom-Zellen die Infektion von Neuroblastom-Zellen mit MV nicht zur Aktivierung von NF- κ B und somit auch nicht zur Induktion von IFN- α/β sowie MHC-Klasse-I-Molekülen führt (Dhib-Jalbut *et al.*, 1999; Fang *et al.*, 2001); dies könnte ein Hinweis darauf sein, wieso MV vor allem in neuronalen Zellen persistiert. Desweiteren ist, wie bereits im Kapitel 1.3 besprochen, die durch WT-MV induzierte Interferon-Induktion im Allgemeinen schwächer als die durch MV-Vakzine induzierte IFN-Antwort, was ebenfalls zur Persistenzentstehung beitragen könnte (Naniche *et al.*, 2000).

Ein weiterer Mechanismus, der zur Persistenzentstehung von MV beiträgt, ist die bereits in den Kapiteln 1.1.3 und 1.2.3. angesprochene, stark eingeschränkte bzw. nicht vorhandene Expression der

viralen Hüllproteine H, F und M, wohingegen der virale RNP-Komplex vermehrt repliziert wird (Rima *et al.*, 1995; Schneider-Schaulies *et al.*, 1999b). Insbesondere das M-Protein sowie der zytosplasmatische Teil des F-Proteins beinhalten eine Reihe von einzelnen Mutationen, Hypermutationen und Deletionen, welche letztendlich dazu führen, dass die Proteine nicht richtig exprimiert werden, dass das *budding* der Viruspartikel reduziert wird und stattdessen die Zell-Fusion unterstützt wird. Untersuchungen von SSPE-Patienten haben gezeigt, dass die virale Polymerase bei der Transkription des Maserngenoms sogenannte *read-through*-Transkripte generieren kann, d.h. anstatt wie normalerweise am Ende des Gens die Transkription zu unterbrechen, läuft die Polymerase einfach bis zum nächsten Gen weiter und erzeugt somit zusammen hängende Transkripte, die jedoch nicht in funktionelle Proteine umgeschrieben werden können. Es gibt jedoch kontroverse Ergebnisse darüber, ob Änderungen in den jeweils betroffenen Gen-Regionen bzw. intergenischen Sequenzen selbst dafür verantwortlich sind (Cattaneo *et al.*, 1986; Cattaneo *et al.*, 1987) oder ob der Grund für diese Fehlfunktion der Polymerase woanders liegt (Yoshikawa *et al.*, 1990; Ayata *et al.*, 2002). Im Gegensatz zu den sehr häufigen Mutationen der H-, F- und M-Proteine weist die Polymerase L die wenigsten Mutationen auf und stellt somit den konstantesten Teil des persistierenden Maserngenoms dar (Baczko *et al.*, 1986; Cattaneo *et al.*, 1988; Reuter *et al.*, 2006).

1.6 Die wichtigsten Tiermodelle in dieser Arbeit

1.6.1 Mausmodell der persistierenden ZNS-Infektion in C57BL/6

Als Tiermodell für eine virale Infektion wurde in unserer Arbeitsgruppe eine persistierende ZNS-Infektion in Mäusen mit einem neurotrophen, rekombinanten Masernvirus (rMV^{Edtag}eGFP-CAMH) etabliert, welches das Hüllprotein H eines an Nager angepassten Virusstammes (CAM/RB) enthält (Duprex *et al.*, 1999a; Schubert *et al.*, 2006). Der besondere Vorteil dieses Modells ist, dass eine durch das grün fluoreszierende Protein (GFP) leicht detektierbare ZNS-Infektion in normalen immunkompetenten Mäusen entsteht; die transgene Expression eines MV-Rezeptors ist also nicht erforderlich. Somit können Mäuse mit verschiedenen Immundefekten ohne Einkreuzung eines Rezeptors verwendet werden. Die Vorarbeiten von Frau Schubert zeigten, dass zwei Wochen alte C57BL/6-Mäuse nach intrazerebraler (*intracerebral*, i.c.) Infektion mit dem rekombinanten Virus zu über 80% eine persistierende ZNS-Infektion entwickeln, wobei über einen Beobachtungszeitraum von mindestens sieben Wochen GFP-positive Neuronen nachweisbar bleiben. Der Verlauf der persistierenden Infektion lässt sich durch Immunisierung mit inaktiviertem MV vor, aber nicht nach der akuten ZNS-Infektion modulieren. Infiltrierende CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen sind histologisch mit

rotem fluoreszierendem Farbstoff in Kombination mit infizierten Zellen (GFP) darstellbar und belegen die zelluläre Immunreaktion im Gehirn der Tiere (Schubert *et al.*, 2006).

1.6.2 Die DEREГ-Maus – Depletion regulatorischer Foxp3⁺ T-Zellen *in vivo*

Diphtherietoxin (DT) ist ein Exotoxin, das von *Corynebacterium diphtheriae* produziert wird und aus zwei Untereinheiten besteht: die B-Untereinheit bindet an den humanen DT-Rezeptor (*heparin binding EGF-like growth factor, hbEGF*) und vermittelt damit die Aufnahme von DT in die Zelle (Naglich *et al.*, 1992); die A-Untereinheit wird nach der Endozytose freigesetzt und katalysiert die ADP-Ribosylierung des Elongationsfaktors 2 (EF2), was zur Folge hat, dass EF2 die Translokation der wachsenden Polypeptidkette in der Zelle nicht mehr katalysieren kann. Dadurch wird die Proteinsynthese der Zelle gehemmt, was letztendlich zur schnellen Apoptose der Zelle führt (Stryer *et al.*, 2003).

Aufgrund der Tatsache, dass murine Zellen resistent gegen DT sind (Pappenheimer *et al.*, 1982) und dass die Wirkungsweise von DT streng Rezeptor-gebunden ist (Naglich *et al.*, 1992), wurde von der Arbeitsgruppe von Tim Sparwasser die DEREГ-Maus entwickelt (Lahl *et al.*, 2007). Die Abkürzung DEREГ steht für *depletion of regulatory T cells* – diese Tiere exprimieren ein auf BAC (*bacterial artificial chromosome*)-Technologie basierendes Fusionsprotein bestehend aus eGFP und dem humanen Diphtherietoxin-Rezeptor unter der Kontrolle des Foxp3-Promotors, d.h. ausschließlich Foxp3⁺ Zellen tragen diesen Rezeptor auf der Zell-Oberfläche. Mit Hilfe der BAC-Technologie werden große Fragmente genomischer DNA, die neben dem *gene of interest* auch regulatorische Elemente enthalten, in das Wirtsgenom eingefügt. Im Fall der DEREГ-Maus wurde ein BAC-Transgen eingefügt, welches im ersten Exon des Foxp3-Gens ein Gen für das Fusionsprotein DTR-eGFP enthält. Damit lassen sich Foxp3⁺ Zellen *ex vivo* in der Durchflusszytometrie aufgrund des GFP-Signals verfolgen. Außerdem lassen sich spezifisch diese Zellen durch intraperitoneal (i.p.) Injektion von DT *in vivo* depletieren, indem DT an den DT-Rezeptor auf der Zelloberfläche der Foxp3⁺ Zellen bindet und Apoptose einleitet.

Im Jahr 2003 wurde der Transkriptionsfaktor Foxp3 als der bis heute spezifischste Marker für regulatorische T-Zellen (T_{reg}) identifiziert (Hori *et al.*, 2003; Fontenot *et al.*, 2003; Khattri *et al.*, 2003). Somit löste er den bis dahin gültigen T_{reg}-Marker CD25 ab, welcher auch auf aktivierten CD4⁺ T-Zellen exprimiert wird (Sakaguchi *et al.*, 1995). Damit stellt die DEREГ-Maus ein ideales Tiermodell für die *in vivo* Depletion Foxp3⁺ T_{reg} dar ohne die Funktion CD25⁺ Effektor-T-Zellen zu beeinflussen. In früheren, konventionellen Depletions-Protokollen wurden T_{reg} mit Hilfe von anti-CD25 Antikörpern *in vivo* eliminiert (Taguchi and Takahashi, 1996; McHugh and Shevach, 2002). Jedoch gibt es auch CD25⁻ T_{reg}, vor allem in peripherem Gewebe, welche in diesem Depletions-Protokoll „übergangen“ werden

(Sakaguchi, 2005; Needham *et al.*, 2006; Leithauser *et al.*, 2006). Da CD25 auch auf aktivierten, konventionellen T-Zellen exprimiert wird, würden diese ebenfalls durch anti-CD25-Depletion verloren gehen; eine Interpretation der Daten, die nach CD25-Depletion erhalten werden, könnten somit nicht eindeutig auf T_{reg} zurück geführt werden (Onizuka *et al.*, 1999; Suttmüller *et al.*, 2001; Needham *et al.*, 2006).

1.7 Die Bedeutung regulatorischer T-Zellen bei viralen Infektionen

Regulatorische T-Zellen, auch bekannt als Suppressor-T-Zellen, unterdrücken die Proliferation und Zytokin-Produktion naiver T-Zellen sowie Gedächtnis-T-Zellen. Sie halten die immunologische Selbst-Toleranz und das immunologische Gleichgewicht aufrecht (Sakaguchi, 2004). In den 1970er Jahren entstand die Idee, dass die Immunantwort durch Suppressor-Zellen begrenzt wird (Gershon and Kondo, 1970, 1971), jedoch wurde sie für lange Zeit nicht weiter verfolgt – hauptsächlich wohl aus dem Grund, dass es keinen eindeutigen Marker für die Identifizierung dieser Zellen gab. Seit der Entdeckung von CD25 sowie vor allem Foxp3 als Marker für regulatorische T-Zellen (vgl. Kapitel 1.6.2), gab es eine Vielzahl wissenschaftlicher Arbeiten, die überwiegend zum Thema Autoimmunität veröffentlicht wurden (Sakaguchi *et al.*, 1995; Thornton and Shevach, 1998; Maloy and Powrie, 2001; Sakaguchi, 2005).

Aber auch im Bereich der Infektionskrankheiten nahmen die Untersuchungen zur Bedeutung regulatorischer T-Zellen in den letzten Jahren immer mehr zu (Belkaid *et al.*, 2002; McGuirk *et al.*, 2002; Suvas *et al.*, 2003; Rouse *et al.*, 2006). Untersuchungen haben gezeigt, dass die Depletion von T_{reg} während der akuten Phase viraler Infektionen die Entstehung von erschöpften T-Zellen (*exhausted T cells*) verhindert und die antivirale Immunantwort verbessert. Auch während der persistierenden Phase viraler Infektionen konnte die antivirale Immunantwort nach T_{reg} -Depletion verbessert werden – Virus-spezifische T-Zellen wurden re-aktiviert und die Viruslast reduziert (Li *et al.*, 2008; Zelinskyy *et al.*, 2009b; Zelinskyy *et al.*, 2009a; Myers *et al.*, 2009; Dietze *et al.*, 2011). Im Gegensatz dazu sind manche Viren in der Lage, selbst die Expansion von T_{reg} zu fördern, um somit antivirale zytotoxische T-Zellen zu supprimieren, die Persistenzentstehung des Virus zu fördern aber gleichzeitig auch die virale Immunpathogenese, d.h. Gewebe- bzw. Zellschäden, die aufgrund der antiviralen Immunantwort entstehen, einzuschränken (Iwashiro *et al.*, 2001; Dittmer *et al.*, 2004; Vahlenkamp *et al.*, 2004; Estes *et al.*, 2006; Krathwohl *et al.*, 2006; Anghelina *et al.*, 2009).

1.8 Zielsetzung dieser Arbeit

In unserer Arbeitsgruppe wurde ein Tiermodell einer persistierenden ZNS-Infektion mit dem neurotrophen, rekombinanten Masernvirus rMV^{E_{dtag}}eGFP-CAMH in 2-Wochen-alten C57BL/6 etabliert. In Fortführung dieser Arbeit sollte im Rahmen meiner Dissertation die zelluläre Immunantwort in Milz, Lymphknoten und Gehirn infolge der intrazerebralen Infektion untersucht werden. Der Fokus sollte dabei auf der Rolle regulatorischer T-Zellen liegen. Die Einwanderung CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in das Gehirn wurde bereits immunhistochemisch während der akuten Infektion belegt (Schubert *et al.*, 2006). Es galt nun die T-Zell-Antwort auch quantitativ mittels Durchflusszytometrie nicht nur während der akuten, sondern auch während der persistierenden ZNS-Infektion zu untersuchen. Desweiteren sollte ein Assay zur Identifizierung Masern-spezifischer T-Zellen etabliert werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollten die Auswirkungen transienter und permanenter Immundefekte auf die persistierende ZNS-Infektion histologisch untersucht werden. Für ersteres wurden regulatorische T-Zellen in der Peripherie mit Hilfe des superagonistischen Maus anti-Maus CD28 monoklonalen Antikörpers expandiert bzw. in DERE_G-Mäusen (*depletion of regulatory T cells*) durch Verabreichung von Diphtherietoxin depletiert. Für letzteres wurde die persistierende ZNS-Infektion in *knock-out*-Mäusen histologisch untersucht, in denen die Funktion vonIDO (Indolamin-2,3-Dioxygenase) ausgeschaltet wurde.

2 Material

2.1 Chemikalien

Agarose	AppliChem (Darmstadt)
Ammoniumchlorid	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Aqua bidest.	Laboreigene Anlage
Benzonase	Novagen (Darmstadt)
Bicinchoninsäure	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Bromphenolblau	AppliChem (Darmstadt)
BSA	AppliChem (Darmstadt)
Calciumchlorid	AppliChem (Darmstadt)
Collagenase	Serva Electrophoresis (Heidelberg)
DABCO	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Dimethylsulfoxid	AppliChem (Darmstadt)
Diphtherietoxin (Cat# 322326; Lot# D00059758 bzw. D00016398)	Calbiochem/Merck (Darmstadt)
EDTA	AppliChem (Darmstadt)
Eisessig	AppliChem (Darmstadt)
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Forene® (Wirkstoff Isofluran)	Abbott (Wiesbaden)
Glycerol	AppliChem (Darmstadt)
Kaliumchlorid	AppliChem (Darmstadt)
Kaliumhydrogencarbonat	AppliChem (Darmstadt)
Kupfer-II-Sulfat	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Magnesiumchlorid	AppliChem (Darmstadt)
Mowiol 4-88	Calbiochem/Merck (Darmstadt)
Natriumazid	AppliChem (Darmstadt)
Natriumcarbonat	AppliChem (Darmstadt)
Natriumchlorid	AppliChem (Darmstadt)
Natriumhydroxid	AppliChem (Darmstadt)
Neutralrot	Merck (Darmstadt)
OPD-Tabletten	Dako (Hamburg)
Paraformaldehyd	Merck (Darmstadt)
Percoll	GE Healthcare (Freiburg)
Phenolrotlösung	Merck (Darmstadt)
Saccharose	AppliChem (Darmstadt)

Salzsäure	AppliChem (Darmstadt)
Schwefelsäure	AppliChem (Darmstadt)
Tris	AppliChem (Darmstadt)
Triton X-100	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Trypanblau	AppliChem (Darmstadt)
Tween20	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Wasserstoffperoxid 30%	AppliChem (Darmstadt)
Xylencyanol FF	Sigma-Aldrich (Steinheim)

2.2 Fertige Lösungen und Reaktionssysteme

AEC Substrat Set	BD Biosciences (San Diego, USA)
DNA-Längenstandard (100bp)	Fermentas (St. Leon-Rot)
Foxp3 Färbe-Puffer-Set	NatuTec (Frankfurt am Main)
Kapa BD 2x Ready Mix	peqLab (Erlangen)
Phusion Blood Direct PCR Kit (F-547S)	Finnzymes (Espoo, Finnland)

2.3 Puffer und sonstige Lösungen

2.3.1 Puffer für die Immunhistochemie

Blockpuffer	PBS mit 10% BSA und 2,5% Triton X-100
Waschpuffer	PBS mit 1% BSA und 0,25% Triton X-100

2.3.2 Puffer für die ELISA-Analysen

Citratpuffer	4 OPD-Tabletten in 12ml H ₂ O, 0,04% (v/v) 30% H ₂ O ₂
<i>Coating</i> -Puffer	50mM Na ₂ CO ₃ , 0,02% (w/v) NaN ₃ pH=9,5, 0,05% (v/v) Phenolrot-Lösung, bei 4°C 2 Wochen haltbar
Inkubationspuffer	1% BSA in Waschpuffer
Waschpuffer	350mM NaCl, 50mM Tris-HCl, pH=7,5, 0,1% (v/v) Tween20

2.3.3 Puffer für die ELISPOT-Analysen

Blockpuffer	RPMI mit 10% FKS und 1% P/S
Verdünnungspuffer	10% FKS in PBS
Waschpuffer	0,05% Tween20 in PBS

2.3.4 Sonstige Puffer und Lösungen

ATV	137mM NaCl, 5mM KCl, 5mM Glucose, 7mM NaHCO ₃ , 0,5g/l Trypsin, 0,2g/l Versene, pH=7,4 (aus Medienküche, Institut für Virologie und Immunbiologie Würzburg)
Dissoziationspuffer	23mM CaCl ₂ , 50mM KCl, 42mM MgCl ₂ , 153mM NaCl
Erythrozyten-Lysepuffer	155mM NH ₄ Cl, 10mM KHCO ₃ , 0,1mM EDTA
FACS-Puffer	0,4% (w/v) BSA, 0,02% (w/v) NaN ₃ in PBS ⁽⁻⁾
Lysispuffer	25mN NaOH, 0,2mM EDTA
Mowiol	2,4g Mowiol 4-88, 6g Glycerol und 6ml H ₂ O auf Magnetrührer 1-2h mischen; Zugabe von 12ml 0,2M Tris-HCl pH=8,5 und Inkubation bei 50°C, 10min; danach bei 4.000g, 20°C 15min zentrifugieren; Überstand mit 2,5% (w/v) DABCO versetzen und bei 37°C lösen; Aliquots à 2ml bei -20°C einfrieren
NTE-Puffer 10x	0,1M Tris, 1M NaCl, 0,01M EDTA, pH=7,4; steril filtrieren
PBBS	123mM NaCl, 4,3mM KCl, 6,5mM Na ₂ HPO ₄ , 1,5mM KH ₂ PO ₄ , 1,3mM CaCl ₂ , 1mM MgCl ₂ ·6H ₂ O, 0,8mM MgSO ₄ ·7H ₂ O, 5mM Glucose, 1% (v/v) Phenolrot (aus Medienküche, Institut für Virologie und Immunbiologie Würzburg)
PBS	138mM NaCl, 2,7mM KCl, 6,5mM Na ₂ HPO ₄ , 1,5mM KH ₂ PO ₄ , 0,9mM CaCl ₂ , 0,5mM MgCl ₂ , pH=7,4 (aus Medienküche, Institut für Virologie und Immunbiologie Würzburg)
PBS ⁽⁻⁾	PBS ohne CaCl ₂ und MgCl ₂ (aus Medienküche, Institut für Virologie und Immunbiologie Würzburg)
PFA 4%	20g PFA in 50ml H ₂ O und 400µl 10N NaOH bei 70°C lösen; mit PBS auf 0,5l auffüllen; bei 4°C lagern
Probenauftragungspuffer 6x	0,25% (w/v) Bromphenolblau, 0,25% (w/v) Xylencyanol FF, 30% Glycerol in H ₂ O; bei 4°C lagern
Saccharose 25%	25g Saccharose in 100ml 1xNTE-Puffer steril filtrieren
TAE-Puffer 50x	2M Tris, 5,71% (v/v) Eisessig, 0,05M EDTA, pH=8,0

2.4 Kulturmedien und Medienzusätze

Agar 2%	2g Bacto-Agar in 100ml H ₂ O (aus Medienküche, Institut für Virologie und Immunbiologie Würzburg)
FKS (fötales Kälberserum)	Invitrogen (Karlsruhe)
MEM und MEM 2x	Zusammensetzung nach Eagle und Levine, 1967 (aus Medienküche, Institut für Virologie und Immunbiologie Würzburg)
Overlay-Mischung	37,5% (v/v) Agar 2%, 37,5% (v/v) MEM 2x, 25% (v/v) MEM mit 5% (v/v) FKS
Penicillin/Streptomycin (P/S)	je 1g/10ml (aus Medienküche, Institut für Virologie und Immunbiologie Würzburg)
RPMI	RPMI 1640 von GibcoBRL (aus Medienküche, Institut für Virologie und Immunbiologie Würzburg)

2.5 Biologisches Material

2.5.1 Zelllinie

Die in dieser Arbeit verwendete Vero-Zelllinie wurde 1962 aus den Epithelzellen der Niere einer Grünen Meerkatze (*Cercopithecus aethiops*) etabliert (ATCC-Nr.: CCL-81™).

Die Zellen wurden in MEM-Medium mit 5% FKS und 1% P/S kultiviert und 2-3x wöchentlich passagiert.

2.5.2 Virusstämme

Virusstamm	Typ	Herkunft
MV ^{Edm}	Laborstamm Edm B Vakzine/60s	Prof. ter Meulen, Institut für Virologie und Immunbiologie Würzburg
rMV ^{Edtag} CAMH	rekombinantes Edm mit dem H-Gen des CAM/RB-Stammes	Paul Duprex, <i>Boston University</i>
rMV ^{Edtag} eGFP-CAMH	eGFP-markiertes rMV ^{Edtag} CAMH	Paul Duprex, <i>Boston University</i> (Ludlow <i>et al.</i> , 2008)
rMV ^{Edtag} HcRed-CAMH	HcRed-markiertes rMV ^{Edtag} CAMH	Linda Rennick, <i>Queen`s University of Belfast</i> (unpublished)

Tab. 1: Übersicht über die verwendeten Masernvirusstämme

2.5.3 Mausstämme

C57BL/6 (J-Stamm) sind Wildtyp-Mäuse aus der Eigenzucht im Institut für Virologie und Immunbiologie Würzburg. Ursprünglich wurden diese Tiere 1921 von C. C. Little gezüchtet.

Alle in dieser Arbeit verwendeten transgenen bzw. *knock-out* (k.o.) Mausstämme basieren auf C57BL/6(J)-Hintergrund.

Die DEREK-Mäuse (Lahl *et al.*, 2007) wurden von Tim Sparwasser (Institut für Infektionsimmunologie, Twincore, Hannover) zur Verfügung gestellt. Sie exprimieren ein Fusionsprotein bestehend aus GFP und dem humanen Diphtherietoxin-Rezeptor unter der Kontrolle des Foxp3-Promotors. Damit lassen sich Foxp3⁺ Zellen *ex vivo* mit Hilfe von GFP detektieren sowie *in vivo* depletieren, indem man den Mäusen Diphtherietoxin (DT) injiziert. Diese Mäuse werden jeweils mit einer WT-Maus verpaart, um transgene Nachkommen zu erhalten, da die reine DEREK-Zucht (homozygot x homozygot) nicht möglich ist. Die Nachkommen müssen dadurch immer wieder auf das Transgen getestet werden.

Die IDOk.o.-Mäuse wurden von Andrew L. Mellor (Georgia Health Sciences University, Augusta, USA) zur Verfügung gestellt (Mellor *et al.*, 2003). Das Neomycin-Gen wurde ersatzweise für Exon 3-5 in das IDO-Gen eingefügt. Dadurch wurde die natürliche Funktion von IDO abgeschaltet. Diese Tiere sind in Bezug auf den *knock-out* homozygot und lassen sich analog zum Wildtyp züchten (homozygot x homozygot). Sie zeigen keine spontanen Autoimmunerkrankungen oder Veränderungen in der Entwicklung des Immunsystems.

2.6 Primer (Oligonukleotide)

Name	Sequenz (5'-3'-Orientierung)
DEREG5-fw	aggcaagggactaggaaga
DEREG5-rev	ccaccacagccaggatagtt
neomycin-2_fw	ctgtgctcgacgttgcact
neomycin1_rev	gctcttcgtccagatcatcc

Tab. 2: Übersicht über die verwendeten Primer zum Nachweis des Genotyps der Mäuse

2.7 Antikörper

2.7.1 Antikörper zur Expansion von T_{reg}

Maus anti-Maus CD28 monoklonaler
Antikörper (D665)

Prof. Dr. T. Hünig, Institut für Virologie und
Immunbiologie Würzburg (Hünig, 2007)

2.7.2 FACS-Antikörper und Pentamer

Alle verwendeten FACS-Antikörper sind monoklonale Antikörper aus der Maus.

Spezifität	Klon	Markierung	Quelle
CD3	145-2C11	FITC	BD-Biosciences (Heidelberg)
CD4	RM4-5	PE, PerCP	BD-Biosciences (Heidelberg)
CD8	Ly-2	PE, PerCP	BD-Biosciences (Heidelberg)
CD19	1D3	FITC	BD-Biosciences (Heidelberg)
CD25	7D4	FITC	BD-Biosciences (Heidelberg)
Foxp3	FJK-16s	PE	NatuTec (Frankfurt am Main)
IgG1, κ	MOPC-31C	FITC, PE, PerCP	BD-Biosciences (Heidelberg)

Tab. 3: Übersicht über die verwendeten FACS-Antikörper

H-2D^b RIVINREHL

ProlImmune (Oxford, UK)

(R-PE markiertes Pro5 MHC Pentamer)

2.7.3 Antikörper für Immunhistochemie

Kaninchen anti-GFP

Acris Antibodies GmbH (Herford)

Ziege anti-Kaninchen IgG(H+L)-Alexa488

Invitrogen (Karlsruhe)

Ziege anti-Kaninchen IgG(H+L)-Alexa594

Invitrogen (Karlsruhe)

2.7.4 ELISA-Antikörper

Ziege anti-Maus IgG+IgM(H+L)

Jackson Immuno Research (Newmarket, UK)

(Peroxidase-konjugiert)

2.7.5 ELISPOT-Antikörper

Für die ELISPOT-Experimente wurde folgender Kit der Firma BD Biosciences (San Diego, USA) verwendet: „Mouse IFN- γ ELISPOT Set“. Dieser beinhaltet 10 ELISPOT-Platten, einen *Capture*-Antikörper (1mg/ml), einen biotinylierten Detektions-Antikörper (0,5mg/ml) und eine Streptavidin-Meerrettichperoxidase (100x).

2.8 Peptide für die ELISPOT-Analysen

Die in dieser Arbeit verwendeten Peptide wurden von der Firma JPT Peptide Technologies GmbH (Berlin) synthetisiert. Eine detaillierte Auflistung ist der Tab. 6 (vgl. Seite 54) zu entnehmen. Alle Peptide wurden in sterilem DMSO gelöst (Konzentration 10mM).

2.9 Geräte

Absaugflasche	Institut für Virologie und Immunbiologie Würzburg
Analysewaage	A. Hartenstein (Würzburg)
Binokular SZ40	Olympus (Hamburg)
BioPhotometer	eppendorf (Hamburg)
Brutschrank	Heraeus (Gera)
Elektrophoresekammern	Institut für Virologie und Immunbiologie Würzburg
ELISA-Reader BEP®2000	Siemens (München)
FACSCalibur	Becton Dickinson (Heidelberg)
Fluoreszenzmikroskop Aristoplan	Leitz (Wetzlar)
Fluoreszenzmikroskop DM IRE220	Leitz (Wetzlar)
Homogenisator	A. Hartenstein (Würzburg)
Lichtmikroskop	Leica Microsystems (Wetzlar)
Magnetrührer	IKA®-Labortechnik (Staufen)
Mastercycler Gradient	eppendorf (Hamburg)
Pipetten	eppendorf (Hamburg)
Schlauchpumpe MS-Reglo	Ismatec SA (Glattbrugg, Schweiz)
Sezierbesteck	A. Hartenstein (Würzburg)
Spannungsgeräte	A. Hartenstein (Würzburg)
Stahlsiebe	Institut für Virologie und Immunbiologie Würzburg

Stepper	Tridak (Torrington, USA)
Sterilwerkbank	Heraeus (Gera) / Gelaire (Brisbane, Australien)
Thoma-Zählkammer	A. Hartenstein (Würzburg)
Tischzentrifuge	Heraeus (Gera)
Ultrazentrifuge <i>Sorvall Discovery 90SE</i>	Thermo Scientific (Waltham, USA)
UV-Systeme	INTAS (Göttingen)
Vibratom Series 1000	Technical Products International (St. Louis, USA)
Vortex VTX-3000L	A. Hartenstein (Würzburg)
Wasserbad	A. Hartenstein (Würzburg)
Wippschüttler	A. Hartenstein (Würzburg)
Zentrifuge	Hettich (Tuttlingen)

2.10 Verbrauchsmaterial

Einfrierröhrchen	greiner bio-one (Frickenhausen)
Einmal-Spritzen	A. Hartenstein (Würzburg)
Deckgläser	A. Hartenstein (Würzburg)
96cl-ELISPOT-Platten	BD Biosciences (San Diego, USA)
FACS-Röhrchen	Becton Dickinson (Heidelberg)
15ml- und 50ml-Falcon	greiner bio-one (Frickenhausen)
Gelträger	Institut für Virologie und Immunbiologie Würzburg
Glasware	Institut für Virologie und Immunbiologie Würzburg
Kanülen	A. Hartenstein (Würzburg)
Maxi-Sorb 96cl	Nunc (Langenselbold)
Objektträger	A. Hartenstein (Würzburg)
6cl- und 48cl-Platten	greiner bio-one (Frickenhausen)
Rasierklingen	Wilkinson Sword (Solingen)
Reaktionsgefäße	eppendorf (Hamburg)
Pipettenspitzen	A. Hartenstein (Würzburg), Carl Roth (Karlsruhe)
Solofix Blutlanzetten	B. Braun (Melsungen)
UZ-Röhrchen SW28	Kontron (München)
Zellkulturflaschen	greiner bio-one (Frickenhausen)
Zellschaber	A. Hartenstein (Würzburg)

2.11 Software

Für die Aufnahme und Auswertung der Daten am FACSCalibur wurde das Programm *CellQuest Pro* der Firma Becton Dickinson (Heidelberg) verwendet.

Die graphische Auswertung und statistische Bewertung (Student's *t*-test bzw. Two-way ANOVA) der Daten erfolgte mit dem Programm *Prism Version 5.00* der Firma GraphPad (La Jolla, USA).

Die Auswahl der Peptidsequenzen erfolgte mit Hilfe der Programme MAPPP (<http://www.mpiib-berlin.mpg.de/MAPPP/cleavage.html>), BIMAS (http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind/) und Syfpeithi (<http://www.syfpeithi.de/>).

Für die Aufnahme der Bilder am Fluoreszenzmikroskop wurde das Programm *Leica Q Fluoro* der Firma Leica (Wetzlar) verwendet.

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Zellkultur

Die Kultivierung der Zellen erfolgte generell in einem Brutschrank bei 37°C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% und einem CO₂-Gehalt von 5%. Die Vero-Zelllinie wuchs als adhärenter Monolayer. Wenn die Vero-Zellen zu ca. 95% konfluent waren, wurden sie in eine neue Flasche umgesetzt. Dazu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit ATV gewaschen und mit ATV vom Boden der Flaschen abgelöst. Ein Zehntel der Zellen wurde dann in eine neue Flasche mit frischem Medium gesetzt. Das Medium enthielt u.a. 10% FKS, welches vor der Zugabe 30min bei 56°C inaktiviert wurde.

3.1.2 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Thoma-Zählkammer bestimmt. Dazu wurde ein Deckgläschen so auf die Kammer gepresst, dass an den Rändern Newton'sche Ringe zu sehen waren. 10µl einer mit Trypanblau verdünnten Probe wurde auf die Kammer pipettiert und die weißen Zellen in den 16 Großquadraten gezählt. Die Zellzahl ergab sich dann nach folgender Formel:

$$\text{gezählte Zahl} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor} = \text{Zellzahl pro ml}$$

3.2 Virologische Methoden

3.2.1 Virusvermehrung und -präparation verschiedener Masernvirusstämme

Für die Vermehrung der Masernvirusstämme wurden Vero-Zellen in 175cm²-Zellkulturflaschen bis zu einer Dichte von ca. 60-70% kultiviert. Die Infektion dieser Zellen erfolgte bei einer MOI=0,01. Nach 2-3d, wenn sich der maximale zytopathische Effekt (Synzytienbildung) zeigte, wurde das Zellkulturmedium bis auf 3ml pro Flasche entfernt und die Flaschen ü.N. bei -80°C eingefroren (Deckel leicht geöffnet, damit die Flaschen nicht platzen).

Um das Virus zu präparieren, wurden die Flaschen zunächst bei 4°C langsam aufgetaut (Deckel leicht geöffnet). Alle weiteren Arbeiten wurden auf Eis ausgeführt. Nachdem die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers vom Flaschenboden abgelöst wurden, wurde das gesamte Medium in einem 50ml-Falcon gesammelt. Damit zellgebundenes Virus gelöst werden konnte, wurde das gesamte Material mit Hilfe eines Homogenisators („Douncer“, ca. 10mal) homogenisiert. Die Zelltrümmer wurden anschließend bei 4.000U/min (3500g), 10°C 15min pelletiert. Der Überstand wurde letztendlich auf vorgekühlte Einfrierröhrchen verteilt und bei -80°C eingefroren.

3.2.2 Virustiterbestimmung mittels Plaquetitration

Bei der Plaquetitration werden sogenannte Plaques (Infektionsherde; Synzytien oder abgelöste Zellen), die sich im Zellmonolayer ausbilden, gezählt und zur Berechnung des Virustiters verwendet. Dazu wurden zunächst drei 6cl-Platten zu je $1,5 \times 10^5$ Vero-Zellen pro Napf in 2-3ml Medium ausgesät (Dreifachbestimmung) und ü.N. im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine Verdünnungsreihe der Viruspräparation (10^{-1} bis 10^{-7}) hergestellt und davon jeweils 1ml pro Napf auf die Zellen gegeben, nachdem das Medium vom Vortag abgenommen wurde. Die erste Verdünnungsstufe (10^{-1}) wurde dabei jedoch verworfen. Nach einer ein- bis zweistündigen Inkubationszeit im Brutschrank wurde die Virusverdünnung durch 3ml *Overlay*-Mischung (Agar-Medium-Gemisch) ersetzt. Die 6cl-Platten wurden auf dem Kopf liegend (Deckel zeigt nach unten) im Brutschrank für 5d inkubiert, nachdem das Agar-Medium-Gemisch erkaltet war. Die Plaques wurden letztendlich mit Hilfe von Neutralrot, das nur lebende Zellen anfärbt, ausgezählt. Hierzu wurde je 1ml pro Napf einer 1:100 in PBS verdünnten 1,6% (w/v) Neutralrotlösung auf das Agar-Medium-Gemisch gegeben und die Platten ca. 1-2h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die Färbelösung abgekippt und die Platten nochmal auf dem Kopf liegend ü.N. im Brutschrank belassen. Das Auszählen der Plaques erfolgte am nächsten Tag. Das Ergebnis wurde bei z.B. im Durchschnitt vier gezählten Plaques in der Verdünnungsstufe 10^{-6} als ein Virustiter von 4×10^6 pfu/ml angegeben.

3.2.3 Virusaufreinigung mittels Ultrazentrifugation und Proteinbestimmung

Für die Virusaufreinigung mittels Ultrazentrifugation (UZ) wurden analog zu Punkt 3.2.1 (Virusvermehrung und -präparation verschiedener Masernvirusstämme) Zellen infiziert, eingefroren, aufgetaut, abgeschabt und homogenisiert. Die Zelltrümmer wurden anschließend bei 4500U/min (4430g), 10°C 15min pelletiert. Der Überstand wurde mit PBS auf 32ml aufgefüllt. Zuvor unter der Sterilwerkbank mittels UV-Licht sterilisierte UZ-Röhrchen wurden mit je 5ml 25% Saccharose befüllt und anschließend mit 32ml Virusüberstand überschichtet. Es ist darauf zu achten, dass die UZ-Röhrchen bis auf 2-3mm unter dem Rand befüllt sind, da sie andererseits in der UZ kollabieren würden. Desweiteren mussten die Röhrchen bis auf 0,01g genau austariert werden. Die UZ wurde anschließend in der Ultrazentrifuge bei 25.000rpm, 4°C 90min gefahren. Das Pellet wurde nach Abkippen des Überstandes ca. 5min getrocknet, danach in 500µl 1xNTE-Puffer auf Eis schonend gelöst (≈ 30 min) und bei -80°C eingefroren.

Als Kontrollpräparation dienten gleichbehandelte, nicht-infizierte Vero-Zellen.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration der UZ-aufgereinigten Viruspräparation wurde die BCA-Methode verwendet. Hierzu wurden 10µl Probe mit 2ml einer 1:50-Verdünnung von Kupfer-II-Sulfat in Bicinchoninsäure gemischt (vortexen). Der Ansatz wurde 30min bei 37°C inkubiert, anschließend

10min auf Eis abgekühlt und im BioPhotometer von Eppendorf bei 562nm gemessen. Als Negativkontrolle dienten 10µl 1xNTE-Puffer. Außerdem wurde ein Proteinstandard von 1mg/ml zum Vergleich gemessen.

3.3 Tierexperimentelle Methoden

3.3.1 Intrazerebrale Infektion von Mäusen

Für die intrazerebrale (i.c.) Infektion der Mäuse wurden die Tiere zunächst in tiefe Vollnarkose mittels Isofluran versetzt (ca. 3min) und anschließend auf dem Bauch liegend im Nackengriff gehalten. Das Virus wurde mit Hilfe einer 1ml-Tuberculinspritze, die in einem Stepper (Tridak) befestigt war, senkrecht von oben in die linke Hirnhälfte mittig zwischen Auge und Ohr injiziert. Das Injektionsvolumen betrug dabei immer 20µl und die Injektionstiefe ca. 2-3mm. Als Kontrolle diente eine Injektion mit 20µl sterilem PBS.

3.3.2 Intraperitoneale Injektion von MV^{Edm}, D665 und DT

Zur Immunisierung der Mäuse wurden 100µl mit 10⁶pfu MV^{Edm} intraperitoneal (i.p.) gespritzt.

Die Verabreichung von D665 und DT erfolgte ebenfalls intraperitoneal. Die jeweilige Dosis richtete sich dabei nach dem Versuchsablauf und wurde in sterilem PBS entsprechend verdünnt. Das Injektionsvolumen für 100µg D665 betrug 100µl (Stammlösung: 1mg/ml). Das Injektionsvolumen für DT betrug unabhängig von der verabreichten Dosis stets 40µl (Stammlösung: 1µg/µl in sterilem PBS). Als Kontrolle diente jeweils eine Injektion mit sterilem PBS gleichen Volumens.

Eine Narkotisierung der Tiere war in keinem der Fälle nötig; die Tiere wurden lediglich im Nackengriff gehalten, um das Spritzen der jeweiligen Lösungen zu vereinfachen.

3.3.3 Blutentnahme aus Mäusen und Serumgewinnung

Für die Blutentnahme aus lebenden Mäusen wurde die *Vena fascialis* im Unterkieferbereich punktiert. Hierfür wurden die Mäuse in kurzer Vollnarkose (Isofluran, ca. 3min) im Nackengriff gehalten und mit einer 3mm Blutlanzette ca. 5mm dorsokaudal des Haarwirbels (weißer Fleck auf schwarzem Fell bei Mäusen mit C57BL/6-Hintergrund) am Unterkiefer punktiert. Nachdem bis zu 0,5ml Blut in einem 1,5ml Reaktionsgefäß aufgefangen wurden, wurde die Einstichstelle komprimiert, um Hämatome zu vermeiden.

Für die Blutentnahme aus toten Mäusen wurde das Herz punktiert. Hierfür wurden die Mäuse mittels CO₂ getötet, in Rückenlage fixiert und der Brustkorb geöffnet. Das Blut wurde mit Hilfe einer 1ml-Tuberculinspritze aus dem rechten Vorhof abgenommen und in einem 1,5ml Reaktionsgefäß gesammelt.

Nach der Blutentnahme wurden die Proben mindestens 1h auf Eis gelagert (ohne Antikoagulans) und anschließend in der Tischzentrifuge 15min bei 13.000rpm, 4°C zentrifugiert. Das im Überstand befindliche Serum wurde vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es war darauf zu achten, eine Kontamination mit Erythrozyten nach Möglichkeit zu vermeiden. Nach einer Lagerung des Serums ü.N. wurde es erneut 15min bei 13.000rpm, 4°C zentrifugiert, um Reste von Erythrozyten zu entfernen. Der Überstand wurde bei -20°C aufbewahrt.

3.3.4 PFA-Perfusion von Mäusen und anschließende Präparation der Hirne

Um die Hirne für histologische Schnitte verwenden zu können, wurden die Mäuse vor der Sektion mit einer 4%igen PFA-Lösung perfundiert. Dazu wurden die Tiere mittels CO₂ getötet, in Rückenlage fixiert, der Brustkorb geöffnet und der rechte Vorhof mit einer kleinen Schere aufgeschnitten, damit das Blut und die PFA-Lösung während der Perfusion aus dem Körper austreten konnten. Die PFA-Lösung wurde anschließend ca. 5min lang unter Verwendung einer Kanüle (Größe 26G), die an einer Schlauchpumpe befestigt war, langsam durch die linke Herzkammer in den Körper gepumpt. Bei der gesamten Prozedur war darauf zu achten, dass man das Genick des Tieres nicht brach, da sonst die Perfusion nicht erfolgreich war.

Nach der Perfusion wurde der Kopf der Tiere mit einer großen Schere abgetrennt und das Hirn frei präpariert. Die Hirne wurden in einer 4%igen PFA-Lösung mindestens eine Woche bei 4°C fixiert, damit sie die nötige Festigkeit erreichten, bevor sie mit Hilfe des Vibratoms geschnitten werden konnten.

3.3.5 Mausektion ohne vorangegangene Perfusion der Tiere

Für die Anfertigung einer Einzelzellsuspension verschiedener Organe (siehe Kapitel 3.3.6 und 3.3.7) wurden die Mäuse mittels zervikaler Dislokation (Genickbruch) getötet und in Rückenlage fixiert. Danach wurde entlang der *Linea alba* (lat. „weiße Linie“) die Bauchhöhle geöffnet und Entlastungsschnitte an den Hinterbeinen gesetzt. Anschließend wurden die Organe entnommen und bis zur weiteren Verarbeitung in PBBS aufbewahrt.

3.3.6 Isolation von Lymphozyten aus ZNS von Mäusen

Für die Isolation von Lymphozyten aus dem Gehirn wurde jeweils das komplette Hirn aus der Maus entnommen und inklusive Meningen aufgearbeitet. Das Gehirn wurde zunächst in 5ml PBBS-3% FKS durch ein steriles Stahlsieb gerieben. Die Einzelzellsuspension wurde in ein 50ml-Falcon überführt, auf 20ml mit PBBS-3% FKS aufgefüllt und bei 170g, 10°C 10min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1,4ml Dissoziationspuffer (inkl. 0,4U Collagenase und 50U Benzoyl-DNAse) resuspendiert und unter gelegentlichem Schwenken 1h bei 37°C inkubiert. Die Suspension wurde anschließend auf 20ml mit PBBS aufgefüllt und erneut bei 170g, 10°C 10min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10ml isoton. Percoll der Dichte 1,088g/ml resuspendiert und in ein neues 50ml-Falcon überführt. Diese Suspension wurde mit 5ml isoton. Percoll der Dichte 1,112g/ml unterschichtet und anschließend nacheinander mit je 9ml isoton. Percoll der Dichte 1,078g/ml, 1,05g/ml und 1,03g/ml und abschließend mit 9ml PBBS überschichtet. Die Zusammensetzung der verschiedenen Percoll-Lösungen ist der Abb. 1A zu entnehmen. Der Gradient wurde bei 1500g, 20°C 45min zentrifugiert (Beschleunigung und Bremse auf niedrigster Stufe). Die Lymphozyten wurden von der 1,088-1,078g/ml Interphase und von der 1,078-1,05g/ml Interphase abgenommen (vgl. Abb. 1B), in ein neues 50ml-Falcon überführt, auf 50ml mit PBBS aufgefüllt und bei 1200U/min (310g), 10°C 10min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 300µl PBBS resuspendiert und für weitere Analysen verwendet. Die Lymphozyten-Fraktion enthielt außerdem Mikroglia-Zellen (vgl. Abb. 1B).

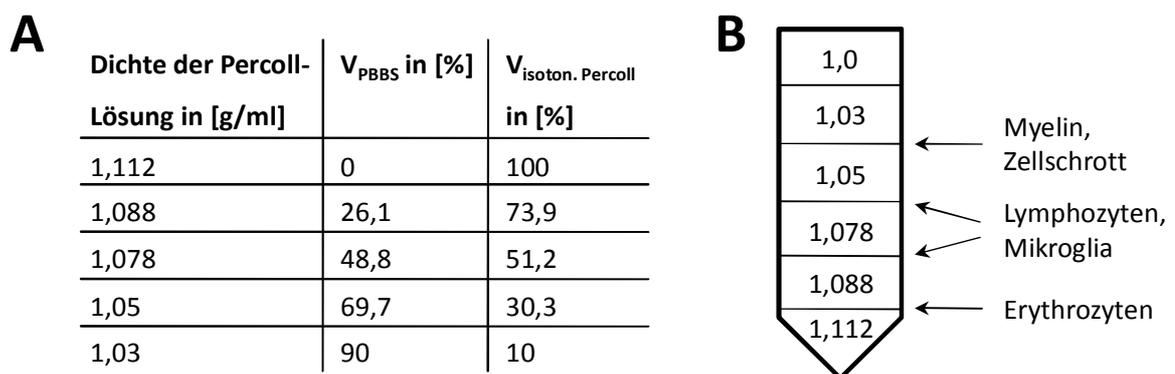


Abb. 1: Percoll-Gradient zur Isolation von Lymphozyten aus dem Gehirn

(A) Übersicht über die verwendeten Percoll-Lösungen und deren Zusammensetzung (isoton. Percoll entspricht 10% 1,5M NaCl in Percoll). (B) Schematische Darstellung des Percoll-Gradienten und Angabe der Zellpopulationen in den entsprechenden Interphasen nach Zentrifugation des Gradienten.

3.3.7 Herstellung einer Milz- bzw. Lymphknotenzellsuspension

Milz bzw. Lymphknoten wurden in 4ml PBBS durch ein steriles Stahlsieb zerrieben. Die Einzelzellsuspension wurde in ein 15ml-Falcon überführt, auf 13ml aufgefüllt und bei 1200U/min (310g), 10°C 10min zentrifugiert. Das Zellpellet der Milz wurde anschließend in 1-2ml Erythrozyten-Lysepuffer resuspendiert und ca. 3min inkubiert. Der Erythrozyten-Lysepuffer wurde nach Zugabe von 10ml PBBS abzentrifugiert (310g, 10°C, 10min). Das Zellpellet, welches außerdem APCs enthielt, wurde letztendlich in einer geeigneten Menge PBBS (0,5-5ml zu einer Endkonzentration von 1×10^6 Zellen/ml) resuspendiert.

3.4 Histologische Methoden

3.4.1 Anfertigung histologischer Schnitte von Mäusehirnen

PFA-fixierte Hirne wurden in einem mit PBS⁽⁻⁾ gefülltem Vibratom geschnitten. Die Schneidwirkung wird dabei durch eine vibrierende Rasierklinge erzeugt. Zunächst wurden das Kleinhirn und die Medulla oblongata (verlängertes Mark) entlang einer koronalen Linie mit einer Rasierklinge entfernt (vgl. Abb. 2) und das Großhirn auf dieser Schnittfläche auf dem Schneideblock aufgeklebt. Gegebenenfalls wurde analog mit dem Kleinhirn verfahren. Anschließend wurden 100µm dicke Hirnschnitte angefertigt und auf einem Objektträger in Mowiol eingedeckelt. Die Gewebeschnitte wurden mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes ausgewertet.

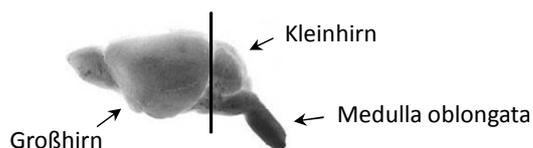


Abb. 2: Seitliche Ansicht eines Mäusehirns

Gezeigt wird die Lage des Großhirns im Vergleich zum Kleinhirn. Der Balken zwischen dem Groß- und Kleinhirn zeigt die Schnittfläche an.

3.4.2 Immunhistochemische Färbung histologischer Schnitte

Nachdem die Hirnschnitte am Vibratom angefertigt wurden, wurden sie für die immunhistochemische Färbung in eine 48cl-Platte überführt und zunächst 1h bei RT in 300µl Blockpuffer geschwenkt. Anschließend wurden sie in 500µl Waschpuffer 10min auf dem Wippschüttler bei RT inkubiert. Die Färbung mit dem Erstantikörper Kaninchen anti-GFP (100µl einer 1:100-Verd. in Waschpuffer \triangleq 10µg/ml) erfolgte auf dem Wippschüttler ü.N. bei 4°C. Am nächsten

Tag wurden die Schnitte 5x mit je 500µl Waschpuffer 10min auf dem Wippschüttler bei RT gewaschen. Die Färbung mit dem Zweitantikörper Ziege anti-Kaninchen IgG(H+L)-Alexa488 (100µl einer 1:100-Verd. in Waschpuffer \triangleq 20µg/ml) erfolgte auf dem Wippschüttler für 1,5h bei RT. Nachdem die Schnitte erneut 5x mit je 500µl Waschpuffer 10min bei RT gewaschen wurden, wurden sie wie gewohnt auf einem Objektträger mit Mowiol eingedeckelt.

3.5 Molekularbiologische Methoden

3.5.1 Isolation genomischer DNA

Für die Isolation genomischer DNA aus murinen Gewebeproben (1mm Schwanzspitze oder 1mm² Ohrstück) wurden diese in einem 0,5ml Reaktionsgefäß in 25µl Lysispuffer 1h bei 95°C erhitzt (Mastercycler mit Deckeltemperatur = 105°C), anschließend auf Eis abgekühlt und mit 25µl 40mM Tris-HCl pH=7,4 versetzt. Für die anschließende PCR wurden 2µl eingesetzt.

3.5.2 Polymerase-Kettenreaktion zur Genotypisierung

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wird ein bestimmtes DNA-Fragment *in vitro* vervielfältigt. Dazu benötigt man sequenzspezifische Primer (Oligonukleotide), die nur in diesem DNA-Abschnitt binden. Die PCR besteht aus drei Schritten: (i) Denaturierung – die beiden Stränge der Template-DNA werden getrennt, (ii) Annealing – die Primer hybridisieren mit der Template-DNA, (iii) Elongation – die Polymerase verlängert templateabhängig die Primer.

Der Ansatz für eine PCR sah folgendermaßen aus:

10µl-Ansatz: 2µl DNA
 1µl 10µM *sense* Primer
 1µl 10µM *antisense* Primer
 5µl PCR-Mix (Kapa BD 2x Ready Mix oder Phusion Blood Direct PCR Kit)
 1µl H₂O

Das PCR-Programm wurde nach folgendem allgemeinen Muster durchgeführt:

1x: 94°C 2min (Denaturierung)
 ?x: 94°C 1min (Denaturierung)
 ?°C ?min (Annealing; ca. 5°C unterhalb der Schmelztemperatur der Primer)
 72°C ?min (Elongation)
 1x: 72°C 10min (Elongation)

Die exakten Angaben für die Annealing-Temperatur und die Zeitangaben variieren je nach Primerkombination und sind der Tab. 4 zu entnehmen.

Nachzuweisendes Gen/Eigenschaft	DEREG	B6.IDOk.o.
<i>sense</i> Primer	DEREG5_fw	neomycin-2_fw
<i>antisense</i> Primer	DEREG5_rev	neomycin-1_rev
Annealing - Temp.	60°C	60°C
Annealing - Zeit	1min	30sec
Elongation - Zeit	20sec	30sec
Anzahl der Zyklen	40	35
Größe des Fragments	209bp	249bp

Tab. 4: Übersicht über die verwendeten PCR-Programme

3.5.3 Aufreinigung mittels Agarosegelelektrophorese

Die Produkte der PCR wurden auf 1,5%igen Agarosegelen unter Verwendung eines 6x Probenauftragspuffers 1h bei 110V in 1x TAE-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Herstellung eines Gels wurde die entsprechende Menge Agarose in 1x TAE-Puffer aufgekocht, mit Ethidiumbromid (1µg/ml Endkonzentration) ergänzt und in eine Gelkammer gegossen, in der sich ein Kamm befand, der die Geltaschen formte. Das Gel wurde nach der Elektrophorese mit Hilfe eines UV-Systems von INTAS photographiert.

3.6 Immunologische Methoden

3.6.1 FACS-Analyse (Durchflusszytometrie)

Mittels der FACS-Analyse (*fluorescence activated cell scanning*) werden die Zellen nach ihrer Größe (wiedergegeben durch FSC), ihrer Granularität (wiedergegeben durch SSC) und ihren Oberflächeneigenschaften sowie intrazellulären Markern beurteilt. Man kann somit eine Aussage über den Reinheitsgrad einer Kultur treffen bzw. darüber, welche Zellen insgesamt in der Kultur vorhanden sind (qualitative und quantitative Bestimmung).

Dazu wurden für die Oberflächen-Färbung die Zellen zu je ca. 1×10^6 in 3ml FACS-Puffer auf FACS-Röhrchen verteilt, bei 1200U/min (310g), 10°C 5min pelletiert und mit dem gewünschten Antikörper 20min bei 4°C im Dunkeln inkubiert (0,5µl Ak in 100µl FACS-Puffer pro FACS-Röhrchen). Die Färbung mit dem Pentamer H-2D^b RIVINREHL erfolgte gleichzeitig mit der Ak-Färbung, mit dem Unterschied, dass 5µl Pentamer pro FACS-Röhrchen eingesetzt wurden und die Inkubation bei 4°C im Dunkeln insgesamt 30min statt nur 20min erfolgte. Die Antikörper und das Pentamer sind jeweils an einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, so dass das FACS-Gerät die Zellen anhand der Fluoreszenz auf ihrer Oberfläche unterscheiden kann. Danach wurden die Zellen mit je 3ml FACS-Puffer gewaschen, bei 1200U/min (310g), 10°C 5min pelletiert und in je 1ml FACS-Puffer aufgenommen.

Für die intrazelluläre Färbung wurden die Zellen direkt nach der Oberflächen-Färbung 1x mit 1-2ml FACS-Puffer gewaschen, pelletiert (310g, 10°C, 5min) und anschließend in 500µl Fix-Perm-Puffer (1 Teil Konzentrat und 3 Teile Diluent) resuspendiert und 1h bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit 500µl Perm-Puffer (1:10 in H₂O verdünnt; Zellen bei 310g, 10°C, 5min pelletieren) wurden die Zellen mit dem Antikörper 30min bei RT im Dunkeln inkubiert (1µl Ak in 100µl Perm-Puffer [1:10 in H₂O verdünnt] pro FACS-Röhrchen). Danach wurden die Zellen mit je 3ml FACS-Puffer gewaschen, bei 310g, 10°C 5min pelletiert und in je 1ml FACS-Puffer aufgenommen.

Die Zell-Analyse erfolgte mit Hilfe des FACSCalibur der Firma Becton Dickinson. In der Regel wurden 10.000 Zellen pro FACS-Röhrchen während der Analyse gemessen.

3.6.2 ELISA

Der enzymgekoppelte Immunadsorptionstest (*enzyme linked immunosorbent assay*), kurz ELISA, ist ein immunologisches Nachweisverfahren, das auf einer enzymatischen Farbreaktion beruht. Somit können Antigenkonzentrationen anhand des Substratumsatzes bestimmt werden. In dieser Arbeit wurde der Sandwich-ELISA angewendet. Prinzipiell wird dabei das gewünschte Antigen durch einen *Capture*-Antikörper abgefangen und mittels eines Detektions-Antikörpers nachgewiesen, der an ein Enzym gekoppelt ist, welches für die Farbreaktion verantwortlich ist.

Zunächst wurde ü.N. bei 4°C eine 96cl-Maxi-Sorb-Platte mit 1µg pro Napf einer UZ-gereinigten MV^{Edm}- bzw. Kontroll-Präparation beschichtet, die zuvor in Glasgefäßen in *Coating*-Puffer zu einer Endkonzentration von je 10µg/ml verdünnt wurden. Die Kontroll-Präparation wurde immer in den ungeraden Spalten und die MV^{Edm}-Präparation in den geraden Spalten pipettiert. Am nächsten Tag wurden zunächst die Verdünnungsreihen der zu untersuchenden Proben sowie der Kontrollen (Positiv- und Negativkontrolle) angesetzt. Die verwendeten Verdünnungen sind der Tab. 5 zu entnehmen. Anschließend wurde der *Coating*-Puffer abgeschüttet, die Platte 5x mit Waschpuffer gewaschen und gut trocken geklopft. Danach wurden je 100µl jeder Verdünnungsstufe auf je einen Kontroll- und einen MV^{Edm}-beschichteten Napf pipettiert und 1h bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert (Einfachbestimmung).

Nr.	Verdünnungsstufe	V _{Inkubationspuffer}	V _{Serum-Probe}
1	1:20	285µl	15µl aus Originalprobe
2	1:50	294µl	6µl aus Originalprobe
3	1:80	296,25µl	3,75µl aus Originalprobe
4	1:200	298,5µl	1,5µl aus Originalprobe
5	1:320	225µl	75µl aus 3
6	1:1280	225µl	75µl aus 5
7	1:5120	225µl	75µl aus 6
8	1:20480	225µl	75µl aus 7

Tab. 5: Übersicht über die verwendeten Serum-Verdünnungsstufen

Danach wurde die Platte wieder 5x mit Waschpuffer gewaschen, gut trocken geklopft und anschließend mit je 100µl pro Napf einer 1:3.000-Verdünnung des Detektions-Antikörpers Ziege anti-Maus IgG+IgM(H+L) (in Inkubationspuffer verdünnt) 1h bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach weiteren 5 Waschschritten erfolgte die Farbreaktion. Dazu wurde die Platte wieder gut trocken geklopft und 100µl pro Napf Citratpuffer (vor dem letzten Waschschritt ansetzen) pipettiert und die Platte anschließend ca. 10-15min dunkel gestellt. Nach erfolgreicher Gelbfärbung des Citratpuffers wurde die Reaktion mit 100µl pro Napf 0,5M H₂SO₄ abgestoppt (Farbumschlag nach braun). Die Messung der Extinktion erfolgte innerhalb der nächsten 60min am ELISA-Reader (Virusdiagnostik, Institut für Virologie und Immunbiologie, Universität Würzburg) bei 492nm/650nm.

3.6.3 IFN- γ -ELISPOT-Assay

Der ELISPOT-Assay (*enzyme linked immuno spot assay*) ist ein sehr sensibles Verfahren mit dem man Zellaktivierung auf Einzelzellniveau messen kann. Dazu werden die gewünschten Zellen in einer ELISPOT-Platte inkubiert und zur Zytokinausschüttung angeregt. Die freigesetzten Zytokine werden mit Hilfe eines Antikörpers, der an der Oberfläche der Mikrotiterplatte gekoppelt ist, „aufgefangen“. Die Stelle, wo die Zytokine ausgeschüttet werden, kann man anschließend über Verknüpfung mit einem Detektionsantikörper und einer Meerrettichperoxidase durch einen „Spot“ sichtbar machen.

Zunächst beschichtete man die 96cl-ELISPOT-Platten steril ü.N. bei 4°C mit dem gereinigten anti-Maus IFN- γ Antikörper (*Capture Antibody*; 100 μ l einer 1:200-Verdünnung in PBS pro Napf), der das freizusetzende IFN- γ bindet. Am nächsten Tag wurde der *Capture-Ak* steril abgesaugt, 1x mit Blockpuffer gewaschen (200 μ l pro Napf) und die Platte 2h im Brutschrank bei 37°C mit dem Blockpuffer (200 μ l pro Napf) gelagert. In dieser Zeit wurden die Zellen vorbereitet, so dass anschließend je 100 μ l mit 10⁵ Zellen pro Napf ausgesät werden konnten. Außerdem wurden die Peptide, welche die Zytokinproduktion stimulieren sollten, so in RPMI verdünnt, dass 100 μ l pro Napf pipettiert werden konnten, die eine Endkonzentration von 2,5 μ M Peptid ergaben. Als Positivkontrolle für die IFN- γ -Ausschüttung wurde 2,5 μ g/ml ConA verwendet. Als Negativkontrolle wurden die Zellen ohne weitere Zusätze – also pur in Medium – inkubiert. Jede Reaktion wurde – im Gegensatz zum ELISA – in Triplets angesetzt. Die Inkubationszeit der Zellen auf den ELISPOT-Platten betrug 20h. Die nach dieser Inkubation folgenden Arbeitsschritte wurden unsteril verrichtet. Nachdem die Zellsuspension abgesaugt wurde, wurden die Platten 2x mit Aqua bidest. (200 μ l pro Napf; kurz einwirken lassen) und 3x mit Waschpuffer (200 μ l pro Napf; kurz einwirken lassen) gewaschen. Danach wurden die Platten mit dem biotinyliertem anti-Maus IFN- γ Detektions-Antikörper 2h bei RT im Dunkeln inkubiert (100 μ l pro Napf einer 1:250-Verdünnung in Verdünnungspuffer). Anschließend wurden nach zwei weiteren Waschschritten mit Waschpuffer die Platten mit der Meerrettichperoxidase-Lösung (100 μ l pro Napf einer 1:100-Verdünnung in Verdünnungspuffer) 1h bei RT im Dunkeln inkubiert. Zum Schluss wurden die Platten 2x mit Waschpuffer und 2x mit PBS gewaschen. Die Reaktion wurde schließlich mit der Final-Substrat-Lösung (2% Chromogen in AEC-Substrat; 15min vorher mischen; 100 μ l pro Napf) im Dunkeln gestartet. Die Entwicklung der Punkte (Spots) sollte im Abstand von 5min beobachtet werden, da sie sehr schnell vonstatten gehen kann. Spätestens aber nach 20min wurde die Reaktion mit Aqua bidest. (100 μ l pro Napf) gestoppt und die Platte ü.N. bei RT im Dunkeln getrocknet. Die Auszählung der Spots erfolgte mit Hilfe eines Binokulars.

4 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte die Immunantwort nach intrazerebraler (i.c.) Infektion mit rMV^{Edtag}eGFP-CAMH charakterisiert werden. Zur Identifizierung Masern-spezifischer T-Zellen wurden ein MV-spezifischer IFN- γ -ELISPOT-Assay und eine Pentamer-Färbung für das Peptid MV-H₂₂₋₃₀ (RIVINREHL) etabliert. Desweiteren sollte untersucht werden, inwieweit regulatorische T-Zellen (T_{reg}) nach i.c. Infektion ins Gehirn einwandern. Zusätzlich wurde die Zahl dieser Zellen in der Peripherie manipuliert, um den Einfluss der T_{reg}-Expansion sowie -Depletion auf die zerebrale Infektion zu untersuchen.

4.1 Charakterisierung der zerebralen MV-Infektion im Mausmodell

Basierend auf den Vorarbeiten von Frau Kendl (Schubert *et al.*, 2006) wurde zunächst die persistierende ZNS-Infektion mit dem rekombinanten Masernvirus rMV^{Edtag}eGFP-CAMH ausführlicher charakterisiert. Das Virus exprimiert neben den Masernproteinen – Nukleokapsid (N), Phosphoprotein (P), Matrixprotein (M), Fusionsprotein (F), Hämagglutinin (H) und Polymerase (L) – auch das grün fluoreszierende Protein (eGFP) als Reporterprotein, welches in der Expressionskassette an erster Stelle steht. Da eGFP nur dann exprimiert wird, wenn die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase aktiv ist, wird gewährleistet, dass ausschließlich infizierte Zellen grün leuchten. Außerdem wurde das ursprüngliche Hämagglutinin-Protein gegen ein an Nager adaptiertes H-Protein (CAM-H) ausgetauscht, welches zusätzlich die Infektion von murinen Zellen erlaubt. Im späteren Verlauf der Arbeit wurde zudem mit dem rekombinanten Masernvirus rMV^{Edtag}CAMH gearbeitet, welches zwar nicht das eGFP-Gen enthält (vgl. Abb. 3A), aber sonst eine zu rMV^{Edtag}eGFP-CAMH vergleichbare Infektion *in vitro* und *in vivo* verursacht.

Für das Mausmodell wurden 2-Wochen-alte C57BL/6-Mäuse verwendet, bzw. transgene oder *knock-out* Mausstämmen, die auf C57BL/6-Hintergrund beruhen. Dieser Zeitpunkt wurde gewählt, da die Tiere im Alter von 2 Wochen die Infektion zu 95% überleben, von denen mehr als 80% eine akute ZNS-Infektion entwickeln. Sind die Tiere jünger als 1 Woche, dann sterben 100% aufgrund der Infektion; sind die Tiere älter als 2 Wochen, dann überleben sie die Infektion ohne sichtbare klinische Anzeichen (Schubert *et al.*, 2006).

Die Injektion des Virus erfolgt immer in die linke Hemisphäre des Gehirns (10³ pfu pro Maus). Anfangs sind nur kleine, nahe der Einstichstelle gelegene Infektionsherde zu beobachten, die jedoch bereits eine intensive Grünfluoreszenz aufweisen (vgl. Abb. 3B, 3dpi und Abb. 3C). Innerhalb einer Woche breitet sich das Virus nicht nur über die gesamte linke Hirnhälfte aus, sondern auch über den rechten Teil des Gehirns, wobei neben dem Kortex auch innen gelegene Bereiche des Gehirns, wie z.B. das Corpus callosum (Hirnbalken), der Thalamus und das Mittelhirn infiziert werden (vgl. Abb. 3B, 7dpi und Abb. 3D).

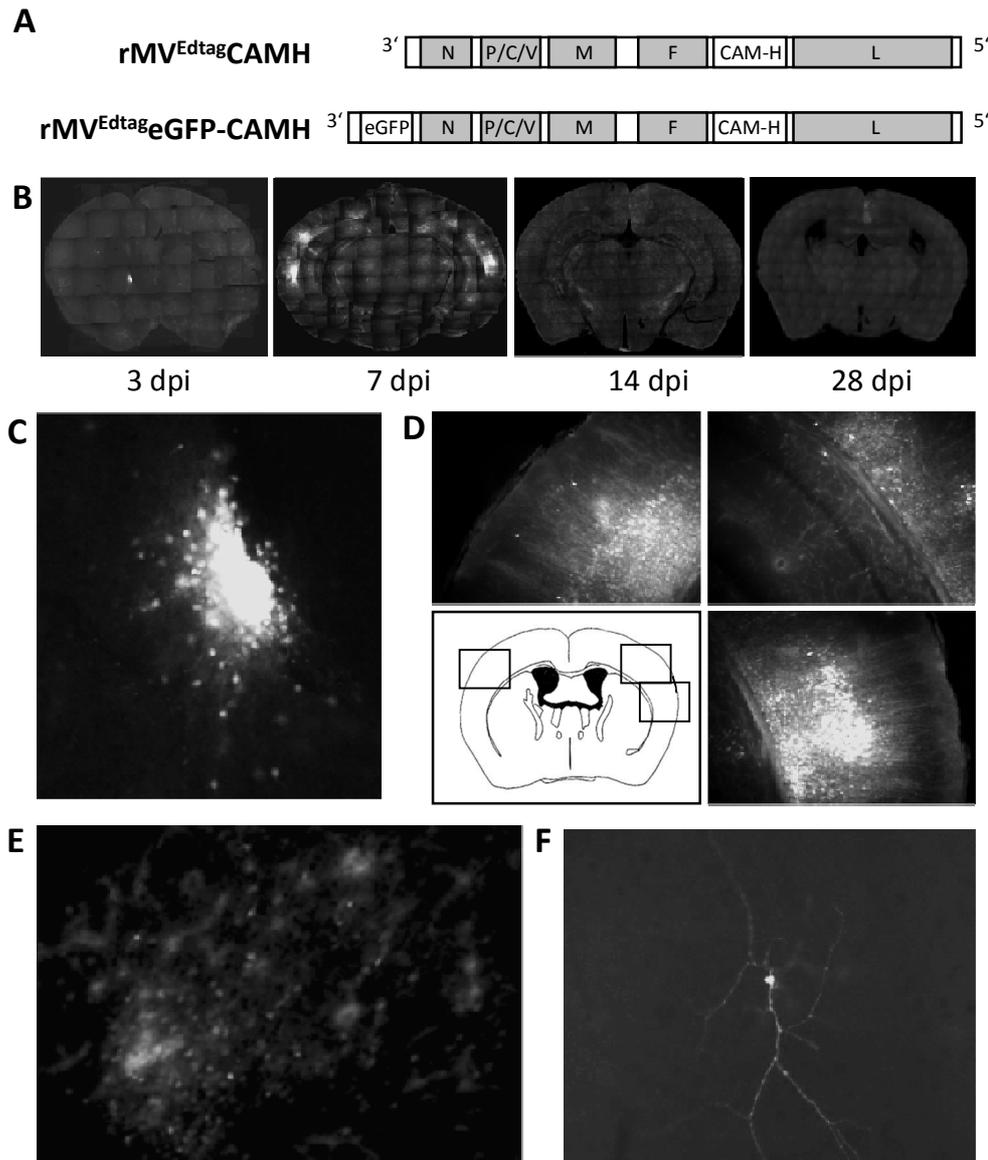


Abb. 3: Rekombinante Viren und ZNS-Infektion in C57BL/6

(A) Genomaufbau der in dieser Arbeit verwendeten rekombinanten Masern-Viren. Beide beinhalten ein an Nager adaptiertes Hämagglutinin (CAMH), welches die Infektion von Mauszellen ermöglicht. Die Infektion der Gehirn-Zellen wurde über die Expression des grün fluoreszierenden Proteins (eGFP) verfolgt. (B) Zeitverlauf der MV-Infektion in koronalen Gehirn-Sektionen (Übersicht wurde aus je mehreren seriellen Einzelbildern zusammen gestellt, die mit 10fach-Vergr. am Mikroskop aufgenommen wurden). 2-Wochen-alte C57BL/6 wurden mit 10^3 pfu rMV^{Edtag}eGFP-CAMH i.c. infiziert (linke Hemisphäre) und nach 3, 7, 14 und 28 Tagen analysiert. (C) Ausschnitt der Abb. 1B, 3dpi. Ein kleiner GFP-positiver Infektionsherd in der linken Hemisphäre nahe der Injektionsstelle (20fach-Vergr.). (D) Ausschnitt der Abb. 1B, 7dpi. Große Gruppen infizierter kortikaler Neuronen, die stark GFP-positiv sind, treten in beiden Hemisphären auf (10fach-Vergr.). (E) Ausschnitt der Abb. 1B, 14dpi. Ein Infektionsherd, dessen GFP-Fluoreszenz nach der akuten ZNS-Infektion langsam „verschwindet“ (20fach-Vergr.). (F) Ausschnitt der Abb. 1B, 28dpi. Eine einzelne, GFP-positive Zelle in der persistierenden Phase der ZNS-Infektion (20fach-Vergr.).

Diese akute ZNS-Infektion bildet sich wieder zurück, so dass 14 Tage nach Infektion überwiegend einzeln infizierte, stark grün leuchtende Neuronen sowie kleinere Infektionsherde, die schwächer grün leuchten, im Gehirn zu beobachten sind (vgl. Abb. 3B, 14dpi und Abb. 3E). Letztere sind Bereiche, in denen die Infektion nahezu eliminiert wurde, woraufhin auch die Expression von eGFP zurück geht. Letztendlich befinden sich 4 Wochen nach Infektion ausschließlich nur noch einzeln infizierte, stark grün leuchtende Neuronen im Gehirn, welche jedoch nicht mehr in der Übersicht einer koronalen Gehirn-Sektion zu sehen sind. Erst bei näherer Betrachtung einzelner Ausschnitte werden diese Neuronen, welche die persistierende Phase der ZNS-Infektion repräsentieren, sichtbar. Interessant ist, dass die Expression des eGFP sich nicht nur auf den Zellkörper beschränkt, sondern auch im Axon und den Dendriten zu beobachten ist (vgl. Abb. 3B, 28dpi und Abb. 3F).

Die Quantität der Infektion wurde durch Auszählung der infizierten Zellen bewertet und in Abb. 4A dargestellt. Zum Zeitpunkt der akuten Infektion (\triangleq 1wpi) wurden >1.000 infizierte Zellen pro Maushirn gezählt. Es ist deutlich zu sehen, dass die Zahl der infizierten Zellen nach Ablauf der akuten Infektion stetig abnimmt bis sie einen Wert von ca. 15 zum Zeitpunkt 4wpi erreicht (Vergleich der Werte vom Zeitpunkt 1wpi mit 4wpi: $P < 0,0001$).

Weiterführend zu Frau Kendl's Vorarbeiten wurde die persistierende Phase der ZNS-Infektion 2, 6, 15 und 20 Wochen nach Infektion untersucht. Dabei war festzustellen, dass sich die Zahl der infizierten Neuronen zwischen 1 und 2wpi bereits um mehr als die Hälfte verringerte (ca. 1400 *versus* 530 infizierte Zellen pro Maushirn; n.s., $P = 0,1019$). Zwischen 4wpi und 6wpi nahm die Infektion nur mäßig ab (15 *versus* 12 infizierte Zellen pro Maushirn; n.s., $P = 0,6450$), wohingegen zum Zeitpunkt 15wpi nur 1 von 6 Tieren eine eGFP-positive Zelle aufwies (Daten nicht gezeigt). Zum Zeitpunkt 20wpi wies sogar nur noch 1 von 10 untersuchten Mäusen eGFP-positive Neuronen auf (linke Hemisphäre: 3 Neuronen, rechte Hemisphäre: 1 Neuron; im Vergleich zu 4wpi: $P = 0,0229$).

Es stellte sich somit die Frage, inwieweit diese Tiere tatsächlich infiziert waren, oder ob das Virus über diesen langen Zeitraum lediglich komplett von der Maus selbst eliminiert wurde. Um dies zu untersuchen, wurde den Tieren der Gruppe „20wpi“ in regelmäßigen Abständen nach i.c. Infektion Blut entnommen. Das Serum der Blutproben wurde präpariert und im ELISA wurde anschließend der anti-MV-Titer bestimmt. Es zeigte sich, dass – unabhängig vom Zeitpunkt – gleichbleibend hohe Antikörper-Titer im Blut nachzuweisen sind, wobei 6 der 10 Tiere Serum-positiv waren, d.h. sie waren im Verlauf des Experimentes tatsächlich durch das Virus infiziert worden, und die anderen 4 Tiere waren Serum-negativ (vgl. Abb. 4B). In der Gruppe der Serum-positiven Tiere befand sich auch die Maus, welche als einzige der Gruppe „20wpi“ noch eGFP-positive Neuronen im Gehirn aufwies.

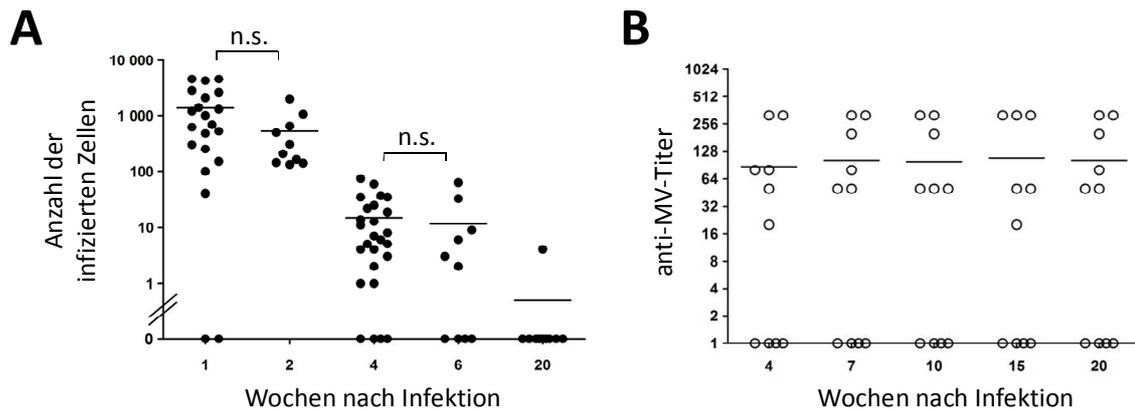


Abb. 4: Verlauf der ZNS-Infektion und des anti-MV-Titers im Blutserum bis 20wpi

2-Wochen-alte C57BL/6 wurden mit 10^3 pfu rMV^{Edtag}eGFP-CAMH i.c. infiziert und in einem Zeitraum bis 20 Wochen nach Infektion analysiert. **(A)** Quantifizierung der Anzahl der infizierten Zellen pro Maushirn ($P < 0,05$, soweit nicht anders angegeben). **(B)** Bestimmung des anti-MV-Titers von Blutproben 10 infizierter Mäuse. Die histologische Auswertung der ZNS-Infektion wurde zum finalen Zeitpunkt 20wpi durchgeführt (Ergebnis vgl. Abb. 4A).

Ein weiterer Aspekt der ZNS-Infektion war die Frage, inwieweit das Virus sich auch auf das Kleinhirn und Rückenmark ausbreitet. Hierzu wurde von akut infizierten Mäusen (7dpi) nicht nur das Großhirn histologisch analysiert, sondern auch das Kleinhirn und die Medulla oblongata. Es zeigte sich, dass bei allen 3 untersuchten Tieren keine einzige infizierte, grün leuchtende Zelle im Kleinhirn und der Medulla oblongata zu beobachten war, obwohl im Großhirn eine sehr starke akute Infektion vorlag (mehr als 1.000 infizierte Zellen pro Maus). Besonders in den Bereichen des Gehirns, in denen die koronalen Sektionen das Kleinhirn mit den umgebenen Großhirnhälften zeigten, war es auffällig, dass die MV-Infektion sich nicht auf das Kleinhirn ausbreitete, obwohl sie im Großhirn z.T. bis an die Grenze zum Kleinhirn heran reichte. In Abb. 5 sind beispielhaft je ein Bereich aus der linken und rechten Großhirnhälfte mit einem stark grün leuchtenden Infektionsherd dargestellt (vgl. Abb. 5 obere Bildausschnitte) sowie je ein Bereich aus der linken und rechten Kleinhirnhälfte, wo keine Infektion zu beobachten war (vgl. Abb. 5 untere Bildausschnitte).

Somit beschränkt sich die i.c. Infektion ausschließlich auf das Großhirn, in welches das Virus injiziert wird, und wird nicht über das Kleinhirn und die Medulla oblongata bis zum Rückenmark weiter verbreitet.

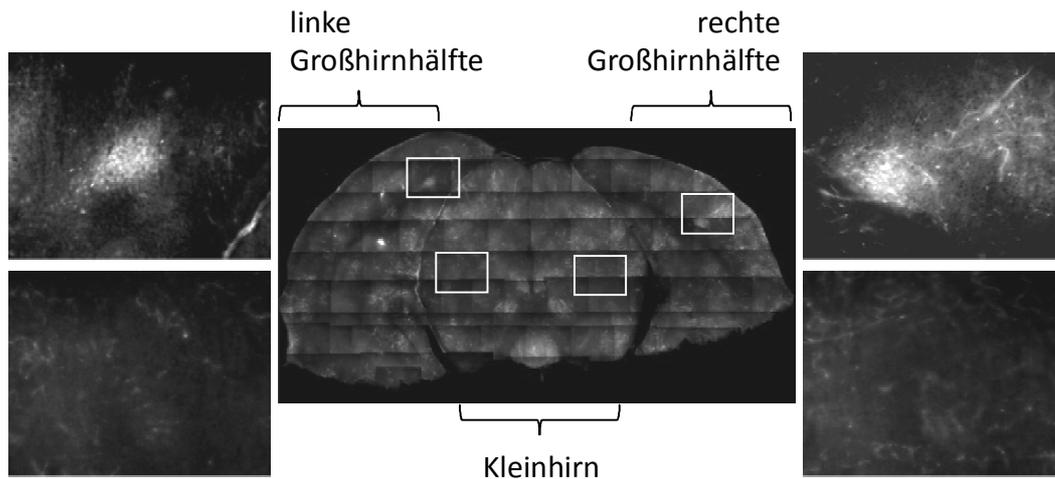


Abb. 5: Akute Infektion im Großhirn, jedoch nicht im angrenzendem Kleinhirn

2-Wochen-alte C57BL/6 wurden i.c. mit 10^3 pfu rMV^{Edtag}eGFP-CAMH infiziert und 7 Tage später analysiert. Koronale Gehirn-Sektion im Überblick (Mitte) mit je 2 beispielhaften Ausschnitten aus dem Großhirn (links und rechts oben, 10fach-Vergr.) bzw. Kleinhirn (links und rechts unten, 10fach-Vergr.). Übersicht wurde aus mehreren seriellen Einzelbildern zusammen gestellt, die mit 10fach-Vergr. am Mikroskop aufgenommen wurden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das rekombinante Masernvirus rMV^{Edtag}eGFP-CAMH eine persistierende ZNS-Infektion in der Maus verursacht, welche sich auf das Großhirn beschränkt, in das das Virus injiziert wird. Die Persistenz wird durch einzeln infizierte, grün leuchtende Zellen repräsentiert und ist über einen Zeitraum von bis zu 6wpi zu beobachten. Über einen längeren Zeitraum (bis 20wpi) verloren die meisten Tiere die Infektion. Für die folgenden Experimente wurde der Zeitpunkt 28dpi für die immunologische und histologische Analyse der persistierenden ZNS-Infektion gewählt.

4.2 Einwanderung von MV-spezifischen, zytotoxischen T-Zellen ins Gehirn MV-infizierter Mäuse

4.2.1 Nachweis zytotoxischer T-Zellen im Gehirn MV-infizierter Mäuse

Im Anschluss an die Charakterisierung der zerebralen Infektion mit rMV^{Edtag}eGFP-CAMH im Mausmodell wurde untersucht, wann T-Zellen nach i.c. Infektion ins Gehirn einwandern und ob auch in der Milz und den Lymphknoten abhängig von der i.c. Infektion unterschiedliche T-Zell-Level detektierbar sind. Hierfür wurden wie oben beschrieben 2-Wochen-alte C57BL/6 mit 10^3 pfu rMV^{Edtag}eGFP-CAMH i.c. infiziert. Als Kontrolle für die Infektion diente eine i.c. Injektion mit 20 μ l PBS. 3, 7, 10, 14 und 28 Tage nach Infektion wurden Lymphozyten aus der Milz, den zervikalen Lymphknoten und dem Gehirn isoliert. Wir entschieden uns in Infektionsversuchen nur die zervikalen Lymphknoten (ZLK, Halslymphknoten) zu analysieren, da diese in kürzester Distanz zum Gehirn liegen und somit in unserem Mausmodell eher an der Immunantwort beteiligt sind als wie z.B. inguinale Lymphknoten, die in der Leistengegend liegen. Die isolierten Lymphozyten wurden anschließend mit den FACS-Antikörpern anti-Maus CD3-FITC, anti-Maus CD8-PE sowie anti-Maus CD4-PerCP gefärbt, um mittels Durchflusszytometrie quantifiziert werden zu können.

In Abb. 6 sind beispielhaft je ein FACS-Bild für die CD3-FITC/CD8-PE- und die CD3-FITC/CD4-PerCP-Färbung der Lymphozyten aller drei Organe dargestellt. Für erstere Färbung sind jeweils deutliche Zell-Populationen für alle Organpräparationen zu erkennen. Auch die CD3-FITC/CD4-PerCP-Färbung zeigte in der Milz und den ZLK jeweils eine deutlich sichtbare Zell-Population, welche im Gehirn jedoch nicht detektiert werden konnte. Daraufhin wurde in einem späteren Experiment für die Lymphozyten aus dem Gehirn eine FACS-Färbung mit der Ak-Kombination anti-Maus CD3-FITC, anti-Maus CD4-PE und anti-Maus CD8-PerCP etabliert, welche sowohl eine CD3⁺ CD8⁺ T-Zell-Population zeigte wie auch eine CD3⁺ CD4⁺ T-Zell-Population (vgl. Abb. 9).

Zunächst wurden jedoch die folgenden Daten auf Basis der FACS-Färbung mit der Ak-Kombination CD3-FITC/CD8-PE/CD4-PerCP ermittelt. Hierzu wurden die Lymphozyten aus dem Gehirn mit Hilfe des Percoll-Dichtegradienten isoliert und gefärbt. Der prozentuale Anteil der im *Live-Gate* befindlichen CD3⁺ CD8⁺ T-Zellen sowie die daraus resultierende Gesamtzellzahl dieser Zellen wurde quantifiziert und in Abb. 7 dargestellt. Beispielhaft wurde je ein FACS-Bild der CD3⁺ CD8⁺ T-Zellen aus infizierten und Kontroll-Tieren zum Zeitpunkt 7dpi gezeigt. Die prozentualen Werte geben nach Abzug der Isotypkontrolle den Anteil der sich im oberen, rechten Quadranten befindlichen, für beide Antikörper doppelt positiven Zellen wieder. Im Vergleich zu PBS-injizierten Kontroll-Tieren sind bereits 3 Tage nach Infektion zytotoxische T-Zellen im Gehirn infizierter Mäuse nachweisbar. Der prozentuale Anteil stieg dabei zunächst auf 1,4% bis Tag 7 an und fiel danach wieder auf 0,6% an Tag 14 ab.

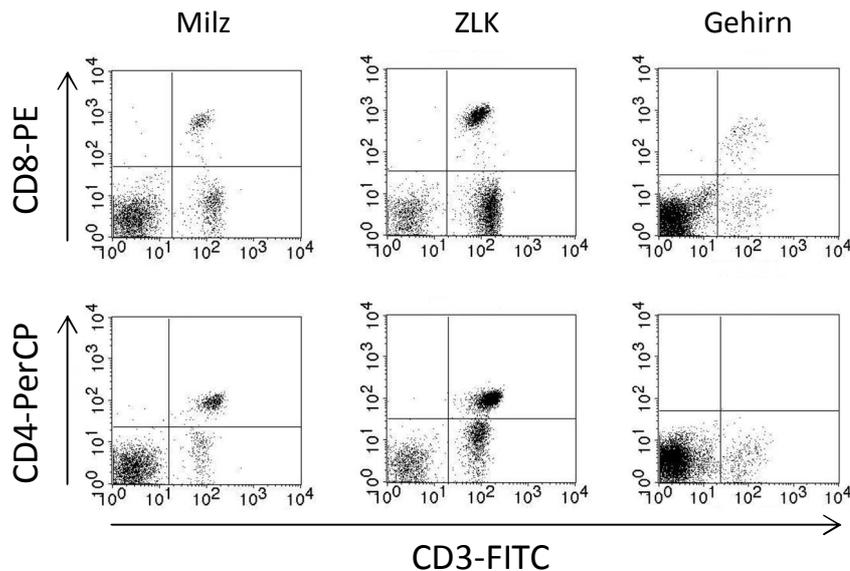


Abb. 6: CD3FITC/CD8PE/CD4PerCP-Färbung der Lymphozyten aus Milz, ZLK und Gehirn

Gezeigt sind beispielhaft je ein FACS-Bild für die Antikörper-Färbung der Lymphozyten aus der Milz, den zervikalen Lymphknoten (ZLK) und dem Gehirn infizierter C57BL/6.

Der mit Abstand höchste prozentuale Anteil der CD3⁺ CD8⁺ T-Zellen wurde an Tag 28 mit 21,6% gemessen ($P = 0,0072$). Die Gesamtzellzahl der zytotoxischen T-Zellen stieg dabei von 390 an Tag 3 stetig auf bis zu 82.500 an Tag 28 nach Infektion an; jedoch war der Unterschied zu den Kontroll-Tieren in diesem Experiment nicht signifikant (n.s., $P = 0,2076$; im nachfolgenden Experiment war der Unterschied der Gesamtzellzahl der CD3-FITC⁺ CD8PerCP⁺ T-Zellen zwischen i.c. infizierten und Kontroll-Tieren jedoch mit einem P-Wert = 0,0312 signifikant, vgl. Seite 51).

Der Anteil der zytotoxischen T-Zellen in Kontroll-Tieren blieb dabei konstant niedrig – abgesehen vom Zeitpunkt 28dpi, was vermutlich einfach darauf zurückzuführen ist, dass mit zunehmendem Alter der Mäuse (28dpi entspricht in unserem Infektionsmodell einem Alter von 6 Wochen) der Anteil der zirkulierenden CD8⁺ T-Zellen zunimmt.

In Zusammenhang mit den Daten der Charakterisierung der zerebralen Infektion aus Kapitel 4.1 lässt sich sagen, dass bei Auftreten der akuten ZNS-Infektion zytotoxische T-Zellen ins Gehirn einwandern, die jedoch nicht verschwinden, wenn das Virus größtenteils von der Maus selbstständig eliminiert wurde. Im Gegenteil – der Anteil der CD3⁺ CD8⁺ T-Zellen ist 28 Tage nach Infektion sogar am größten, obwohl nur noch wenige, einzeln infizierte Zellen im Gehirn persistieren (vgl. Abb. 4A).

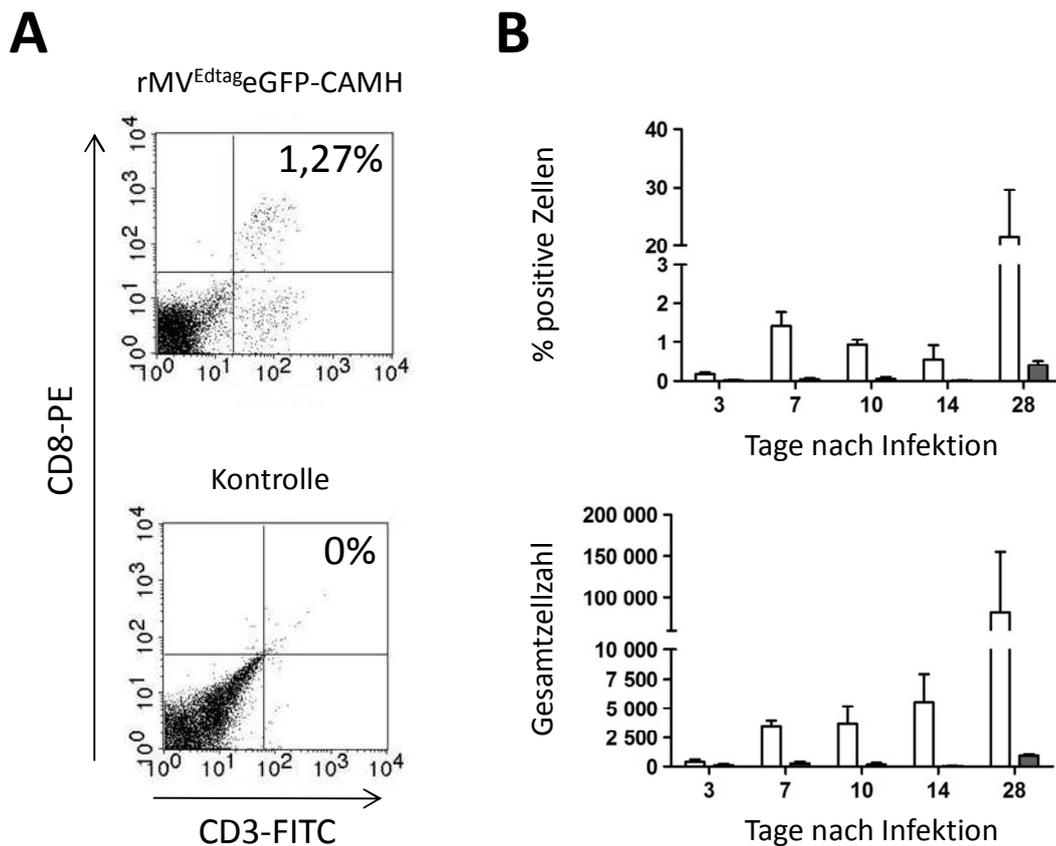


Abb. 7: CD3⁺ CD8⁺ T-Zellen im Gehirn nach i.c. Infektion mit rMV^{Edtag}eGFP-CAMH

2-Wochen-alte C57BL/6 wurden mit 10^3 pfu rMV^{Edtag}eGFP-CAMH i.c. infiziert und nach 3 bis 28 Tagen analysiert. Als Kontrolle diente eine i.c. Injektion mit 20 μ l PBS. Lymphozyten wurden aus dem Gehirn isoliert, mit den Antikörpern anti-Maus CD3-FITC sowie anti-Maus CD8-PE gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. (A) Dargestellt ist je ein beispielhaftes FACS-Bild mit den dazu gehörigen Prozentangaben der im oberen, rechten Quadranten befindlichen Zellen nach Abzug des Wertes für die Isotypkontrolle. (B) Der prozentuale Anteil der im *Live-Gate* befindlichen CD3⁺ CD8⁺ T-Zellen (oben, $P = 0,0072$) bzw. die daraus resultierende Gesamtzellzahl der zytotoxischen T-Zellen (unten, n.s., $P = 0,2076$) wurde quantifiziert. Angabe der Mittelwerte mit Standardfehler ($n=3$).

weiß: rMV^{Edtag}eGFP-CAMH; grau: Kontrolle

Parallel zum Gehirn wurden auch die Lymphozyten aus der Milz und den zervikalen Lymphknoten (ZLK) isoliert und untersucht. Die Lymphozyten aus Milz und ZLK wurden ebenfalls mit den Antikörpern anti-Maus CD3-FITC, anti-Maus CD8-PE sowie anti-Maus CD4-PerCP gefärbt, um mittels Durchflusszytometrie quantifiziert werden zu können. Der prozentuale Anteil der im *Live-Gate* befindlichen CD3⁺ CD8⁺ T-Zellen sowie der CD3⁺ CD4⁺ T-Zellen wurde quantifiziert und in Abb. 8 dargestellt. In Bezug auf beide Parameter wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen rMV^{Edtag}eGFP-CAMH-infizierten und Kontroll-Tieren detektiert (n.s., $P > 0,05$). Eine Ausnahme bildete

der prozentuale Anteil der CD3⁺ CD4⁺ T-Zellen in der Milz, welcher einen zwar nur sehr geringen, jedoch signifikanten Unterschied zwischen infizierten und Kontroll-Tieren aufzeigte ($P < 0,05$).

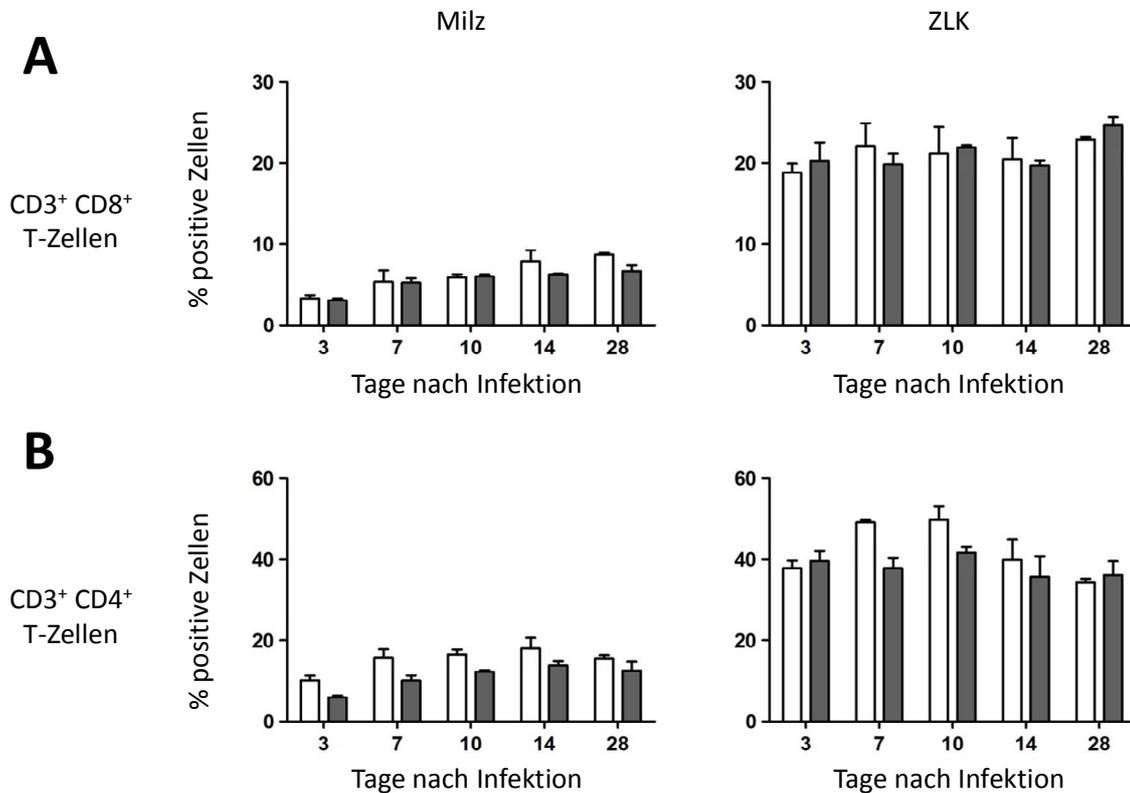


Abb. 8: CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen in der Milz und in den ZLK nach i.c. Infektion mit rMV^{Edtag}eGFP-CAMH

2-Wochen-alte C57BL/6 wurden mit 10^3 pfu rMV^{Edtag}eGFP-CAMH i.c. infiziert und nach 3 bis 28 Tagen analysiert. Als Kontrolle diente eine i.c. Injektion mit 20 μ l PBS. Lymphozyten wurden aus der Milz und den ZLK isoliert, mit den Antikörpern anti-Maus CD3-FITC, anti-Maus CD8-PE sowie anti-Maus CD4-PerCP gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Dargestellt sind der prozentuale Anteil der im *Live-Gate* befindlichen CD3⁺ CD8⁺ T-Zellen (oben) bzw. der CD3⁺ CD4⁺ T-Zellen (unten). Angabe der Mittelwerte mit Standardfehler (n=3; n.s., $P > 0,05$ außer Abb. unten links: $P < 0,05$).

weiß: rMV^{Edtag}eGFP-CAMH; grau: Kontrolle

Wie bereits erwähnt, war die Ak-Färbung der aus dem Gehirn isolierten Lymphozyten mit anti-Maus CD4-PerCP nicht erfolgreich, woraufhin in einem gesonderten Experiment für die Hirn-Lymphozyten eine FACS-Färbung mit der Ak-Kombination anti-Maus CD3-FITC, anti-Maus CD4-PE und anti-Maus CD8-PerCP etabliert wurde. Dieses Mal war es möglich, jeweils eine CD3⁺ CD4⁺ T-Zell-Population als auch eine CD3⁺ CD8⁺ T-Zell-Population zu identifizieren (vgl. Abb. 9).

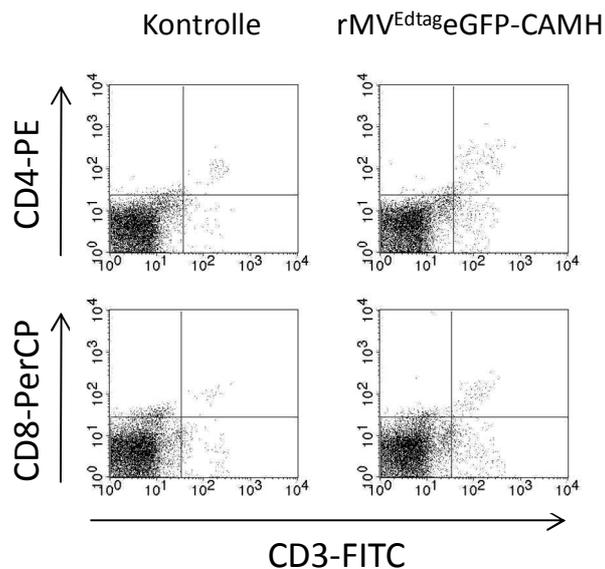


Abb. 9: CD3FITC/CD4PE/CD8PerCP-Färbung der Lymphozyten aus dem Gehirn

Gezeigt sind beispielhaft je ein FACS-Bild für die Antikörper-Färbung der Lymphozyten aus dem Gehirn infizierter C57BL/6 bzw. Kontroll-Tiere.

Die Verteilung der CD3⁺ CD8⁺ T-Zellen war in diesem Experiment mit den Daten aus Abb. 7 vergleichbar: der prozentuale Anteil wie auch die Gesamtzellzahl dieser Zellen stieg nach i.c. Infektion kontinuierlich an, wohingegen beide Werte in Kontroll-Tieren konstant niedrig blieben; der leichte Anstieg beider Werte (prozentualer Anteil sowie Gesamtzellzahl) in Kontroll-Tieren zum Zeitpunkt 28dpi war auch in diesem Experiment zu beobachten. Insgesamt wiesen beide Daten einen signifikanten Unterschied zwischen infizierten und Kontroll-Tieren auf ($P < 0,05$; vgl. Abb. 10B).

Der prozentuale Anteil der im *Live-Gate* befindlichen CD3⁺ CD4⁺ T-Zellen sowie die daraus resultierende Gesamtzellzahl dieser Zellen wurde ebenfalls quantifiziert und in Abb. 10 dargestellt. Im Vergleich zu PBS-injizierten Kontroll-Tieren wurden in Bezug auf den prozentualen Anteil der CD3⁺ CD4⁺ T-Zellen nur minimal erhöhte CD4-Level in i.c. infizierten Tieren detektiert; zum Zeitpunkt 28dpi war gar kein Unterschied zwischen infizierten und Kontroll-Tieren zu beobachten. Der prozentuale Anteil stieg dabei zunächst von 0,9% an Tag 3 auf bis zu 3,4% an Tag 10 nach Infektion an und fiel danach wieder auf 2,1% an Tag 14 ab. Der mit Abstand höchste prozentuale Anteil der CD3⁺ CD4⁺ T-Zellen wurde an Tag 28 mit 7,9% gemessen (n.s., $P = 0,2837$). Die Gesamtzellzahl der CD3⁺ CD4⁺ T-Zellen stieg jedoch stetig von 4.200 an Tag 3 auf bis zu 24.900 an Tag 28 nach Infektion an (n.s., $P = 0,0777$).

Der prozentuale Anteil der CD3⁺ CD4⁺ T-Zellen in Kontroll-Tieren blieb bis Tag 14 nach Infektion jedoch konstant niedrig bei ca. 0,6% – abgesehen vom Zeitpunkt 28dpi, wo der Anteil auf 8,6% anstieg. Die Gesamtzellzahl dieser Zellen bewegte sich bis Tag 14 nach Infektion zwischen 2.100 und 5.000 und stieg zum späteren Zeitpunkt 28dpi auf bis zu 24.700 an.

Zusätzlich wurde das Verhältnis der $CD3^+ CD4^+$ T-Zellen zu den $CD3^+ CD8^+$ T-Zellen in i.c. infizierten und Kontroll-Tieren für jeden Zeitpunkt nach Infektion quantifiziert. Hierzu wurden die Werte für die Gesamtzellzahl der $CD3^+ CD4^+$ T-Zellen durch die Werte für die Gesamtzellzahl der $CD3^+ CD8^+$ T-Zellen dividiert und graphisch dargestellt (vgl. Abb. 10C; ein nahezu identisches Bild erhielt man für die Werte des prozentualen Anteils der $CD3^+ CD4^+$ - und $CD3^+ CD8^+$ T-Zellen). Der Unterschied zwischen i.c. infizierten und Kontroll-Tieren war dabei jedoch nicht signifikant (n.s., $P = 0,8177$), d.h. in Bezug auf die Einwanderung von T-Zellen ins Gehirn nach i.c. Infektion bestand keine Präferenz für $CD4^+$ oder $CD8^+$ Zellen.

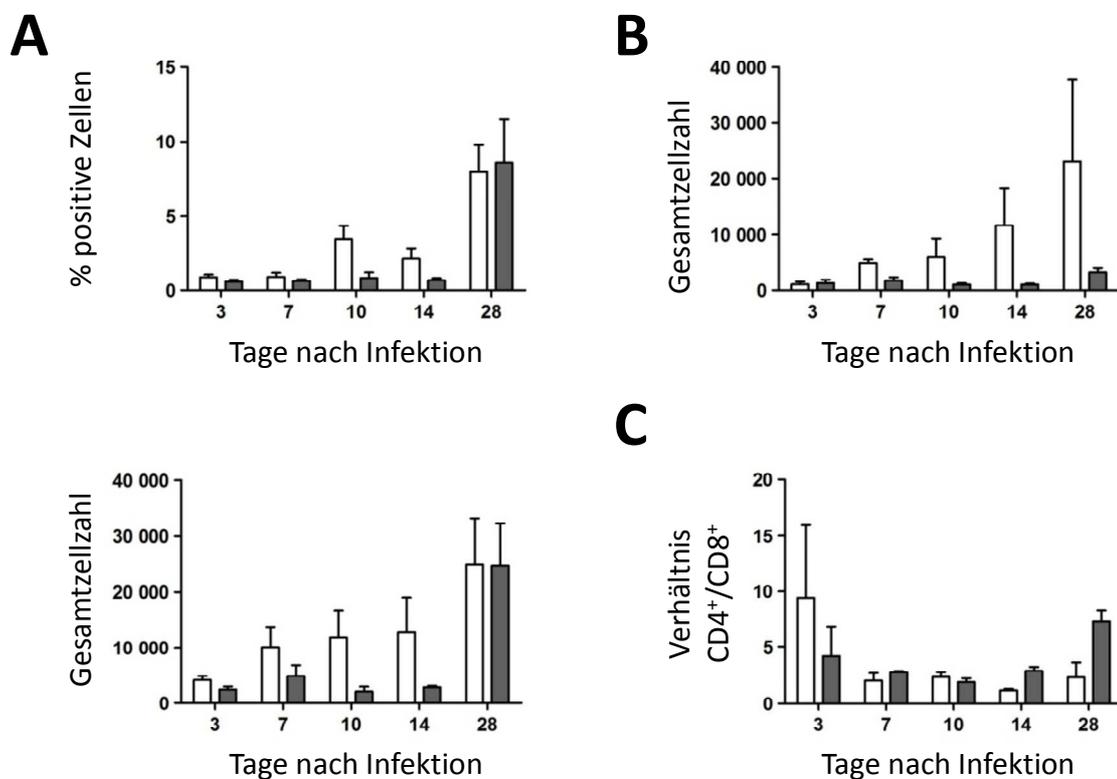


Abb. 10: $CD3^+ CD4^+$ T-Zellen im Gehirn nach i.c. Infektion mit rMV^{Edtag}eGFP-CAMH

2-Wochen-alte C57BL/6 wurden mit 10^3 pfu rMV^{Edtag}eGFP-CAMH i.c. infiziert und nach 3 bis 28 Tagen analysiert. Als Kontrolle diente eine i.c. Injektion mit 20 μ l PBS. Lymphozyten wurden aus dem Gehirn isoliert, mit den Antikörpern anti-Maus $CD3$ -FITC, anti-Maus $CD4$ -PE sowie anti-Maus $CD8$ -PerCP gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. **(A)** Der prozentuale Anteil der im *Live-Gate* befindlichen $CD3^+ CD4^+$ T-Zellen (oben) bzw. die daraus resultierende Gesamtzellzahl der Helfer-T-Zellen (unten) wurde quantifiziert (n.s., $P > 0,05$). **(B)** Die Gesamtzellzahl der im *Live-Gate* befindlichen $CD3^+ CD8^+$ T-Zellen wurde quantifiziert ($P < 0,05$). **(C)** Kalkulation des Vielfachen der $CD3^+ CD4^+$ T-Zellen gemessen an den $CD3^+ CD8^+$ T-Zellen (n.s., $P > 0,05$). Angabe der Mittelwerte mit Standardfehler ($n=3$).

weiß: rMV^{Edtag}eGFP-CAMH; grau: Kontrolle

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass abhängig von der i.c. Infektion mit rMV^{Edtag}eGFP-CAMH zytotoxische CD3⁺ CD8⁺ T-Zellen ins Gehirn einwandern, deren Level in der Milz und den ZLK jedoch davon unbeeinflusst bleiben. Auch der Anteil der CD3⁺ CD4⁺ Helfer-T-Zellen ist in Milz und ZLK unabhängig von der i.c. Infektion, wohingegen im Gehirn während der akuten ZNS-Infektion gegenüber Kontroll-Tieren leicht erhöhte CD4-Level detektierbar waren (vor allem 10dpi und 14dpi). Interessanterweise ist das Verhältnis der CD4⁺- und CD8⁺ T-Zellen im Gehirn unabhängig von der i.c. Infektion.

4.2.2 Etablierung eines IFN- γ -ELISPOT-Assay zum Nachweis MV-spezifischer Zellen

In vitro Experimente mit humanen T-Zellen haben bereits gezeigt, dass MV-spezifische CD8⁺ T-Zellen die Virusausbreitung unterdrücken können (de Vries *et al.*, 2010). Um MV-spezifische Effektor-Zellen in unserem Mausmodell zu identifizieren, haben wir einen IFN- γ -ELISPOT-Assay etabliert. Dieser ermöglicht es, die Ausschüttung von IFN- γ spezifischer Effektorzellen zu messen, wenn diese mit ihrem Stimulans kokultiviert werden. In unserem Fall wurden Lymphozyten als Effektorzellen eingesetzt und als Stimulans dienten bestimmte MV-Peptide, die bei Zugabe zu der Lymphozytenkultur auf die entsprechenden MHC-Moleküle an der Oberfläche von Antigen-präsentierenden Zellen (*antigen presenting cells*, APCs) gebunden werden.

Dazu wurden zunächst geeignete Peptidsequenzen aus den MV-Proteinen Nukleokapsid und Hämagglutinin mit Hilfe der Computer-Programme MAPPP, BIMAS und Syfpeithi ausgewählt (vgl. Tab. 6), die in Zusammenhang mit einem MHC-Klasse-I-Molekül von zytotoxischen T-Zellen erkannt werden können. Dabei war zu beachten, dass C57BL/6 die MHC-Klasse-I-Moleküle „H-2K^b“ und „H-2D^b“ exprimieren, welche ausschließlich Peptide präsentieren, die eine Länge von 8 oder 9 Aminosäuren (aa) haben. Das Programm MAPPP gibt eine Vorhersage darüber, welche Peptide bei der Prozessierung eines Proteins durch das Proteasom entstehen können. Die Programme BIMAS und Syfpeithi geben hingegen an, welche Peptide am wahrscheinlichsten von entsprechenden MHC-Molekülen präsentiert werden. Die Auswahl der Peptide erfolgte über den Score, den die Computer-Programme den Peptiden zuordneten. Dementsprechend wurden Peptidsequenzen ausgewählt, die gleichzeitig einen hohen Score in allen 3 Programmen aufwiesen.

Position der aa	Peptidsequenz	MV-Protein	Position der aa	Peptidsequenz	MV-Protein
357-364	FDPAYFRL (60/21)	MV-N (H-2K ^b)	129-136	REYDFRDL (66/29)	MV-H (H-2K ^b)
277-284	IETMYPAL (22/21)		406-413	RIPSYGVL (79/23)	
325-332	SAGSYPLL (22/22)		107-114	TPQRFTDL (39/22)	
242-250	RTPGNKPRI (41/23)	MV-N (H-2D ^b)	164-172	NALVNSTLL (3024/30)	MV-H (H-2D ^b)
318-326	NSIQNKFSA (365/16)		22-30	RIVINREHL (1526/23)	
372-380	SAGKVSSTL (22/20)		446-454	SNHNNVYWL (243/22)	

Tab. 6: Übersicht über die verwendeten Peptide

Mit Hilfe der Computer-Programme MAPPP, BIMAS und Syfpeithi wurden geeignete Peptidsequenzen aus den MV-N- und MV-H-Proteinen ausgewählt, die von den MHC-Molekülen H-2K^b und H-2D^b auf der Oberfläche von APCs präsentiert werden können. Die Zahlen in Klammern geben den jeweiligen Score der Peptidsequenzen wieder, der mit Hilfe der Programme BIMAS und Syfpeithi ermittelt wurde.

Zunächst wurden adulte C57BL/6 einmalig mit je 10⁶pfu MV^{Edm} immunisiert und 7d später analysiert, um herauszufinden, welche der Peptide eine sichtbare IFN- γ -Produktion hervorrufen. Dazu wurden die Lymphozyten aus der Milz und den Lymphknoten (12 Stk. pro Maus: 6 zervikale, 4 axilläre und 2 inguinale Lymphknoten) isoliert und im ELISPOT-Assay mit den ausgewählten Peptiden re-stimuliert. Die Lymphozyten-Präparationen aus Milz und Lymphknoten enthielten außerdem APCs, welche für die Präsentation der eingesetzten MV-Peptide dienten. Für den Assay wurden pro Napf 10⁵ Zellen eingesetzt. Als Positivkontrolle für einen erfolgreichen Assay wurden die Lymphozyten mit ConA kokultiviert, welches u.a. T-Zellen stimuliert und zur IFN- γ -Ausschüttung anregt. Als eine weitere Kontrolle diente die Re-Stimulation der isolierten Lymphozyten mit 10³ bzw. 10⁵pfu MV^{Edm}. Als Negativkontrolle wurden die isolierten Lymphozyten ohne weitere Zusätze – also nur in Medium – kultiviert. Die Spot-Entwicklung des Assay erfolgte nach einer 20stündigen Inkubation der Zellen. Das Ergebnis der IFN- γ -Produktion der Milzzellen ist in Auszügen in Abb. 11 dargestellt.

Von allen ausgewählten Peptiden induzierten lediglich zwei eine im Vergleich zur Positivkontrolle relativ starke IFN- γ -Ausschüttung: RIVINREHL (MV-H₂₂₋₃₀) und SNHNNVYWL (MV-H₄₄₆₋₄₅₄) – beide stammen vom Hämagglutinin-Protein ab (vgl. Abb. 11). Die Re-Stimulation mit MV^{Edm} ergab eine vergleichsweise moderate IFN- γ -Ausschüttung. Sämtliche anderen Peptide induzierten keine weitere IFN- γ -Ausschüttung. Als Beispiel dafür ist das ebenfalls vom H-Protein abstammende NALVNSTLL-Peptid (MV-H₁₆₄₋₁₇₂) in Abb. 11 angegeben.

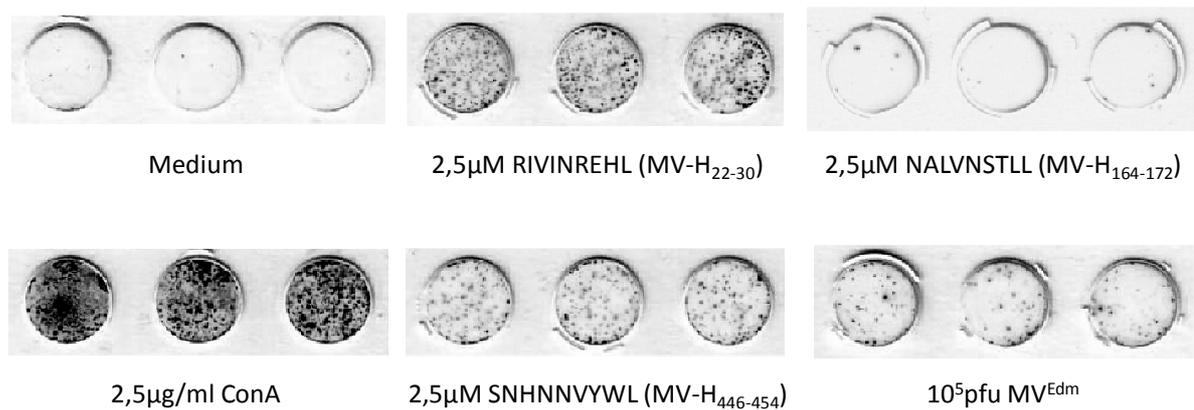


Abb. 11: IFN- γ -ELISPOT-Assay von Milz-Lymphozyten nach Immunisierung von C57BL/6

C57BL/6 wurden mit 10^6 pfu MV^{Edm} i.p. immunisiert und 7d später analysiert. Lymphozyten wurden aus der Milz isoliert und im IFN- γ -ELISPOT-Assay mit den in Tab. 6 aufgelisteten Peptiden bzw. MV^{Edm} re-stimuliert. Dargestellt sind je ein repräsentatives Beispiel der Spotentwicklung (3fach-Ansatz) nach Inkubation mit den angegebenen Peptiden. ConA diente als Positivkontrolle für die IFN- γ -Ausschüttung. Als Negativkontrolle wurden die Milz-Lymphozyten ohne weitere Zusätze („Medium“; oben links) kultiviert.

Die IFN- γ -Ausschüttung der Lymphozyten aus der Milz fiel im Großen und Ganzen gesehen stärker aus, als die der aus den Lymphknoten isolierten Lymphozyten, welches lediglich ein Zeichen dafür war, dass in der Milz mehr Effektorzellen und APCs als in den Lymphknoten vorhanden waren.

Somit wurden für die folgenden Infektionsversuche die Peptide RIVINREHL (Bestandteil des Hüllproteins H; Aminosäuren 22 bis 30) und SNHNNVYWL (Bestandteil des Hüllproteins H; Aminosäuren 446 bis 454) eingesetzt. Ersteres diente auch zur Generierung eines Pentamer-Moleküls, mit dem MV-spezifische Zellen in der Durchflusszytometrie detektiert werden können (vgl. Kapitel 4.2.4 und 4.2.5).

4.2.3 MV-H₂₂₋₃₀- und MV-H₄₄₆₋₄₅₄-spezifische, IFN- γ -produzierende Zellen im Gehirn, der Milz und den ZLK nach i.c. Infektion

Der nächste Schritt bestand darin, herauszufinden, ob in unserem Mausmodell nach i.c. Infektion von C57BL/6 mit rMV^{Edtag}eGFP-CAMH ebenfalls MV-spezifische, IFN- γ -produzierende Zellen in der Milz, den zervikalen Lymphknoten und im Gehirn nachweisbar sind. Hierzu wurden wieder 2-Wochen-alte C57BL/6 i.c. infiziert und 3, 7, 10, 14 und 28 Tage später analysiert. Als Kontrolle für die Infektion diente eine Injektion mit sterilem PBS. Die isolierten Lymphozyten wurden im ELISPOT-Assay mit den

Peptiden MV-H₂₂₋₃₀ (RIVINREHL) und MV-H₄₄₆₋₄₅₄ (SNHNNVYWL) re-stimuliert, da diese beiden Peptide im vorherigen Immunisierungs-Experiment die stärkste IFN- γ -Ausschüttung der Lymphozyten auslösten. Die Lymphozyten-Präparationen aller drei Organe enthielten außerdem APCs, welche für die Präsentation der eingesetzten MV-Peptide dienten. Pro Napf wurden erneut 10⁵ Zellen pro Organ eingesetzt. Als Positivkontrolle für einen erfolgreichen Assay wurde ebenfalls ConA verwendet und als Negativkontrolle wurden die Lymphozyten ohne weitere Zusätze (\triangleq „Medium“ in Abb. 12) inkubiert. Die Auswertung der Experimente erfolgte über die Auszählung der sichtbaren Spots pro Napf (vgl. Abb. 12). Dabei entspricht ein Spot jeweils einer IFN- γ -produzierenden Zelle.

Bereits 7 Tage nach Infektion wurden für beide Peptide spezifische IFN- γ -produzierende Zellen aus der Milz (MV-H₂₂₋₃₀-spezifisch: 58 Spots; MV-H₄₄₆₋₄₅₄-spezifisch: 14 Spots) und den zervikalen Lymphknoten (MV-H₂₂₋₃₀-spezifisch: 30 Spots; MV-H₄₄₆₋₄₅₄-spezifisch: 10 Spots) isoliert, wohingegen vergleichbare Zellen im Gehirn erst an Tag 10 detektiert wurden (MV-H₂₂₋₃₀-spezifisch: 85 Spots; MV-H₄₄₆₋₄₅₄-spezifisch: 57 Spots). Die stärkste IFN- γ -Ausschüttung erfolgte bei allen untersuchten Lymphozyten nach Re-Stimulation mit dem Peptid MV-H₂₂₋₃₀. Auffällig war, dass zum Zeitpunkt 10dpi die aus dem Gehirn infizierter Mäuse isolierten, nicht re-stimulierten Lymphozyten bereits eine im Vergleich zur Re-Stimulation mit Peptid relativ hohe IFN- γ -Ausschüttung aufwiesen (41 Spots; \triangleq „Medium“ in Abb. 12). Die höchste Anzahl der Spots war in der Milz 10 Tage nach Infektion zu beobachten (MV-H₂₂₋₃₀-spezifisch: 128 Spots; MV-H₄₄₆₋₄₅₄-spezifisch: 89 Spots). Zu den Zeitpunkten 14dpi und 28dpi sank die Zahl der Spots bei den Lymphozyten aller 3 Organe. Die zervikalen Lymphknoten zeigten letztendlich nahezu keine re-stimulierbaren, IFN- γ -produzierenden Zellen mehr an (28dpi: MV-H₂₂₋₃₀-spezifisch: 2 Spots; MV-H₄₄₆₋₄₅₄-spezifisch: 1 Spot). In der Milz sank das Level der IFN- γ -Ausschüttung ebenfalls stark ab (28dpi: MV-H₂₂₋₃₀-spezifisch: 12 Spots; MV-H₄₄₆₋₄₅₄-spezifisch: 4 Spots). Nur im Gehirn waren zum Zeitpunkt der persistierenden ZNS-Infektion noch vergleichsweise viele Spots sichtbar (MV-H₂₂₋₃₀-spezifisch: 32 Spots; MV-H₄₄₆₋₄₅₄-spezifisch: 5 Spots), aber im Gegensatz zu den Zeitpunkten 10dpi und 14dpi waren keine Spots mehr in den Näpfen mit den nicht stimulierten Zellen zu beobachten.

Lymphozyten aus Kontroll-Tieren zeigten keine IFN- γ -Produktion, weder in den nicht stimulierten noch in den MV-Peptid re-stimulierten Proben.

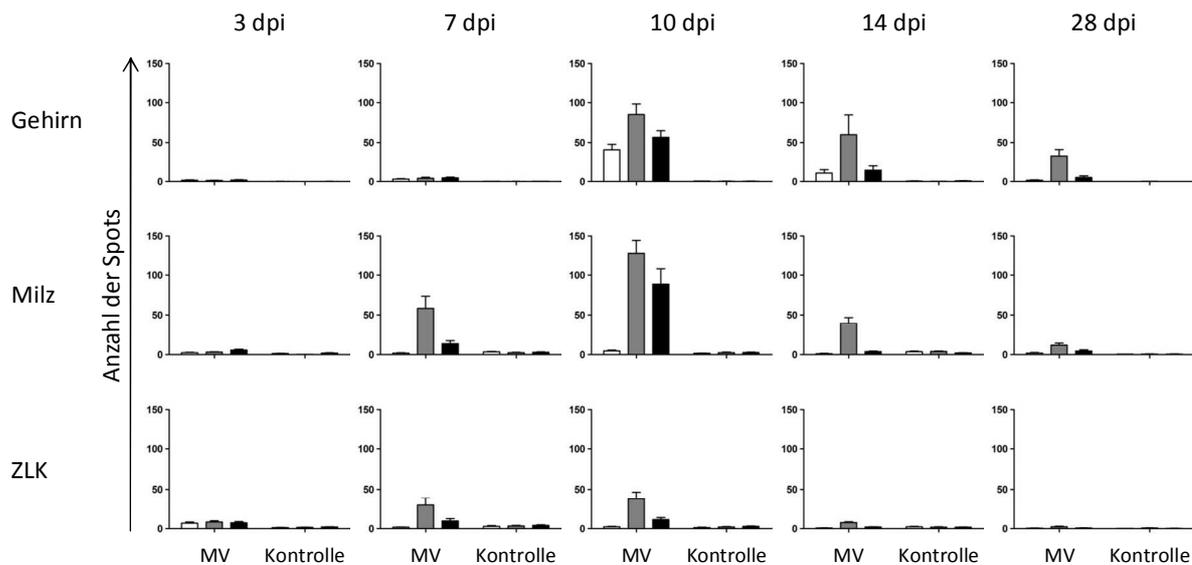


Abb. 12: MV-spezifische, IFN- γ -produzierende Zellen nach i.c. Infektion mit rMV^{Edtag}eGFP-CAMH (I)

2-Wochen-alte C57BL/6 wurden mit 10^3 pfu rMV^{Edtag}eGFP-CAMH (MV) i.c. infiziert und nach 3 bis 28 Tagen analysiert. Als Kontrolle diente eine i.c. Injektion mit 20 μ l PBS. Lymphozyten wurden aus dem Gehirn, der Milz und den ZLK isoliert und deren IFN- γ -Produktion im ELISPOT-Assay gemessen. Re-Stimulation der Lymphozyten mit: Medium (weiß), 2,5 μ M MV-H₂₂₋₃₀-Peptid (grau) bzw. 2,5 μ M MV-H₄₄₆₋₄₅₄-Peptid (schwarz); Angabe der Mittelwerte mit Standardfehler (n=4).

Die Anzahl der Spots pro Napf wurde außerdem für die Daten aus den MV-infizierten Tieren auf die Gesamtzellzahl der jeweiligen Organe hochgerechnet und der prozentuale Anteil der IFN- γ -Spots innerhalb der Gesamtzellzahl der isolierten Lymphozyten wurde in Abb. 13 dargestellt. Auf den ersten Blick sehen beide Abbildungen relativ ähnlich aus. Das Verhältnis der Daten aus Abb. 12 spiegelt sich in Abb. 13 wider. Der einzige Unterschied ist zum Zeitpunkt 10dpi zwischen dem Gehirn und der Milz zu beobachten – die absolute Anzahl der Spots pro Napf (Abb. 12) ist bei der Milz am höchsten, wohingegen der prozentuale Anteil der IFN- γ -Spots innerhalb der Gesamtzellzahl (Abb. 13) im Gehirn am größten ist (MV-H₂₂₋₃₀-spezifisch: 0,13% in der Milz *versus* 0,24% im Gehirn; MV-H₄₄₆₋₄₅₄-spezifisch: 0,09% in der Milz *versus* 0,17% im Gehirn).

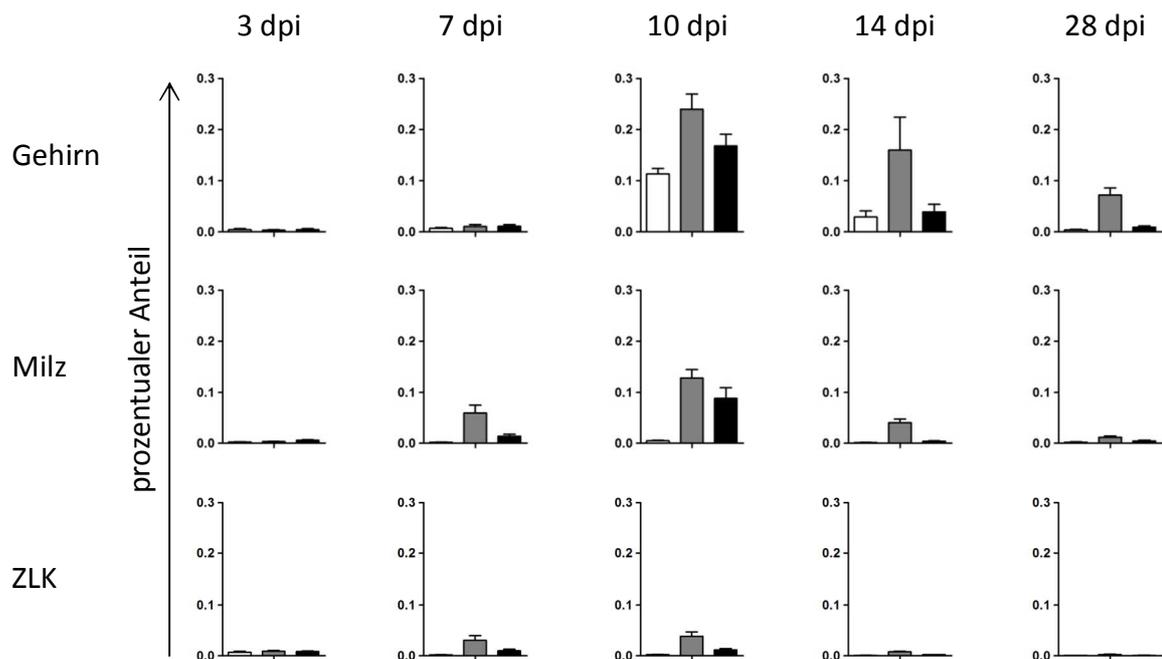


Abb. 13: MV-spezifische, IFN- γ -produzierende Zellen nach i.c. Infektion mit rMV^{Edtag}eGFP-CAMH (II)

Neukalkulation der Daten der MV-Tiere aus Abb. 12 unter Berücksichtigung der Gesamtzellzahl der aus den jeweiligen Organen isolierten Lymphozyten. Re-Stimulation der Lymphozyten mit: Medium (weiß), 2,5 μ M MV-H₂₂₋₃₀-Peptid (grau) bzw. 2,5 μ M MV-H₄₄₆₋₄₅₄-Peptid (schwarz); Angabe der Mittelwerte mit Standardfehler (n=4).

4.2.4 Etablierung einer Pentamer-Färbung zum Nachweis MV-spezifischer T-Zellen

Um MV-spezifische Effektor-Zellen in unserem Mausmodell zu identifizieren, wurde außerdem eine Pentamer-Färbung dieser Zellen für das Peptid MV-H₂₂₋₃₀ (RIVINREHL) etabliert, welches – wie schon erwähnt – Bestandteil des Hüllproteins H ist und in den vorangegangenen Untersuchungen die stärkste IFN- γ -Ausschüttung nach Re-Stimulation der isolierten Lymphozyten aus der Milz, den zervikalen Lymphknoten und dem Gehirn induzierte. Jedes Pentamer-Molekül besteht aus 5 MHC-Peptid-Komplexen und 5 Fluoreszenz-Markern, die die Detektion der markierten Zellen in der Durchflusszytometrie ermöglichen. Die MHC-Peptid-Komplexe werden von den T-Zell-Rezeptoren (TZR) auf der Oberfläche der zytotoxischen T-Zellen erkannt und gebunden, wenn dieser TZR spezifisch für das gewählte Peptid ist. In anderen Worten ausgedrückt imitieren Pentamer-Moleküle die Antigen-präsentierenden Zellen. In unserem Fall ließen wir von der Firma ProImmune das Pentamer „H-2D^b RIVINREHL“ synthetisieren, welches mit dem Fluoreszenzfarbstoff R-PE markiert ist. Damit sollte es uns möglich sein, zytotoxische T-Zellen zu identifizieren, die spezifisch das Peptid MV-H₂₂₋₃₀ (RIVINREHL) erkennen, welches von dem MHC-Molekül H-2D^b gebunden wird.

Zunächst wurden – analog zur Etablierung des IFN- γ -ELISPOT-Assay – adulte C57BL/6-Mäuse einmalig mit je 10^6 pfu MV^{Edm} immunisiert und 7d später analysiert, um herauszufinden, welches Protokoll für die Färbung der Lymphozyten mit dem Pentamer am besten geeignet ist. Hierzu wurden die Lymphozyten der Milz isoliert und zu je 10^6 Zellen auf FACS-Röhrchen in 100 μ l FACS-Puffer verteilt. Es wurde stets eine Dreifachfärbung der Zellen mit dem Pentamer-Molekül (R-PE gekoppelt) und den Antikörpern anti-Maus CD8-PerCP und anti-Maus CD19-FITC pro Röhrchen angesetzt. Der Antikörper anti-Maus CD8 diente zur Identifizierung zytotoxischer T-Zellen. Der zweite Ak anti-Maus CD19 diente zum Ausschluss falsch-positiver Ergebnisse, da bekannt ist, dass das Pentamer-Molekül auch CD19⁺ B-Zellen unspezifisch markiert. Es wurden diverse Mengen des Pentamers (1, 3 und 5 μ l pro FACS-Röhrchen) bei 4°C bzw. RT getestet. In allen Ansätzen wurden zusätzlich je 0,5 μ l der beiden Ak anti-Maus CD8 und anti-Maus CD19 verwendet. Die Färbung der Zellen bei 4°C erfolgte in einem Komplett-Ansatz inkl. Pentamer und Antikörper und dauerte 30min. Die Färbung der Zellen bei RT erfolgte zunächst erst mit dem Pentamer für 10min und nach einem anschließenden Waschschrift mit den beiden Antikörpern bei 4°C für 20min. Bei der Auswertung der FACS-Daten wurde die Darstellung der CD8⁺ Pentamer⁺ T-Zellen immer auf die CD19⁻ Lymphozyten bezogen. Das beste Ergebnis wurde erreicht, wenn die Zellen gleichzeitig mit den Antikörpern und 5 μ l Pentamer 30min bei 4°C inkubiert wurden. In diesem Fall war zum einen die CD8⁺ Pentamer⁺ T-Zell-Population zahlenmäßig am größten und die Hintergrundfärbung des Pentamer am geringsten. Die Färbung bei RT erzielte eine zahlenmäßig kleinere CD8⁺ Pentamer⁺ T-Zell-Population (vgl. Abb. 14).

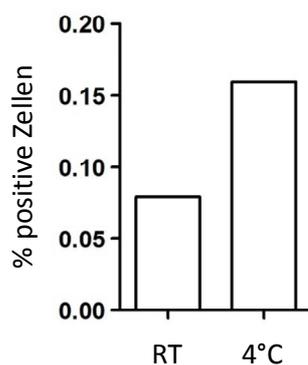


Abb. 14: Titration des Pentamer-Moleküls

C57BL/6 wurden mit 10^6 pfu MV^{Edm} i.p. immunisiert und 7d später analysiert. Lymphozyten wurden aus der Milz isoliert, mit den Antikörpern anti-Maus CD19-FITC und anti-Maus CD8-PerCP sowie mit dem Pentamer (R-PE gekoppelt) bei RT bzw. 4°C gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Der prozentuale Anteil der im *Live-Gate* befindlichen CD19⁻ CD8⁺ Pentamer⁺ T-Zellen wurde quantifiziert.

4.2.5 D^bMV-H₂₂₋₃₀-spezifische T-Zellen im Gehirn, der Milz und den ZLK nach i.c. Infektion

Der nächste Schritt bestand darin, herauszufinden, ob in unserem Mausmodell nach i.c. Infektion von C57BL/6 mit rMV^{Edtag}eGFP-CAMH ebenfalls MV-spezifische, Pentamer⁺ T-Zellen in der Milz, den zervikalen Lymphknoten und im Gehirn nachweisbar sind. Hierzu wurden wieder 2-Wochen-alte C57BL/6 infiziert und 3, 7, 10, 14 und 28 Tage später analysiert. Als Kontrolle für die Infektion diente wieder eine Injektion mit sterilem PBS. Die isolierten Lymphozyten wurden mit den Antikörpern anti-Maus CD19-FITC und anti-Maus CD8-PerCP sowie mit dem Pentamer „H-2D^b RIVINREHL“ (5µl pro FACS-Röhrchen; Inkubation dieser Dreifachfärbung bei 4°C 30min) gefärbt um mittels Durchflusszytometrie quantifiziert werden zu können. Bei der Auswertung der FACS-Daten wurde die Darstellung der CD8⁺ Pentamer⁺ T-Zellen wie zuvor auf die CD19⁻ Lymphozyten bezogen.

Betrachten wir zunächst die aus dem Gehirn isolierten Lymphozyten: der prozentuale Anteil der sich im *Live-Gate* befindlichen CD19⁻ CD8⁺ Pentamer⁺ T-Zellen sowie die daraus resultierende Gesamtzellzahl dieser Zellen wurde quantifiziert und in Abb. 15 dargestellt. Beispielhaft wurde je ein FACS-Bild der CD19⁻ CD8⁺ Pentamer⁺ T-Zellen aus infizierten und Kontroll-Tieren zum Zeitpunkt 7dpi gezeigt. Die prozentualen Werte geben nach Abzug der Isotypkontrolle den Anteil der sich im oberen, rechten Quadranten befindlichen, doppelt positiven Zellen wieder. Im Vergleich zu PBS-injizierten Kontroll-Tieren sind 7 Tage nach Infektion CD19⁻ CD8⁺ Pentamer⁺ T-Zellen im Gehirn infizierter Mäuse nachweisbar, welche erwartungsgemäß in Kontroll-Tieren nicht zu detektieren waren. Der prozentuale Anteil stieg dabei von 2% an Tag 7 auf bis zu 6% an Tag 28 nach Infektion (P = 0,0028). Die Gesamtzellzahl verhielt sich ähnlich und stieg von 3.200 an Tag 7 auf bis zu 8.300 an Tag 28 nach Infektion (P < 0,0001). Das Maximum der CD19⁻ CD8⁺ Pentamer⁺ T-Zellen wurde während der akuten ZNS-Infektion mit 9.100 Zellen an Tag 10 erreicht. Interessanterweise stieg diese Zahl nach einem zwischenzeitlichen Abfall an Tag 14 (2.600 Zellen) wieder bis Tag 28 nach Infektion an – unabhängig davon, dass die Gesamtzellzahl der aus dem Gehirn isolierten Lymphozyten MV-infizierter Tiere an Tag 14 und 28 relativ gleich hoch war (210.000 Zellen an Tag 14 *versus* 180.000 Zellen an Tag 28). Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass abhängig von der Infektion D^bMV-H₂₂₋₃₀-spezifische CD8⁺ T-Zellen ins Gehirn einwandern.

Parallel zum Gehirn wurden auch die Lymphozyten aus der Milz und den ZLK isoliert und untersucht. Die Zellen wurden ebenfalls mit den Antikörpern anti-Maus CD19-FITC und anti-Maus CD8-PerCP sowie dem Pentamer „H-2D^b RIVINREHL“ (5µl pro FACS-Röhrchen) gefärbt um mittels Durchflusszytometrie quantifiziert werden zu können. Der prozentuale Anteil der sich im *Live-Gate* befindlichen CD19⁻ CD8⁺ Pentamer⁺ T-Zellen sowie die daraus resultierende Gesamtzellzahl dieser Zellen wurde quantifiziert und in Abb. 16 dargestellt.

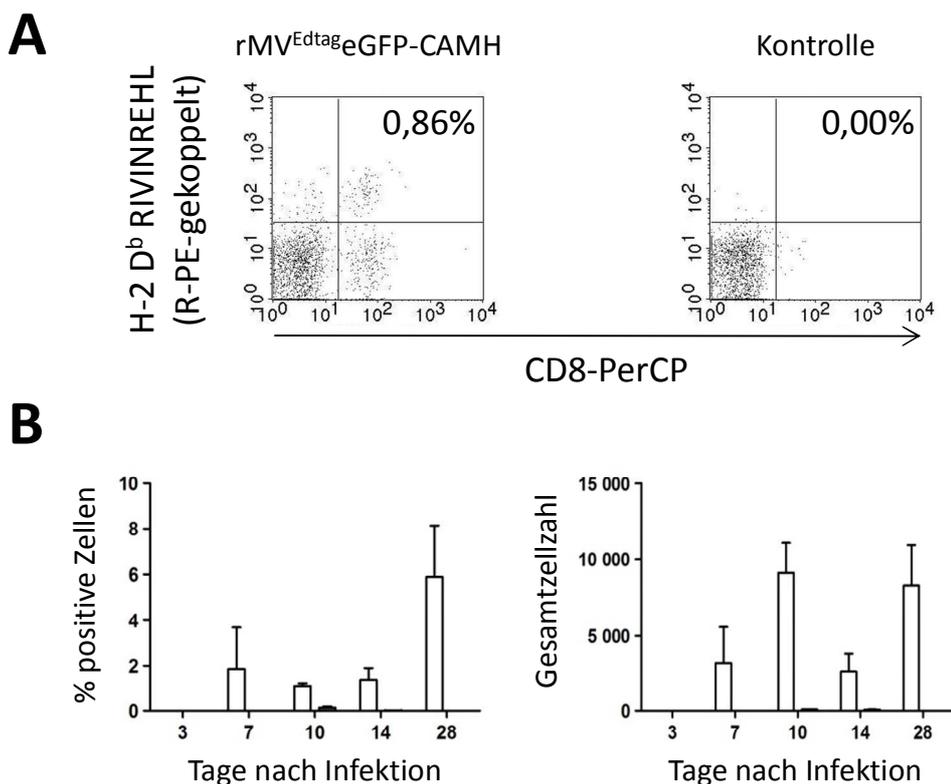


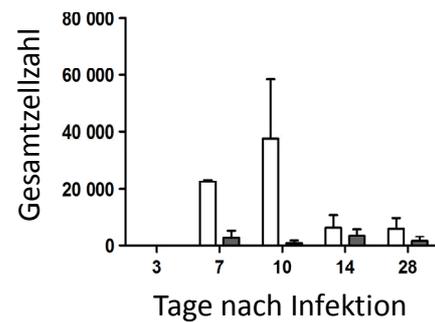
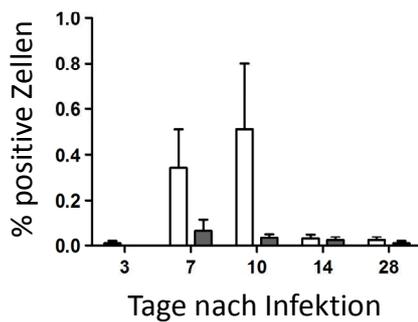
Abb. 15: D^bMV-H₂₂₋₃₀-spezifische CD8⁺ T-Zellen im Gehirn MV-infizierter Mäuse

2-Wochen-alte C57BL/6 wurden i.c. mit 10^3 pfu rMV^{Edtag}eGFP-CAMH infiziert und nach 3 bis 28 Tagen analysiert. Als Kontrolle diente eine i.c. Injektion mit 20 μ l PBS. Lymphozyten wurden aus dem Gehirn isoliert, mit den Antikörpern anti-Maus CD19-FITC, anti-Maus CD8-PerCP sowie dem Pentamer „H-2D^b RIVINREHL“ (R-PE gekoppelt) gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. (A) Dargestellt ist je ein repräsentatives FACS-Bild (*gagatet* auf CD19⁻ T-Zellen) von Lymphozyten aus dem Gehirn infizierter Tiere und Kontroll-Tiere zum Zeitpunkt 7dpi mit den dazu gehörigen Prozentangaben der im oberen, rechten Quadranten befindlichen Zellen nach Abzug des Wertes für die Isotypkontrolle. (B) Dargestellt sind der prozentuale Anteil sowie die daraus resultierende Gesamtzellzahl der D^bMV-H₂₂₋₃₀-spezifischen CD19⁻ CD8⁺ T-Zellen im Gehirn infizierter Tiere und Kontroll-Tiere. Angabe der Mittelwerte mit Standardfehler (n=3; P < 0,005).

weiß: rMV^{Edtag}eGFP-CAMH; grau: Kontrolle

D^bMV-H₂₂₋₃₀-spezifische CD8⁺ T-Zellen wurden 7 und 14 Tage nach i.c. Infektion mit rMV^{Edtag}eGFP-CAMH in der Milz und den ZLK detektiert. Der prozentuale Anteil dieser Zellen betrug 0,34% an Tag 7 und 0,51% an Tag 10 in der Milz (P = 0,0323) sowie 0,2% an Tag 7 und 0,05% an Tag 10 in den ZLK (P = 0,0212). Die Gesamtzellzahl der CD19⁻ CD8⁺ Pentamer⁺ T-Zellen betrug 22.000 an Tag 7 und 38.000 an Tag 10 in der Milz (P = 0,0085) sowie 4.000 an Tag 7 und 1.300 an Tag 10 in den ZLK (n.s., P = 0,0546). An Tag 14 und 28 nach Infektion wurden im Vergleich zu den Werten aus Kontroll-Tieren keine D^bMV-H₂₂₋₃₀-spezifischen T-Zellen in der Milz und den ZLK detektiert.

Milz:



zervikale Lymphknoten:

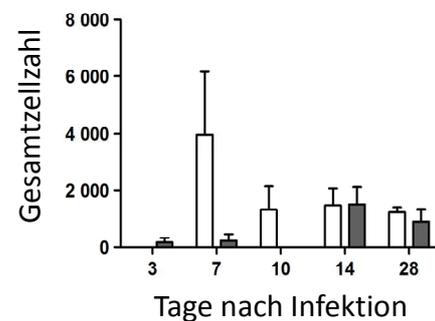
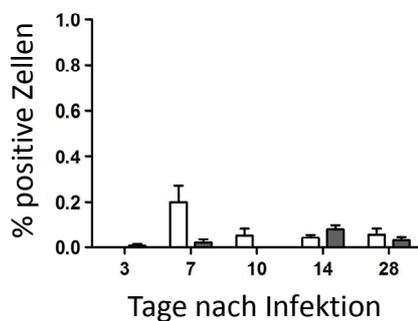


Abb. 16: D^bMV-H₂₂₋₃₀-spezifische CD8⁺ T-Zellen in der Milz und den ZLK MV-infizierter Mäuse

2-Wochen-alte C57BL/6 wurden i.c. mit 10^3 pfu rMV^{Edtag}eGFP-CAMH infiziert und nach 3 bis 28 Tagen analysiert. Als Kontrolle diente eine i.c. Injektion mit 20 μ l PBS. Lymphozyten wurden aus der Milz und den ZLK isoliert, mit den Antikörpern anti-Maus CD19-FITC, anti-Maus CD8-PerCP sowie dem Pentamer „H-2D^b RIVINREHL“ (R-PE gekoppelt) gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Dargestellt sind der prozentuale Anteil (links) und die daraus resultierende Gesamtzellzahl (rechts) der D^bMV-H₂₂₋₃₀-spezifischen CD19⁻ CD8⁺ T-Zellen aus infizierten Tieren und Kontroll-Tieren. Angabe der Mittelwerte mit Standardfehler (n=3; P < 0,05 außer Abb. unten rechts: P = 0,0546).

weiß: rMV^{Edtag}eGFP-CAMH; grau: Kontrolle

Eine sehr interessante Darstellung ergibt sich, wenn man die Daten aus Abb. 15 und Abb. 16 neu kalkuliert und den prozentualen Anteil der D^bMV-H₂₂₋₃₀-spezifischen CTLs innerhalb der gesamten CD8⁺ T-Zell-Population berechnet (vgl. Abb. 17). Dabei ist nun zu sehen, dass der mit Abstand höchste Anteil der D^bMV-H₂₂₋₃₀-spezifischen CD8⁺ T-Zellen im Gehirn zu detektieren war – unabhängig vom Zeitpunkt. Der geringste prozentuale Anteil war in den ZLK zu beobachten mit max. 0,7% an Tag 7 nach Infektion. Die Milz-Lymphozyten enthielten bis zu 2,4% D^bMV-H₂₂₋₃₀-spezifische CD8⁺ T-Zellen. Im Gehirn war z.T. jede dritte CD8⁺ T-Zelle D^bMV-H₂₂₋₃₀-spezifisch (31% an Tag 10). Erstaunlicherweise war sogar zum Zeitpunkt der persistierenden ZNS-Infektion immer noch ein hoher Anteil der CTLs

Masern-spezifisch (16% an Tag 28; im Vergleich zu 10dpi: $P > 0,05$). Dies zeigt, dass in unserem Mausmodell der i.c. Infektion Masern-spezifische T-Zellen vor allem am Ort der Infektion (Gehirn) und weniger in der Milz oder den zervikalen Lymphknoten vorzufinden sind.

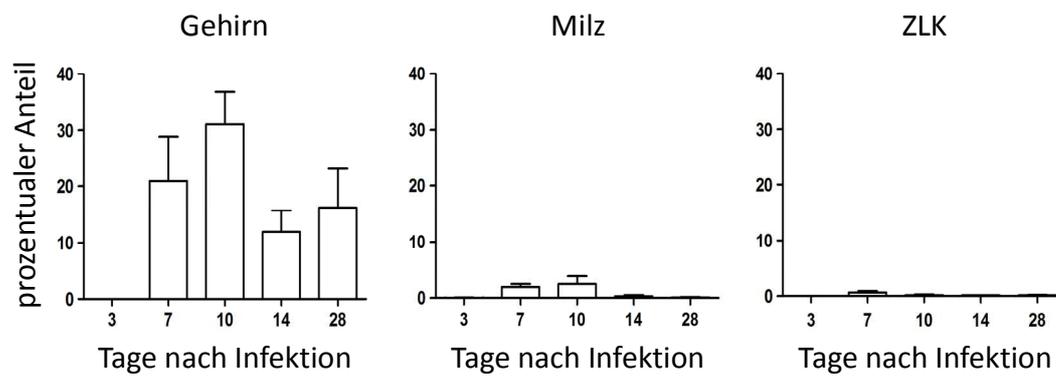


Abb. 17: Anteil der D^b MV- H_{22-30} -spezifischen CTLs innerhalb der gesamten $CD8^+$ T-Zell-Population

Quantifizierung des prozentualen Anteils der D^b MV- H_{22-30} -spezifischen Zellen innerhalb der gesamten $CD8^+$ T-Zell-Population. Angabe der Mittelwerte mit Standardfehler ($n=3$).

4.3 Einwanderung von regulatorischen T-Zellen ins Gehirn MV-infizierter Mäuse

4.3.1 i.c. Infektion von C57BL/6 mit rMV^{Edtag}eGFP-CAMH hat keinen Einfluss auf die Verteilung der T_{reg} in der Milz und den ZLK

Die intranasale (i.n.) Infektion CD150-transgener Mäuse mit Wildtyp-MV zeigte bereits, dass CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T-Zellen nach Infektion ins Gehirn einwandern (Sellin *et al.*, 2009). Um den Anteil dieser Zellen in unserem Mausmodell zu bestimmen, wurden wieder 2-Wochen-alte C57BL/6 mit 10³pfu rMV^{Edtag}eGFP-CAMH i.c. infiziert und 3, 7, 10, 14 und 28 Tage später analysiert. Als Kontrolle für die Infektion diente wieder eine i.c. Injektion mit 20µl PBS. Die aus der Milz, den ZLK und dem Gehirn isolierten Lymphozyten wurden mit den Antikörpern anti-Maus CD4-PerCP, anti-Maus CD25-FITC und anti-Maus Foxp3-PE gefärbt und in der Durchflusszytometrie untersucht. Der prozentuale Anteil der sich im *Live-Gate* befindlichen CD4⁺ Foxp3⁺ T-Zellen aus der Milz und den ZLK wurde quantifiziert und in Abb. 18B dargestellt. Beispielhaft wurde je ein FACS-Bild der CD4⁺ Foxp3⁺ T-Zellen aus den ZLK und dem Gehirn infizierter Tiere zum Zeitpunkt 7dpi gezeigt (vgl. Abb. 18A). Der prozentuale Wert gibt nach Abzug der Isotypkontrolle den Anteil der sich im oberen, rechten Quadranten befindlichen, für beide Antikörper doppelt positiven Zellen wieder.

Vergleicht man in der Milz und den ZLK die prozentualen Anteile der CD4⁺ Foxp3⁺ T-Zellen zwischen MV-infizierten und Kontroll-Tieren, so sind über den gesamten Zeitraum keine signifikanten Unterschiede zu beobachten. In der Milz bewegen sich die Werte um die 2% (n.s., P = 0,0605) und in den ZLK um die 5% (n.s., P = 0,0639).

Da im Gehirn keine eindeutige, mit den ZLK oder der Milz vergleichbare CD4⁺ Foxp3⁺ T-Zell-Population sichtbar war (vgl. Abb. 18A), wurde auf die Angabe des prozentualen Wertes für den oberen, rechten Quadranten des FACS-Bildes sowie auf die Quantifizierung der Daten verzichtet. Es war nicht klar, ob die Färbung der aus dem Gehirn isolierten Lymphozyten mit dem Ak anti-Maus Foxp3-PE nicht funktionierte oder ob die Zahl der Foxp3⁺ T-Zellen lediglich unterhalb der Detektionsgrenze fiel. Um dennoch die Einwanderung von T_{reg} ins Gehirn beurteilen zu können, wurden DEREK-Mäuse mit rMV^{Edtag}CAMH infiziert und analysiert (vgl. Kapitel 4.3.2).

4.3.2 Einwanderung von T_{reg} nach i.c. Infektion mit rMV^{Edtag}CAMH in DEREK-Mäusen

Es stellte sich also die Frage, ob tatsächlich abhängig von der Infektion T_{reg} ins Gehirn einwandern. Zur weiteren Klärung dieser Fragestellung wurden transgene Mäuse verwendet, die das grün fluoreszierende Protein (GFP) unter der Kontrolle des Foxp3-Promotors exprimieren (DEREK-Mäuse; (Lahl *et al.*, 2007)), d.h. GFP wird ausschließlich in Foxp3⁺ T-Zellen gebildet. Eine Färbung dieser Zellen ist mit Antikörpern nicht notwendig, da GFP in der Durchflusszytometrie direkt detektiert werden kann.

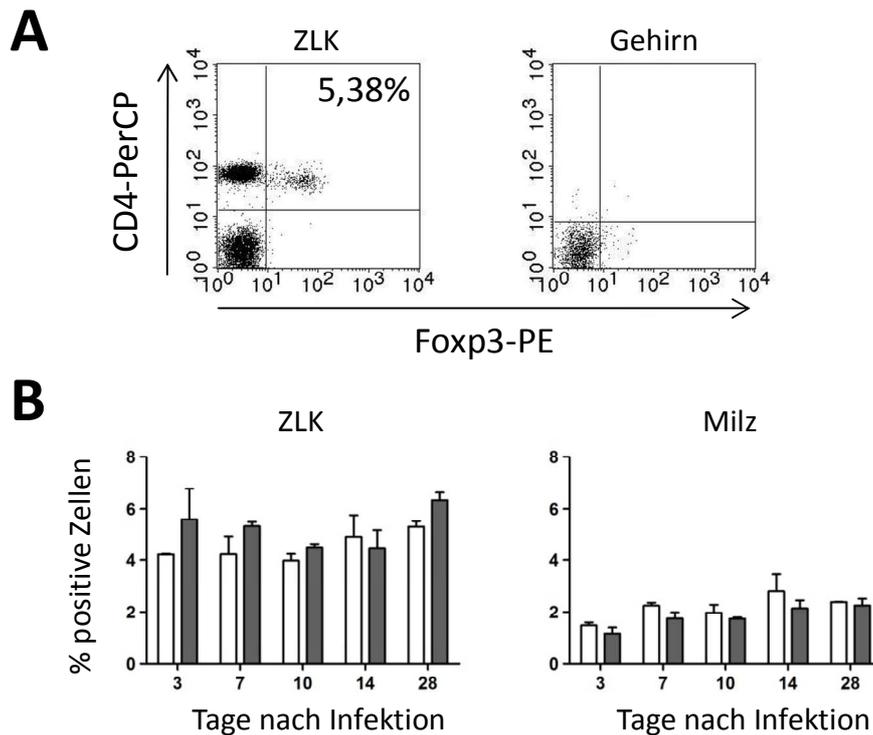


Abb. 18: Verteilung von T_{reg} in den ZLK und der Milz nach i.c. Infektion mit $rMV^{Edtag}eGFP-CAMH$

2-Wochen-alte C57BL/6 wurden i.c. mit 10^3 pfu $rMV^{Edtag}eGFP-CAMH$ infiziert und nach 3 bis 28 Tagen analysiert. Als Kontrolle diente eine i.c. Injektion mit 20 μ l PBS. Lymphozyten wurden aus dem Gehirn, der Milz und den ZLK isoliert, mit den Antikörpern anti-Maus CD25-FITC, anti-Maus CD4-PerCP sowie anti-Maus Foxp3-PE gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. **(A)** Dargestellt ist je ein repräsentatives FACS-Bild der Lymphozyten aus den ZLK und dem Gehirn. **(B)** Der prozentuale Anteil der im *Live-Gate* befindlichen $CD4^+$ Foxp3⁺ T-Zellen aus den ZLK und der Milz wurden quantifiziert. Angabe der Mittelwerte mit Standardfehler (n=3; n.s., $P > 0,05$).

weiß: $rMV^{Edtag}eGFP-CAMH$; grau: Kontrolle

Aufgrund der Tatsache, dass DEREK-Mäuse nicht homozygot gezüchtet werden können, wurden die Tiere immer heterozygot mit einer WT-Maus verpaart. Dadurch mussten die Nachkommen jedes Mal typisiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dafür eine PCR mit dem Primerpaar „DEREG5_fw“/„DEREG5_rev“ etabliert, welche die Identifizierung von DEREK-Mäusen ermöglicht. Dazu wurde von den Tieren eine Gewebeprobe entnommen, die genomische DNA aufgereinigt und mittels PCR analysiert. Das für die DEREK-Mäuse typische PCR-Fragment hatte eine Größe von 209bp. In Abb. 19 sind beispielhaft die Ergebnisse für eine DEREK- und eine C57BL/6-WT-Maus gezeigt.

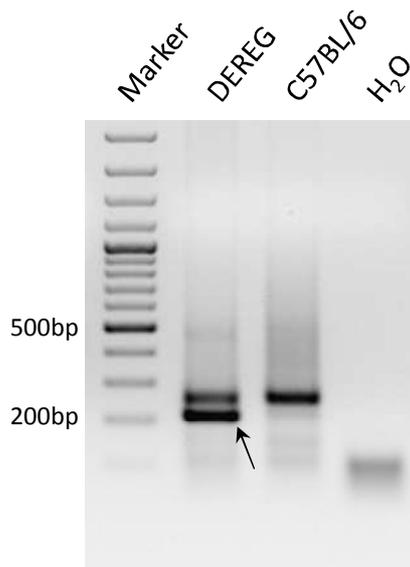


Abb. 19: Genotypisierung DEREK-Mäuse

Mausgewebeprobe einer DEREK- und einer C57BL/6-WT-Maus wurden mittels PCR typisiert. Der Pfeil markiert das entsprechende PCR-Produkt im Gel (209bp), welches typisch für DEREK-Mäuse ist.

Innerhalb der Infektionsversuche wurden 2-Wochen-alte DEREK-Mäuse mit 10^3 pfu rMV^{Edtag}CAMH i.c. infiziert. Als Kontrolle für die Infektion diente eine i.c. Injektion mit 20 μ l PBS. Nach 3, 7, 10, 14 und 28 Tagen nach Infektion wurden Lymphozyten aus dem Gehirn isoliert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Der prozentuale Anteil der sich im *Live-Gate* befindlichen Foxp3GFP⁺ T-Zellen sowie die daraus resultierende Gesamtzellzahl dieser Zellen wurde quantifiziert und in Abb. 20 dargestellt. Es zeigte sich, dass abhängig von der Infektion Foxp3GFP⁺ T-Zellen ins Gehirn einwandern. Bei allen untersuchten Zeitpunkten wurden bis zu 0,1% Foxp3GFP⁺ Zellen detektiert ($P = 0,0035$ im Vergleich zur Kontrolle). An Tag 14 nach Infektion stieg der prozentuale Anteil dieser Zellen sogar bis auf fast das Doppelte im Vergleich zu den restlichen Zeitpunkten an (0,17% Foxp3GFP⁺ Zellen). Die Gesamtzellzahl dieser Zellen stieg von anfänglich 600 an Tag 3 auf bis zu 1.300 an Tag 7 nach Infektion an und nahm danach wieder bis auf 600 an Tag 28 ab ($P = 0,0005$ im Vergleich zur Kontrolle). Der prozentuale Anteil und die Gesamtzellzahl der Foxp3GFP⁺ T-Zellen in Kontroll-Tieren blieben jedoch konstant niedrig (max. 0,02% bzw. 50 Zellen).

Vergleicht man die Daten mit denen aus der Milz und den ZLK (vgl. Abb. 18B), dann sieht man jedoch, dass der prozentuale Anteil der T_{reg} im Gehirn verschwindend gering ist (2% in der Milz und 5% in den ZLK *versus* 0,1% im Gehirn; $P < 0,0001$).

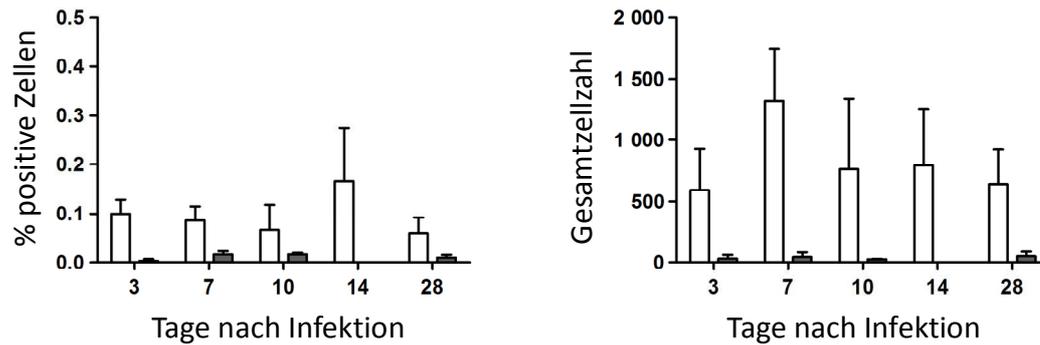


Abb. 20: Foxp3GFP⁺ Zellen im Gehirn MV-infizierter Mäuse

2-Wochen-alte DEREK-Mäuse wurden i.c. mit 10^3 pfu rMV^{Edtag}CAMH infiziert und nach 3 bis 28 Tagen analysiert. Als Kontrolle diente eine i.c. Injektion mit 20 μ l PBS. Lymphozyten wurden aus dem Gehirn isoliert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Dargestellt sind der prozentuale Anteil sowie die Gesamtzellzahl der aus dem Gehirn infizierter Tiere und Kontroll-Tiere isolierten Foxp3GFP⁺ Lymphozyten. Angabe der Mittelwerte mit Standardfehler (n=3; P < 0,005).

weiß: rMV^{Edtag}CAMH; grau: Kontrolle

Eine weitere Möglichkeit, das Vorhandensein sowie die Position Foxp3GFP⁺ T-Zellen im Gehirn infizierter DEREK-Mäuse nachzuweisen, ist die fluoreszenzmikroskopische Analyse histologischer Schnitte. Da GFP am Fluoreszenzmikroskop aber bekannterweise nicht direkt detektierbar ist (Lahl *et al.*, 2007), sollte eine immunhistochemische Färbung mit dem Erstantikörper Kaninchen anti-GFP sowie dem Zweitantikörper Ziege anti-Kaninchen IgG(H+L)-Alexa488 etabliert werden, um das GFP-Signal soweit zu verstärken, bis es fluoreszenzmikroskopisch sichtbar wurde.

Da nun aber die Foxp3GFP⁺ Zellen grün leuchten, wurde bei der ZNS-Infektion das rot-fluoreszierende Virus rMV^{Edtag}HcRed-CAMH verwendet (vgl. Abb. 21), damit die Virusinfektion von den T_{reg} unterschieden werden konnte. Dieses Virus hat den gleichen Genomaufbau wie rMV^{Edtag}eGFP-CAMH; aber anstelle des GFP beinhaltet es das rot fluoreszierende Protein HcRed (*Heteractis crispa red fluorescent protein*). Desweiteren wurden im P-Gen des rMV^{Edtag}HcRed-CAMH die 5'-nicht-translatierte Region verkürzt und 3 Mutationen (aa-Positionen 110 H→Y, 246 S→L und 306 H→Y) eingefügt, so dass die WT-P-Sequenz exprimiert wird.

Das Virus verursachte eine zu rMV^{Edtag}eGFP-CAMH vergleichbare Infektion *in vitro*. Jedoch wurde für die *in vivo* Infektion 2-Wochen-alter DEREK-Mäuse eine Virusmenge von 5×10^3 pfu pro Maus eingesetzt, um eine zu rMV^{Edtag}eGFP-CAMH (1×10^3 pfu/Maus) vergleichbare ZNS-Infektion zu erreichen. Abgesehen von der erhöhten injizierten Virusmenge verursachte rMV^{Edtag}HcRed-CAMH im Gehirn genauso eine akute ZNS-Infektion wie rMV^{Edtag}eGFP-CAMH. Innerhalb einer Woche breitete sich das Virus ebenso nicht nur über die gesamte linke Hirnhälfte aus, sondern auch über den

rechten Teil des Gehirns, wobei vor allem im Kortex große Foki infizierter Zellen zu beobachten waren (vgl. Abb. 21B). Nachdem das Immunsystem der Maus die akute Infektion größtenteils eliminierte, blieben nur noch einzeln infizierte, rot fluoreszierende Neuronen übrig, die die persistierende ZNS-Infektion repräsentierten. Ebenso wie bei $rMV^{Edtag}eGFP-CAMH$ beschränkte sich die Expression des HcRed nicht nur auf den Zellkörper, sondern konnte auch im Axon und den Dendriten beobachtet werden (vgl. Abb. 21C).

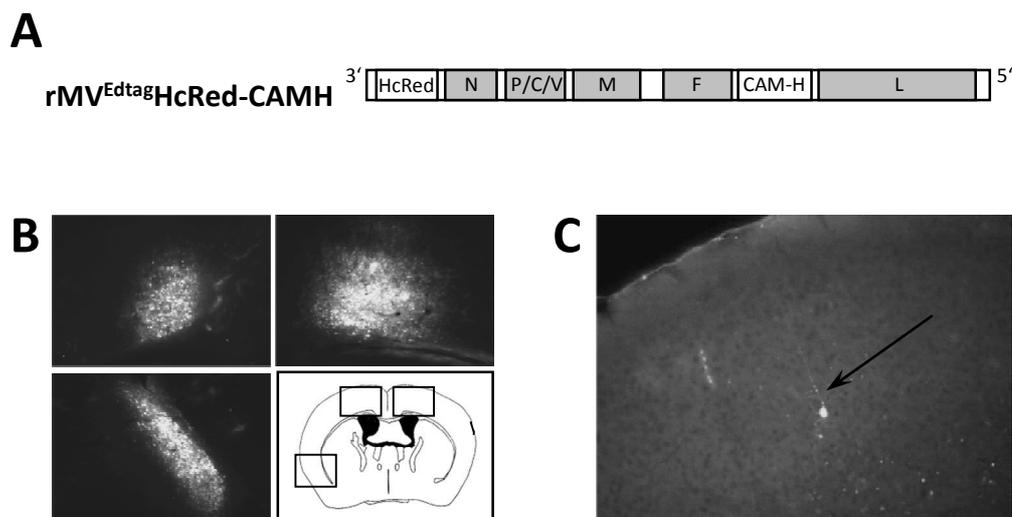


Abb. 21: Rekombinantes rot-fluoreszierendes Virus und ZNS-Infektion

(A) Genomaufbau des rot fluoreszierenden, rekombinanten Masernvirus. Analog zu $rMV^{Edtag}eGFP-CAMH$ beinhaltet es das an Nager adaptierte Hämagglutinin (CAMH). Die Infektion der Gehirn-Zellen wurde über die Expression des rot fluoreszierenden Proteins (HcRed) verfolgt. (B) und (C) 2-Wochen-alte DEREK-Mäuse wurden mit 5×10^3 pfu $rMV^{Edtag}HcRed-CAMH$ i.c. infiziert (linke Hemisphäre) und nach 7 Tagen bzw. 28 Tagen analysiert. (B) Ausschnitte aus einer koronalen Gehirn-Sektion der akuten ZNS-Infektion (7dpi; 10fach-Vergr.). (C) Eine einzelne, HcRed-positive Zelle in der persistierenden Phase der ZNS-Infektion (28dpi; 10fach-Vergr.). Der Pfeil markiert das Axon, welches vom Zellkörper aus nach oben gerichtet ist.

Wie bereits erwähnt, ist es schwierig, GFP fluoreszenzmikroskopisch direkt zu beobachten. Dies bestätigte sich bei den histologischen Gehirn-Schnitten $rMV^{Edtag}HcRed-CAMH$ -infizierter DEREK-Mäuse. Daraufhin sollte zusätzlich eine Antikörper-Färbung gegen das GFP-Protein entwickelt werden, um die Grünfluoreszenz optisch zu verstärken. Für die immunhistochemische Färbung von GFP wurde zunächst ein Färbeprotokoll anhand $rMV^{Edtag}eGFP-CAMH$ -infizierter C57BL/6 etabliert. Hierfür wurde das Gehirn einer $rMV^{Edtag}eGFP-CAMH$ infizierten Maus (7dpi) verwendet, da in diesem Fall eindeutig infizierte GFP-positive Zellen sichtbar waren. GFP-positive Hirnschnitte wurden laut

Protokoll (vgl. Kapitel 3.4.2) mit drei verschiedenen Konzentrationen des Erstantikörpers Kaninchen anti-GFP (3µg/ml, 10µg/ml bzw. 30µg/ml) sowie zwei verschiedenen Konzentrationen des Zweitantikörpers Ziege anti-Kaninchen IgG(H+L)-Alexa594 (1:50-Verd., 1:200-Verd.) gefärbt. Die Fluoreszenz des Zweit-Ak wurde in rot gewählt, damit man den Unterschied zwischen der endogenen GFP-Expression und der Färbung mit dem Ak anti-GFP sehen konnte sowie die Qualität der Färbung mit dem Ak anti-GFP beurteilen konnte. Es zeigte sich, dass die Kombination aus 10µg/ml Erst-Ak und der 1:200-Verd. des Zweit-Ak das beste Ergebnis erzielte (vgl. Abb. 22). Obwohl die Grünfluoreszenz am Mikroskop nur relativ schwach zu sehen war, ist eine überaus deutliche Rotfluoreszenz zu beobachten gewesen, d.h. der Ak anti-GFP detektierte sogar GFP-positive Bereiche, die für das menschliche Auge nahezu unsichtbar waren.

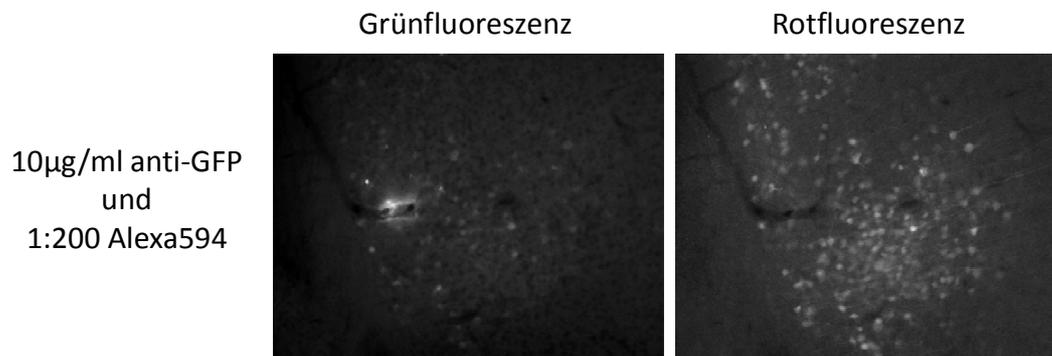


Abb. 22: Färbung von rMV^{Edtag}eGFP-CAMH infizierten Hirnschnitten mit anti-GFP

2-Wochen-alte C57BL/6 wurden mit 10^3 pfu rMV^{Edtag}eGFP-CAMH i.c. infiziert und nach 7 Tagen analysiert. Die Hirn-Sektionen wurden mit Kaninchen anti-GFP (Erstantikörper) und Ziege anti-Kaninchen IgG(H+L)-Alexa594 (Zweitantikörper) gefärbt. Gezeigt ist ein Ausschnitt aus dem Kortex der rechten Hemisphäre (20fach-Vergr.).

Aufgrund dieses Ergebnisses wurden die Hirnschnitte rMV^{Edtag}HcRed-CAMH infizierter DEREK-Mäuse mit 10µg/ml Kaninchen anti-GFP sowie einer 1:100-Verd. des Zweit-Ak Ziege anti-Kaninchen IgG(H+L)-Alexa488 gefärbt (vgl. Kapitel 3.4.2). Im Gegensatz zur vorhergehenden Färbung wurde dieses Mal die Fluoreszenz des Zweit-Ak in grün gewählt, um die Grünfluoreszenz der Foxp3GFP⁺ Zellen am Mikroskop optisch nur zu verstärken. Dies diente auch der Unterscheidung zwischen infizierten Zellen (Rotfluoreszenz) und Foxp3GFP⁺ Zellen (Grünfluoreszenz). Es konnte jedoch in keinem der Hirnschnitte eine spezifische GFP-positive Färbung der Foxp3GFP⁺ Zellen beobachtet werden. Es zeigte sich lediglich ein grün leuchtender „Feinstaub“, der sich aber als Hintergrund heraus stellte, da er auch bei den beiden Kontrollen (i.c. Injektion mit PBS einer DEREK-Maus bzw. rMV^{Edtag}HcRed-CAMH Infektion einer DEREK-neg. Maus) zu beobachten war. Diese

Hintergrundfärbung beruhte auf der Färbung mit dem Erst-Ak (vgl. Abb. 23 oben), da sie nicht bei Proben sichtbar war, die nur mit dem Zweit-Ak gefärbt wurden (vgl. Abb. 23 unten).

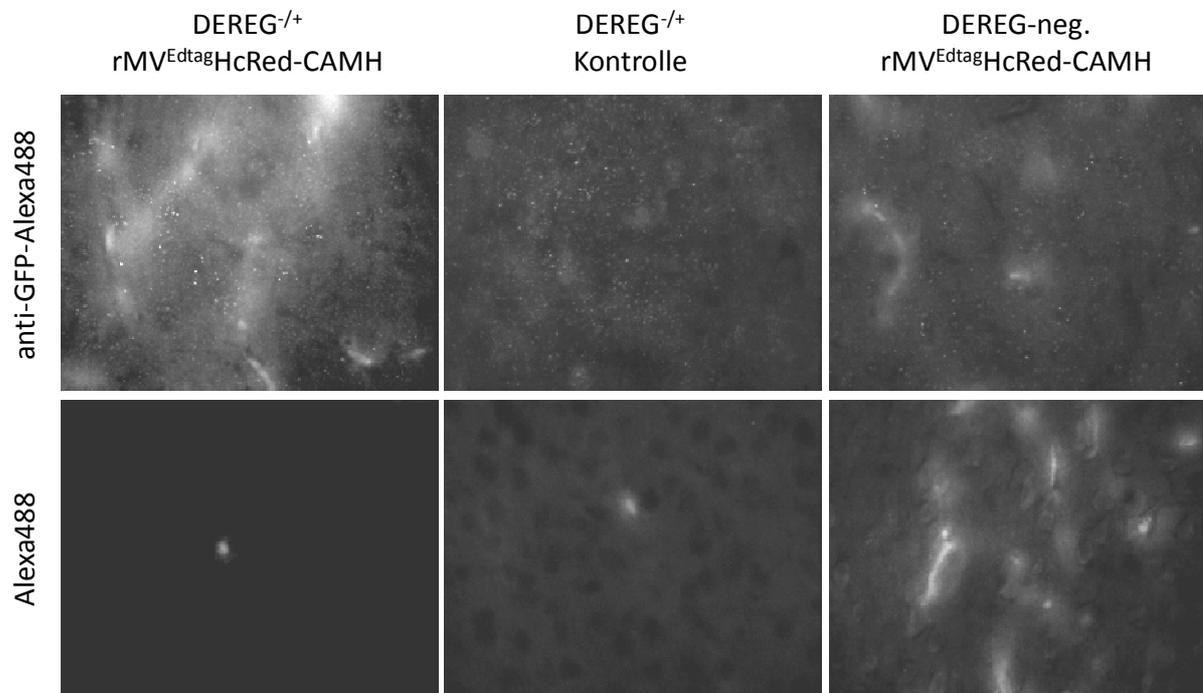


Abb. 23: Färbung von Foxp3GFP mit anti-GFP

2-Wochen-alte DEREG-Mäuse wurden mit 5×10^3 pfu rMV^{Edtag}HcRed-CAMH i.c. infiziert und nach 7 Tagen analysiert. Als Kontrolle diente eine i.c. Injektion mit 20 μ l PBS (Mitte) bzw. eine Infektion einer DEREG-neg. Maus mit rMV^{Edtag}HcRed-CAMH (rechts). Die Hirn-Sektionen wurden mit Kaninchen anti-GFP (Erstantikörper; 10 μ g/ml) und Ziege anti-Kaninchen IgG(H+L)-Alexa488 (Zweitantikörper; 1:100-Verd.) gefärbt (oben) bzw. nur mit Ziege anti-Kaninchen IgG(H+L)-Alexa488 gefärbt (unten). Gezeigt ist jeweils ein Ausschnitt aus der rechten Hemisphäre (Kortex; 40fach-Vergr.).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Detektion Foxp3GFP⁺ Zellen im Gehirn von DEREG-Mäusen per Durchflusszytometrie möglich ist, jedoch nicht mittels immunhistochemischer Färbung von PFA-fixierten, 100 μ m-dicken Gewebeschnitten. Der Anteil der T_{reg} im Gehirn infizierter Mäuse lag in der Durchflusszytometrie bei ca. 0,1% innerhalb der vorhandenen Lymphozyten. Vermutlich bewegt sich dieser äußerst geringe Anteil dieser Zellen in der Immunhistochemie unterhalb der Detektionsgrenze.

4.4 Einfluss der Expansion regulatorischer T-Zellen auf die MV-Infektion

Nachdem gezeigt wurde, dass Masern-spezifische CTLs sowie ein kleiner Anteil T_{reg} ins Gehirn MV-infizierter Mäuse einwandern, sollte im weiteren Teil der Arbeit die Zahl der T_{reg} in der Peripherie manipuliert werden, um den Einfluss der T_{reg} auf die zerebrale MV-Infektion zu untersuchen.

4.4.1 Expansion von T_{reg} in C57BL/6 mit Hilfe des superagonistischen Antikörpers D665

D665 ist ein superagonistischer anti-CD28 monoklonaler Antikörper, der spezifisch für Maus ist. Mit Hilfe dieses Antikörpers werden $CD4^+ CD25^+ Foxp3^+$ T-Zellen *in vivo* transient expandiert (Hünig, 2007). Zunächst wurden verschiedene Dosen des Antikörpers in 2-Wochen-alten C57BL/6 getestet: 100 bzw. 150 μ g. Als Kontrolle diente eine Injektion mit sterilem PBS. Dazu wurden die entsprechenden Dosen D665 i.p. injiziert und 3d später die Lymphozyten der Milz und Lymphknoten (pro Maus 6 zervikale, 4 axilläre und 2 inguinale Lymphknoten) per Durchflusszytometrie analysiert. Hierzu wurden die isolierten Lymphozyten zuvor mit den Antikörpern anti-Maus Foxp3-PE und anti-Maus CD4-PerCP gefärbt.

Der prozentuale Anteil der sich im *Live-Gate* befindlichen $CD4^+ Foxp3^+$ Zellen lag in der Milz bei 1,57% (Kontrolle), 2,51% (100 μ g D665; $P = 0,0071$) bzw. 2,80% (150 μ g D665; $P = 0,0001$) und in den Lymphknoten bei 4,78% (Kontrolle), 7,91% (100 μ g D665; $P = 0,0143$) bzw. 9,33% (150 μ g D665; $P = 0,0004$; P-Werte beziehen sich jeweils auf die dazugehörige Kontrolle). Diese Werte ergaben eine durchschnittliche Steigerung des prozentualen Anteils der $CD4^+ Foxp3^+$ Zellen von 170% in der Milz und 180% in den Lymphknoten (vgl. Abb. 24B oben).

In Bezug auf die Gesamtzellzahl der isolierten Lymphozyten lagen die Werte für die $CD4^+ Foxp3^+$ Zellen in der Milz bei $2,6 \times 10^5$ (Kontrolle), $4,3 \times 10^5$ (100 μ g D665; $P = 0,0089$) bzw. $5,6 \times 10^5$ (150 μ g D665; $P = 0,0007$) und in den Lymphknoten bei $0,34 \times 10^6$ (Kontrolle), $1,2 \times 10^6$ (100 μ g D665; $P < 0,0001$) bzw. $1,4 \times 10^6$ (150 μ g D665; $P = 0,0004$; P-Werte beziehen sich jeweils auf die dazugehörige Kontrolle). Diese Werte ergaben eine durchschnittliche Steigerung der Gesamtzellzahl der $CD4^+ Foxp3^+$ Zellen von 190% in der Milz und 380% in den Lymphknoten (vgl. Abb. 24B unten).

4.4.2 T_{reg} -Expansion verstärkt die persistierende ZNS-Infektion

Um nun den Einfluss der T_{reg} -Expansion in unserem Mausmodell der persistierenden ZNS-Infektion zu untersuchen, wurden 2-Wochen-alte C57BL/6 mit 10^3 pfu rMV^{Edtag}eGFP-CAMH i.c. infiziert, 14 und 21 Tage später mit je 100 μ g D665 i.p. behandelt und zu den Zeitpunkten 4wpi und 6wpi analysiert. Hierzu wurde die Anzahl der infizierten Zellen in PFA-fixierten Hirngewebeschnitten bestimmt. Als Kontrolle dienten die Ergebnisse der normalen persistierenden ZNS-Infektion zu den Zeitpunkten 4wpi und 6wpi (vgl. Abb. 4).

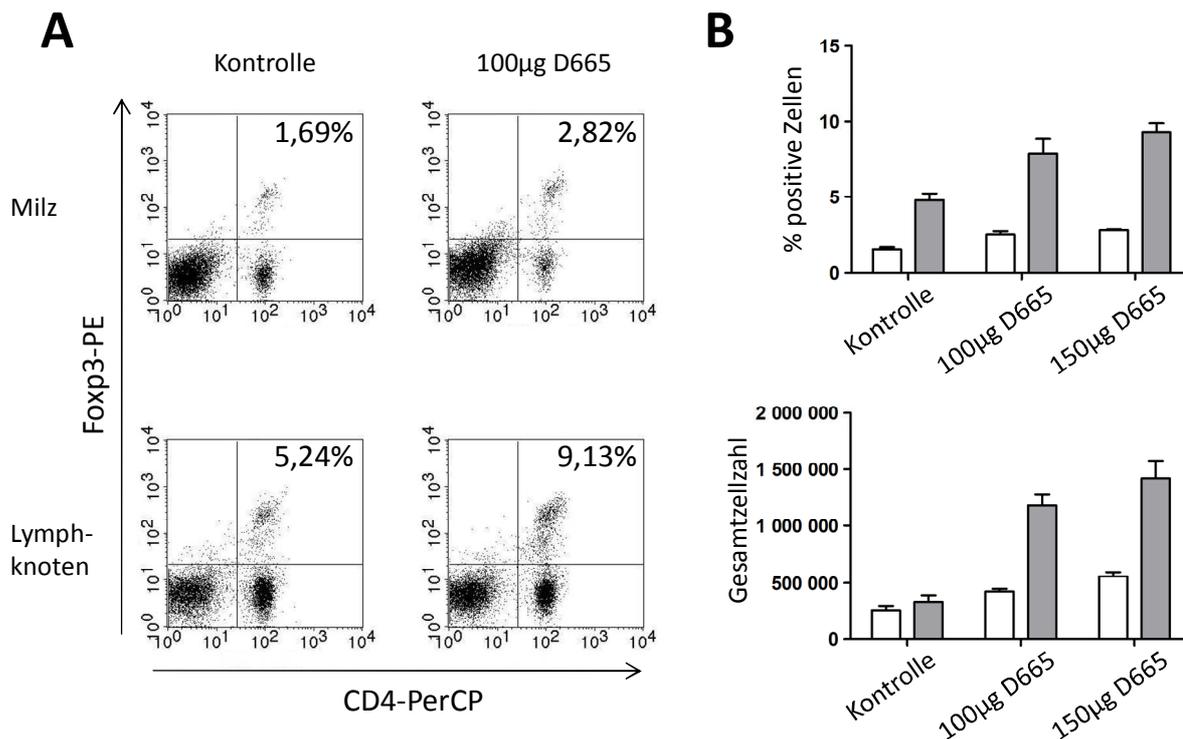


Abb. 24: Expansion von T_{reg} in C57BL/6 mittels D665

2-Wochen-alte C57BL/6 wurden mit 100 bzw. 150µg D665 i.p. behandelt und 3d später analysiert. Als Kontrolle diente eine i.p. Injektion mit PBS. Lymphozyten wurden aus der Milz und den Lymphknoten (pro Maus 6 zervikale, 4 axilläre und 2 inguinale Lymphknoten) isoliert, mit den Antikörpern anti-Maus CD4-PerCP sowie anti-Maus Foxp3-PE gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. **(A)** Dargestellt ist je ein repräsentatives FACS-Bild der Lymphozyten aus der Milz und den Lymphknoten behandelter Tiere und Kontroll-Tiere. **(B)** Dargestellt sind der Anteil der im *Live-Gate* befindlichen CD4⁺ Foxp3⁺ T-Zellen (oben) bzw. die daraus resultierende Gesamtzellzahl der CD4⁺ Foxp3⁺ T-Zellen (unten). Angabe der Mittelwerte mit Standardfehler (n=4; P < 0,05).

weiß: Milz; grau: Lymphknoten

Die Zahl der infizierten Zellen stieg nach Behandlung mit D665 zum Zeitpunkt 4wpi von 15 auf 1570; dies entspricht einer Steigerung der Infektion um das ca. 100fache (P < 0,0001; vgl. Abb. 25B). Bemerkenswert war, dass nicht einfach nur die Anzahl der einzeln infizierten Zellen, welche typisch für die persistierende ZNS-Infektion sind, zunahm sondern, dass auch größere Gruppen einzeln infizierter Zellen zu beobachten waren, welche nicht für die normale persistierende ZNS-Infektion typisch sind. Es waren sogar Infektionsherde zu beobachten, wie sie sonst nur während der akuten ZNS-Infektion vorhanden sind (vgl. Abb. 25A).

Bei der Analyse der Mäuse zum Zeitpunkt 6wpi war festzustellen, dass die Zahl der infizierten Zellen im Vergleich zu 4wpi wieder abgenommen hatte. Jedoch lag der Wert für die D665-Gruppe noch

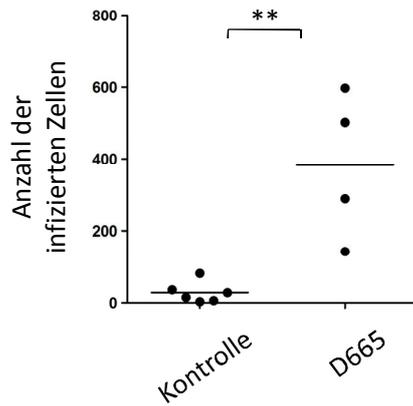


Abb. 26: Einfluss der Immunsuppression auf die persistierende ZNS-Infektion

2-Wochen-alte C57BL/6 wurden i.c. mit 10^3 pfu rMV^{Edtag}eGFP-CAMH infiziert, 2 Tage zuvor mit 20µg D665 i.p. behandelt und 28dpi analysiert. Als Kontrolle diente eine i.p. Injektion mit 20µl PBS. Quantitative Auswertung der Anzahl der infizierten Zellen pro Maushirn (P = 0,0026).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Expansion von T_{reg} in der Peripherie zu einer verstärkten persistierenden ZNS-Infektion in unserem Mausmodell führt, unabhängig davon, wann der Status der Immunsuppression herbei geführt wird – noch vor der akuten Infektion oder erst danach im Laufe der persistierenden Phase der ZNS-Infektion.

4.5 Einfluss der Depletion regulatorischer T-Zellen auf die MV-Infektion

Aufgrund der Tatsache, dass eine Expansion der T_{reg} in der Peripherie zu einer verstärkten persistierenden ZNS-Infektion in unserem Mausmodell führte, sollte im nächsten Schritt untersucht werden, ob eine Depletion der T_{reg} den umgekehrten Effekt haben würde.

4.5.1 Depletion von T_{reg} in DEREK-Mäusen

Ein besonders geeignetes Mausmodell für die Depletion von T_{reg} ist die DEREK-Maus (Lahl *et al.*, 2007). Diese transgene Maus exprimiert – wie schon bereits in Kapitel 4.3.2 erwähnt – das grün fluoreszierende Protein eGFP ausschließlich in $Foxp3^+$ T-Zellen. Außerdem wird in diesen $Foxp3^+$ Zellen noch ein humaner Diphtherietoxin-Rezeptor gebildet. Beide Komponenten – eGFP und DTR – werden in der Zelle als Fusionsprotein exprimiert, d.h. jede $Foxp3^+$ Zelle trägt gleichzeitig den DT-Rezeptor auf ihrer Zelloberfläche und leuchtet nach Anregung mit blauem Licht grün. Injiziert man der Maus i.p. Diphtherietoxin (DT), so wird dieses vom DT-Rezeptor gebunden, was letztendlich zur Depletion der $Foxp3^+$ Zellen führt.

Da bekannt ist, dass unterschiedliche Chargen von DT unterschiedliche Toxizitäten aufweisen, die unter Umständen mit Gewichtsverlust der Tiere einhergehen können (Lahl and Sparwasser, 2011), wurde die von Merck bestellte Charge (Lot# D00059758) zunächst in 6-Wochen-alten DEREK-Mäusen gemäß dem Depletions-Protokoll von Lahl *et al.* (2007) getestet. Hierzu wurde 6d in Folge $1\mu\text{g}$ DT i.p. injiziert. Als Kontrolle diente eine Injektion mit $40\mu\text{l}$ sterilem PBS. An Tag 7 wurden die Lymphozyten der Milz und Lymphknoten (pro Maus 6 zervikale, 4 axilläre und 2 inguinale Lymphknoten) per Durchflusszytometrie analysiert.

Der prozentuale Anteil der sich im *Live-Gate* befindlichen $Foxp3GFP^+$ Zellen lag in der Milz bei 1,72% (Kontrolle) bzw. 0,11% (DT; $P < 0,0001$) und in den Lymphknoten bei 4,43% (Kontrolle) bzw. 0,04% (DT; $P < 0,0001$). Diese Werte ergaben eine durchschnittliche Reduktion des prozentualen Anteils der $Foxp3GFP^+$ Zellen von 93% in der Milz und 99% in den Lymphknoten (vgl. Abb. 27B oben).

In Bezug auf die Gesamtzellzahl der isolierten Lymphozyten lagen die Werte für die $Foxp3GFP^+$ Zellen in der Milz bei $1,35 \times 10^6$ (Kontrolle) bzw. $4,20 \times 10^4$ (DT; $P = 0,0129$) und in den Lymphknoten bei $3,19 \times 10^5$ (Kontrolle) bzw. $1,41 \times 10^4$ (DT; $P = 0,0123$). Diese Werte ergaben eine durchschnittliche Reduktion der Gesamtzellzahl der $Foxp3GFP^+$ Zellen von 97% in der Milz und 96% in den Lymphknoten (vgl. Abb. 27B unten).

Bei keinem der mit DT behandelten Tiere waren Anzeichen für Gewichtsverlust oder sonstige toxische Nebenwirkungen zu beobachten.

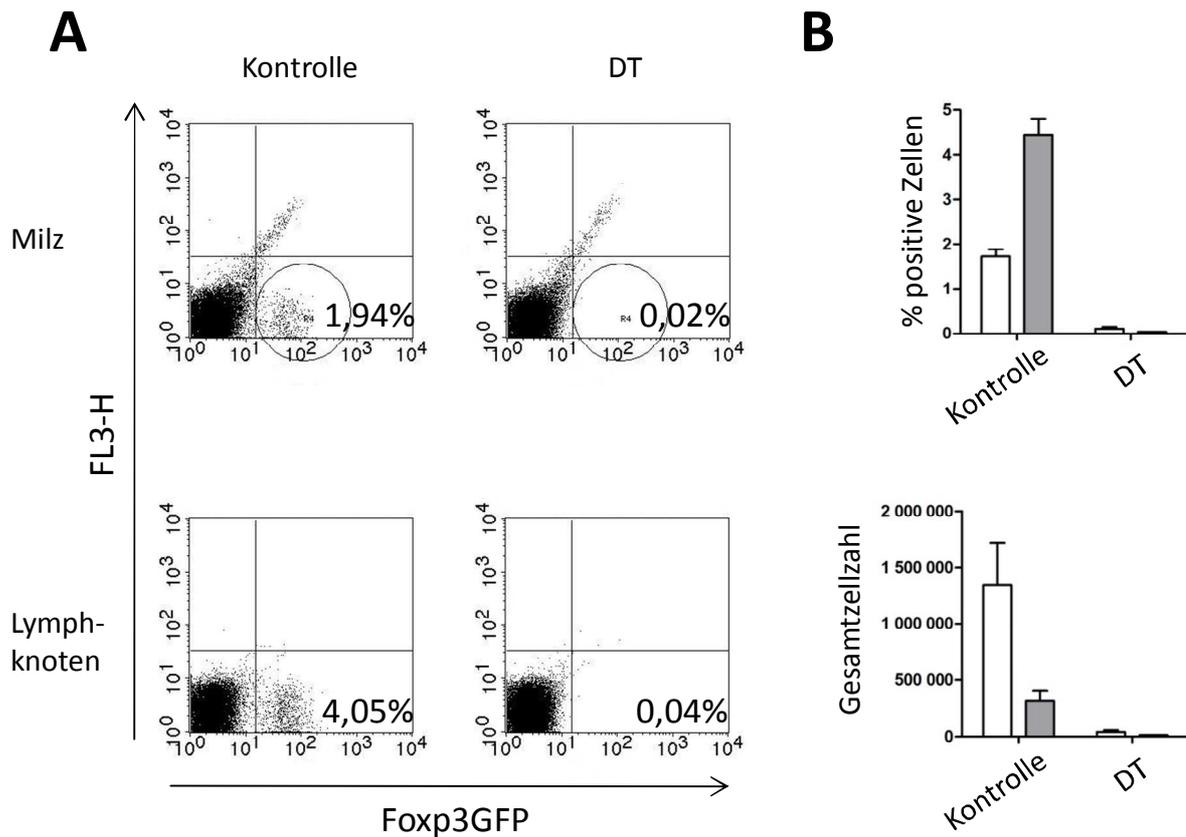


Abb. 27: Depletion von T_{reg} in 6-Wochen-alten DEREK-Mäusen mittels DT

6-Wochen-alte DEREK-Mäuse wurden mit 1µg DT i.p. für 6d in Folge behandelt und an Tag 7 analysiert. Als Kontrolle diente eine i.p. Injektion mit PBS. Lymphozyten wurden aus der Milz und den Lymphknoten (pro Maus 6 zervikale, 4 axilläre und 2 inguinale Lymphknoten) isoliert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. **(A)** Dargestellt ist je ein repräsentatives FACS-Bild der Lymphozyten aus der Milz und den Lymphknoten behandelter Tiere und Kontroll-Tiere. **(B)** Dargestellt sind der Anteil der im *Live-Gate* befindlichen Foxp3GFP⁺ Zellen (oben) bzw. die daraus resultierende Gesamtzellzahl der Foxp3GFP⁺ Zellen (unten). Angabe der Mittelwerte mit Standardfehler (n=4; P < 0,05).

weiß: Milz; grau: Lymphknoten

Im Anschluss wurde der Effekt von DT in 4½-Wochen-alten DEREK-Mäusen getestet. Da bekannt ist, dass DT für jüngere Tiere schädlich ist, wurde die DT-Behandlung von 6 auf 3 Tage verkürzt. Analog zu den nachfolgenden Infektionsversuchen (vgl. Kapitel 4.5.2) wurden die Tiere mit je 1µg DT i.p. an Tag „17dpi“, „18dpi“ und „20dpi“ behandelt. Diese Zeitpunkte entsprechen jeweils einem Alter von 31, 32 und 34 Tagen. Als Kontrolle diente wiederum eine Injektion mit 40µl sterilem PBS. An Tag „21dpi“ (entspricht einem Alter von 35 Tagen) wurden die Lymphozyten der Milz und Lymphknoten (pro Maus 6 zervikale, 4 axilläre und 2 inguinale Lymphknoten) per Durchflusszytometrie analysiert.

Der prozentuale Anteil der sich im *Live-Gate* befindlichen Foxp3GFP⁺ Zellen lag in der Milz bei 1,20% (Kontrolle) bzw. 0,12% (DT; $P < 0,0001$) und in den Lymphknoten bei 3,99% (Kontrolle) bzw. 0,11% (DT; $P = 0,0003$). Diese Werte ergaben eine durchschnittliche Reduktion des prozentualen Anteils der Foxp3GFP⁺ Zellen von 90% in der Milz und 97% in den Lymphknoten (vgl. Abb. 28 links).

In Bezug auf die Gesamtzellzahl der isolierten Lymphozyten lagen die Werte für die Foxp3GFP⁺ Zellen in der Milz bei $5,45 \times 10^5$ (Kontrolle) bzw. $7,05 \times 10^4$ (DT; $P = 0,0043$) und in den Lymphknoten bei $5,05 \times 10^5$ (Kontrolle) bzw. $5,14 \times 10^4$ (DT; $P = 0,0040$). Diese Werte ergaben eine durchschnittliche Reduktion der Gesamtzellzahl der Foxp3GFP⁺ Zellen von 87% in der Milz und 90% in den Lymphknoten (vgl. Abb. 28 rechts).

Bei keinem der mit DT behandelten Tiere waren Anzeichen für Gewichtsverlust oder sonstige toxische Nebenwirkungen zu beobachten.

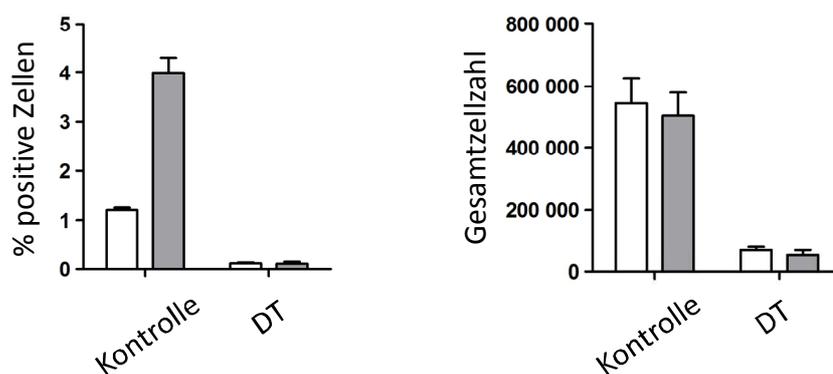


Abb. 28: Depletion von T_{reg} in 4½-Wochen-alten DEREg-Mäusen mittels DT

4½-Wochen-alte DEREg-Mäuse wurden mit 1µg DT i.p. an Tag „17dpi“, „18dpi“ und „20dpi“ behandelt und an Tag „21dpi“ analysiert. Als Kontrolle diente eine i.p. Injektion mit PBS. Lymphozyten wurden aus der Milz und den Lymphknoten (pro Maus 6 zervikale, 4 axilläre und 2 inguinale Lymphknoten) isoliert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Dargestellt sind der Anteil der im *Live-Gate* befindlichen Foxp3GFP⁺ Zellen (links) bzw. die daraus resultierende Gesamtzellzahl der Foxp3GFP⁺ Zellen (rechts). Angabe der Mittelwerte mit Standardfehler (n=3; $P < 0,005$).

weiß: Milz; grau: Lymphknoten

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Depletion von Foxp3⁺ T_{reg} in DEREg-Mäusen gemäß diesen beiden Protokollen sehr effektiv ist.

4.5.2 T_{reg}-Depletion verringert die persistierende ZNS-Infektion

Um nun den Einfluss der T_{reg}-Depletion in unserem Mausmodell der persistierenden ZNS-Infektion zu untersuchen, wurden 2-Wochen-alte DEREГ-Mäuse mit 10³pfu rMV^{Edtag}eGFP-CAMH i.c. infiziert, anschließend zunächst gemäß dem publizierten Depletions-Protokoll von Lahl *et al.* (2007) 6d in Folge (17dpi bis 22dpi) mit je 1µg DT i.p. behandelt und zum Zeitpunkt 28dpi analysiert. Hierzu wurde die Anzahl der infizierten Zellen in PFA-fixierten Hirngewebeschnitten bestimmt. Als Kontrolle diente eine gleichbehandelte Gruppe DEREГ-negativer Mäuse (entsprechen genotypisch gesehen dem WT; sind die Geschwister der DEREГ-Tiere).

Die Zahl der infizierten Zellen sank im Vergleich zur Kontroll-Gruppe nach Behandlung mit DT in DEREГ-Mäusen von 194 auf 71; dies entspricht einer Abnahme der Infektion um ca. 63% (P = 0,0098; vgl. Abb. 29A). In beiden Gruppen waren ausschließlich einzeln, infizierte Zellen im Gehirn zu beobachten.

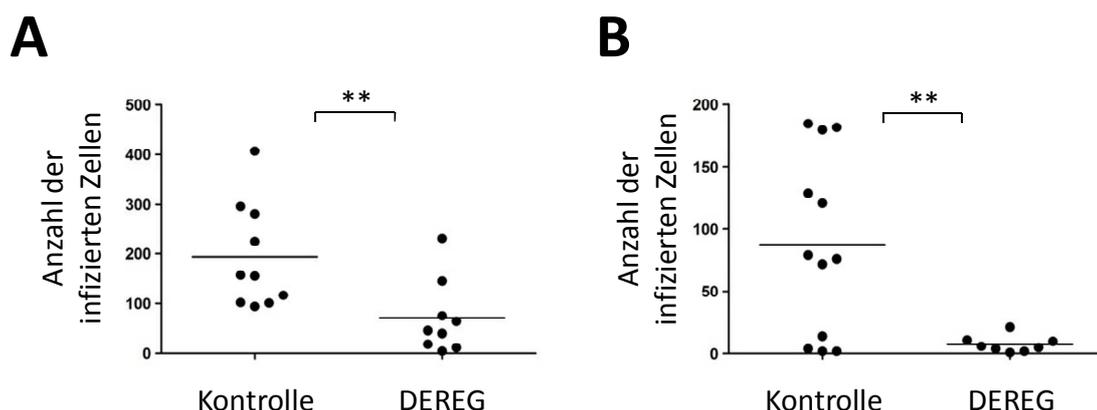


Abb. 29: Depletion von T_{reg} führt zu einer verringerten persistierenden ZNS-Infektion

2-Wochen-alte DEREГ-Mäuse wurden i.c. mit 10³pfu rMV^{Edtag}eGFP-CAMH infiziert, zu verschiedenen Zeitpunkten mit je 1µg DT i.p. behandelt und 28dpi analysiert. Als Kontrolle wurden gleichbehandelte DEREГ-neg. Mäuse verwendet. Quantitative Auswertung der Anzahl der infizierten Zellen pro Maushirn. (A) Die DT-Behandlung erfolgte an 6 aufeinander folgenden Tagen zwischen 17dpi und 22dpi (P = 0,0098). (B) Die DT-Behandlung erfolgte 17dpi, 18dpi und 20dpi (P = 0,0064).

Auffällig war, dass die Tiere beider Gruppen z.T. unter merklichem Gewichtsverlust litten, was auf die hohe Dosis von DT zurückzuführen war; die Tiere waren während der DT-Behandlung mit 4½ bis 5 Wochen jünger als die in der Publikation von Lahl *et al.* (2007) verwendeten Tiere. Zudem musste davon ausgegangen werden, dass der Streß einer DT-Behandlung zusätzlich durch die vorhergehende

i.c. Infektion und ihre unmittelbaren Folgen für das Immunsystem verstärkt wurde. Daraufhin wurde das Depletions-Protokoll von 6 auf 3 Tage verkürzt, welches aber immer noch einen vergleichbaren Effekt in Bezug auf die Depletion von T_{reg} hatte wie ersteres (vgl. Kapitel 4.5.1).

Mit rMV^{Edtag} eGFP-CAMH infizierte DEREK-Mäuse wurden mit je $1\mu\text{g}$ DT i.p. an Tag 17dpi, 18dpi und 20dpi behandelt und zum Zeitpunkt 28dpi analysiert. Als Kontrolle diente wiederum eine gleichbehandelte Gruppe DEREK-negativer Tiere (sind die Geschwister der DEREK-Tiere).

Die Zahl der infizierten Zellen sank im Vergleich zur Kontroll-Gruppe nach Behandlung mit DT in DEREK-Mäusen von 87 auf 8; dies entspricht einer Abnahme der Infektion um ca. 91% ($P = 0,0064$; vgl. Abb. 29B). In beiden Gruppen waren ausschließlich einzeln, infizierte Zellen im Gehirn zu beobachten.

Beim Vergleich beider Depletions-Protokolle fällt auf, dass die Zahl der infizierten Zellen in den Kontroll-Gruppen beträchtlich voneinander abweichen. Nach 6fach-Depletion betrug die Anzahl 194; nach 3fach-Depletion betrug diese Zahl nur noch 87. Eine statistische Analyse ergab, dass der Unterschied zwischen diesen beiden Kontroll-Gruppen signifikant ist ($P = 0,0109$). Auch der Unterschied zwischen den beiden DEREK-Gruppen (6fach-Depletion: 71 infizierte Zellen; 3fach-Depletion: 8 infizierte Zellen) ist signifikant ($P = 0,0289$). Dies legt – im Zusammenhang mit dem beobachteten Gewichtsverlust der Tiere – nahe, dass die 6fach-Depletion für die Tiere in unserem Experimentalansatz eine zu große körperliche Belastung darstellt und immunsuppressiv wirkt. Diese Belastung war bei den Tieren nach 3fach-Depletion nicht zu beobachten, obwohl der Effekt der DT-Behandlung auf den Anteil der T_{reg} vergleichbar mit dem der 6fach-Depletion war (vgl. Kapitel 4.5.1). Ein weiterer Aspekt, der für die 3fach-Depletion spricht, ist die Tatsache, dass die Anzahl der infizierten Zellen um 91% sank, wohingegen nach 6fach-Depletion nur eine Reduktion der Infektion um 63% erreicht wurde.

4.5.3 T_{reg} -Depletion resultiert in einem erhöhten Anteil $D^bMV\text{-}H_{22-30}$ -spezifischer T-Zellen im Gehirn nach i.c. Infektion

Um nun zu untersuchen, ob der Effekt der reduzierten ZNS-Infektion nach T_{reg} -Depletion auf eine erhöhte Anzahl zytotoxischer, MV-spezifischer T-Zellen zurückzuführen ist, wurde der Anteil der $D^bMV\text{-}H_{22-30}$ -spezifischen T-Zellen zum Zeitpunkt 28dpi analysiert. Dazu wurden 2-Wochen-alte DEREK-Mäuse mit rMV^{Edtag} eGFP-CAMH i.c. infiziert und mit $1\mu\text{g}$ DT i.p. an Tag 17dpi, 18dpi und 20dpi behandelt. Aufgrund der vorangegangenen Ergebnisse, dass die Mäuse eine 3fache T_{reg} -Depletion besser vertragen, als eine 6fache Depletion, wurde für dieses Experiment auf das kürzere Depletions-

Protokoll zurück gegriffen. Die Analyse der aus dem Gehirn isolierten Lymphozyten erfolgte an Tag 28dpi per Durchflusszytometrie. Als Kontrolle diente wieder eine gleichbehandelte Gruppe DEREГ-negativer Tiere.

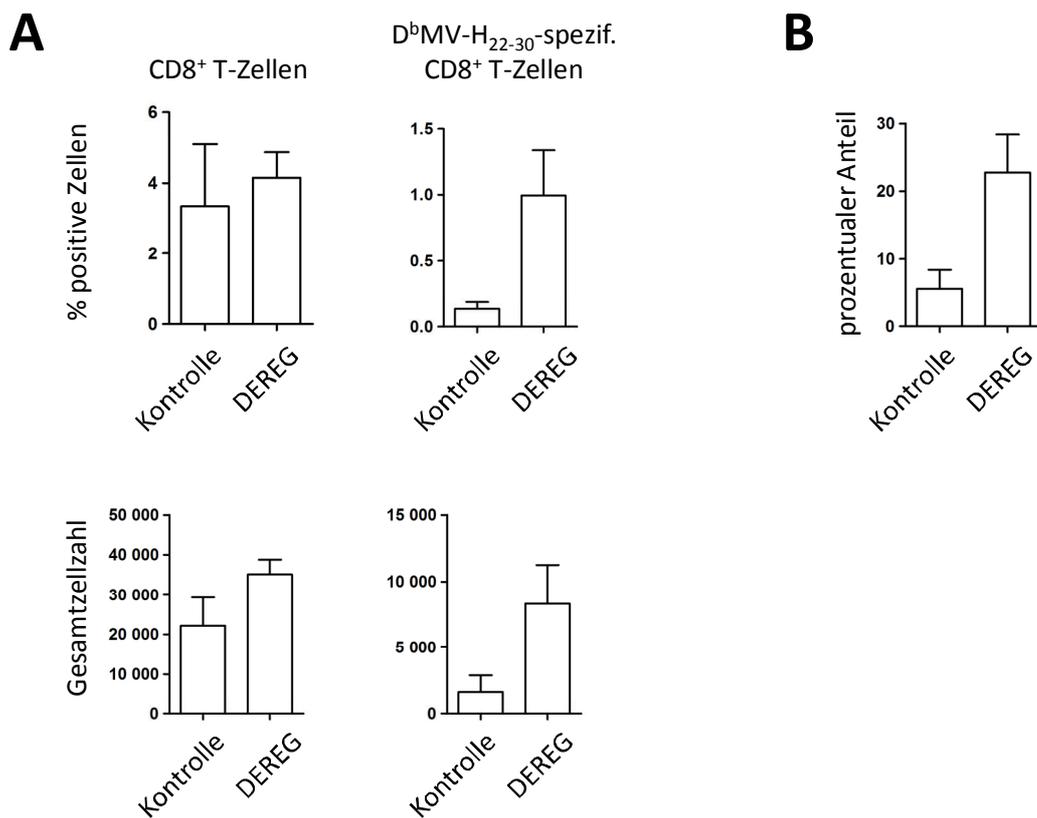


Abb. 30: T_{reg}-Depletion erhöht den Anteil der D^bMV-H₂₂₋₃₀-spezifischen T-Zellen im Gehirn persistent infizierter Mäuse

2-Wochen-alte DEREГ-Mäuse wurden i.c. mit 10^3 pfu rMV^{Edtag}eGFP-CAMH infiziert, 17, 18 und 20 Tage später mit je 1µg DT i.p. behandelt und 28dpi analysiert. Als Kontrolle wurden gleichbehandelte DEREГ-negative Mäuse verwendet. Lymphozyten wurden aus dem Gehirn isoliert, mit den Antikörpern anti-Maus CD19-FITC, anti-Maus CD8-PerCP sowie dem Pentamer „H-2^b RIVINREHL“ (R-PE gekoppelt) gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. **(A)** Der prozentuale Anteil der im *Live-Gate* befindlichen CD8⁺ T-Zellen sowie der D^bMV-H₂₂₋₃₀-spezifischen CD19⁻ CD8⁺ T-Zellen (oben) bzw. die daraus resultierende Gesamtzellzahl dieser Zellen (unten) wurde quantifiziert. **(B)** Quantifizierung des prozentualen Anteils der D^bMV-H₂₂₋₃₀-spezifischen Zellen innerhalb der gesamten CD8⁺ T-Zell-Population (n.s., P = 0,0548). Angabe der Mittelwerte mit Standardfehler (n=3).

Betrachtete man zunächst die Verteilung der gesamten CD8⁺ T-Zell-Population, so waren keine bzw. nur sehr geringe Unterschiede bezüglich des prozentualen Anteils der im *Live-Gate* befindlichen Zellen (n.s., $P = 0,6878$) oder der daraus resultierenden Gesamtzellzahl (n.s., $P = 0,1843$) zu detektieren (vgl. Abb. 30A). Bezüglich der Verteilung der D^bMV-H₂₂₋₃₀-spezifischen CD8⁺ T-Zellen ist jedoch ein deutlicher Unterschied zu beobachten. Der prozentuale Anteil der D^bMV-H₂₂₋₃₀-spezifischen CD8⁺ T-Zellen stieg von 0,13% (Kontrolle) auf 1% (DEREG-Mäuse); dies entspricht einer Steigerung um das ca. 8fache (n.s., $P = 0,0699$). Die Gesamtzellzahl der D^bMV-H₂₂₋₃₀-spezifischen CD8⁺ T-Zellen stieg von 1700 (Kontrolle) auf 8300 (DEREG-Mäuse); dies entspricht einer Steigerung um das ca. 5fache (n.s., $P = 0,1039$). Es wurde außerdem der prozentuale Anteil der D^bMV-H₂₂₋₃₀-spezifischen CD8⁺ T-Zellen innerhalb der gesamten CD8⁺ T-Zell-Population berechnet – dieser stieg von 5,7% (Kontrolle) auf 22,7% (DEREG-Mäuse), was einer Steigerung um das ca. 4fache entspricht (n.s., $P = 0,0548$; vgl. Abb. 30B).

4.5.4 T_{reg}-Depletion in Kombination mit postinfektöser Immunisierung

Die Vorarbeiten von Frau Kendl haben gezeigt, dass eine Immunisierung der Mäuse mit MV^{Edm} eine Woche vor der i.c. Infektion mit rMV^{Edtag}eGFP-CAMH die Virus-Ausbreitung im ZNS bei mehr als 70% der Tiere verhindert. Eine Immunisierung nach der i.c. Infektion hatte dagegen keinen Einfluss auf den Verlauf der Infektion (Schubert *et al.*, 2006). In Fortführung dieser Ergebnisse sollte untersucht werden, ob eine postinfektöse Kombinationstherapie aus MV-Immunisierung und T_{reg}-Depletion die persistierende ZNS-Infektion in unserem Mausmodell stärker reduziert als die alleinige T_{reg}-Depletion (vgl. Abb. 29). Hierzu wurden 2-Wochen-alte DEREG-Mäuse mit 10³pfu rMV^{Edtag}eGFP-CAMH i.c. infiziert, 14 Tage später mit 10⁶pfu MV^{Edm} i.p. immunisiert und anschließend mit je 1µg DT i.p. behandelt (17, 18 und 20dpi). Die Analyse erfolgte 28dpi mit Hilfe histologischer Gewebeschnitte PFA-fixierter Maushirne. Als Kontrolle dienten gleichbehandelte DEREG-negative Mäuse aus den jeweiligen gleichen Würfen.

Die Zahl der infizierten Zellen im Gehirn sank im Vergleich zur Kontroll-Gruppe nach Immunisierung und T_{reg}-Depletion von 148 auf 22; dies entspricht einer Reduktion der persistierenden ZNS-Infektion um ca. 85% ($P = 0,0141$; vgl. Abb. 31).

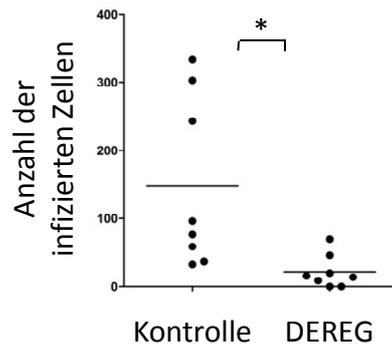


Abb. 31: Eine zusätzliche Immunisierung verbessert nicht den Effekt der T_{reg} -Depletion auf die persistierende ZNS-Infektion

2-Wochen-alte DERE-Mäuse wurden mit 10^3 pfu $rMV^{Edtag}eGFP$ -CAMH i.c. infiziert, mit je 10^6 pfu MV^{Edm} an Tag 14dpi i.p. immunisiert, mit je $1\mu g$ DT an Tag 17, 18 und 20dpi i.p. behandelt und 28dpi analysiert. Als Kontrolle wurden gleichbehandelte DERE-neg. Mäuse verwendet. Quantitative Auswertung der Anzahl der infizierten Zellen pro Maushirn ($P = 0,0141$).

Im Vergleich zur alleinigen T_{reg} -Depletion (91% Reduktion der persistierenden ZNS-Infektion; vgl. Abb. 29B) wurde durch das vorliegende Protokoll der Kombinationstherapie mit 85% Reduktion der persistierenden ZNS-Infektion jedoch keine Verbesserung erzielt.

4.6 Der antivirale Effekt von IDO während der persistierenden ZNS-Infektion

Die Abkürzung IDO steht für Indolamin-2,3-Dioxygenase; dieses Enzym katalysiert einen geschwindigkeitsbestimmenden Schritt im Tryptophan-Stoffwechsel (Yamamoto and Hayaishi, 1967) und wirkt antiviral (Obojes *et al.*, 2005) als auch immunsuppressiv (Mellor and Munn, 2004). Außerdem ist bekannt, dass zwei Abbauprodukte des IDO-vermittelten Tryptophan-Stoffwechsels (3-Hydroxyanthranilat und Chinolinsäure) neurotoxisch wirken (Kwidzinski and Bechmann, 2007). Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Ausbreitung von rMV^{Edtag}eGFP-CAMH im Gehirn von IDOk.o.-Mäusen untersucht werden. IDOk.o.-Mäuse sind C57BL/6, in denen das IDO-Gen ausgeschaltet wurde, indem das Neomycin-Gen anstelle von Exon 3-5 des IDO-Gens (enthalten wichtige Teile der enzymatischen katalytischen Seite) eingefügt wurde (Mellor *et al.*, 2003). Zusätzlich wurde in die Sequenz des zweiten Exons des IDO-Gens ein Stopcodon (TAG) eingefügt.

IDOk.o.-Tiere sind in Bezug auf den *knock-out* homozygot und lassen sich analog zum Wildtyp züchten: homozygot x homozygot. Eine Typisierung der Nachkommen entfällt somit. Jedoch wurden die für die Zucht eingesetzten IDOk.o.-Mäuse regelmäßig typisiert (jede dritte Generation), um sicher zu stellen, dass der *knock-out* immer noch besteht. Hierfür wurde eine PCR mit dem Primerpaar „neomycin-2_fw“/„neomycin-1_rev“ etabliert. Das für die IDOk.o.-Mäuse typische PCR-Fragment hatte eine Größe von 249bp. In Abb. 32 sind beispielhaft die Ergebnisse für eine IDOk.o.- und eine C57BL/6-WT-Maus gezeigt. Das 249bp-Fragment fehlt bei den C57BL/6-WT-Tieren.

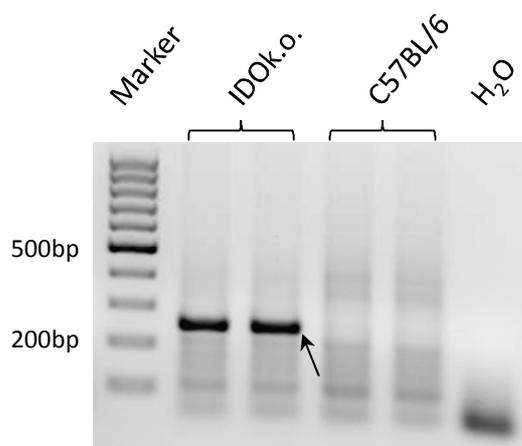


Abb. 32: Genotypisierung IDOk.o.-Mäuse

Mausgewebeprouben zweier IDOk.o.- und C57BL/6-Mäuse wurden mittels PCR typisiert. Der Pfeil markiert das entsprechende PCR-Produkt im Gel (249bp).

Für die Infektionsexperimente wurden analog zu den C57BL/6-WT-Tieren 2-Wochen-alte IDOk.o.-Mäuse mit 10^3 pfu rMV^{Edtag}eGFP-CAMH i.c. infiziert und 7 bzw. 28 Tage später histologisch analysiert. Die Überlebensrate der IDOk.o.-Mäuse ist in Abb. 33 dargestellt. Im Verlauf des gesamten Experimentes starben bis einschließlich 10 Tage nach Infektion 47% der Tiere. Die restlichen 53% überlebten die Infektion ohne sichtbare Symptome. Im Vergleich zu den C57BL/6-WT-Tieren, bei denen 95% der infizierten Tiere überlebten (Schubert *et al.*, 2006), war die Sterberate der IDOk.o.-Tiere signifikant höher ($P < 0,005$).

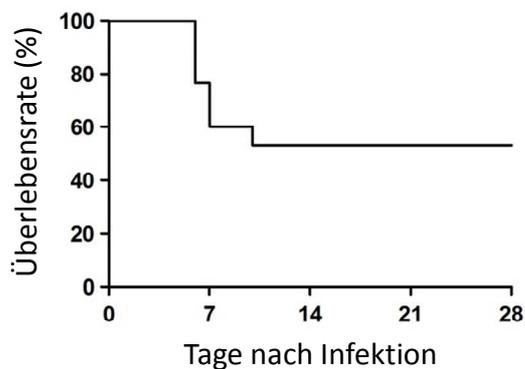


Abb. 33: Überlebensrate der IDOk.o.-Mäuse

2-Wochen-alte IDOk.o.-Mäuse wurden mit 10^3 pfu rMV^{Edtag}eGFP-CAMH i.c. infiziert und über einen Zeitraum von 28 Tagen beobachtet. Der prozentuale Anteil der überlebenden Tiere ist in Abhängigkeit von der Zeit nach i.c. Infektion angegeben.

Für die histologische Auswertung der Daten wurde die Anzahl der infizierten Zellen in PFA-fixierten Hirngewebeschnitten bestimmt. Als Kontrolle dienten die Gruppen der ZNS-Infektion in C57BL/6-WT-Tieren zum jeweiligen Zeitpunkt (vgl. Abb. 4A). Bei der Analyse der akuten ZNS-Infektion (7dpi) wurde kein signifikanter Unterschied zu C57BL/6 festgestellt. In beiden Gruppen waren zu diesem Zeitpunkt >1.000 infizierte Zellen pro Maushirn zu beobachten (n.s., $P = 0,9043$). Im Gegensatz dazu waren während der persistierenden Phase der ZNS-Infektion in den IDOk.o.-Mäusen mehr infizierte Zellen zu beobachten als in C57BL/6: 75 Zellen in IDOk.o. *versus* 15 Zellen in C57BL/6 ($P = 0,0005$; vgl. Abb. 34). Dies deutet darauf hin, dass in unserem Mausmodell der persistierenden ZNS-Infektion der antivirale Effekt von IDO stärker ist als der immunsuppressive Effekt.

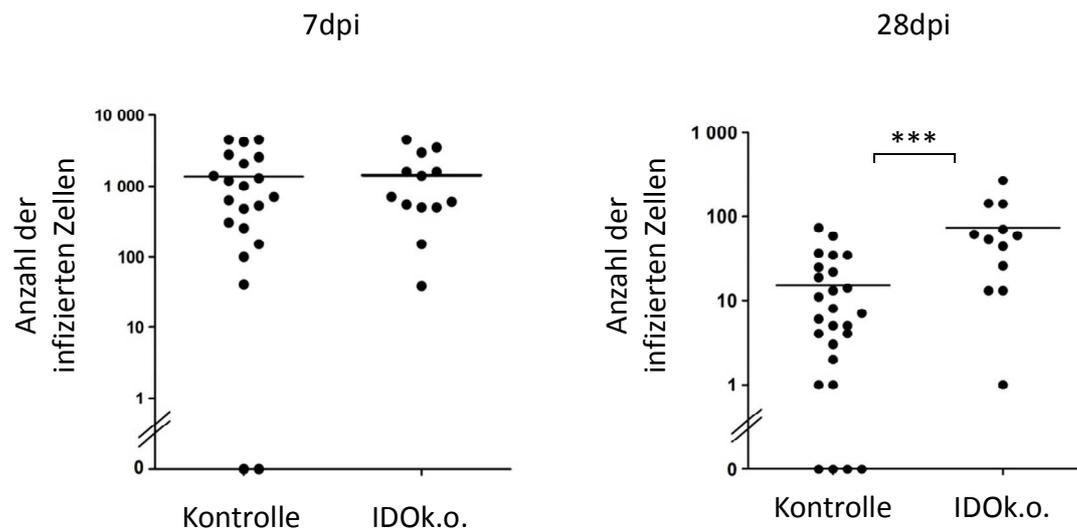


Abb. 34: Verlauf der ZNS-Infektion in IDOk.o.-Mäusen

2-Wochen-alte IDOk.o.-Mäuse wurden mit 10^3 pfu rMV^{Edtag}eGFP-CAMH i.c. infiziert und zu den Zeitpunkten 7dpi und 28dpi analysiert. Als Kontrolle dienten die Gruppen der ZNS-Infektion in C57BL/6 zum jeweiligen Zeitpunkt (vgl. Abb. 4A). Quantifizierung der Anzahl der infizierten Zellen pro Maushirn (7dpi: n.s., $P = 0,9043$; 28dpi: $P = 0,0005$).

Dieses Ergebnis spiegelt sich auch in *in vitro*-Versuchen mit Vero- und 293T-Zellen wider, die in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt wurden. In diesen Zellen wurde zunächst IDO überexprimiert und anschließend wurden die Zellen mit rMV^{Edtag}eGFP-CAMH infiziert. Die Überexpression von IDO führte zu einer verminderten Virusausbreitung bei allen untersuchten Zeitpunkten (12hpi, 24hpi, 48hpi und 72hpi), welche sich in einer verminderten Synzytienbildung wider spiegelte sowie durch einen drastisch reduzierten Virustiter im Vergleich zur Kontrolle (72hpi: 293T-Kontrolle $2,1 \times 10^7$ pfu/ml, IDO-exprimierende 293T-Zellen 3×10^2 pfu/ml; Diplomarbeit von A. Kloos, angefertigt 2006 in der Arbeitsgruppe von Jürgen Schneider-Schaulies).

5 Diskussion

5.1 Tiermodelle für die ZNS-Infektion mit dem Masernvirus

In der vorliegenden Doktorarbeit wurde das Mausmodell einer persistierenden ZNS-Infektion mit dem neurotrophen, rekombinanten Masernvirus rMV^{Edtag}eGFP-CAMH in C57BL/6 verwendet, welches zuvor in der Arbeitsgruppe von Jürgen Schneider-Schaulies etabliert wurde (Schubert *et al.*, 2006). Dieses Virus basiert auf dem rekombinant hergestellten Virusstamm Edtag, welcher sich in nur drei Nukleotiden in der nicht-kodierenden Region zwischen den Genen N und P vom Vakzine-Stamm Edmonston B unterscheidet (Radecke *et al.*, 1995). Zusätzlich wurde das ursprüngliche H-Gen von Edtag gegen das H-Gen des MV-Stammes CAM/RB ausgetauscht, welcher an neuronale Zellen der Ratte adaptiert wurde; diese Virusvariante wurde in dieser Arbeit als rMV^{Edtag}CAMH bezeichnet. Das H-Protein vermittelt die Bindung des Virus an den zellulären Rezeptor und somit in Zusammenspiel mit dem F-Protein den Eintritt in die Wirtszelle. Es wurde bereits gezeigt, dass der Austausch des H-Proteins im Vergleich zu den ursprünglichen Virusstämmen Edtag und CAM/RB keine Auswirkungen auf die Wachstumskurve von rMV^{Edtag}CAMH auf Vero-Zellen hatte. Die Untersuchungen von Duprex *et al.* sowie unserer eigenen Arbeitsgruppe haben desweiteren gezeigt, dass das H-Protein des CAM/RB-Stammes die Neurovirulenz des Masernvirus, d.h. dessen Fähigkeit ZNS-Erkrankungen hervor zu rufen, vermittelt. Eine Infektion normaler neuronaler Zellen mit dem Vakzine-Stamm Edmonston B ist dagegen nicht möglich (Duprex *et al.*, 1999a; Moeller *et al.*, 2001; Moeller-Ehrlich *et al.*, 2007). Diese Anpassung im H-Gen umfasst im Vergleich zum Virusstamm Edmonston B insgesamt 12 Nukleotide (Liebert *et al.*, 1994) und ermöglicht die Ausbreitung von rMV^{Edtag}CAMH im Gehirn immunkompetenter Mäuse, ohne dass diese einen humanen MV-Rezeptor exprimieren müssen. Zusätzlich wurde das eGFP-Gen vor das N-Gen gesetzt, um die Infektion fluoreszenzmikroskopisch direkt ohne Antikörper-Färbung gegen eines der Masernproteine, wie es z.B. in den Arbeiten von Duprex und Weidinger (Duprex *et al.*, 1999a; Weidinger *et al.*, 2000) durchgeführt wurde, verfolgen zu können; diese Virusvariante wurde in dieser Arbeit als rMV^{Edtag}eGFP-CAMH bezeichnet. Im Vergleich zum nicht-fluoreszierenden rMV^{Edtag}CAMH zeigen beide Viren ähnliche Wachstumskurven, d.h. die Transkriptions- und Replikationsrate von rMV^{Edtag}eGFP-CAMH wird durch das zusätzliche eGFP-Gen nicht beeinflusst (Schubert *et al.*, 2006). Der besondere Vorteil des „grün leuchtenden Virus“ ist, dass das komplette Maushirn in relativ kurzer Zeit fluoreszenzmikroskopisch direkt analysiert werden kann. Aufwendige und zeitintensive Färbemethoden entfallen. Darüber hinaus ermöglicht die starke Fluoreszenz des eGFP die Anfertigung vergleichsweise dicker Gewebeschnitte (100µm am Vibratom; Gefrierschnitte sind z.B. nur 10-20µm dick), wobei die Gewebeproben zuvor lediglich in 4% PFA fixiert wurden. Die Anzahl der Schnitte wurde somit deutlich reduziert (in unserem Fall ca. 60-70 Schnitte pro murines Großhirn), was eine schnellere Analyse erlaubte. Die Anfertigung von Vibratom-Schnitten zur Identifizierung von rMV^{Edtag}eGFP-CAMH in PFA-fixierten

Gehirnen i.c. infizierter Mäuse wurde auch von einer anderen Arbeitsgruppe beschrieben. Sie verglichen die Detektion rMV^{Edtag}eGFP-CAMH-positiver Zellen in 200µm-dicken Vibratom-Schnitten (Analyse der eGFP-Fluoreszenz) mit rMV^{Edtag}CAMH-positiven 7µm-dicken Mikrotom-Schnitten (Analyse nach immunhistochemischer Färbung gegen das MV-N-Protein). Es wurden keine Unterschiede bezüglich der Lokalisation und Ausbreitung des Virus festgestellt (Ludlow *et al.*, 2008). Aufgrund des in rMV^{Edtag}eGFP-CAMH einklonierten H-Proteins vom CAM/RB-Stamm war es – wie bereits erwähnt – möglich, dass für unsere Infektionsexperimente normale, immunkompetente Mäuse ohne Einkreuzung eines humanen MV-Rezeptors verwendet wurden. Dies erleichterte auch die Untersuchung diverser Transgene bzw. Gendefekte, da in solchen Fällen nur das zu untersuchende Transgen bzw. der Gendefekt selbst im C57BL/6-Hintergrund benötigt wurde, nicht aber zusätzlich ein humaner MV-Rezeptor. Je mehr genetische Manipulationen in einer Maus kombiniert werden sollen, desto aufwendiger gestaltet sich nicht nur die Typisierung der Tiere, sondern auch die Zucht solcher mehrfach transgenen Mäuse. Der Vorteil des an Nagern adaptierten H-Proteins in rMV^{Edtag}eGFP-CAMH wurde bei der i.c. Infektion der in dieser Doktorarbeit verwendeten einfach transgenen bzw. *knock-out* Tieren (DEREG- und IDOk.o.-Mäuse) ausgenutzt.

In der Literatur gibt es eine Vielzahl weiterer Tiermodelle für die ZNS-Infektion mit dem Masernvirus. Hierzu gehören neben den Mausmodellen auch die Infektion von Ratten und Hamstern (Liebert and Finke, 1995; Oldstone, 2009). In diesen Tiermodellen wurden entweder an das Gehirn von Nagern angepasste Virusstämme in genetisch nicht veränderten Tieren verwendet oder es erfolgte eine Infektion MV-Rezeptor (CD46 oder CD150)-transgener Mäuse mit dem Vakzine-Stamm Edmonston oder einem WT-MV-Stamm.

Die i.c. Infektion neugeborener Mäuse (jünger als 7 Tage) mit 3×10^4 pfu (Lawrence *et al.*, 1999) bzw. 3×10^5 TCID₅₀ MV-Edmonston (Evlashev *et al.*, 2000) löste bei allen CD46-transgenen Mäusen eine Enzephalitis aus, die letztendlich innerhalb von 2 Wochen zu 100% tödlich verlief. Bis zu 7 Tage-alte CD150-transgene C57BL/6, die mit bis zu 6×10^2 pfu WT-MV i.c. infiziert wurden, überlebten die Infektion nur maximal 10 Tage (Sellin *et al.*, 2006). Auch in unseren eigenen Vorarbeiten wurden Infektionsexperimente mit neugeborenen Mäusen (1 Tag alte C57BL/6) durchgeführt, wobei die Dosis von rMV^{Edtag}eGFP-CAMH pro Maus nur 10^3 pfu betrug. Innerhalb von 5 Tagen nach i.c. Infektion verstarben alle Tiere (Schubert *et al.*, 2006). Es ist bekannt, dass neugeborene Mäuse noch kein ausgereiftes Immunsystem besitzen (Adkins *et al.*, 1994) und deshalb nicht in der Lage sind, eine ZNS-Infektion mit dem Masernvirus zu bekämpfen.

Dagegen ist eine krankheitsauslösende i.c. Infektion bei erwachsenen MV-Rezeptor-transgenen Tieren in den zuvor genannten Tiermodellen nicht möglich. Unsere eigenen Vorarbeiten zeigen, dass 3-Wochen-alte C57BL/6 ebenfalls nach einer i.c. Infektion mit rMV^{Edtag}eGFP-CAMH keine klinischen

Symptome aufweisen und zu 100% überleben (Schubert *et al.*, 2006). Nur in Kombination mit Immundefekten wurde auch bei erwachsenen Tieren eine tödlich verlaufende Enzephalitis ausgelöst. Mrkic *et al.* haben z.B. 6-8 Wochen alte IFN- α/β -Rezeptor-defiziente CD46-transgene Mäuse (C57BL/6-Hintergrund) mit 3.000 infektiösen Einheiten MV-Edmonston i.c. infiziert, wobei alle Tiere neurologische Krankheitssymptome aufwiesen von denen 88% innerhalb von 27 Tagen nach Infektion starben (Mrkic *et al.*, 1998). In einer weiteren Arbeit wurden CD46-transgene Rag1-defiziente Mäuse (C57BL/6-Hintergrund; besitzen keine B- und T-Zellen) i.c. mit MV-Edmonston (injizierte Virusmenge unbekannt) infiziert, wobei bis 65 Tage nach Infektion 92% der Tiere und bis 100 Tage nach Infektion alle Tiere starben (Oldstone, 2009). Dies wurde 1999 bereits von Lawrence *et al.* gezeigt, die CD46-transgene Rag2-defiziente Mäuse (besitzen ebenfalls keine B- und T-Zellen), welche mindestens 4 Wochen alt waren, i.c. mit 3×10^4 pfu MV-Edmonston infizierten, von denen 71% innerhalb von 20 Tagen nach Infektion starben. Die restlichen 29%, die die Infektion überlebten, zeigten keine nachweisbare neuronale MV-Infektion, d.h. alle Tiere, die tatsächlich nach der Injektion mit dem Virus infiziert waren, starben (Lawrence *et al.*, 1999). Diese Daten zeigen, dass für die Bekämpfung einer ZNS-Infektion mit dem Masernvirus bei erwachsenen Mäusen eine funktionierende IFN- α/β - (angeborene Immunität) sowie B- und/oder T-Zell-Antwort (adaptive Immunität) benötigt wird.

Eine Zwischenstellung nehmen heranwachsende Nager ein, bei denen das Immunsystem zwar immer noch nicht voll ausgereift ist, die aber bereits eine stärkere Resistenz gegenüber einer intrazerebralen Infektion zeigen als neugeborene Nager (Griffin, 1976; Neighbour *et al.*, 1978; Liebert and ter Meulen, 1987). So wurden z.B. 11-17 Tage alte CD46-transgene immunkompetente C57BL/6 mit 3×10^4 pfu MV-Edmonston i.c. infiziert, von denen 50% überlebten, wohingegen erwachsene CD46-transgene immunkompetente C57BL/6 (mindestens 4 Wochen alt) zu 100% überlebten (Lawrence *et al.*, 1999). Auch 2-Wochen-alte CD150-transgene C57BL/6, die mit 3×10^3 pfu des WT-MV-Stammes G954 i.c. infiziert wurden, überlebten die Infektion nur zu ca. 30%, wohingegen erwachsene 4-Wochen-alte Tiere trotz einer sehr hohen Virusmenge nicht starben (Sellin *et al.*, 2006). Eine bessere Überlebensrate erreichten wir in unseren eigenen Vorarbeiten, bei denen 2-Wochen-alte C57BL/6 mit 10^3 pfu rMV^{Edtag}eGFP-CAMH i.c. infiziert wurden, von denen 95% überlebten (Schubert *et al.*, 2006).

Die fluoreszenzmikroskopische Analyse der Maushirne unseres Tiermodells ergab, dass 7 Tage nach i.c. Infektion (das Virus wurde immer in die linke Großhirnhälfte injiziert) 86% der Tiere eine Maserninfektion in der linken Großhirnhälfte aufwiesen und 71% der Tiere eine Infektion in der rechten Großhirnhälfte zeigten (Schubert *et al.*, 2006); das Virus ist also in der Lage, sich von einer Hirnhälfte zur anderen auszubreiten. Da auch im Corpus callosum (Hirnbalken) eGFP-positive

Bereiche beobachtet werden können, breitet sich die Infektion vermutlich über den Hirnbalken aus, welcher beide Hemisphären miteinander verbindet. Der Unterschied zwischen den beiden Hirnhälften war zwar statistisch nicht signifikant, jedoch wurde er auch in der Arbeit von Duprex *et al.* beobachtet, in der die Masernviren CAM/RB bzw. Edtag-CAMH (entspricht dem in dieser Doktorarbeit verwendeten Virusstamm rMV^{Edtag}CAMH) immer in die rechte Großhirnhälfte injiziert wurden und dort auch eine ausgedehntere Infektion verursachten als in der linken Großhirnhälfte. Auch die Lokalisation des Virus innerhalb des Großhirns ist in beiden Arbeiten ähnlich; so wurden infizierte Bereiche u.a. im Kortex, Subkortex und Hippokampus gefunden, nicht aber im Kleinhirn (vgl. Abb. 5). In Bezug auf den Zelltyp, der infiziert wurde, gibt es ebenfalls Parallelen in beiden Arbeiten; so wurden neuronale Zellen positiv und Astrozyten negativ auf MV getestet (Duprex *et al.*, 1999a; Reuter and Schneider-Schaulies, 2010). Dies wurde auch bei CD150-transgenen C57BL/6 gezeigt, die intranasal mit dem WT-MV-Stamm G954 infiziert wurden, woraufhin im Gehirn das Virus ausschließlich in Neuronen nachgewiesen wurde, jedoch nicht in Astrozyten (Sellin *et al.*, 2006).

In Abb. 4A ist der Zeitverlauf der zerebralen Infektion dargestellt. In Zusammenhang mit Abb. 3B bis Abb. 3F ist zu sehen, dass bereits 3 Tage nach i.c. Infektion einzelne, kleine Infektionsherde zu beobachten sind, die sich bis 7dpi über das gesamte Großhirn ausgebreitet haben und bereits zum Zeitpunkt 14dpi wieder rückläufig sind; zum Zeitpunkt 28dpi sind nur noch wenige, einzeln infizierte Zellen sichtbar. Diese Daten gehen mit den Experimenten von Fr. Kendl einher, in denen gezeigt wurde, dass die Menge des Virus, welches aus dem Gehirn infizierter Mäuse durch Kokultivierung mit Vero-Zellen re-isoliert werden konnte, von 10^3 pfu (7dpi) auf 10^2 pfu (14dpi) sank. Zum Zeitpunkt der persistierenden ZNS-Infektion (28dpi) konnte kein infektiöses Virus mehr re-isoliert werden (Schubert *et al.*, 2006). In den Untersuchungen von Sellin *et al.* wurde nach i.c. Infektion 2-Tage-alter CD150-transgener C57BL/6 mit 2×10^4 pfu des WT-MV-Stammes G954 die Menge des infektiösen Virus ebenfalls durch Kokultivierung von Gehirn-Gewebe mit Vero-SLAM-Zellen bestimmt. Der Virustiter erreichte dabei ein Maximum von 5×10^5 pfu pro Maus 4 bis 5 Tage nach Infektion. Jedoch konnte kein infektiöses Virus nach i.c. Infektion adulter 4-Wochen-alter Tiere (10^5 pfu pro Maus) isoliert werden, obwohl auf RNA-Ebene bis 12 Wochen nach Infektion MV nachgewiesen wurde (Sellin *et al.*, 2006). In einer weiteren Arbeit wurde auf RNA-Ebene gezeigt, dass 3 bis 7 Tage nach i.c. Infektion 6- bis 8-Wochen-alter NSE-CD46-transgener C57BL/6 (CD46-Expression ausschließlich in Neuronen) mit 10^4 pfu MV-Edmonston zunehmende Virusmengen nachweisbar sind, jedoch nicht mehr nach dem Zeitpunkt 13dpi (Patterson *et al.*, 2002).

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde desweiteren gezeigt, dass über einen Zeitraum von 20 Wochen nach i.c. Infektion mit rMV^{Edtag}eGFP-CAMH bei 6 Mäusen gleichbleibend hohe anti-MV-Titer im Blut nachweisbar waren, obwohl zum Zeitpunkt der finalen Analyse (20wpi) nur noch 1 von 6 Mäusen eGFP-positive Zellen im Gehirn aufwies (vgl. Abb. 4), d.h. in unserem Mausmodell der

persistierenden ZNS-Infektion sind die Tiere in der Lage, das Virus über diesen langen Zeitraum selbstständig zu eliminieren. Die Vorarbeiten von Frau Kendl haben bereits gezeigt, dass eine nachträgliche Immunisierung der Mäuse 2 Wochen nach der i.c. Infektion keinen Einfluss auf die persistierende ZNS-Infektion hat, obwohl der anti-MV-Titer im Vergleich zu nicht-immunisierten Mäusen ca. 10fach höher war (Schubert *et al.*, 2006). Diese Daten legen nahe, dass andere Komponenten des Immunsystems für die Viruseliminierung in diesem Mausmodell verantwortlich sind. Dieses Phänomen spiegelt sich auch bei SSPE-Patienten wieder, die trotz hoher Antikörper-Titer im Blut und CSF die Infektion jedoch nicht bekämpfen können (Modrow *et al.*, 2003; Weissbrich *et al.*, 2003).

Die Zahl der infizierten Zellen pro Maushirn blieb jedoch zwischen 4wpi und 6wpi noch relativ stabil (15 *versus* 12 eGFP-positive Zellen pro Maushirn, vgl. Abb. 4). Aufgrund dessen wurde in den folgenden Experimenten immer der Zeitpunkt 28dpi (\triangleq 4wpi) gewählt, wenn die persistierende ZNS-Infektion untersucht wurde. Somit ist dieses Mausmodell geeignet, Faktoren zu untersuchen, die die persistierende ZNS-Infektion beeinflussen könnten.

5.2 Adaptive Immunantwort gegen das Masernvirus im Gehirn

Im Anschluss an die Charakterisierung der ZNS-Infektion in unserem Mausmodell wurde die Anwesenheit von CD4⁺ Helfer-T-Zellen und CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen im Gehirn infizierter C57BL/6 quantifiziert. Die Einwanderung dieser Zellen in das Gehirn infizierter Mäuse (insbesondere in die Nähe infizierter Neuronen) wurde bereits histologisch zu den Zeitpunkten 5dpi und 10dpi belegt (Schubert *et al.*, 2006). Die Ergebnisse dieser Doktorarbeit zeigen, dass abhängig von der i.c. Infektion mit rMV^{Edtag}eGFP-CAMH zunehmend zytotoxische T-Zellen ins Gehirn der Tiere einwandern (vgl. Abb. 7), wohingegen im Vergleich zu Kontroll-Tieren nur ein leicht erhöhtes Level CD4⁺ Helfer-T-Zellen an Tag 7 und 10 nach der i.c. Infektion detektiert wurde. Interessanterweise war das Verhältnis der CD4⁺ zu CD8⁺ T-Zellen unabhängig von der i.c. Infektion (vgl. Abb. 10). Im Unterschied zu den histologischen Daten von Schubert *et al.*, bei denen die Tiere vor der Organentnahme mit 4% PFA perfundiert wurden, wurden für die durchflusszytometrische Analyse der Lymphozyten die Organe ohne vorhergehende Perfusion der Tiere entnommen; d.h. die FACS-Analyse umfasst somit nicht nur die direkt in das Gehirn-Parenchym eingewanderten Lymphozyten, sondern auch die, die sich in den Blutgefäßen befinden, welche das Gehirn umgeben.

Der Anteil beider Zellpopulationen (CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen) zeigte in der Milz und den zervikalen Lymphknoten keine Unterschiede zwischen i.c. infizierten Tieren und Kontroll-Tieren (vgl. Abb. 8). Im Gegensatz dazu stehen die Daten von Sellin *et al.*, bei denen 13 Tage nach intranasaler Infektion

CD150-transgener C57BL/6 mit dem WT-MV-Stamm G954 gezeigt wurde, dass in der Milz im Vergleich zu Kontroll-Tieren (infizierte WT-C57BL/6 bzw. uninfizierte CD150-transgene C57BL/6) der Anteil CD4⁺ T-Zellen 2fach höher und der Anteil CD8⁺ T-Zellen 3fach höher war. Jedoch gab es keine Untersuchungen über die Verteilung dieser Zellen in der Milz nach intrazerebraler Infektion (Sellin *et al.*, 2009).

Die Einwanderung CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in das Gehirn MV-infizierter Mäuse wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen gezeigt. So wurden z.B. 6- bis 8-Wochen-alte NSE-CD46-transgene C57BL/6 (CD46-Expression ausschließlich in Neuronen) mit 10⁴pfu MV-Edmonston i.c. infiziert und die Anwesenheit CD4⁺ und CD8⁺ intraparenchymaler T-Zellen 4 bis 37 Tage nach Infektion histologisch belegt. Das quantitative Verhältnis beider Zellpopulationen war in dieser Arbeit zu allen untersuchten Zeitpunkten relativ gleich (CD4⁺:CD8⁺ ca. 1:1). Kontroll-Tiere wiesen ebenfalls – jedoch in vergleichsweise sehr geringer Menge – CD4⁺ (ca. 10% gegenüber i.c. infizierten Tieren) und CD8⁺ (ca. 6% gegenüber i.c. infizierten Tieren) T-Zellen auf (Patterson *et al.*, 2002). Im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Doktorarbeit gibt es bei Patterson *et al.* jedoch keine Angaben über die Anteile beider Zellpopulationen im gesamten Gehirn. In anderen Untersuchungen wurden 8- bis 10-Wochen-alte NSE-CD46-transgene C57BL/6 mit 2.000 pfu MV-Edmonston i.c. infiziert und die aus dem Gehirn isolierten Leukozyten 7 Tage später durchflusszytometrisch analysiert. Dabei wurden im Durchschnitt 22% CD4⁺ und 17% CD8⁺ T-Zellen detektiert. Die Autoren versetzten desweiteren *in vitro* infizierte Gehirn-Explantate mit den aus dem Gehirn infizierter Mäuse isolierten Leukozyten und beobachteten 24h später die Einwanderung CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in die Nachbarschaft infizierter Neuronen innerhalb dieser Explantate (Stubblefield Park *et al.*, 2011). Auch mit dem WT-MV-Stamm G954 intranasal infizierte CD150-transgene C57BL/6 wiesen zum Zeitpunkt 8dpi CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in Nachbarschaft zu MV-infizierten Neuronen in histologischen Schnitten des Gehirns auf. Die durchflusszytometrische Analyse dieser Zellen ergab zu diesem Zeitpunkt im Vergleich zu infizierten Kontroll-Tieren (WT-C57BL/6) eine ca. 2fache Steigerung des prozentualen Anteils innerhalb der Lymphozyten (Sellin *et al.*, 2009). Die Einwanderung CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in die Nachbarschaft infizierter Neuronen wurde – wie bereits erwähnt – bereits in unseren eigenen Vorarbeiten anhand histologischer Gewebeschnitte gezeigt. In beiden letztgenannten Arbeiten gab es jedoch keine Angaben über die Verteilung beider Zellpopulationen im Gehirn zu anderen Zeitpunkten nach der Infektion.

Es ist bereits von anderen ZNS-Erkrankungen, die auf einer viralen Infektion, wie z.B. mit LCMV (Lymphozytäres-Choriomeningitis-Virus), dem Theiler-Virus, HIV (Humanes Immundefizienz-Virus) und West-Nil-Virus beruhen, bekannt, dass die Einwanderung der Immunzellen in das Gehirn infizierter Tiere, insbesondere in die Nähe infizierter Hirnzellen (vor allem Neuronen und Astrozyten) nicht zufällig erfolgt, sondern von der Chemokin-Produktion (z.B. IP-10, MIP-1alpha, MIP-1beta,

RANTES) infizierter Zellen abhängt (Asensio *et al.*, 1999; Palma and Kim, 2004; Shacklett *et al.*, 2004; Shirato *et al.*, 2004; Klein *et al.*, 2005). Desweiteren wurde anhand des Maus-Hepatitis-Virus gezeigt, dass die Neutralisierung der Chemokine IP-10 (= CXCL10) und RANTES (= CCL5) die Einwanderung der Immunzellen in das Gehirn reduziert (Liu *et al.*, 2000; Lane *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2001). Dieser Sachverhalt wurde ebenfalls anhand der zerebralen Infektion mit dem Masernvirus für die Chemokine IP-10 und RANTES gezeigt. Die Eliminierung des Masernvirus in den infizierten Neuronen ist jedoch nicht von diesen Chemokinen abhängig (Patterson *et al.*, 2003; Stubblefield Park *et al.*, 2011). Diese Daten zeigen, dass infizierte Neuronen selbst Signale aussenden, die indirekt zur Eliminierung der Infektion beitragen können. Matullo *et al.* veröffentlichten kürzlich eine interessante Arbeit, die zeigt, dass das Chemokin-induzierte Anlocken von Immunzellen Antigen-unabhängig erfolgt. Sie infizierten erwachsene NSE-CD46⁺ Mäuse (H-2^b-Hintergrund) zur gleichen Zeit mit MV (i.c. Infektion) und LCMV (i.p. Infektion), von denen ca. 50% der Tiere starben; bei jeweils getrennter Infektion starb keines der Tiere. Im Gehirn ko-infizierter Mäuse wiesen die Autoren LCMV-spezifische Tetramer⁺ CD8⁺ T-Zellen nach, obwohl keine LCMV-Antigene im Gehirn vorzufinden waren. Die Autoren geben an, dass LCMV-spezifische CTLs den Rezeptor für CXCL10 (= CXCR3) exprimieren (Christensen *et al.*, 2006), weshalb sie vermuten, dass diese Zellen in das Gehirn aufgrund der MV-induzierten Produktion von CXCL10 (Patterson *et al.*, 2003) einwandern (Matullo *et al.*, 2011).

Die Bedeutsamkeit CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen für die Eliminierung der zerebralen MV-Infektion wurde bereits in verschiedenen Tiermodellen gezeigt (Maehlen *et al.*, 1989; Finke and Liebert, 1994; Weidinger *et al.*, 2000; Tishon *et al.*, 2006). Unabhängig vom verwendeten Mausstamm sind vor allem CD4⁺ T-Zellen essentiell, um die MV-Infektion zu kontrollieren – entweder allein oder in Wechselwirkung mit CD8⁺ T-Zellen oder B-Zellen. Die umfangreichsten Untersuchungen wurden dabei von Tishon *et al.* unternommen, bei denen adulten CD46-transgenen Rag1-defizienten Mäusen zunächst aufgereinigte CD4⁺ T-Zellen, CD8⁺ T-Zellen, B-Zellen oder verschiedene Kombinationen dieser Zellpopulationen i.p. verabreicht wurden und 3 Tage später mit 10⁵pfu MV-Edmonston i.c. infiziert wurden. Im Vergleich zu nicht-transferierten Tieren, stieg die Überlebensrate nach i.c. Infektion nur bei den Tieren an, die eine Kombination aus CD4⁺ T-Zellen und B-Zellen oder CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen erhielten. Die Verabreichung von CD8⁺ T-Zellen in Kombination mit B-Zellen oder alle 3 Zellpopulationen für sich allein hatten keinen Einfluss auf die Überlebensrate der Tiere (Tishon *et al.*, 2006). Nur in einem der genannten Fälle sind CD8⁺ T-Zellen in der Lage gewesen, unabhängig von CD4⁺ T-Zellen das Gehirn vor einer MV-Infektion zu schützen. In diesem Fall wurden MV-spezifische CD8⁺ T-Zellen aus der Milz MV-immunisierter Balb/c-Mäuse isoliert und deren hohe lytische Kapazität gegenüber MV-infizierten Zellen *in vitro* gezeigt. Anschließend wurden diese Zellen in naive Balb/c-Mäuse, in denen zuvor alle CD4⁺ T-Zellen depletiert wurden, transferiert. Zeitgleich mit dem CD8-T-

Zell-Transfer erfolgte eine i.c. Infektion mit 10^4 TCID₅₀ CAM/RBH. Die Überlebensrate der Mäuse stieg gegenüber nicht-transferierten Tieren von 10% auf 87% (Weidinger *et al.*, 2000).

Klassischerweise wird die T-Zell-Antwort durch die Bindung des T-Zell-Rezeptors (T-Zelle) an den Antigen-MHC-Komplex (Antigen-präsentierende Zelle) vermittelt. Hierbei werden MHC-I-Moleküle von CD8-Rezeptoren und MHC-II-Moleküle von CD4-Rezeptoren erkannt und gebunden (Konig *et al.*, 1996; Gao and Jakobsen, 2000). Jahrelang war man der allgemein akzeptierten Meinung, dass Neuronen im Normalfall jedoch keine MHC-Moleküle exprimieren und somit im Gegensatz zu dendritischen Zellen nicht als professionelle Antigen-präsentierende Zellen dienen können (Lampson, 1995). Man nahm an, dass aber genau dieses Fehlen der MHC-Moleküle dazu beiträgt, dass das Gehirn vor Schäden aufgrund einer CTL-vermittelten Lyse geschützt wird. Andererseits wird dadurch aber auch eine persistierende Virusinfektion in Neuronen begünstigt (Chakraborty *et al.*, 2010). Die Blut-Hirn-Schranke verhindert zudem zum größten Teil den Eintritt von Immunzellen in das Gehirnparenchym – einerseits durch *Tight Junctions* und andererseits aufgrund der relativ geringen Expression von Adhäsionsmolekülen auf den zerebrovaskulären Endothelzellen. Jedoch haben bereits ältere Studien gezeigt, dass aktivierte T-Zellen durchaus in der Lage sind, Antigen-unabhängig im Rahmen einer normalen „immunologischen Überwachung“ aller Gewebe die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden. Dabei haben zwei der bekanntesten Adhäsionsmoleküle, die auf Endothelzellen exprimiert werden – ICAM-1 und VCAM – jedoch keine weitere Bedeutung (Wekerle *et al.*, 1986; Hickey *et al.*, 1991; Irani and Griffin, 1996; Hickey *et al.*, 1997). Im Gegensatz dazu spielt aber z.B. die Interaktion von P-Selectin, das in geringen Mengen auf normalen zerebrovaskulären Endothelzellen exprimiert wird, mit P-Selectin-Ligand, der auf aktivierten CD4⁺ T-Zellen exprimiert wird, eine Rolle (Carrithers *et al.*, 2000).

Ohne Vorliegen einer zerebralen Infektion verweilen aktivierte T-Zellen nicht sehr lang im Gehirnparenchym; stattdessen verlassen sie es wieder oder es wird vor Ort Apoptose eingeleitet. Im Falle einer Infektion, wenn entsprechende Antigene auf MHC-Molekülen präsentiert werden, verbleiben aktivierte T-Zellen im Gehirnparenchym und können mit den Antigen-MHC-Komplexen interagieren (Irani and Griffin, 1996; Ransohoff *et al.*, 2003). Zu den MHC-exprimierenden Zellen im perivaskulären Raum des Gehirns gehören nach einer ZNS-Infektion u.a. Mikroglia-Zellen, perivaskuläre Makrophagen, Astrozyten und Oligodendrozyten (Suzumura *et al.*, 1988; Hickey and Kimura, 1988; Pope *et al.*, 1998; Sedgwick *et al.*, 1998; Kimura and Griffin, 2000). Kürzlich wurde gezeigt, dass aber – wenn auch in geringerem Maße als andere Zellen – auch uninfizierte Neuronen durchaus in der Lage sind, klassische wie auch nicht-klassische MHC-I-Moleküle *in vivo* zu exprimieren (Boulanger and Shatz, 2004). Hierzu gehören u.a. MHC-Moleküle der Klasse Ib, wie z.B. in der Maus H-2M (Loconto *et al.*, 2003; Ishii *et al.*, 2003) und Qa-1 (Huh *et al.*, 2000) sowie im

Menschen HLA-G (Maier *et al.*, 1999). Die neuronale Expression dieser Moleküle verstärkte sich, wenn die Neuronen beschädigt wurden und/oder Zytokinen (Neumann *et al.*, 1995; Neumann *et al.*, 1997a) oder viralen Infektionen (Irwin *et al.*, 1999; Redwine *et al.*, 2001; Loconto *et al.*, 2003) ausgesetzt waren; letzteres wurde auch bereits für die Infektion mit MV gezeigt (Gopas *et al.*, 1992; Gogate *et al.*, 1996). Die Untersuchungen von Rall *et al.* haben gezeigt, dass Neuronen, die MHC-I-Moleküle exprimieren (NSE-D^b-transgene C57BL/6), infolge einer i.c. Infektion mit LCMV *in vivo* resistent gegenüber einer CTL-vermittelten Lyse sind. Obwohl verstärkt zytotoxische T-Zellen in das Gehirn einwanderten und das Virus aus den MHC-I-exprimierenden Neuronen eliminiert wurde, wurde keine Lyse der neuronalen Zellen beobachtet (Rall *et al.*, 1995). In Bezug auf eine ZNS-Infektion mit dem Masernvirus wurde in der Gruppe um Patterson *et al.* ebenfalls gezeigt, dass das Virus in den Neuronen nicht-zytolytisch eliminiert wird (Patterson *et al.*, 2002; Stubblefield Park *et al.*, 2011). Diese Untersuchungen bestätigen unsere eigenen Beobachtungen, dass die Tiere in unserem Mausmodell die i.c. Infektion mit rMV^{Edtag}eGFP-CAMH bzw. rMV^{Edtag}CAMH ohne sichtbare neuronale Schäden überstehen. Eine nicht-zytolytische Viruseliminierung im Gehirn wurde ebenfalls in weiteren Tiermodellen, wie z.B. für LCMV (Tishon *et al.*, 1993; Rall and Oldstone, 1995), das Sindbis-Virus (Binder and Griffin, 2001), Maus-Hepatitis-Virus (Lin *et al.*, 1997; Stohlman *et al.*, 1998; Parra *et al.*, 1999) und Vesicular Stomatitis Virus gezeigt (Komatsu *et al.*, 1999). Diese Studien verdeutlichen, dass der Organismus Mechanismen entwickelt hat, die eine CTL-vermittelte Lyse infizierter, nicht erneuerbarer Neuronen verhindern. Auch außerhalb des Gehirns wurde bereits die nicht-zytolytische Viruseliminierung in der Leber im Rahmen eines Mausmodells einer Hepatitis-B-Virus-Infektion beobachtet (Guidotti *et al.*, 1999).

In allen soeben genannten Beispielen der nicht-zytolytischen Viruseliminierung spielt IFN- γ eine bedeutende Rolle. IFN- γ besitzt sehr vielseitige Funktionen. Es übt nicht nur einen antiviralen Effekt aus, sondern besitzt auch immunmodulatorische Eigenschaften, inhibiert die Zell-Proliferation und wirkt sich auf die Apoptose aus. Desweiteren beeinflusst es die Antigen-Prozessierung und Antigen-Präsentation, und stimuliert die Expression der MHC-I- und MHC-II-Moleküle. Außerdem induziert IFN- γ Proteine, die die Migration und Adhäsion von Leukozyten beeinflussen, wie z.B. RANTES, IP-10, ICAM-1 und VCAM-1 (Schroder *et al.*, 2004). Studien haben gezeigt, dass die Serumkonzentration von IFN- γ nach einer akuten MV-Infektion oder nach der Impfung gegen MV gegenüber Kontroll-Gruppen erhöht ist (Okada *et al.*, 2001; Ovsyannikova *et al.*, 2003). Bei SSPE-Patienten wurde IFN- γ postmortem in Gehirnläsionen nachgewiesen (Nagano *et al.*, 1994). Die Bedeutung von IFN- γ während der zerebralen Maserninfektion wurde experimentell in diversen Mausmodellen gezeigt. Es wurde festgestellt, dass das Fehlen von IFN- γ nicht nur die Resistenz gegenüber einer MV-induzierten Enzephalitis aufhebt, sondern auch die Persistenz des Virus fördert. Dabei wurde die Funktion des

Zytokins entweder mit Hilfe eines neutralisierenden Antikörpers geblockt (Finke *et al.*, 1995; Weidinger *et al.*, 2001; Stubblefield Park *et al.*, 2011) oder in entsprechenden *knock-out*-Mäusen abgeschaltet (Patterson *et al.*, 2002; Tishon *et al.*, 2006). Unsere eigenen Untersuchungen haben gezeigt, dass das Überleben 2-Wochen-alter IFN- γ -Rezeptor-defizienter C57BL/6 nach i.c. Infektion mit rMV^{E₂tag}eGFP-CAMH innerhalb der folgenden 4 Wochen auf 38% sinkt (unveröffentlicht). Stubblefield Park *et al.* haben gezeigt, dass *in vitro* rekombinantes IFN- γ allein ausreicht, um MV in infizierten Gehirn-Explantaten zu 97% zu eliminieren. Aber auch aus dem Gehirn MV-infizierter Mäuse isolierte Leukozyten waren in der Lage, *ex vivo* die MV-Infektion in Gehirn-Explantaten um 60% zu reduzieren. Interessanterweise stellten die Autoren dabei fest, dass die Leukozytenvermittelte, IFN- γ -abhängige Viruseliminierung jedoch Antigen-unabhängig verläuft, d.h. aus dem Gehirn MV-infizierter Mäuse isolierte Leukozyten waren in der Lage, *ex vivo* in Gehirn-Explantaten eine Infektion mit MHV-A59 (Maus-Hepatitis-Virus) bzw. WNV (West-Nil-Virus) mindestens genauso gut zu reduzieren wie eine Infektion mit MV (Stubblefield Park *et al.*, 2011). Dies lässt sich vermutlich dadurch erklären, dass zum einen das Maus-Hepatitis-Virus (Parra *et al.*, 1999) und West-Nil-Virus (Shrestha *et al.*, 2006) durch IFN- γ eliminiert werden kann und dass zum anderen – wie bereits beschrieben – beide Viren die Chemokin-Produktion im Gehirn anregen, welche Virus-unabhängig T-Zellen anlocken.

Als Quelle für die IFN- γ -Produktion *in vivo* wurden neben aktivierten T- und NK-Zellen aber auch Neuronen identifiziert (Eneroth *et al.*, 1991; Neumann *et al.*, 1997b). Es ist also nicht weiter verwunderlich, dass Neuronen selbst IFN- γ -vermittelte, antivirale Aktivitäten ausüben (Eneroth *et al.*, 1992). Inwieweit solch ein autokriner Mechanismus bei der Eliminierung von MV in Neuronen eine Rolle spielt, muss noch untersucht werden.

Weiterführende Untersuchungen zur antiviralen Aktivität von IFN- γ haben in unserer eigenen Arbeitsgruppe gezeigt, dass IFN- γ *in vitro* das Enzym Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO; katalysiert den ersten und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des Tryptophan-Stoffwechsels (Yamamoto and Hayaishi, 1967)) in Epithel- (A549 und Vero), Endothel- (HUVEC und HBMEC) und Astrogliazelllinien (86HG39), jedoch nicht in neuronalen Zelllinien (IMR-32, NT2 und SKN-MC) induziert. Die IFN- γ -induzierte, IDO-vermittelte anti-MV-Aktivität wurde durch Zugabe eines Tryptophan-Überschusses zwar nicht komplett, aber zum größten Teil aufgehoben. Dies lässt vermuten, dass neben IDO noch andere antivirale Mechanismen eine Rolle spielen (Obojes *et al.*, 2005). Desweiteren wurde der anti-MV-Effekt von IDO *in vitro* mit Hilfe einer Vektor-basierten Überexpression von IDO in Vero- und 293T-Zellen gezeigt (Diplomarbeit von A. Kloos, angefertigt 2006 in der Arbeitsgruppe von Jürgen Schneider-Schaulies). Die antivirale Aktivität von IDO wurde *in vitro* auch schon für das Humane

Cytomegalievirus (Bodaghi *et al.*, 1999) und Herpes-Simplex-Virus 1 (Adams *et al.*, 2004) gezeigt, welche dort ebenfalls durch einen Tryptophan-Überschuss aufgehoben wurde.

Die in dieser Doktorarbeit durchgeführten *in vivo* Experimente zeigen nicht nur, dass die Überlebensrate 2-Wochen-alter IDOk.o.-Mäuse, die i.c. mit rMV^{Edtag}eGFP-CAMH infiziert wurden, nur noch 53% betrug (vgl. Abb. 33; bei C57BL/6-WT 95% (Schubert *et al.*, 2006)), sondern dass die persistierende ZNS-Infektion in den überlebenden IDOk.o.-Mäusen signifikant stärker ausgeprägt war, als in C57BL/6-WT-Tieren (vgl. Abb. 34). Diese Beobachtungen bestätigen die *in vitro* gezeigte antivirale Aktivität vonIDO gegen MV. Der gegensätzliche Effekt vonIDO wurde *in vivo* anhand eines Mausmodells für eine HIV-induzierte Enzephalitis gezeigt. In dieser Arbeit wurde die Aktivität vonIDO mit Hilfe von 1-Methyl-D-Tryptophan (1-MT) gehemmt. Drei Wochen nach der Induktion der HIV-vermittelten Enzephalitis zeigten 1-MT-behandelte Mäuse gegenüber unbehandelten Tieren eine 89%ige Reduktion HIV-infizierter Zellen im Gehirn, sowie eine 2-3fache Steigerung HIV-1^{gag}-spezifischer CD8⁺ T-Zellen in der Milz. Außerdem wurde gezeigt, dass zwei Wochen nach der Induktion der Enzephalitis die doppelte Menge CD8⁺ T-Zellen im Gehirn 1-MT-behandelter Tiere vorhanden war; jedoch gab es keine Angaben über die Einwanderung HIV-spezifischer T-Zellen in das Gehirn (Potula *et al.*, 2005). Eine ähnliche Arbeit wurde später von Hoshi *et al.* veröffentlicht, in der der Einfluss vonIDO auf die retrovirale Infektion mit dem murinen Leukämievirus LP-BM5 im Mausmodell untersucht wurde, welches ein zu HIV vergleichbares Krankheitsbild verursacht (murines AIDS). Dabei wurden IDOk.o.-Mäuse (C57BL/6-Hintergrund) sowie 1-MT-behandelte C57BL/6-WT-Mäuse (vorübergehender Aktivitätsverlust vonIDO) mit unbehandelten WT-Tieren verglichen. Die Autoren stellten fest, dass im Vergleich zu Kontroll-Tieren die Blockade vonIDO nicht nur das Überleben der Tiere nach Infektion verbessert, sondern dass auch die Replikation des Virus verringert wurde und dass die Produktion der Typ-I-Interferone in der Milz hoch reguliert wurde (Hoshi *et al.*, 2010). In diesen beiden Fällen übteIDO einen immunsuppressiven Effekt aus, der die Virusausbreitung begünstigte.IDO ist also in der Lage, einerseits die Virusausbreitung einzudämmen; andererseits unterdrückt es aber auch die Immunantwort – dies trägt vermutlich dazu bei, dass im Gehirn neuronale Schäden aufgrund einer überschießenden T-Zell-Reaktion verhindert werden, obwohl dadurch die Viruspersistenz gefördert wird.

Die IFN- γ -induzierte Expression vonIDO im Gehirn wurde bisher direkt *in vivo* und anhand primärer Zellkulturen für Mikroglia, Makrophagen, Astrozyten und auch Neuronen gezeigt (Alberati-Giani *et al.*, 1996; Heyes *et al.*, 1996; Heyes *et al.*, 1997; Roy *et al.*, 2005; Guillemain *et al.*, 2005). Hinsichtlich der nicht erneuerbaren Neuronen sollte erwähnt werden, dass zwei Abbauprodukte desIDO-vermittelten Tryptophan-Stoffwechsels (3-Hydroxyanthranilat und Chinolinsäure) neurotoxisch wirken (Schwarcz *et al.*, 1983; Eastman and Guilarte, 1990; Okuda *et al.*, 1996; Kwidzinski and Bechmann, 2007). Guillemain *et al.* haben jedoch gezeigt, dass Neuronen und auch Astrozyten im

Gegensatz zu Mikroglia in der Lage sind, Chinolinsäure abzubauen und somit damit verbundenen neurotoxischen Effekten zu entgehen (Guillemin *et al.*, 2005). Inwieweit und vor allem in welchen Zellen des GehirnsIDO tatsächlich in unserem Mausmodell der akuten und persistierenden ZNS-Infektion induziert wird und ob der *knock-out* von IDO einen Einfluss auf die Einwanderung Masernspezifischer T-Zellen in das Gehirn hat, muss noch mit Hilfe geeigneter Verfahren, wie z.B. Western-Blot oder Immunhistochemie bzw. Durchflusszytometrie untersucht werden. In Hinblick auf die bereits vorliegenden Daten der *in vitro*- und *in vivo*-Experimente unserer Arbeitsgruppe sowie der anderen genannten Veröffentlichungen ist es jedoch sehr wahrscheinlich, dass IDO in erster Linie während der akuten ZNS-Infektion im Gehirn nachweisbar ist und dass in IDOk.o.-Mäusen während der persistierenden Phase der ZNS-Infektion im Gehirn evtl. weniger Masern-spezifische T-Zellen vorzufinden sind als in C57BL/6-WT-Tieren.

In den bereits genannten Publikationen (Patterson *et al.*, 2002; Stubblefield Park *et al.*, 2011) wurde zwar davon gesprochen, dass MV-geprimte T-Zellen in das Gehirn infizierter Mäuse einwandern, jedoch gibt es noch keine Veröffentlichung, die das anhand MV-Epitop-spezifischer T-Zellen belegt. Die Arbeit von de Vries *et al.* zeigte bereits am Beispiel des humanen Systems, dass MV-spezifische CD8⁺ T-Zell-Klone *in vitro* die Virusausbreitung von MV hemmen; zwei der T-Zell-Klone waren spezifisch für das MV-Fusionsprotein, wohingegen die Spezifität der anderen beiden T-Zell-Klone unbekannt war (de Vries *et al.*, 2010).

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde deshalb nach der allgemeinen Charakterisierung CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen auch die Einwanderung Masern-spezifischer T-Zellen in das Gehirn infizierter Mäuse untersucht. Dabei haben wir uns auf CD8⁺ CTLs konzentriert, die 8-9 aa lange Peptide erkennen, die mit Hilfe von MHC-I-Molekülen auf der Oberfläche Antigen-präsentierender Zellen exprimiert werden. Unter Zuhilfenahme der Programme Syfpeithi, BIMAS und MAPPP wurden insgesamt je sechs Peptidsequenzen für das MV-Nucleocapsid und -Hämagglutinin ausgewählt, die mit hoher Wahrscheinlichkeit von den Maus-MHC-Molekülen „H-2K^b“ bzw. „H-2D^b“ präsentiert werden (vgl. Tab. 6). Mit Hilfe des IFN- γ -ELISPOT-Assay (Bercovici *et al.*, 2000) wurden die ausgewählten Peptide bezüglich ihrer Immunogenität, d.h. ihre Fähigkeit, eine Immunreaktion auszulösen, getestet. Von allen untersuchten Peptiden induzierten lediglich zwei eine relativ starke IFN- γ -Produktion im ELISPOT-Assay, bei dem Milz- bzw. Lymphknotenzellen immunisierter C57BL/6 mit den jeweiligen Peptiden *ex vivo* re-stimuliert wurden: MV-H₂₂₋₃₀ (RIVINREHL) und MV-H₄₄₆₋₄₅₄ (SNHNNVYWL) (vgl. Abb. 11). Dies ist die erste Arbeit, in der diese beiden Epitope des MV-Hämagglutinins für C57BL/6-Mäuse identifiziert wurden, welche die IFN- γ -Produktion muriner CD8⁺ CTLs *ex vivo* stimulieren.

In der Literatur wurden bereits diverse andere Masernepitope für andere Inzuchtstämme beschrieben, die von murinen CD8⁺ CTLs erkannt werden. Die meisten Epitope wurden dabei für das

Nukleokapsid identifiziert (Beauverger *et al.*, 1993; Cardoso *et al.*, 1995; Beauverger *et al.*, 1996; Partidos *et al.*, 1997; Neumeister and Niewiesk, 1998; Schadeck *et al.*, 1999; Weidinger *et al.*, 2000; Etchart *et al.*, 2001; Neumeister *et al.*, 2001). Aber auch für das Hämagglutinin wurden bereits diverse Epitope beschrieben, die von CD8⁺ CTLs erkannt werden (Beauverger *et al.*, 1994; Cardoso *et al.*, 1996). Ebenso gibt es einige Veröffentlichungen, die diverse Masernepitope angeben, die von murinen CD4⁺ T-Zellen erkannt werden (Partidos and Steward, 1990; Giraudon *et al.*, 1992; Fournier *et al.*, 1996; Rivaille *et al.*, 1998; El Kasmi *et al.*, 1999).

In den nachfolgenden Infektionsexperimenten wurden die beiden Peptide MV-H₂₂₋₃₀ und MV-H₄₄₆₋₄₅₄ verwendet, um die Masern-spezifische IFN- γ -Produktion der aus der Milz, den zervikalen Lymphknoten und dem Gehirn isolierten Lymphozyten zu untersuchen. Dabei haben wir in unserem Mausmodell der i.c. Infektion mit rMV^{Edtag}eGFP-CAMH festgestellt, dass MV-H₂₂₋₃₀- und MV-H₄₄₆₋₄₅₄-spezifische, IFN- γ -produzierende Zellen in der Milz und den zervikalen Lymphknoten vor allem während der akuten ZNS-Infektion anzutreffen sind, wohingegen sich diese Zellen auch noch während der persistierenden Phase der Infektion im Gehirn befinden (vgl. Abb. 12).

Desweiteren wurde in dieser Doktorarbeit ein Assay etabliert, der die durchflusszytometrische Identifizierung MV-spezifischer T-Zellen mit Hilfe von Pentameren ermöglicht. Äquivalent zu den allgemein bekannten Tetrameren (Altman *et al.*, 1996; Bercovici *et al.*, 2000), bestehen Pentamere aus je 5 Fluoreszenz-markierten MHC-Peptid-Komplexen, die an ihren entsprechenden T-Zell-Rezeptor binden. Gemäß Tab. 6 und den Ergebnissen aus dem IFN- γ -ELISPOT-Assay (vgl. Abb. 11 und Abb. 12) wurden Pentamere synthetisiert, die das MV-H₂₂₋₃₀-Peptid in Zusammenhang mit dem MHC-Molekül H-2D^b beinhalten. In unserem Mausmodell der i.c. Infektion mit rMV^{Edtag}eGFP-CAMH wurden – in Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus dem IFN- γ -ELISPOT-Assay – D^b-MV-H₂₂₋₃₀-spezifische CD8⁺ T-Zellen in der Milz und den zervikalen Lymphknoten vor allem während der akuten ZNS-Infektion beobachtet (vgl. Abb. 16), wohingegen diese Zellen im Gehirn auch noch während der persistierenden Phase der ZNS-Infektion zu detektieren waren (vgl. Abb. 15). Interessanterweise war der Anteil der D^b-MV-H₂₂₋₃₀-spezifischen T-Zellen innerhalb der gesamten CD8⁺ T-Zell-Population für alle untersuchten Zeitpunkte nach i.c. Infektion im Gehirn mit Abstand am größten, wohingegen in der Milz nur eine vergleichsweise kleine Population dieser Zellen detektiert wurde und in den zervikalen Lymphknoten der Anteil dieser Zellen sogar verschwindend gering war (vgl. Abb. 17). Diese Beobachtungen zeigen, dass in unserem Mausmodell Masern-spezifische CD8⁺ T-Zellen nach i.c. Infektion mit rMV^{Edtag}eGFP-CAMH vor allem in das Gehirn einwandern – also dahin, wo sich die Infektion befindet.

5.3 Regulation der antiviralen Aktivität im Gehirn

In der Literatur ist beschrieben, dass interessanterweise die Aktivität MV-spezifischer CD4⁺ T-Gedächtniszellen im Laufe der Zeit abnimmt, wohingegen die der CD8⁺ T-Gedächtniszellen konstant bleibt, genauso wie das Level MV-spezifischer IgG-Antikörper (Naniche *et al.*, 2004; Amanna *et al.*, 2007). Dies wurde auch in dieser Doktorarbeit anhand des über 20 Wochen hinweg konstanten anti-MV-Titers in i.c. infizierten Mäusen gezeigt (vgl. Abb. 4B). Desweiteren war zum Zeitpunkt der persistierenden ZNS-Infektion (28dpi) der Anteil der gesamten CD8⁺ T-Zellen im Gehirn infizierter Mäuse signifikant höher als in Kontroll-Tieren (vgl. Abb. 10B), wohingegen der Anteil der CD4⁺ T-Zellen in beiden Maus-Gruppen gleich war (vgl. Abb. 10A). Die Tatsache, dass während der persistierenden Phase der ZNS-Infektion vereinzelt infizierte Zellen im Gehirn verbleiben, obwohl der Anteil der Masern-spezifischen CTLs im Gehirn immer noch recht hoch ist, bedarf weiterer Untersuchungen. Es stellt sich u.a. die Frage, wie sich diese Situation zu einem späteren Zeitpunkt (z.B. 6 oder 8 Wochen nach Infektion) verhält; vor allem, inwieweit Masern-spezifische CTLs dann immer noch funktionell sind. Es ist bekannt, dass Virus-spezifische CTLs im Laufe einer chronischen bzw. persistierenden Infektion in einen Zustand sogenannter „Erschöpfung“ (*T cell exhaustion*) übergehen können, der u.a. gekennzeichnet ist durch eine Abnahme der Zytokin-Produktion (in erster Linie IL-2, TNF- α und IFN- γ), Zytotoxizität, Zellproliferation und Regeneration (Jin *et al.*, 2011). Als ein für T-Zell-Erschöpfung bekannter Marker wurde 2006 im Rahmen eines Mausmodells einer chronischen Infektion mit LCMV auf Virus-spezifischen CTLs PD-1 identifiziert. Dieser Marker ging einher mit einer reduzierten Zytokin-Produktion (IFN- γ und TNF- α) sowie beeinträchtigten Zellproliferation (Barber *et al.*, 2006). Die Abkürzung PD-1 steht für *programmed cell death*; dieses Molekül wurde 1992 auf einer Hybridom-Zelllinie entdeckt, in der der „programmierte Zelltod“ – daher auch der Name – induziert wurde (Ishida *et al.*, 1992). PD-1 wurde bis heute in Zusammenhang mit weiteren chronischen Virus-Infektionen beschrieben, wie z.B. mit HIV, Hepatitis B und C, Herpes-Simplex-Virus 1 und Friend-Retrovirus (Day *et al.*, 2006; Urbani *et al.*, 2006; Peng *et al.*, 2008; Mott *et al.*, 2009; Takamura *et al.*, 2010). Die Blockade der PD-1/PD-L1-Interaktion führte dazu, dass die erschöpften T-Zellen wieder ihre Funktion ausüben konnten, d.h. am Beispiel von Barber *et al.* waren LCMV-spezifische CTLs wieder in der Lage zu proliferieren, vermehrt Zytokine (IFN- γ und TNF- α) zu sezernieren, infizierte Zellen zu töten und die Viruslast zu verringern (Barber *et al.*, 2006). Man nimmt an, dass die PD-1-vermittelte Interaktion Virus-spezifische CTLs abschaltet und somit vor Schäden schützt, die während einer persistierenden Infektion durch diese Immunzellen verursacht werden. Inwieweit diese Interaktion auch bei der Infektion mit MV eine Rolle spielt, muss noch untersucht werden. Es gibt bisher eine Veröffentlichung, die anhand von SSPE-Patienten zeigt, dass das Expressionslevel von PD-1 gegenüber einer Kontroll-Gruppe signifikant hochreguliert ist, woraus

die Autoren auf eine genetische Prädisposition der untersuchten Patienten in Bezug auf SSPE schließen (Ishizaki *et al.*, 2010).

Im Gegensatz zu PD-1, das direkt von den Virus-spezifischen Zellen selbst exprimiert wird und deren Funktion supprimiert, gibt es regulatorische Foxp3⁺ T-Zellen (Hori *et al.*, 2003; Fontenot *et al.*, 2003; Khattri *et al.*, 2003), die die Funktion von Effektor-T-Zellen (wie z.B. CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, B-, NK-, NKT-Zellen) aber auch APCs (wie z.B. dendritische Zellen und Makrophagen) unterdrücken bzw. regulieren können (Shevach, 2009).

In Bezug auf eine Infektion mit MV gibt es in der Literatur bisher nur eine weitere Veröffentlichung, die die Einwanderung Foxp3⁺ T_{reg} in das Gehirn zeigt (Sellin *et al.*, 2009). Dabei wurden CD150-transgene C57BL/6 mit dem WT-Stamm G954 intranasal infiziert und 8 Tage später analysiert. Das Alter der Tiere beträgt vermutlich 7 Tage (eine exakte Angabe fehlt jedoch), da von „suckling mice“ gesprochen wird, die in einer vorhergehenden Publikation von Sellin *et al.* mit einem Alter von 7 Tagen angegeben wurden (Sellin *et al.*, 2006). Die Autoren zeigen in der Immunhistochemie Foxp3⁺ T_{reg} in der Nähe infizierter Zellen im Gehirn (Abb. 4C und 4D (Sellin *et al.*, 2009)), wobei der Anteil dieser Zellen gegenüber CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen vergleichsweise gering ist. Im Text wird davon gesprochen, dass in MV-infizierten WT-Mäusen weder Virus (eine Infektion der Tiere mit WT-MV ist aufgrund des fehlenden CD150-Rezeptors nicht möglich; \triangle Kontroll-Tiere) noch Foxp3⁺ T_{reg} im Gehirn beobachtet wurden. Daraus schlussfolgern sie, dass im Gehirn T_{reg} in Arealen mit MV-Infektion akkumulieren. Jedoch zeigen die Autoren in einer weiteren Abbildung, dass in der durchflusszytometrischen Analyse Foxp3⁺ Lymphozyten im Gehirn infizierter Foxp3-GFP-transgener Mäuse detektiert wurden (eine Infektion der Tiere mit WT-MV ist aufgrund des fehlenden CD150-Rezeptors auch hier nicht möglich; \triangle Kontroll-Tiere). Der Anteil Foxp3⁺ Zellen innerhalb der CD4⁺ Population lag bei dem gezeigten Beispiel in infizierten Kontroll-Tieren bei 4,53% und in infizierten CD150-transgenen Tieren bei 15,6% (Abb. 3C), d.h. die i.n. Infektion mit WT-MV bewirkte im Gehirn eine Steigerung der T_{reg} um das 3fache. Es stellt sich also die Frage, ob in Kontroll-Tieren, bei denen MV keine Infektion verursacht, T_{reg} im Gehirn nun vorhanden sind oder nicht. Eine mögliche Erklärung dieser abweichenden Daten wäre gewesen, dass die Tiere wie in der vorliegenden Doktorarbeit für die histologische Analyse, jedoch nicht für die durchflusszytometrische Analyse vor der Entnahme der Gehirne perfundiert wurden. Da die Tiere aber in beiden Fällen zuvor mit PBS perfundiert wurden, sind die Ergebnisse in der Publikation (Sellin *et al.*, 2009) widersprüchlich. Desweiteren wurde nach der Infektion nur ein Zeitpunkt betrachtet, d.h. es liegen keine Daten darüber vor, wann T_{reg} frühestens ins Gehirn einwandern und ob sie zu einem späteren Zeitraum wieder verschwinden oder sogar im Gehirn verweilen.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde daraufhin in unserem Mausmodell der ZNS-Infektion mit MV die Expression des Transkriptionsfaktors Foxp3 der aus der Milz, den zervikalen Lymphknoten und dem Gehirn isolierten Lymphozyten über einen Zeitraum von 4 Wochen nach Infektion untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass in Bezug auf den Anteil Foxp3⁺ T_{reg} in der Milz und den ZLK keine signifikanten Unterschiede zwischen i.c. infizierten Mäusen und Kontroll-Mäusen zu beobachten waren (vgl. Abb. 18). Im Gegensatz dazu war 13 Tage nach i.n. Infektion CD150-transgener C57BL/6 mit MV-G954, die eine systemische Ausbreitung des Virus zur Folge hat (Infektion in Lunge, Niere, Thymus, Gehirn und Nasal-assoziiertes Lymphgewebe), der Anteil Foxp3⁺ T_{reg} in der Milz im Vergleich zu Kontroll-Tieren von 7,27% auf 10,02% gestiegen (Sellin *et al.*, 2009). Dies lässt vermuten, dass eine signifikante Zunahme der T_{reg} in der Peripherie nur bei einer systemischen Ausbreitung des Virus vorkommt, jedoch nicht, wenn – wie in unserem Fall – die Infektion sich auf das Gehirn beschränkt. Allerdings bedarf dieser Punkt weiterer Untersuchungen, da in einer anderen Veröffentlichung keine Änderungen bezüglich Foxp3⁺ T_{reg} in der Milz und den inguinalen Lymphknoten nach i.p. Infektion mit MV zu beobachten waren, obwohl das Virus nachweislich in der Milz und diversen Lymphknoten (zervikal, mesenterisch, inguinal, lumbal und mediastinal) replizierte (Koga *et al.*, 2010).

Im Gehirn wurden in unserem Mausmodell in Abhängigkeit von der Infektion – wenn auch in nur sehr geringer Zahl – Foxp3⁺ T_{reg} detektiert (vgl. Abb. 20). Die Detektion Foxp3⁺ T_{reg} mit Hilfe der Immunhistochemie und die damit verbundene Lokalisation dieser Zellen im Verhältnis zur MV-Infektion war in der vorliegenden Arbeit nicht erfolgreich (vgl. Abb. 23), was vermutlich zum einen an der sehr geringen Anzahl dieser Zellen während der Infektion lag (vgl. Abb. 20 rechts), welche in unserem Fall evtl. unter die Detektionsgrenze der Immunhistochemie fiel. Für einen direkten Vergleich mit den Ergebnissen von Sellin *et al.* fehlen in der Veröffentlichung die entsprechenden Angaben zur Gesamtzellzahl der Foxp3⁺ T_{reg} im Gehirn infizierter Tiere. Zum anderen ist es denkbar, dass die Dicke der PFA-fixierten Hirn-Gewebeschnitte (100µm) für eine immunhistochemische, intrazelluläre Antikörper-Färbung zu groß war; im Fall von Sellin *et al.* wurden nur 10µm-dicke kryokonservierte Gewebeschnitte verwendet (Sellin *et al.*, 2009). Dennoch zeigen unsere Daten, dass eine Infektion mit MV die Migration von Foxp3⁺ T_{reg} in das Gehirn bereits zu Beginn der akuten ZNS-Infektion zur Folge hat und dass diese Zellen auch während der persistierenden Phase der ZNS-Infektion im Gehirn nachweisbar sind. Zusammen mit den Daten von Sellin *et al.* kann man daraus schlussfolgern, dass das Masernvirus die Expansion und/oder Migration von T_{reg} fördert und dass dies zur MV-induzierten Immunsuppression (von Pirquet, 1908) beitragen könnte.

Die Regulation über Foxp3⁺ T_{reg} wird entweder durch Rezeptor/Ligand-Interaktionen (wie z.B. LAG-3/LAG-3L, GITR/GITR-L, CTLA-4/B7-1/2, CD95/CD95-L oder auch PD-1/PD-L1/L2), durch Ausschüttung immunsuppressiver Zytokine (wie z.B. IL-10, IL-35 und TGF-β), durch Verbrauch des IL-2 (wodurch es nicht mehr für die Aktivierung von Effektor-Zellen zur Verfügung steht) oder durch Granzym-

induzierte Zytolyse vermittelt (Shevach, 2009; Sakaguchi *et al.*, 2010; Jin *et al.*, 2011). Welche dieser Mechanismen bei der persistierenden ZNS-Infektion mit MV eine Rolle spielen, muss noch untersucht werden. Eine Studie an Patienten hat gezeigt, dass nach MV-Infektion die Konzentration von IL-10 im Blutplasma ansteigt sowie dass der Anteil $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ regulatorischer T-Zellen innerhalb der PBMC-Population erhöht ist (Yu *et al.*, 2008). Es wurde gezeigt, dass eine niedrige Expression von CD127 auf der Zelloberfläche humaner $CD4^+$ T_{reg} mit einer hohen intrazellulären Expression von Foxp3 einhergeht (Liu *et al.*, 2006), d.h. die T_{reg} -Population, die bei der Studie von Yu *et al.* untersucht wurde, exprimiert mit hoher Wahrscheinlichkeit den für T_{reg} typischen Transkriptionsfaktor Foxp3. Eine erst im letzten Jahr veröffentlichte Arbeit zeigt, dass humane $CD4^+CD25^+CD127^{dim}Foxp3^+$ T_{reg} *in vitro* neurotoxisch wirken. Diese Zellen exprimierten hohe Level an GranzymB und IFN- γ und zeigten keinerlei suppressive Aktivitäten. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Rolle humaner $Foxp3^+$ T_{reg} noch intensiv untersucht werden muss (Haile *et al.*, 2011). Die Blockade des Rezeptors für IL-10 führte in einem Mausmodell einer i.p. Infektion mit WT-MV dazu, dass die Kontakt-Überempfindlichkeitsreaktion genauso stark verlief wie in uninfizierten Mäusen, d.h. IL-10 spielt eine entscheidende Rolle bei der MV-vermittelten Immunsuppression (Koga *et al.*, 2010).

Ziel dieser Doktorarbeit war es, den Einfluss der Immunkompetenz auf den Verlauf der persistierenden ZNS-Infektion mit MV in unserem Mausmodell zu untersuchen. Diesbezüglich gibt es in der Literatur bisher noch keine vergleichbare Veröffentlichung. Wir entschieden uns, einerseits periphere $Foxp3^+$ T_{reg} mit Hilfe des superagonistischen anti-Maus CD28 monoklonalen Antikörpers (D665; (Hünig, 2007)) in C57BL/6 zu expandieren und andererseits diese Zellen mittels Injektion von Diphtherie-Toxin (DT) in DEREK-Mäusen (Lahl *et al.*, 2007) zu depletieren. Die Ergebnisse zeigen, dass eine vorübergehende Expansion $Foxp3^+$ T_{reg} nach als auch vor der akuten ZNS-Infektion zu einer im Vergleich zu Kontroll-Tieren stärker ausgeprägten persistierenden ZNS-Infektion führt (vgl. Abb. 25 und Abb. 26), wohingegen eine vorübergehende Depletion $Foxp3^+$ T_{reg} nach der akuten ZNS-Infektion in einer verringerten persistierenden ZNS-Infektion sowie in einem erhöhten Anteil Masernspezifischer CTLs im Gehirn resultierte (vgl. Abb. 29 und Abb. 30).

In der Literatur ist beschrieben, dass die Expansion von T_{reg} die virale Immunpathogenese, d.h. Gewebe- und Zellschäden, die aufgrund der antiviralen Immunantwort entstehen, einschränken (Iwashiro *et al.*, 2001; Dittmer *et al.*, 2004; Vahlenkamp *et al.*, 2004; Estes *et al.*, 2006; Krathwohl *et al.*, 2006; Anghelina *et al.*, 2009); jedoch wird dadurch in unserem Mausmodell der Umfang der persistierenden Infektion von MV drastisch gefördert (ca. 100fache Steigerung der persistierenden ZNS-Infektion; vgl. Abb. 25). Auch ein zum Zeitpunkt der Infektion bereits bestehender Zustand der Immunsuppression begünstigt nicht nur – wie bereits bekannt – Sekundärinfektionen mit anderen Erregern, sondern begünstigt auch die Infektion mit MV selbst (vgl. Abb. 26).

Im Gegensatz dazu verhindert die T_{reg} -Depletion bzw. Inhibierung der T_{reg} -Suppressor-Aktivität die Entstehung erschöpfter T-Zellen und verbessert die antivirale Immunantwort, indem Virus-spezifische T-Zellen re-aktiviert und die Viruslast reduziert werden. Dies wurde bereits u.a. am Beispiel des Herpes-Simplex-Virus, Influenza-A-Virus, Vakzinia-Virus, Hepatitis-B- und -C-Virus und Friend-Retrovirus gezeigt, indem die Tiere entweder mit anti-CD25- oder anti-GITR-Antikörpern behandelt wurden (Suvas *et al.*, 2003; Dittmer *et al.*, 2004; Boettler *et al.*, 2005; Haeryfar *et al.*, 2005; Stoop *et al.*, 2005; Myers *et al.*, 2009). Eine verbesserte antivirale Immunantwort aufgrund $Foxp3^+$ T_{reg} -Depletion mit Hilfe der DREG-Maus wurde bereits am Beispiel der Infektion mit dem Friend-Retrovirus, LCMV und dem respiratorischem Synzytialvirus demonstriert, die jeweils mit einem Anstieg Virus-spezifischer CTLs einher ging (Zelinskyy *et al.*, 2009b; Dietze *et al.*, 2011; Eberlein *et al.*, 2011; Loebbermann *et al.*, 2012). Der Vorteil der DREG-Maus gegenüber konventionellen T_{reg} -Depletions-Protokollen ist die selektive Depletion $Foxp3^+$ T_{reg} ohne $CD25^+$ aktivierte, konventionelle Effektor-T-Zellen zu beeinflussen (Onizuka *et al.*, 1999; Suttmüller *et al.*, 2001; Needham *et al.*, 2006). Die Idee, bestimmte Zellpopulationen *in vivo* mit Hilfe von DT zu depletieren, welches nicht toxisch für murine Zellen ist, wurde 2001 von Saito *et al.* am Beispiel von Leberzellen entwickelt (Saito *et al.*, 2001).

Eine negative Begleiterscheinung der T_{reg} -Depletion (mit Hilfe des konventionellen anti-CD25 monoklonalen Ak PC61) nach einer Kornea-Infektion mit dem Herpes-Simplex-Virus war jedoch der erhöhte Gewebeschaden in der Hornhaut verursacht durch $CD4^+$ Effektor-T-Zellen (Suvas *et al.*, 2004). In der Veröffentlichung von Anghelina *et al.* resultierte die T_{reg} -Depletion (ebenfalls mit Hilfe des konventionellen anti-CD25 monoklonalen Ak PC61) im Mausmodell einer Coronavirus-induzierten akuten Enzephalitis in einem signifikanten Gewichtsverlust aller Tiere sowie einer 50%igen Mortalität; die Eliminierung des Virus wurde dabei jedoch nicht beeinflusst. Die Autoren gaben außerdem an, dass die Enzephalitis z.T. aufgrund $CD4^+$ Effektor-T-Zellen verursacht wird (Anghelina *et al.*, 2009). Diese beschriebenen negativen Effekte hinsichtlich der Überlebensrate der Tiere und der Gewebeschäden wurden in unserem Mausmodell der persistierenden ZNS-Infektion nach T_{reg} -Depletion nicht beobachtet; dies ist vermutlich darauf zurück zu führen, dass MV nicht-zytolytisch eliminiert wird (Patterson *et al.*, 2002; Stubblefield Park *et al.*, 2011).

Ein sehr interessanter Aspekt ist die Möglichkeit durch T_{reg} -Depletion den Effekt einer anti-viralen Vakzinierung zu verstärken. Obwohl eine Vakzinierung gegen viele virale Infektionen schützt, wenn sie vor der Infektion mit dem entsprechenden Virus durchgeführt wird, so ist es bisher in den wenigsten Fällen möglich, eine bestehende persistierende Infektion im Nachhinein durch eine Vakzinierung zu eliminieren bzw. zu kontrollieren (Autran *et al.*, 2004). Die Gründe für dieses Phänomen, das ein und derselbe Impfstoff vor aber nicht nach einer Infektion vor der Krankheit schützt, sind noch unklar. Man vermutet aber, dass Vakzine immunsuppressive Komponenten des

Immunsystems nicht beeinflussen und dadurch verlieren auch Vakzin-induzierte Effektor-Zellen über kurz oder lang ihre anti-viralen Eigenschaften. Blockiert man jedoch die immunsuppressiven Komponenten, könnte man diesen Effekt evtl. teilweise aufheben. So wurden in einem Mausmodell einer LCMV-Infektion die Tiere in einem Zeitraum von ca. 3 bis 5 Wochen nach Infektion mit einem anti-IL10R-Ak behandelt sowie gegen LCMV immunisiert. Diese kombinierte Behandlung führte nicht nur dazu, dass der Anteil LCMV-spezifischer CTLs anstieg, sondern auch, dass der Virustiter im Serum und in der Leber stärker reduziert wurde, als nach Einzelbehandlung (Brooks *et al.*, 2008). In der Arbeit von Toka *et al.* wurde ebenfalls nicht nur gezeigt, dass eine Kombination aus T_{reg}-Depletion (anti-CD25 mAk PC61) und Immunisierung (4 Tage später) die primäre und sekundäre HSV-spezifische CTL-Antwort steigert, sondern dass diese Behandlung bei einer nachfolgenden Infektion auch in einem geringeren Virustiter resultierte (Toka *et al.*, 2004). In einer weiteren Arbeit wurde gezeigt, dass der Anteil HBV-spezifischer CD8⁺ T-Zellen ca. um das 2fache steigt, wenn die DNA-Vakzinierung gegen HBV mit einer T_{reg}-Depletion (anti-CD25 mAk PC61; Injektion 3 Tage vor der Immunisierung) kombiniert wird (Furuichi *et al.*, 2005). In der vorliegenden Doktorarbeit wurde daraufhin versucht, die persistierende ZNS-Infektion mit MV durch eine Kombinationstherapie aus MV^{Edm}-Immunisierung und anschließender T_{reg}-Depletion in DEREK-Mäusen stärker zu reduzieren (vgl. Abb. 31), als nach alleiniger T_{reg}-Depletion (vgl. Abb. 29B). Vorläufige Ergebnisse zeigen jedoch, dass die zusätzliche Immunisierung in unserem Fall keinen vorteilhaften Effekt auf den Verlauf der persistierenden ZNS-Infektion hatte. In weiteren Untersuchungen müsste getestet werden, ob durch die Kombinationstherapie mehr Masern-spezifische CTLs generiert werden, als nach alleiniger T_{reg}-Depletion und ob diese dann auch vermehrt in das Gehirn einwandern. Ein weiterer Punkt, der berücksichtigt werden muss, ist, dass bei unseren Experimenten die T_{reg}-Depletion erst 3 Tage nach der Immunisierung gestartet wurde – evtl. könnten die vorliegenden Ergebnisse verbessert werden, wenn die T_{reg}-Depletion wie bei den anderen genannten Veröffentlichungen vor der Immunisierung durchgeführt wird.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Verlauf der persistierenden ZNS-Infektion mit MV in unserem Mausmodell durch Manipulation der T_{reg} in der Peripherie reguliert werden kann.

5.4 Therapieansätze gegen die persistierende ZNS-Infektion mit MV

Neben der im vorangegangenen Kapitel angesprochenen Möglichkeit, die persistierende ZNS-Infektion mit MV durch T_{reg}-Depletion zu verringern, wurden in unserer Arbeitsgruppe bereits andere Methoden untersucht, um eine MV-Infektion *in vitro* zu reduzieren, welche in weiterführenden Arbeiten auch im Mausmodell therapeutisch getestet und weiterentwickelt werden könnten. Hierzu gehört zum einen die siRNA-vermittelte Reduktion der MV-Infektion. Die Doktorarbeit von Thorsten Reuter hat bereits gezeigt, dass eine allgemeine Herunterregulierung der viralen Genexpression aufgrund von siRNAs erreicht wurde, die gegen das N-, P- und L-Protein von MV gerichtet sind. Das Ausmaß der MV-induzierten Zell-Zell-Fusion wurde durch siRNAs gegen das H- und F-Protein reduziert. Interessanterweise erhöhte eine gegen das M-Protein gerichtete siRNA jedoch nicht nur die Zell-Zell-Fusion sondern auch den Anteil viraler mRNAs und genomischer MV-RNA; ein Mechanismus, der wahrscheinlich dazu beiträgt, dass das Masernvirus sich in SSPE-Patienten so effektiv ausbreiten kann, wo das M-Protein vielen Mutationen unterlegen ist und somit nur sehr unzureichend transkribiert und translatiert wird (Reuter *et al.*, 2006). Im Gegensatz zur Arbeit von Thorsten Reuter, in der die „siRNA-Behandlung“ vor der MV-Infektion erfolgte, untersuchte Michael Zinke den Effekt von siRNAs in persistent infizierten Zellen. Auch in diesem Fall wurde die MV-Infektion durch siRNA gegen das M-Protein nicht reduziert, jedoch war es möglich, persistent infizierte Zellen jeweils mit Hilfe einer siRNA gegen das N-, P- und L-Protein zu „heilen“ (Zinke *et al.*, 2009). Diese Methode ist hinsichtlich der therapeutischen Anwendung gegen eine persistierende ZNS-Infektion somit recht vielversprechend. In der Tat gibt es bereits erste auf RNAi basierende Therapieansätze gegen andere virale Infektionen, wie z.B. HIV, Hepatitis B und C, Influenza A, das respiratorische Synzytialvirus und das Dengue-Virus, die sich entweder kurz vor oder schon in der präklinischen Testphase befinden (Caplen, 2003; Lopez-Fraga *et al.*, 2008; Chen and Zhaori, 2011). Einige Ansätze wurden auch schon zum Patent angemeldet (Saravolac *et al.*, 2010). Bei der therapeutischen Anwendung von siRNA muss darauf geachtet werden, dass die siRNA entsprechend „verpackt“ und somit geschützt wird, bevor man sie dem Patienten verabreicht, damit die siRNA z.B. im Blut nicht vorzeitig durch Nukleasen abgebaut wird. Außerdem muss sicher gestellt werden, dass z.B. im Fall der persistierenden ZNS-Infektion mit MV die siRNA in das Gehirn gelangen kann (Überwindung der Blut-Hirn-Schranke) und dass sie dort bevorzugt in MV-infizierte Zellen eingeschleust wird.

Eine zweite Möglichkeit, die Ausbreitung von MV *in vitro* einzuschränken, ist die Zugabe kleiner Moleküle, die entweder den Eintritt des Virus in die Zelle (Plemper *et al.*, 2004; Plemper *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2006; Singethan *et al.*, 2010) oder die virale Polymerase hemmen (Sun *et al.*, 2007; White *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2008). Um eine persistierende ZNS-Infektion zu therapieren, sind vor allem die Substanzen interessant, die die virale Polymerase hemmen und somit die Ausbreitung viraler RNPs

verhindern. Damit diese Substanzen therapeutisch auch genutzt werden können, müssen analog zur Therapie mit siRNA Strategien entwickelt werden, die es ermöglichen, die Substanzen so zu „verpacken“, dass sie einerseits die Blut-Hirn-Schranke passieren können und andererseits idealerweise nur die infizierten Zellen „behandeln“. Es gibt zwar noch keine effektive Behandlungsmöglichkeit für SSPE, aber die derzeitig eingesetzten Medikamente Ribavirin, Inosiplex und IFN- α sind bisher am besten geeignet, den Krankheitsverlauf zu verzögern (Weissbrich *et al.*, 2003). Untersuchungen *in vivo* haben gezeigt, dass Ribavirin nicht die Blut-Hirn-Schranke überwinden kann und somit direkt intrakranial appliziert werden müsste, um effektiv gegen eine ZNS-Infektion mit MV wirken zu können (Honda *et al.*, 1994; Ishii *et al.*, 1996). Die einfachere und weniger invasive Methode wäre jedoch eine intraperitoneale oder intravenöse Injektion des Medikamentes. Jeulin *et al.* haben Ribavirin mit α -Cyclodextrin komplexiert und erreichten *in vivo* bei einem Mausmodell einer i.c. Infektion mit MV gegenüber Mock-behandelten Kontroll-Tieren eine Senkung der Mortalität von 100% auf 40% sowie eine signifikante Senkung der Viruslast (Jeulin *et al.*, 2008). Da in diesem Fall die Behandlung mit Ribavirin direkt nach der i.c. Infektion gestartet wurde und da die Viruslast im Gehirn nicht über 6dpi hinaus untersucht wurde, müssen weitere Untersuchungen hinsichtlich eines therapeutischen Effektes dieses Medikamentes während der persistierenden ZNS-Infektion unternommen werden.

Eine weit verbreitete Behandlungsmethode gegen akute Masern ist Vitamin A (D'Souza and D'Souza, 2002; Huiming *et al.*, 2005). Eine Studie hat gezeigt, dass der Serumspiegel von Vitamin A bei SSPE-Patienten z.T. vergleichsweise niedrig ist (Gungor *et al.*, 2007), weshalb man vermutet, dass bei SSPE-Patienten eine Ergänzung der Interferon-Behandlung mit Vitamin A von Vorteil wäre.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in der näheren Zukunft siRNA und kleine Moleküle die aussichtsreichsten Kandidaten für eine erfolgreiche Therapie gegen eine persistierende ZNS-Infektion mit MV sein könnten.

6 Zusammenfassung

Zu den gefährlichen Komplikationen der Masern gehört die selten vorkommende ZNS-Erkrankung subakute sklerosierende Panenzephalitis (SSPE), die erst mehrere Jahre nach einer akuten Masernvirusinfektion auftritt. Die SSPE verläuft immer tödlich und bis heute gibt es keine spezifische Therapie gegen diese Erkrankung. Unsere Arbeitsgruppe hat ein Modell für eine persistierende, virale ZNS-Infektion entwickelt, in dem 2-Wochen-alte, immunologisch normale C57BL/6-Mäuse mit einem rekombinanten, neurotrophen Masernvirus (MV), das das Hämagglutinin eines an Nagern angepassten MV-Stammes enthält, intrazerebral (i.c.) infiziert werden. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde die Rolle regulatorischer $CD4^+$ $CD25^+$ $Foxp3^+$ T-Zellen (T_{reg}) in diesem Mausmodell analysiert und untersucht, ob die persistierende ZNS-Infektion durch Manipulation peripherer T_{reg} beeinflusst werden kann. Außerdem wurde ein $IFN-\gamma$ -ELISPOT-Assay etabliert, der $CD8^+$ zytotoxische T-Zellen (CTL) identifiziert, die spezifisch für die MV-Hämagglutinin-Epitope MV-H₂₂₋₃₀ (RIVINREHL) bzw. MV-H₄₄₆₋₄₅₄ (SNHNNVYWL) sind. In Bezug auf das erstgenannte Epitop wurde desweiteren eine Pentamer-Färbung etabliert, um CTLs mit Hilfe der Durchflusszytometrie zu identifizieren, die H-2D^b-gekoppelte MV-H₂₂₋₃₀-Epitope erkennen. Die Ergebnisse dieser Doktorarbeit zeigen, dass sich trotz eines hohen Anteils Masern-spezifischer CTLs und nur sehr wenigen T_{reg} im Gehirn eine persistierende ZNS-Infektion ausbildet. Periphere T_{reg} wurden während der persistierenden Phase der ZNS-Infektion expandiert bzw. depletiert und die Konsequenzen für die Virus-spezifische Immunantwort sowie das Ausmaß der persistierenden Infektion wurden analysiert. Die Expansion von T_{reg} mit Hilfe des superagonistischen anti-Maus $CD28$ Antikörpers D665 verursachte eine transiente Immunsuppression, die die Virus-Replikation sowie -Ausbreitung im Gehirn verstärkte. Im Gegensatz dazu führte die Depletion von T_{reg} in DEREK-Mäusen mittels Diphtherietoxin zu einem erhöhten Anteil Virus-spezifischer CTLs im Gehirn sowie zu einer Reduktion der persistierenden ZNS-Infektion. Diese Daten zeigen, dass T_{reg} die Fähigkeit besitzen, die Persistenz von MV im Gehirn zu kontrollieren und somit möglicherweise Teil eines Therapiekonzeptes gegen ZNS-Infektionen mit dem Masernvirus sein können. Frühere Studien unserer Arbeitsgruppe haben außerdem gezeigt, dass das durch $IFN-\gamma$ induzierbare Enzym Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) antivirale Aktivitäten gegen MV aufweist. Dies wurde in dieser Doktorarbeit *in vivo* in unserem Mausmodell anhand von IDO-K.o.-Tieren bestätigt, die nach i.c. Infektion nicht nur eine erhöhte Mortalitätsrate aufwiesen sondern auch in den überlebenden Tieren eine verstärkte persistierende ZNS-Infektion zeigten.

7 Summary

Among the serious complications following a measles virus infection is the CNS disease subacute sclerosing panencephalitis (SSPE), which occurs very late after acute measles and always leads to death within a few years. Unfortunately, there is no specific therapy available till today. Our group earlier established a model of a persistent viral CNS infection using two week old immunologically normal mice and a recombinant neurotropic MV expressing the hemagglutinin of the rodent brain-adapted MV strain CAM/RB. Using this model infection we investigated the role of regulatory CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T cells (T_{reg}) as regulators of the immune response in the brain, and assessed whether the persistent CNS infection can be modulated by manipulation of T_{reg} in the periphery. We also established an IFN- γ -ELISPOT assay to identify CD8⁺ cytotoxic T cells (CTLs) specific for the MV hemagglutinin epitopes MV-H₂₂₋₃₀ (RIVINREHL) and MV-H₄₄₆₋₄₅₄ (SNHNNVYWL). With respect to the first epitope (MV-H₂₂₋₃₀) we also established pentamer staining identifying CTLs recognising this epitope linked to H-2D^b molecules via FACS analyses. Our results show that in spite of a high number of MV-specific CTLs and only a few T_{reg} in the brain a persistent infection is established. T_{reg} were expanded or depleted during the persistent phase of the CNS infection, and the consequences for the virus-specific immune response and the extent of persistent infection were analyzed. Expansion of T_{reg} after intraperitoneal application of the superagonistic mouse anti-mouse CD28 monoclonal antibody D665 inducing transient immunosuppression caused increased virus replication and spread in the CNS. In contrast, depletion of T_{reg} using diphtheria toxin (DT) in DERE (depletion of regulatory T cells)-mice induced an increase of virus-specific CTLs in the brain and caused a reduction of the persistent infection. These data indicate that T_{reg} have the capacity to control MV persistence in the CNS which recommend them to be considered as a strategy to combat human MV CNS diseases. Previous studies in our group also showed an anti-MV activity of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), an IFN- γ inducible enzyme, which was confirmed in this work using IDO *knock-out* mice resulting in increased disease after intracerebral infection and enhanced persistent CNS infection in surviving animals compared to wild type mice.

8 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
aa	Aminosäure/-n (<i>amino acid</i>)
Abb.	Abbildung
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazole
Ak	Antikörper
APCs	Antigen-präsentierende Zellen (<i>antigen presenting cells</i>)
APME	akute postinfektiöse Masern-Enzephalitis (<i>acute post infectious measles encephalitis</i>)
ATV	<i>antibiotic trypsin versene</i>
BAC	<i>bacterial artificial chromosome</i>
BCA	Bicinchoninsäure
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CAMH	Hämagglutinin des CAM/RB-Stammes
CAM/RB	an Nagerhirn adaptierter neurovirulenter Virus-Stamm
CD	Differenzierungscluster (<i>cluster of differentiation</i>)
cl	Napf (<i>cluster</i>)
ConA	Concanavalin A
CSF	Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit (<i>cerebrospinal fluid</i>)
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten (<i>cytotoxic T lymphocyte</i>)
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
DCs	dendritische Zellen (<i>dendritic cells</i>)
DEREG	<i>depletion of regulatory T cell</i>
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dpi	Tage nach Infektion (<i>days post infection</i>)
DT	Diphtherietoxin
DTR	Diphtherietoxinrezeptor
Edm	Edmonston
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	verbessertes grün fluoreszierendes Protein (<i>enhanced green fluorescent protein</i>)

ELISA	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>)
ELISPOT	<i>enzyme linked immuno spot assay</i>
evtl.	eventuell
F	F-Protein des Masernvirus
FACS	<i>fluorescence activated cell scanning</i>
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
FL3-H	<i>Fluorescence3-Height</i>
Foxp3	<i>forkhead box P3</i>
FSC	<i>forward scatter</i>
g	g-Zahl
GFP	grün fluoreszierendes Protein (<i>green fluorescent protein</i>)
H	H-Protein des Masernvirus
HcRed	<i>Heteractis crispa red fluorescent protein</i>
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus (<i>human immunodeficiency virus</i>)
hpi	Stunden nach Infektion (<i>hours post infection</i>)
i.c.	intrazerebral (<i>intracerebral</i>)
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
i.n.	intranasal
i.p.	intraperitoneal
isoton.	isotonisch
k.o.	<i>knock-out</i>
L	L-Protein des Masernvirus
lat.	lateinisch
LCMV	Lymphozytäres-Choriomeningitis-Virus
M	M-Protein des Masernvirus
mAk	monoklonaler Antikörper
MEM	<i>minimum essential medium</i>
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
MIBE	Einschlusskörperchenenzephalitis (<i>measles inclusion body encephalitis</i>)
MOI	infektiöse Dosis (<i>multiplicity of infection</i>)
mRNA	<i>messenger RNA</i>

MV	Masernvirus
N	N-Protein des Masernvirus
n.s.	nicht signifikant
P	P-Protein des Masernvirus oder P-Wert (Statistik)
PBBS	<i>phosphate-buffered balanced salt solution</i>
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (<i>peripheral blood mononuclear cell</i>)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate-buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
PFA	Paraformaldehyd
pfu	<i>plaque forming unit</i>
pH	pH-Wert
P/S	Penicillin/Streptomycin
r	recombinant
RNA	Ribonukleinsäure
RNP	Ribonukleoprotein
R-PE	R-Phycoerythrin
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur oder Reverse Transkription
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SLAM	<i>signaling lymphocyte activation molecule</i>
SSC	<i>side scatter</i>
SSPE	subakute sklerosierende Panenzephalitis (<i>subacute sclerosing panencephalitis</i>)
Stk.	Stück
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Temp.	Temperatur
TNF	Tumornekrosefaktor
T _{reg}	regulatorische T-Zelle
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Umdrehung oder Unit
u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
UV	Ultraviolett

UZ	Ultrazentrifuge/Ultrazentrifugation
v	Volumen (<i>volume</i>)
Verd.	Verdünnung
Vergr.	Vergrößerung
vgl.	vergleiche
w	Gewicht (<i>weight</i>)
wpi	Wochen nach Infektion (<i>weeks post infection</i>)
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
ZLK	zervikale Lymphknoten (Halslymphknoten)
ZNS	Zentralnervensystem
z.T.	zum Teil

Maßeinheiten und SI-Präfixe entsprechen dem Internationalen Einheitensystem (französisch: *Système international d'unités, SI*).

Summenformeln wurden nach den Richtlinien der IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) bezeichnet.

9 Literaturverzeichnis

(2009). Measles vaccines: WHO position paper. *Wkly Epidemiol Rec* 84, 349-360.

Adams, O., Besken, K., Oberdorfer, C., MacKenzie, C.R., Takikawa, O., and Daubener, W. (2004). Role of indoleamine-2,3-dioxygenase in alpha/beta and gamma interferon-mediated antiviral effects against herpes simplex virus infections. *J Virol* 78, 2632-2636.

Adkins, B., Ghanei, A., and Hamilton, K. (1994). Up-regulation of murine neonatal T helper cell responses by accessory cell factors. *J Immunol* 153, 3378-3385.

Aicardi, J., Goutieres, F., Arsenio-Nunes, M.L., and Lebon, P. (1977). Acute measles encephalitis in children with immunosuppression. *Pediatrics* 59, 232-239.

Alberati-Giani, D., Ricciardi-Castagnoli, P., Kohler, C., and Cesura, A.M. (1996). Regulation of the kynurenine metabolic pathway by interferon-gamma in murine cloned macrophages and microglial cells. *J Neurochem* 66, 996-1004.

Albrecht, P., Ennis, F.A., Saltzman, E.J., and Krugman, S. (1977). Persistence of maternal antibody in infants beyond 12 months: mechanism of measles vaccine failure. *J Pediatr* 91, 715-718.

Allen, I.V., McQuaid, S., McMahon, J., Kirk, J., and McConnell, R. (1996). The significance of measles virus antigen and genome distribution in the CNS in SSPE for mechanisms of viral spread and demyelination. *J Neuropathol Exp Neurol* 55, 471-480.

Altman, J.D., Moss, P.A., Goulder, P.J., Barouch, D.H., McHeyzer-Williams, M.G., Bell, J.I., McMichael, A.J., and Davis, M.M. (1996). Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* 274, 94-96.

Amanna, I.J., Carlson, N.E., and Slifka, M.K. (2007). Duration of humoral immunity to common viral and vaccine antigens. *N Engl J Med* 357, 1903-1915.

Andres, O., Obojes, K., Kim, K.S., ter Meulen, V., and Schneider-Schaulies, J. (2003). CD46- and CD150-independent endothelial cell infection with wild-type measles viruses. *J Gen Virol* 84, 1189-1197.

Anghelina, D., Zhao, J., Trandem, K., and Perlman, S. (2009). Role of regulatory T cells in coronavirus-induced acute encephalitis. *Virology* 385, 358-367.

Asensio, V.C., Kincaid, C., and Campbell, I.L. (1999). Chemokines and the inflammatory response to viral infection in the central nervous system with a focus on lymphocytic choriomeningitis virus. *J Neurovirol* 5, 65-75.

Autran, B., Carcelain, G., Combadiere, B., and Debre, P. (2004). Therapeutic vaccines for chronic infections. *Science* 305, 205-208.

Aversa, G., Chang, C.C., Carballido, J.M., Cocks, B.G., and de Vries, J.E. (1997). Engagement of the signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) on activated T cells results in IL-2-independent, cyclosporin A-sensitive T cell proliferation and IFN-gamma production. *J Immunol* 158, 4036-4044.

Ayata, M., Komase, K., Shingai, M., Matsunaga, I., Katayama, Y., and Ogura, H. (2002). Mutations affecting transcriptional termination in the p gene end of subacute sclerosing panencephalitis viruses. *J Virol* 76, 13062-13068.

Baczko, K., Liebert, U.G., Billeter, M., Cattaneo, R., Budka, H., and ter Meulen, V. (1986). Expression of defective measles virus genes in brain tissues of patients with subacute sclerosing panencephalitis. *J Virol* 59, 472-478.

Barber, D.L., Wherry, E.J., Masopust, D., Zhu, B., Allison, J.P., Sharpe, A.H., Freeman, G.J., and Ahmed, R. (2006). Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* 439, 682-687.

Barrett, P.N., Koschel, K., Carter, M., and ter Meulen, V. (1985). Effect of measles virus antibodies on a measles SSPE virus persistently infected C6 rat glioma cell line. *J Gen Virol* 66 (Pt 7), 1411-1421.

Bartz, R., Firsching, R., Rima, B., ter Meulen, V., and Schneider-Schaulies, J. (1998). Differential receptor usage by measles virus strains. *J Gen Virol* 79 (Pt 5), 1015-1025.

- Beauverger, P., Buckland, R., and Wild, F. (1994). Measles virus hemagglutinin induces an Ld-restricted CD8+ cytotoxic T lymphocyte response to two specific epitopes. *Virology* *200*, 281-283.
- Beauverger, P., Buckland, R., and Wild, T.F. (1993). Measles virus antigens induce both type-specific and canine distemper virus cross-reactive cytotoxic T lymphocytes in mice: localization of a common Ld-restricted nucleoprotein epitope. *J Gen Virol* *74 (Pt 11)*, 2357-2363.
- Beauverger, P., Cardoso, A.I., Daviet, L., Buckland, R., and Wild, T.F. (1996). Analysis of the contribution of CTL epitopes in the immunobiology of morbillivirus infection. *Virology* *219*, 133-139.
- Bech, V. (1959). Studies on the development of complement fixing antibodies in measles patients. Observations during a measles epidemic in Greenland. *J Immunol* *83*, 267-275.
- Belkaid, Y., Piccirillo, C.A., Mendez, S., Shevach, E.M., and Sacks, D.L. (2002). CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature* *420*, 502-507.
- Bellini, W.J., and Rota, P.A. (2011). Biological feasibility of measles eradication. *Virus Res* *162*, 72-79.
- Bercovici, N., Duffour, M.T., Agrawal, S., Salcedo, M., and Abastado, J.P. (2000). New methods for assessing T-cell responses. *Clin Diagn Lab Immunol* *7*, 859-864.
- Bieback, K., Lien, E., Klagge, I.M., Avota, E., Schneider-Schaulies, J., Duprex, W.P., Wagner, H., Kirschning, C.J., Ter Meulen, V., and Schneider-Schaulies, S. (2002). Hemagglutinin protein of wild-type measles virus activates toll-like receptor 2 signaling. *J Virol* *76*, 8729-8736.
- Binder, G.K., and Griffin, D.E. (2001). Interferon-gamma-mediated site-specific clearance of alphavirus from CNS neurons. *Science* *293*, 303-306.
- Black, F.L. (1966). Measles endemicity in insular populations: critical community size and its evolutionary implication. *J Theor Biol* *11*, 207-211.
- Bodaghi, B., Goureau, O., Zipeto, D., Laurent, L., Virelizier, J.L., and Michelson, S. (1999). Role of IFN-gamma-induced indoleamine 2,3 dioxygenase and inducible nitric oxide synthase in the replication of human cytomegalovirus in retinal pigment epithelial cells. *J Immunol* *162*, 957-964.
- Boettler, T., Spangenberg, H.C., Neumann-Haefelin, C., Panther, E., Urbani, S., Ferrari, C., Blum, H.E., von Weizsacker, F., and Thimme, R. (2005). T cells with a CD4+CD25+ regulatory phenotype suppress in vitro proliferation of virus-specific CD8+ T cells during chronic hepatitis C virus infection. *J Virol* *79*, 7860-7867.
- Borrow, P., and Oldstone, M.B. (1995). Measles virus-mono-nuclear cell interactions. *Curr Top Microbiol Immunol* *191*, 85-100.
- Bouche, F.B., Ertl, O.T., and Muller, C.P. (2002). Neutralizing B cell response in measles. *Viral Immunol* *15*, 451-471.
- Boulanger, L.M., and Shatz, C.J. (2004). Immune signalling in neural development, synaptic plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci* *5*, 521-531.
- Bouteille, M., Fontaine, C., Vedrenne, C.L., and Dalarue, J. (1965). Sur un cas de encéphalite suaigue à inclusions: étude anatomoclinique et ultrastructurale. *Rev Neurol (Paris)* *118*, 454-458.
- Breitfeld, V., Hashida, Y., Sherman, F.E., Odagiri, K., and Yunis, E.J. (1973). Fatal measles infection in children with leukemia. *Lab Invest* *28*, 279-291.
- Brooks, D.G., Lee, A.M., Elsaesser, H., McGavern, D.B., and Oldstone, M.B. (2008). IL-10 blockade facilitates DNA vaccine-induced T cell responses and enhances clearance of persistent virus infection. *J Exp Med* *205*, 533-541.
- Brooks, G.F., Butel, J.S., and Morse, S.A. (1998). Paramyxovirus and rubella virus. In Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology, J.P. Butler, J. Ransom, and E. Ryan, eds. (Stamford, Appleton & Lange), pp. 507-527.
- Buchholz, C.J., Koller, D., Devaux, P., Mumenthaler, C., Schneider-Schaulies, J., Braun, W., Gerlier, D., and Cattaneo, R. (1997). Mapping of the primary binding site of measles virus to its receptor CD46. *J Biol Chem* *272*, 22072-22079.

- Burnet, F.M. (1968). Measles as an index of immunological function. *Lancet* 2, 610-613.
- Calain, P., and Roux, L. (1993). The rule of six, a basic feature for efficient replication of Sendai virus defective interfering RNA. *J Virol* 67, 4822-4830.
- Caplen, N.J. (2003). RNAi as a gene therapy approach. *Expert Opin Biol Ther* 3, 575-586.
- Carballido, J.M., Aversa, G., Kaltoft, K., Cocks, B.G., Punnonen, J., Yssel, H., Thestrup-Pedersen, K., and de Vries, J.E. (1997). Reversal of human allergic T helper 2 responses by engagement of signaling lymphocytic activation molecule. *J Immunol* 159, 4316-4321.
- Cardoso, A.I., Beauverger, P., Gerlier, D., Wild, T.F., and Rabourdin-Combe, C. (1995). Formaldehyde inactivation of measles virus abolishes CD46-dependent presentation of nucleoprotein to murine class I-restricted CTLs but not to class II-restricted helper T cells. *Virology* 212, 255-258.
- Cardoso, A.I., Gerlier, D., Wild, T.F., and Rabourdin-Combe, C. (1996). The ectodomain of measles virus envelope glycoprotein does not gain access to the cytosol and MHC class I presentation pathway following virus-cell fusion. *J Gen Virol* 77 (Pt 11), 2695-2699.
- Carrithers, M.D., Visintin, I., Kang, S.J., and Janeway, C.A., Jr. (2000). Differential adhesion molecule requirements for immune surveillance and inflammatory recruitment. *Brain* 123 (Pt 6), 1092-1101.
- Carter, M.J., Willcocks, M.M., and ter Meulen, V. (1983). Defective translation of measles virus matrix protein in a subacute sclerosing panencephalitis cell line. *Nature* 305, 153-155.
- Casasnovas, J.M., Larvie, M., and Stehle, T. (1999). Crystal structure of two CD46 domains reveals an extended measles virus-binding surface. *Embo J* 18, 2911-2922.
- Castro, A.G., Hauser, T.M., Cocks, B.G., Abrams, J., Zurawski, S., Churakova, T., Zonin, F., Robinson, D., Tangye, S.G., Aversa, G., Nichols, K.E., de Vries, J.E., Lanier, L.L., and O'Garra, A. (1999). Molecular and functional characterization of mouse signaling lymphocytic activation molecule (SLAM): differential expression and responsiveness in Th1 and Th2 cells. *J Immunol* 163, 5860-5870.
- Cattaneo, R., Rebmann, G., Schmid, A., Bacsko, K., ter Meulen, V., and Billeter, M.A. (1987). Altered transcription of a defective measles virus genome derived from a diseased human brain. *Embo J* 6, 681-688.
- Cattaneo, R., Schmid, A., Eschle, D., Bacsko, K., ter Meulen, V., and Billeter, M.A. (1988). Biased hypermutation and other genetic changes in defective measles viruses in human brain infections. *Cell* 55, 255-265.
- Cattaneo, R., Schmid, A., Rebmann, G., Bacsko, K., Ter Meulen, V., Bellini, W.J., Rozenblatt, S., and Billeter, M.A. (1986). Accumulated measles virus mutations in a case of subacute sclerosing panencephalitis: interrupted matrix protein reading frame and transcription alteration. *Virology* 154, 97-107.
- Chakraborty, S., Nazmi, A., Dutta, K., and Basu, A. (2010). Neurons under viral attack: victims or warriors? *Neurochem Int* 56, 727-735.
- Chen, S.H., and Zhaori, G. (2011). Potential clinical applications of siRNA technique: benefits and limitations. *Eur J Clin Invest* 41, 221-232.
- Cherry, J.D. (2004). *Textbook of pediatric infectious diseases*, 5. edn (Philadelphia, WB. Saunders).
- Christensen, J.E., de Lemos, C., Moos, T., Christensen, J.P., and Thomsen, A.R. (2006). CXCL10 is the key ligand for CXCR3 on CD8+ effector T cells involved in immune surveillance of the lymphocytic choriomeningitis virus-infected central nervous system. *J Immunol* 176, 4235-4243.
- Christensen, P.E., Schmidt, H., Bang, H.O., Andersen, V., Jordal, B., and Jensen, O. (1953). An epidemic of measles in southern Greenland, 1951; measles in virgin soil. II. The epidemic proper. *Acta Med Scand* 144, 430-449.
- Cocks, B.G., Chang, C.C., Carballido, J.M., Yssel, H., de Vries, J.E., and Aversa, G. (1995). A novel receptor involved in T-cell activation. *Nature* 376, 260-263.

- Connolly, J.H., Allen, I.V., Hurwitz, L.J., and Millar, J.H. (1967). Measles-virus antibody and antigen in subacute sclerosing panencephalitis. *Lancet* *1*, 542-544.
- Cutts, F.T., Henao-Restrepo, A., and Olive, J.M. (1999). Measles elimination: progress and challenges. *Vaccine* *17 Suppl 3*, S47-52.
- D'Souza, R.M., and D'Souza, R. (2002). Vitamin A for preventing secondary infections in children with measles--a systematic review. *J Trop Pediatr* *48*, 72-77.
- Dawson, J.R. (1933). Cellular Inclusions in Cerebral Lesions of Lethargic Encephalitis. *Am J Pathol* *9*, 7-16 13.
- Day, C.L., Kaufmann, D.E., Kiepiela, P., Brown, J.A., Moodley, E.S., Reddy, S., Mackey, E.W., Miller, J.D., Leslie, A.J., DePierres, C., Mncube, Z., Duraiswamy, J., Zhu, B., Eichbaum, Q., Altfeld, M., Wherry, E.J., Coovadia, H.M., Goulder, P.J., Klenerman, P., Ahmed, R., Freeman, G.J., and Walker, B.D. (2006). PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature* *443*, 350-354.
- de Swart, R.L., Ludlow, M., de Witte, L., Yanagi, Y., van Amerongen, G., McQuaid, S., Yuksel, S., Geijtenbeek, T.B., Duprex, W.P., and Osterhaus, A.D. (2007). Predominant infection of CD150+ lymphocytes and dendritic cells during measles virus infection of macaques. *PLoS Pathog* *3*, e178.
- de Vries, R.D., Yuksel, S., Osterhaus, A.D., and de Swart, R.L. (2010). Specific CD8(+) T-lymphocytes control dissemination of measles virus. *Eur J Immunol* *40*, 388-395.
- de Witte, L., Abt, M., Schneider-Schaulies, S., van Kooyk, Y., and Geijtenbeek, T.B. (2006). Measles virus targets DC-SIGN to enhance dendritic cell infection. *J Virol* *80*, 3477-3486.
- de Witte, L., de Vries, R.D., van der Vlist, M., Yuksel, S., Litjens, M., de Swart, R.L., and Geijtenbeek, T.B. (2008). DC-SIGN and CD150 have distinct roles in transmission of measles virus from dendritic cells to T-lymphocytes. *PLoS Pathog* *4*, e1000049.
- Derycke, M.S., Pambuccian, S.E., Gilks, C.B., Kalloger, S.E., Ghidouche, A., Lopez, M., Bliss, R.L., Geller, M.A., Argenta, P.A., Harrington, K.M., and Skubit, A.P. (2010). Nectin 4 overexpression in ovarian cancer tissues and serum: potential role as a serum biomarker. *Am J Clin Pathol* *134*, 835-845.
- Dhib-Jalbut, S., Xia, J., Rangaviggula, H., Fang, Y.Y., and Lee, T. (1999). Failure of measles virus to activate nuclear factor-kappa B in neuronal cells: implications on the immune response to viral infections in the central nervous system. *J Immunol* *162*, 4024-4029.
- Dietze, K.K., Zelinsky, G., Gibbert, K., Schimmer, S., Francois, S., Myers, L., Sparwasser, T., Hasenkrug, K.J., and Dittmer, U. (2011). Transient depletion of regulatory T cells in transgenic mice reactivates virus-specific CD8+ T cells and reduces chronic retroviral set points. *Proc Natl Acad Sci U S A* *108*, 2420-2425.
- Dittmar, S., Harms, H., Runkler, N., Maisner, A., Kim, K.S., and Schneider-Schaulies, J. (2008). Measles virus-induced block of transendothelial migration of T lymphocytes and infection-mediated virus spread across endothelial cell barriers. *J Virol* *82*, 11273-11282.
- Dittmer, U., He, H., Messer, R.J., Schimmer, S., Olbrich, A.R., Ohlen, C., Greenberg, P.D., Stromnes, I.M., Iwashiro, M., Sakaguchi, S., Evans, L.H., Peterson, K.E., Yang, G., and Hasenkrug, K.J. (2004). Functional impairment of CD8(+) T cells by regulatory T cells during persistent retroviral infection. *Immunity* *20*, 293-303.
- Dorig, R.E., Marcil, A., Chopra, A., and Richardson, C.D. (1993). The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain). *Cell* *75*, 295-305.
- Dunster, L.M., Schneider-Schaulies, J., Loffler, S., Lankes, W., Schwartz-Albiez, R., Lottspeich, F., and ter Meulen, V. (1994). Moesin: a cell membrane protein linked with susceptibility to measles virus infection. *Virology* *198*, 265-274.
- Duprex, W.P., Duffy, I., McQuaid, S., Hamill, L., Cosby, S.L., Billeter, M.A., Schneider-Schaulies, J., ter Meulen, V., and Rima, B.K. (1999a). The H gene of rodent brain-adapted measles virus confers neurovirulence to the Edmonston vaccine strain. *J Virol* *73*, 6916-6922.
- Duprex, W.P., McQuaid, S., Hangartner, L., Billeter, M.A., and Rima, B.K. (1999b). Observation of measles virus cell-to-cell spread in astrocytoma cells by using a green fluorescent protein-expressing recombinant virus. *J Virol* *73*, 9568-9575.

- DuRant, R.H., and Dyken, P.R. (1983). The effect of inosiplex on the survival of subacute sclerosing panencephalitis. *Neurology* 33, 1053-1055.
- DuRant, R.H., Dyken, P.R., and Swift, A.V. (1982). The influence of inosiplex treatment on the neurological disability of patients with subacute sclerosing panencephalitis. *J Pediatr* 101, 288-293.
- Dyken, P.R., Swift, A., and DuRant, R.H. (1982). Long-term follow-up of patients with subacute sclerosing panencephalitis treated with inosiplex. *Ann Neurol* 11, 359-364.
- Eastman, C.L., and Guilarte, T.R. (1990). The role of hydrogen peroxide in the in vitro cytotoxicity of 3-hydroxykynurenine. *Neurochem Res* 15, 1101-1107.
- Eberlein, J., Davenport, B., Nguyen, T.T., Victorino, F., Sparwasser, T., and Homann, D. (2011). Multiple layers of CD80/86-dependent costimulatory activity regulate primary, memory, and secondary lymphocytic choriomeningitis virus-specific T cell immunity. *J Virol* 86, 1955-1970.
- El Kasmi, K.C., Theisen, D., Brons, N.H., Ammerlaan, W., Klingele, M., Truong, A.T., and Muller, C.P. (1999). A hemagglutinin-derived peptide-vaccine ignored by virus-neutralizing passive antibodies, protects against murine measles encephalitis. *Vaccine* 17, 2436-2445.
- Enders, J.F., Katz, S.L., Milovanovic, M.V., and Holloway, A. (1960). Studies on an attenuated measles-virus vaccine. I. Development and preparations of the vaccine: technics for assay of effects of vaccination. *N Engl J Med* 263, 153-159.
- Enders, J.F., and Peebles, T.C. (1954). Propagation in tissue cultures of cytopathogenic agents from patients with measles. *Proc Soc Exp Biol Med* 86, 277-286.
- Eneroth, A., Andersson, T., Olsson, T., Orvell, C., Norrby, E., and Kristensson, K. (1992). Interferon-gamma-like immunoreactivity in sensory neurons may influence the replication of Sendai and mumps viruses. *J Neurosci Res* 31, 487-493.
- Eneroth, A., Kristensson, K., Ljungdahl, A., and Olsson, T. (1991). Interferon-gamma-like immunoreactivity in developing rat spinal ganglia neurons in vivo and in vitro. *J Neurocytol* 20, 225-231.
- Erlenhoefler, C., Wurzer, W.J., Loffler, S., Schneider-Schaulies, S., ter Meulen, V., and Schneider-Schaulies, J. (2001). CD150 (SLAM) is a receptor for measles virus but is not involved in viral contact-mediated proliferation inhibition. *J Virol* 75, 4499-4505.
- Esolen, L.M., Takahashi, K., Johnson, R.T., Vaisberg, A., Moench, T.R., Wesselingh, S.L., and Griffin, D.E. (1995). Brain endothelial cell infection in children with acute fatal measles. *J Clin Invest* 96, 2478-2481.
- Estes, J.D., Li, Q., Reynolds, M.R., Wietgreffe, S., Duan, L., Schacker, T., Picker, L.J., Watkins, D.I., Lifson, J.D., Reilly, C., Carlis, J., and Haase, A.T. (2006). Premature induction of an immunosuppressive regulatory T cell response during acute simian immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* 193, 703-712.
- Etchart, N., Desmoulins, P.O., Chemin, K., Maliszewski, C., Dubois, B., Wild, F., and Kaiserlian, D. (2001). Dendritic cells recruitment and in vivo priming of CD8+ CTL induced by a single topical or transepithelial immunization via the buccal mucosa with measles virus nucleoprotein. *J Immunol* 167, 384-391.
- Evlashv, A., Moyse, E., Valentin, H., Azocar, O., Trescol-Biemont, M.C., Marie, J.C., Rabourdin-Combe, C., and Horvat, B. (2000). Productive measles virus brain infection and apoptosis in CD46 transgenic mice. *J Virol* 74, 1373-1382.
- Fabre-Lafay, S., Garrido-Urbani, S., Reymond, N., Goncalves, A., Dubreuil, P., and Lopez, M. (2005). Nectin-4, a new serological breast cancer marker, is a substrate for tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (TACE)/ADAM-17. *J Biol Chem* 280, 19543-19550.
- Fang, Y.Y., Song, Z.M., and Dhib-Jalbut, S. (2001). Mechanism of measles virus failure to activate NF-kappaB in neuronal cells. *J Neurovirol* 7, 25-34.
- Ferreira, C.S., Frenzke, M., Leonard, V.H., Welstead, G.G., Richardson, C.D., and Cattaneo, R. (2010). Measles virus infection of alveolar macrophages and dendritic cells precedes spread to lymphatic organs in transgenic mice expressing human signaling lymphocytic activation molecule (SLAM, CD150). *J Virol* 84, 3033-3042.

- Finke, D., Brinckmann, U.G., ter Meulen, V., and Liebert, U.G. (1995). Gamma interferon is a major mediator of antiviral defense in experimental measles virus-induced encephalitis. *J Virol* *69*, 5469-5474.
- Finke, D., and Liebert, U.G. (1994). CD4+ T cells are essential in overcoming experimental murine measles encephalitis. *Immunology* *83*, 184-189.
- Firsching, R., Buchholz, C.J., Schneider, U., Cattaneo, R., ter Meulen, V., and Schneider-Schaulies, J. (1999). Measles virus spread by cell-cell contacts: uncoupling of contact-mediated receptor (CD46) downregulation from virus uptake. *J Virol* *73*, 5265-5273.
- Fontenot, J.D., Gavin, M.A., and Rudensky, A.Y. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* *4*, 330-336.
- Fournier, P., Ammerlaan, W., Ziegler, D., Giminez, C., Rabourdin-Combe, C., Fleckenstein, B.T., Wiesmuller, K.H., Jung, G., Schneider, F., and Muller, C.P. (1996). Differential activation of T cells by antibody-modulated processing of the flanking sequences of class II-restricted peptides. *Int Immunol* *8*, 1441-1451.
- Freeman, J.M., Magoffin, R.L., Lennette, E.H., and Herndon, R.M. (1967). Additional evidence of the relation between subacute inclusion-body encephalitis and measles virus. *Lancet* *2*, 129-131.
- Fujinami, R.S., and Oldstone, M.B. (1979). Antiviral antibody reacting on the plasma membrane alters measles virus expression inside the cell. *Nature* *279*, 529-530.
- Fujinami, R.S., and Oldstone, M.B. (1980). Alterations in expression of measles virus polypeptides by antibody: molecular events in antibody-induced antigenic modulation. *J Immunol* *125*, 78-85.
- Fukuyama, Y., Nihei, K., Matsumoto, S., Ebina, T., Kamoshita, S., Sato, T., Arima, M., Yabuuchi, H., Ueda, S., Ohtahara, S., and et al. (1987). Clinical effects of MND-19 (Inosiplex) on subacute sclerosing panencephalitis--a multi-institutional collaborative study--The Inosiplex-SSPE Research Committee. *Brain Dev* *9*, 270-282.
- Fulginiti, V.A., Eller, J.J., Downie, A.W., and Kempe, C.H. (1967). Altered reactivity to measles virus. Atypical measles in children previously immunized with inactivated measles virus vaccines. *Jama* *202*, 1075-1080.
- Furuichi, Y., Tokuyama, H., Ueha, S., Kurachi, M., Moriyasu, F., and Kakimi, K. (2005). Depletion of CD25+CD4+T cells (Tregs) enhances the HBV-specific CD8+ T cell response primed by DNA immunization. *World J Gastroenterol* *11*, 3772-3777.
- Gadoth, N., Kott, E., Levin, S., and Hahn, T. (1989). The interferon system in subacute sclerosing panencephalitis and its response to isoprinosine. *Brain Dev* *11*, 308-312.
- Gao, G.F., and Jakobsen, B.K. (2000). Molecular interactions of coreceptor CD8 and MHC class I: the molecular basis for functional coordination with the T-cell receptor. *Immunol Today* *21*, 630-636.
- Gascon, G., Yamani, S., Crowell, J., Stigsby, B., Nester, M., Kanaan, I., and Jallu, A. (1993). Combined oral isoprinosine-intraventricular alpha-interferon therapy for subacute sclerosing panencephalitis. *Brain Dev* *15*, 346-355.
- Gascon, G.G. (2003). Randomized treatment study of inosiplex versus combined inosiplex and intraventricular interferon-alpha in subacute sclerosing panencephalitis (SSPE): international multicenter study. *J Child Neurol* *18*, 819-827.
- Gershon, R.K., and Kondo, K. (1970). Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology* *18*, 723-737.
- Gershon, R.K., and Kondo, K. (1971). Infectious immunological tolerance. *Immunology* *21*, 903-914.
- Giraudon, P., Buckland, R., and Wild, T.F. (1992). The immune response to measles virus in mice. T-helper response to the nucleoprotein and mapping of the T-helper epitopes. *Virus Res* *22*, 41-54.
- Gogate, N., Swoveland, P., Yamabe, T., Verma, L., Woyciechowska, J., Tarnowska-Dziduszko, E., Dymecki, J., and Dhib-Jalbut, S. (1996). Major histocompatibility complex class I expression on neurons in subacute sclerosing panencephalitis and experimental subacute measles encephalitis. *J Neuropathol Exp Neurol* *55*, 435-443.
- Good, R.A., and Zak, S.J. (1956). Disturbances in gamma globulin synthesis as experiments of nature. *Pediatrics* *18*, 109-149.

- Gopas, J., Itzhaky, D., Segev, Y., Salzberg, S., Trink, B., Isakov, N., and Rager-Zisman, B. (1992). Persistent measles virus infection enhances major histocompatibility complex class I expression and immunogenicity of murine neuroblastoma cells. *Cancer Immunol Immunother* *34*, 313-320.
- Greenfield, J.G. (1950). Encephalitis and encephalomyelitis in England and Wales during the last decade. *Brain* *73*, 141-166.
- Griffin, D.E. (1976). Role of the immune response in age-dependent resistance of mice to encephalitis due to Sindbis virus. *J Infect Dis* *133*, 456-464.
- Griffin, D.E. (2003). Immune responses to RNA-virus infections of the CNS. *Nat Rev Immunol* *3*, 493-502.
- Griffin, D.E. (2010). Measles virus-induced suppression of immune responses. *Immunol Rev* *236*, 176-189.
- Griffin, D.E., Hemachudha, T., and Johnson, R.T. (1989a). Postinfectious and postvaccinal encephalomyelitis. In *Clinical and Molecular Aspects of Neurotropic Virus Infection*, D.H. Gilden, and H.L. Lipton, eds. (Boston, Kluwer Academic), pp. 501-527.
- Griffin, D.E., and Ward, B.J. (1993). Differential CD4 T cell activation in measles. *J Infect Dis* *168*, 275-281.
- Griffin, D.E., Ward, B.J., Jauregui, E., Johnson, R.T., and Vaisberg, A. (1989b). Immune activation in measles. *N Engl J Med* *320*, 1667-1672.
- Grunewald, T., Lampe, J., Weissbrich, B., and Reichmann, H. (1998). A 35-year-old bricklayer with hemimyoclonic jerks. *Lancet* *351*, 1926.
- Guidotti, L.G., Rochford, R., Chung, J., Shapiro, M., Purcell, R., and Chisari, F.V. (1999). Viral clearance without destruction of infected cells during acute HBV infection. *Science* *284*, 825-829.
- Guillemin, G.J., Smythe, G., Takikawa, O., and Brew, B.J. (2005). Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase and production of quinolinic acid by human microglia, astrocytes, and neurons. *Glia* *49*, 15-23.
- Gungor, S., Olmez, A., Pinar Arikan, F., Haliloglu, G., and Anlar, B. (2007). Serum retinol and beta-carotene levels in subacute sclerosing panencephalitis. *J Child Neurol* *22*, 341-343.
- Haeryfar, S.M., DiPaolo, R.J., Tscharke, D.C., Bennink, J.R., and Yewdell, J.W. (2005). Regulatory T cells suppress CD8+ T cell responses induced by direct priming and cross-priming and moderate immunodominance disparities. *J Immunol* *174*, 3344-3351.
- Haile, Y., Pasychniyk, D., Turner, D., Bleackley, R.C., and Giuliani, F. (2011). CD4+CD25+CD127dimFoxp3+ T cells are cytotoxic for human neurons. *J Leukoc Biol* *89*, 927-934.
- Harrowe, G., Sudduth-Klinger, J., and Payan, D.G. (1992). Measles virus-substance P receptor interaction: Jurkat lymphocytes transfected with substance P receptor cDNA enhance measles virus fusion and replication. *Cell Mol Neurobiol* *12*, 397-409.
- Herschke, F., Plumet, S., Duhon, T., Azocar, O., Druelle, J., Laine, D., Wild, T.F., Rabourdin-Combe, C., Gerlier, D., and Valentin, H. (2007). Cell-cell fusion induced by measles virus amplifies the type I interferon response. *J Virol* *81*, 12859-12871.
- Heyes, M.P., Achim, C.L., Wiley, C.A., Major, E.O., Saito, K., and Markey, S.P. (1996). Human microglia convert l-tryptophan into the neurotoxin quinolinic acid. *Biochem J* *320 (Pt 2)*, 595-597.
- Heyes, M.P., Chen, C.Y., Major, E.O., and Saito, K. (1997). Different kynurenine pathway enzymes limit quinolinic acid formation by various human cell types. *Biochem J* *326 (Pt 2)*, 351-356.
- Hickey, W.F., Hsu, B.L., and Kimura, H. (1991). T-lymphocyte entry into the central nervous system. *J Neurosci Res* *28*, 254-260.
- Hickey, W.F., and Kimura, H. (1988). Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen in vivo. *Science* *239*, 290-292.

- Hickey, W.F., Lassmann, H., and Cross, A.H. (1997). Lymphocyte entry and the initiation of inflammation in the central nervous system. In *Immunology of the nervous system*, R.W. Keane, and W.F. Hickey, eds. (New York, Oxford University Press), pp. 200-225.
- Hofman, F.M., Hinton, D.R., Baemayr, J., Weil, M., and Merrill, J.E. (1991). Lymphokines and immunoregulatory molecules in subacute sclerosing panencephalitis. *Clin Immunol Immunopathol* 58, 331-342.
- Honda, Y., Hosoya, M., Ishii, T., Shigeta, S., and Suzuki, H. (1994). Effect of ribavirin on subacute sclerosing panencephalitis virus infections in hamsters. *Antimicrob Agents Chemother* 38, 653-655.
- Hori, S., Nomura, T., and Sakaguchi, S. (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299, 1057-1061.
- Horta-Barbosa, L., Fuccillo, D.A., Sever, J.L., and Zeman, W. (1969). Subacute sclerosing panencephalitis: isolation of measles virus from a brain biopsy. *Nature* 221, 974.
- Hoshi, M., Saito, K., Hara, A., Taguchi, A., Ohtaki, H., Tanaka, R., Fujigaki, H., Osawa, Y., Takemura, M., Matsunami, H., Ito, H., and Seishima, M. (2010). The absence of IDO upregulates type I IFN production, resulting in suppression of viral replication in the retrovirus-infected mouse. *J Immunol* 185, 3305-3312.
- Hosoya, M., Shigeta, S., Nakamura, K., and De Clercq, E. (1989). Inhibitory effect of selected antiviral compounds on measles (SSPE) virus replication in vitro. *Antiviral Res* 12, 87-97.
- Hsu, E.C., Iorio, C., Sarangi, F., Khine, A.A., and Richardson, C.D. (2001). CDw150(SLAM) is a receptor for a lymphotropic strain of measles virus and may account for the immunosuppressive properties of this virus. *Virology* 279, 9-21.
- Hsu, E.C., Sarangi, F., Iorio, C., Sidhu, M.S., Udem, S.A., Dillehay, D.L., Xu, W., Rota, P.A., Bellini, W.J., and Richardson, C.D. (1998). A single amino acid change in the hemagglutinin protein of measles virus determines its ability to bind CD46 and reveals another receptor on marmoset B cells. *J Virol* 72, 2905-2916.
- Hünig, T. (2007). Manipulation of regulatory T-cell number and function with CD28-specific monoclonal antibodies. *Adv Immunol* 95, 111-148.
- Huh, G.S., Boulanger, L.M., Du, H., Riquelme, P.A., Brotz, T.M., and Shatz, C.J. (2000). Functional requirement for class I MHC in CNS development and plasticity. *Science* 290, 2155-2159.
- Huiming, Y., Chaomin, W., and Meng, M. (2005). Vitamin A for treating measles in children. *Cochrane Database Syst Rev*, CD001479.
- Huttenlocher, P.R., and Mattson, R.H. (1979). Isoprinosine in subacute sclerosing panencephalitis. *Neurology* 29, 763-771.
- Irani, D.N., and Griffin, D.E. (1996). Regulation of lymphocyte homing into the brain during viral encephalitis at various stages of infection. *J Immunol* 156, 3850-3857.
- Irwin, D.J., Wunner, W.H., Ertl, H.C., and Jackson, A.C. (1999). Basis of rabies virus neurovirulence in mice: expression of major histocompatibility complex class I and class II mRNAs. *J Neurovirol* 5, 485-494.
- Ishida, Y., Agata, Y., Shibahara, K., and Honjo, T. (1992). Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *Embo J* 11, 3887-3895.
- Ishii, T., Hirota, J., and Mombaerts, P. (2003). Combinatorial coexpression of neural and immune multigene families in mouse vomeronasal sensory neurons. *Curr Biol* 13, 394-400.
- Ishii, T., Hosoya, M., Mori, S., Shigeta, S., and Suzuki, H. (1996). Effective ribavirin concentration in hamster brains for antiviral chemotherapy for subacute sclerosing panencephalitis. *Antimicrob Agents Chemother* 40, 241-243.
- Ishizaki, Y., Yukaya, N., Kusuhara, K., Kira, R., Torisu, H., Ihara, K., Sakai, Y., Sanefuji, M., Pipo-Deveza, J.R., Silao, C.L., Sanchez, B.C., Lukban, M.B., Salonga, A.M., and Hara, T. (2010). PD1 as a common candidate susceptibility gene of subacute sclerosing panencephalitis. *Hum Genet* 127, 411-419.
- Iwashiro, M., Messer, R.J., Peterson, K.E., Stromnes, I.M., Sugie, T., and Hasenkrug, K.J. (2001). Immunosuppression by CD4+ regulatory T cells induced by chronic retroviral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 9226-9230.

- Jabbour, J.T., Garcia, J.H., Lemmi, H., Ragland, J., Duenas, D.A., and Sever, J.L. (1969). Subacute sclerosing panencephalitis. A multidisciplinary study of eight cases. *Jama* 207, 2248-2254.
- Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M., and Shlomchik, M. (2002). *Immunologie*, 5. edn (Berlin, Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg).
- Jeulin, H., Grancher, N., Kedzierewicz, F., Finance, C., Le Faou, A.E., and Venard, V. (2008). In vivo antiviral activity of ribavirin/alpha-cyclodextrin complex: evaluation on experimental measles virus encephalitis in mice. *Int J Pharm* 357, 148-153.
- Jin, H.T., Jeong, Y.H., Park, H.J., and Ha, S.J. (2011). Mechanism of T cell exhaustion in a chronic environment. *BMB Rep* 44, 217-231.
- Johnson, R.T., Griffin, D.E., Hirsch, R.L., Wolinsky, J.S., Roedenbeck, S., Lindo de Soriano, I., and Vaisberg, A. (1984). Measles encephalomyelitis—clinical and immunologic studies. *N Engl J Med* 310, 137-141.
- Joncas, J.H., Robillard, L.R., Boudreault, A., Leyritz, M., and McLaughlin, B.J. (1976). Letter: Interferon in serum and cerebrospinal fluid in subacute sclerosing panencephalitis. *Can Med Assoc J* 115, 309.
- Jones, C.E., Dyken, P.R., Huttenlocher, P.R., Jabbour, J.T., and Maxwell, K.W. (1982). Inosiplex therapy in subacute sclerosing panencephalitis. A multicentre, non-randomised study in 98 patients. *Lancet* 1, 1034-1037.
- Joseph, B.S., and Oldstone, M.B. (1974). Antibody-induced redistribution of measles virus antigens on the cell surface. *J Immunol* 113, 1205-1209.
- Katayama, Y., Hotta, H., Nishimura, A., Tatsuno, Y., and Homma, M. (1995). Detection of measles virus nucleoprotein mRNA in autopsied brain tissues. *J Gen Virol* 76 (Pt 12), 3201-3204.
- Katayama, Y., Kohso, K., Nishimura, A., Tatsuno, Y., Homma, M., and Hotta, H. (1998). Detection of measles virus mRNA from autopsied human tissues. *J Clin Microbiol* 36, 299-301.
- Katz, M. (1995). Clinical spectrum of measles. *Curr Top Microbiol Immunol* 191, 1-12.
- Keeling, M.J. (1997). Modelling the persistence of measles. *Trends Microbiol* 5, 513-518.
- Khattri, R., Cox, T., Yasayko, S.A., and Ramsdell, F. (2003). An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol* 4, 337-342.
- Kimura, T., and Griffin, D.E. (2000). The role of CD8(+) T cells and major histocompatibility complex class I expression in the central nervous system of mice infected with neurovirulent Sindbis virus. *J Virol* 74, 6117-6125.
- Kirk, J., Zhou, A.L., McQuaid, S., Cosby, S.L., and Allen, I.V. (1991). Cerebral endothelial cell infection by measles virus in subacute sclerosing panencephalitis: ultrastructural and in situ hybridization evidence. *Neuropathol Appl Neurobiol* 17, 289-297.
- Klein, R.S., Lin, E., Zhang, B., Luster, A.D., Tollett, J., Samuel, M.A., Engle, M., and Diamond, M.S. (2005). Neuronal CXCL10 directs CD8+ T-cell recruitment and control of West Nile virus encephalitis. *J Virol* 79, 11457-11466.
- Koga, R., Ohno, S., Ikegame, S., and Yanagi, Y. (2010). Measles virus-induced immunosuppression in SLAM knock-in mice. *J Virol* 84, 5360-5367.
- Komatsu, T., Srivastava, N., Revzin, M., Ireland, D.D., Chesler, D., and Reiss, C.S. (1999). Mechanisms of cytokine-mediated inhibition of viral replication. *Virology* 259, 334-341.
- Konig, R., Fleury, S., and Germain, R.N. (1996). The structural basis of CD4-MHC class II interactions: coreceptor contributions to T cell receptor antigen recognition and oligomerization-dependent signal transduction. *Curr Top Microbiol Immunol* 205, 19-46.
- Koplik, H. (1962). The diagnosis of the invasion of measles from a study of the exanthema as it appears on the buccal mucous membrane. *Arch Pediatr* 79, 162-165.

- Krathwohl, M.D., Schacker, T.W., and Anderson, J.L. (2006). Abnormal presence of semimature dendritic cells that induce regulatory T cells in HIV-infected subjects. *J Infect Dis* *193*, 494-504.
- Kuroki, S., Tsutsui, T., Yoshioka, M., Mizue, H., Kita, M., and Kishida, T. (1989). The effect of intraventricular interferon on subacute sclerosing panencephalitis. *Brain Dev* *11*, 65-69.
- Kwidzinski, E., and Bechmann, I. (2007). IDO expression in the brain: a double-edged sword. *J Mol Med (Berl)* *85*, 1351-1359.
- Lahl, K., Loddenkemper, C., Drouin, C., Freyer, J., Arnason, J., Eberl, G., Hamann, A., Wagner, H., Huehn, J., and Sparwasser, T. (2007). Selective depletion of Foxp3+ regulatory T cells induces a scurfy-like disease. *J Exp Med* *204*, 57-63.
- Lahl, K., and Sparwasser, T. (2011). In vivo depletion of FoxP3+ Tregs using the DEREK mouse model. *Methods Mol Biol* *707*, 157-172.
- Lampe, J.B., Schneider-Schaulies, S., and Aguzzi, A. (2003). Expression of the interferon-induced MxA protein in viral encephalitis. *Neuropathol Appl Neurobiol* *29*, 273-279.
- Lampson, L.A. (1995). Interpreting MHC class I expression and class I/class II reciprocity in the CNS: reconciling divergent findings. *Microsc Res Tech* *32*, 267-285.
- Lane, T.E., Liu, M.T., Chen, B.P., Asensio, V.C., Samawi, R.M., Paoletti, A.D., Campbell, I.L., Kunkel, S.L., Fox, H.S., and Buchmeier, M.J. (2000). A central role for CD4(+) T cells and RANTES in virus-induced central nervous system inflammation and demyelination. *J Virol* *74*, 1415-1424.
- Lawrence, D.M., Patterson, C.E., Gales, T.L., D'Orazio, J.L., Vaughn, M.M., and Rall, G.F. (2000). Measles virus spread between neurons requires cell contact but not CD46 expression, syncytium formation, or extracellular virus production. *J Virol* *74*, 1908-1918.
- Lawrence, D.M., Vaughn, M.M., Belman, A.R., Cole, J.S., and Rall, G.F. (1999). Immune response-mediated protection of adult but not neonatal mice from neuron-restricted measles virus infection and central nervous system disease. *J Virol* *73*, 1795-1801.
- Leithauser, F., Meinhardt-Krajina, T., Fink, K., Wotschke, B., Moller, P., and Reimann, J. (2006). Foxp3-expressing CD103+ regulatory T cells accumulate in dendritic cell aggregates of the colonic mucosa in murine transfer colitis. *Am J Pathol* *168*, 1898-1909.
- Lemon, K., de Vries, R.D., Mesman, A.W., McQuaid, S., van Amerongen, G., Yuksel, S., Ludlow, M., Rennick, L.J., Kuiken, T., Rima, B.K., Geijtenbeek, T.B., Osterhaus, A.D., Duprex, W.P., and de Swart, R.L. (2011). Early target cells of measles virus after aerosol infection of non-human primates. *PLoS Pathog* *7*, e1001263.
- Leonard, V.H., Hodge, G., Reyes-Del Valle, J., McChesney, M.B., and Cattaneo, R. (2010). Measles virus selectively blind to signaling lymphocytic activation molecule (SLAM; CD150) is attenuated and induces strong adaptive immune responses in rhesus monkeys. *J Virol* *84*, 3413-3420.
- Leonard, V.H., Sinn, P.L., Hodge, G., Miest, T., Devaux, P., Oezguen, N., Braun, W., McCray, P.B., Jr., McChesney, M.B., and Cattaneo, R. (2008). Measles virus blind to its epithelial cell receptor remains virulent in rhesus monkeys but cannot cross the airway epithelium and is not shed. *J Clin Invest* *118*, 2448-2458.
- Li, S., Gowans, E.J., Chougnet, C., Plebanski, M., and Dittmer, U. (2008). Natural regulatory T cells and persistent viral infection. *J Virol* *82*, 21-30.
- Liebert, U.G. (1997). Measles virus infections of the central nervous system. *Intervirology* *40*, 176-184.
- Liebert, U.G., Baczko, K., Budka, H., and ter Meulen, V. (1986). Restricted expression of measles virus proteins in brains from cases of subacute sclerosing panencephalitis. *J Gen Virol* *67 (Pt 11)*, 2435-2444.
- Liebert, U.G., and Finke, D. (1995). Measles virus infections in rodents. In *Measles virus*, M.A. Billeter, and V. ter Meulen, eds. (Berlin, Springer-Verlag), pp. 149-166.
- Liebert, U.G., Flanagan, S.G., Löffler, S., Baczko, K., ter Meulen, V., and Rima, B.K. (1994). Antigenic determinants of measles virus hemagglutinin associated with neurovirulence. *J Virol* *68*, 1486-1493.

- Liebert, U.G., and ter Meulen, V. (1987). Virological aspects of measles virus-induced encephalomyelitis in Lewis and BN rats. *J Gen Virol* 68 (Pt 6), 1715-1722.
- Lin, M.T., Stohlman, S.A., and Hinton, D.R. (1997). Mouse hepatitis virus is cleared from the central nervous systems of mice lacking perforin-mediated cytolysis. *J Virol* 71, 383-391.
- Liston, P., and Briedis, D.J. (1995). Ribosomal frameshifting during translation of measles virus P protein mRNA is capable of directing synthesis of a unique protein. *J Virol* 69, 6742-6750.
- Liu, M.T., Chen, B.P., Oertel, P., Buchmeier, M.J., Armstrong, D., Hamilton, T.A., and Lane, T.E. (2000). The T cell chemoattractant IFN-inducible protein 10 is essential in host defense against viral-induced neurologic disease. *J Immunol* 165, 2327-2330.
- Liu, M.T., Keirstead, H.S., and Lane, T.E. (2001). Neutralization of the chemokine CXCL10 reduces inflammatory cell invasion and demyelination and improves neurological function in a viral model of multiple sclerosis. *J Immunol* 167, 4091-4097.
- Liu, W., Putnam, A.L., Xu-Yu, Z., Szot, G.L., Lee, M.R., Zhu, S., Gottlieb, P.A., Kapranov, P., Gingeras, T.R., Fazekas de St Groth, B., Clayberger, C., Soper, D.M., Ziegler, S.F., and Bluestone, J.A. (2006). CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med* 203, 1701-1711.
- Loconto, J., Papes, F., Chang, E., Stowers, L., Jones, E.P., Takada, T., Kumanovics, A., Fischer Lindahl, K., and Dulac, C. (2003). Functional expression of murine V2R pheromone receptors involves selective association with the M10 and M1 families of MHC class Ib molecules. *Cell* 112, 607-618.
- Loebbermann, J., Thornton, H., Durant, L., Sparwasser, T., Webster, K.E., Sprent, J., Culley, F.J., Johansson, C., and Openshaw, P.J. (2012). Regulatory T cells expressing granzyme B play a critical role in controlling lung inflammation during acute viral infection. *Mucosal Immunol* 5, 161-172.
- Lopez-Fraga, M., Wright, N., and Jimenez, A. (2008). RNA interference-based therapeutics: new strategies to fight infectious disease. *Infect Disord Drug Targets* 8, 262-273.
- Lucas, J. (1790). An account of uncommon symptoms succeeding the measles; with additional remarks on the infection of measles and smallpox. *London Med J* 11, 325-331.
- Ludlow, M., Allen, I., and Schneider-Schaulies, J. (2009). Systemic spread of measles virus: Overcoming the epithelial and endothelial barriers. *Thromb Haemost* 102, 1050-1056.
- Ludlow, M., Duprex, W.P., Cosby, S.L., Allen, I.V., and McQuaid, S. (2008). Advantages of using recombinant measles viruses expressing a fluorescent reporter gene with vibratome slice technology in experimental measles neuropathogenesis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 34, 424-434.
- Maehlen, J., Olsson, T., Love, A., Klareskog, L., Norrby, E., and Kristensson, K. (1989). Persistence of measles virus in rat brain neurons is promoted by depletion of CD8+ T cells. *J Neuroimmunol* 21, 149-155.
- Maier, S., Geraghty, D.E., and Weiss, E.H. (1999). Expression and regulation of HLA-G in human glioma cell lines. *Transplant Proc* 31, 1849-1853.
- Maloy, K.J., and Powrie, F. (2001). Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat Immunol* 2, 816-822.
- Manchester, M., Eto, D.S., Valsamakis, A., Liton, P.B., Fernandez-Munoz, R., Rota, P.A., Bellini, W.J., Forthal, D.N., and Oldstone, M.B. (2000). Clinical isolates of measles virus use CD46 as a cellular receptor. *J Virol* 74, 3967-3974.
- Manchester, M., Liszewski, M.K., Atkinson, J.P., and Oldstone, M.B. (1994). Multiple isoforms of CD46 (membrane cofactor protein) serve as receptors for measles virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 2161-2165.
- Manchester, M., Valsamakis, A., Kaufman, R., Liszewski, M.K., Alvarez, J., Atkinson, J.P., Lublin, D.M., and Oldstone, M.B. (1995). Measles virus and C3 binding sites are distinct on membrane cofactor protein (CD46). *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 2303-2307.
- Markowitz, L.E., Chandler, F.W., Roldan, E.O., Saldana, M.J., Roach, K.C., Hutchins, S.S., Preblud, S.R., Mitchell, C.D., and Scott, G.B. (1988). Fatal measles pneumonia without rash in a child with AIDS. *J Infect Dis* 158, 480-483.

- Matullo, C.M., O'Regan, K.J., Curtis, M., and Rall, G.F. (2011). CNS recruitment of CD8+ T lymphocytes specific for a peripheral virus infection triggers neuropathogenesis during polymicrobial challenge. *PLoS Pathog* 7, e1002462.
- McGuirk, P., McCann, C., and Mills, K.H. (2002). Pathogen-specific T regulatory 1 cells induced in the respiratory tract by a bacterial molecule that stimulates interleukin 10 production by dendritic cells: a novel strategy for evasion of protective T helper type 1 responses by *Bordetella pertussis*. *J Exp Med* 195, 221-231.
- McHugh, R.S., and Shevach, E.M. (2002). Cutting edge: depletion of CD4+CD25+ regulatory T cells is necessary, but not sufficient, for induction of organ-specific autoimmune disease. *J Immunol* 168, 5979-5983.
- McNeill, W.H. (1976). *Plagues and Peoples*. Garden City, NY: Anchor Press/Doubleday.
- McQuaid, S., and Cosby, S.L. (2002). An immunohistochemical study of the distribution of the measles virus receptors, CD46 and SLAM, in normal human tissues and subacute sclerosing panencephalitis. *Lab Invest* 82, 403-409.
- McQuaid, S., Kirk, J., Zhou, A.L., and Allen, I.V. (1993). Measles virus infection of cells in perivascular infiltrates in the brain in subacute sclerosing panencephalitis: confirmation by non-radioactive in situ hybridization, immunocytochemistry and electron microscopy. *Acta Neuropathol* 85, 154-158.
- Mehta, P.D., Kulczycki, J., Mehta, S.P., Sobczyk, W., Coyle, P.K., Sersen, E.A., and Wisniewski, H.M. (1992). Increased levels of beta 2-microglobulin, soluble interleukin-2 receptor, and soluble CD8 in patients with subacute sclerosing panencephalitis. *Clin Immunol Immunopathol* 65, 53-59.
- Meissner, N.N., and Koschel, K. (1995). Downregulation of endothelin receptor mRNA synthesis in C6 rat astrocytoma cells by persistent measles virus and canine distemper virus infections. *J Virol* 69, 5191-5194.
- Mellor, A.L., Baban, B., Chandler, P., Marshall, B., Jhaver, K., Hansen, A., Koni, P.A., Iwashima, M., and Munn, D.H. (2003). Cutting edge: induced indoleamine 2,3 dioxygenase expression in dendritic cell subsets suppresses T cell clonal expansion. *J Immunol* 171, 1652-1655.
- Mellor, A.L., and Munn, D.H. (2004). IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol* 4, 762-774.
- Meyer, E., and Byers, R.K. (1952). Measles encephalitis; a follow up study of sixteen patients. *AMA Am J Dis Child* 84, 543-579.
- Mitchell, C.D., and Balfour, H.H., Jr. (1985). Measles control: so near and yet so far. *Prog Med Virol* 31, 1-42.
- Miyazaki, M., Nishimura, M., Toda, Y., Saijo, T., Mori, K., and Kuroda, Y. (2005). Long-term follow-up of a patient with subacute sclerosing panencephalitis successfully treated with intrathecal interferon alpha. *Brain Dev* 27, 301-303.
- Modrow, S., Falke, D., and Truyen, U. (2003). *Molekulare Virologie*, 2. edn (Berlin, Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg).
- Moeller-Ehrlich, K., Ludlow, M., Beschoner, R., Meyermann, R., Rima, B.K., Duprex, W.P., Niewiesk, S., and Schneider-Schaulies, J. (2007). Two functionally linked amino acids in the stem 2 region of measles virus haemagglutinin determine infectivity and virulence in the rodent central nervous system. *J Gen Virol* 88, 3112-3120.
- Moeller, K., Duffy, I., Duprex, P., Rima, B., Beschoner, R., Fauser, S., Meyermann, R., Niewiesk, S., ter Meulen, V., and Schneider-Schaulies, J. (2001). Recombinant measles viruses expressing altered hemagglutinin (H) genes: functional separation of mutations determining H antibody escape from neurovirulence. *J Virol* 75, 7612-7620.
- Moench, T.R., and Johnson, R.T. (1989). Measles. In *Clinical and Molecular Aspects of Neurotropic Virus Infection*, D.H. Gilden, and H.L. Lipton, eds. (Boston, Kluwer Academic), pp. 201-229.
- Moll, M., Pfeuffer, J., Klenk, H.D., Niewiesk, S., and Maisner, A. (2004). Polarized glycoprotein targeting affects the spread of measles virus in vitro and in vivo. *J Gen Virol* 85, 1019-1027.
- Mongkolsapaya, J., Jaye, A., Callan, M.F., Magnusen, A.F., McMichael, A.J., and Whittle, H.C. (1999). Antigen-specific expansion of cytotoxic T lymphocytes in acute measles virus infection. *J Virol* 73, 67-71.
- Moss, W.J., and Griffin, D.E. (2006). Global measles elimination. *Nat Rev Microbiol* 4, 900-908.

- Moss, W.J., Ryon, J.J., Monze, M., and Griffin, D.E. (2002). Differential regulation of interleukin (IL)-4, IL-5, and IL-10 during measles in Zambian children. *J Infect Dis* 186, 879-887.
- Mott, K.R., Bresee, C.J., Allen, S.J., BenMohamed, L., Wechsler, S.L., and Ghiasi, H. (2009). Level of herpes simplex virus type 1 latency correlates with severity of corneal scarring and exhaustion of CD8+ T cells in trigeminal ganglia of latently infected mice. *J Virol* 83, 2246-2254.
- Mrkic, B., Pavlovic, J., Rulicke, T., Volpe, P., Buchholz, C.J., Hourcade, D., Atkinson, J.P., Aguzzi, A., and Cattaneo, R. (1998). Measles virus spread and pathogenesis in genetically modified mice. *J Virol* 72, 7420-7427.
- Mühlebach, M.D., Mateo, M., Sinn, P.L., Pruffer, S., Uhlig, K.M., Leonard, V.H., Navaratnarajah, C.K., Frenzke, M., Wong, X.X., Sawatsky, B., Ramachandran, S., McCray, P.B., Cichutek, K., von Messling, V., Lopez, M., and Cattaneo, R. (2011). Adherens junction protein nectin-4 is the epithelial receptor for measles virus. *Nature* 480, 530-533.
- Mustafa, M.M., Weitman, S.D., Winick, N.J., Bellini, W.J., Timmons, C.F., and Siegel, J.D. (1993). Subacute measles encephalitis in the young immunocompromised host: report of two cases diagnosed by polymerase chain reaction and treated with ribavirin and review of the literature. *Clin Infect Dis* 16, 654-660.
- Myers, L., Messer, R.J., Carmody, A.B., and Hasenkrug, K.J. (2009). Tissue-specific abundance of regulatory T cells correlates with CD8+ T cell dysfunction and chronic retrovirus loads. *J Immunol* 183, 1636-1643.
- Nader, P.R., Horwitz, M.S., and Rousseau, J. (1968). Atypical exanthem following exposure to natural measles: Eleven cases in children previously inoculated with killed vaccine. *J Pediatr* 72, 22-28.
- Nagano, I., Nakamura, S., Yoshioka, M., and Kogure, K. (1991). Immunocytochemical analysis of the cellular infiltrate in brain lesions in subacute sclerosing panencephalitis. *Neurology* 41, 1639-1642.
- Nagano, I., Nakamura, S., Yoshioka, M., Onodera, J., Kogure, K., and Itoyama, Y. (1994). Expression of cytokines in brain lesions in subacute sclerosing panencephalitis. *Neurology* 44, 710-715.
- Naglich, J.G., Metherall, J.E., Russell, D.W., and Eidels, L. (1992). Expression cloning of a diphtheria toxin receptor: identity with a heparin-binding EGF-like growth factor precursor. *Cell* 69, 1051-1061.
- Nakayama, T., Mori, T., Yamaguchi, S., Sonoda, S., Asamura, S., Yamashita, R., Takeuchi, Y., and Urano, T. (1995). Detection of measles virus genome directly from clinical samples by reverse transcriptase-polymerase chain reaction and genetic variability. *Virus Res* 35, 1-16.
- Nakayama, T., Urano, T., Osano, M., Maehara, N., Sasaki, K., and Makino, S. (1988). Long-term regulation of interferon production by lymphocytes from children inoculated with live measles virus vaccine. *J Infect Dis* 158, 1386-1390.
- Naniche, D., Garenne, M., Rae, C., Manchester, M., Buchta, R., Brodine, S.K., and Oldstone, M.B. (2004). Decrease in measles virus-specific CD4 T cell memory in vaccinated subjects. *J Infect Dis* 190, 1387-1395.
- Naniche, D., Varior-Krishnan, G., Cervoni, F., Wild, T.F., Rossi, B., Roubourdin-Combe, C., and Gerlier, D. (1993a). Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus. *J Virol* 67, 6025-6032.
- Naniche, D., Wild, T.F., Roubourdin-Combe, C., and Gerlier, D. (1992). A monoclonal antibody recognizes a human cell surface glycoprotein involved in measles virus binding. *J Gen Virol* 73 (Pt 10), 2617-2624.
- Naniche, D., Wild, T.F., Roubourdin-Combe, C., and Gerlier, D. (1993b). Measles virus haemagglutinin induces down-regulation of gp57/67, a molecule involved in virus binding. *J Gen Virol* 74 (Pt 6), 1073-1079.
- Naniche, D., Yeh, A., Eto, D., Manchester, M., Friedman, R.M., and Oldstone, M.B. (2000). Evasion of host defenses by measles virus: wild-type measles virus infection interferes with induction of Alpha/Beta interferon production. *J Virol* 74, 7478-7484.
- Needham, D.J., Lee, J.X., and Beilharz, M.W. (2006). Intra-tumoural regulatory T cells: a potential new target in cancer immunotherapy. *Biochem Biophys Res Commun* 343, 684-691.
- Neighbour, P.A., Rager-Zisman, B., and Bloom, B.R. (1978). Susceptibility of mice to acute and persistent measles infection. *Infect Immun* 21, 764-770.

- Neumann, H., Cavalie, A., Jenne, D.E., and Wekerle, H. (1995). Induction of MHC class I genes in neurons. *Science* 269, 549-552.
- Neumann, H., Schmidt, H., Cavalie, A., Jenne, D., and Wekerle, H. (1997a). Major histocompatibility complex (MHC) class I gene expression in single neurons of the central nervous system: differential regulation by interferon (IFN)-gamma and tumor necrosis factor (TNF)-alpha. *J Exp Med* 185, 305-316.
- Neumann, H., Schmidt, H., Wilharm, E., Behrens, L., and Wekerle, H. (1997b). Interferon gamma gene expression in sensory neurons: evidence for autocrine gene regulation. *J Exp Med* 186, 2023-2031.
- Neumeister, C., Nanan, R., Cornu, T., Luder, C., ter Meulen, V., Naim, H., and Niewiesk, S. (2001). Measles virus and canine distemper virus target proteins into a TAP-independent MHC class I-restricted antigen-processing pathway. *J Gen Virol* 82, 441-447.
- Neumeister, C., and Niewiesk, S. (1998). Recognition of measles virus-infected cells by CD8+ T cells depends on the H-2 molecule. *J Gen Virol* 79 (Pt 11), 2583-2591.
- Norrby, E., and Gollmar, Y. (1972). Appearance and persistence of antibodies against different virus components after regular measles infections. *Infect Immun* 6, 240-247.
- Norrby, E., Orvell, C., Vandvik, B., and Cherry, J.D. (1981). Antibodies against measles virus polypeptides in different disease conditions. *Infect Immun* 34, 718-724.
- Noyce, R.S., Bondre, D.G., Ha, M.N., Lin, L.T., Sisson, G., Tsao, M.S., and Richardson, C.D. (2011). Tumor cell marker PVRL4 (nectin 4) is an epithelial cell receptor for measles virus. *PLoS Pathog* 7, e1002240.
- Obojes, K., Andres, O., Kim, K.S., Daubener, W., and Schneider-Schaulies, J. (2005). Indoleamine 2,3-dioxygenase mediates cell type-specific anti-measles virus activity of gamma interferon. *J Virol* 79, 7768-7776.
- Ogata, A., Czub, S., Ogata, S., Cosby, S.L., McQuaid, S., Budka, H., ter Meulen, V., and Schneider-Schaulies, J. (1997). Absence of measles virus receptor (CD46) in lesions of subacute sclerosing panencephalitis brains. *Acta Neuropathol* 94, 444-449.
- Ogata, S., Ogata, A., Schneider-Schaulies, S., and Schneider-Schaulies, J. (2004). Expression of the interferon-alpha/beta-inducible MxA protein in brain lesions of subacute sclerosing panencephalitis. *J Neurol Sci* 223, 113-119.
- Oglesbee, M., and Niewiesk, S. (2011). Measles virus neurovirulence and host immunity. *Future Virol* 6, 85-99.
- Ogura, H., Ayata, M., Hayashi, K., Seto, T., Matsuoka, O., Hattori, H., Tanaka, K., Tanaka, K., Takano, Y., and Murata, R. (1997). Efficient isolation of subacute sclerosing panencephalitis virus from patient brains by reference to magnetic resonance and computed tomographic images. *J Neurovirol* 3, 304-309.
- Ohgimoto, S., Ohgimoto, K., Niewiesk, S., Klagge, I.M., Pfeuffer, J., Johnston, I.C., Schneider-Schaulies, J., Weidmann, A., ter Meulen, V., and Schneider-Schaulies, S. (2001). The haemagglutinin protein is an important determinant of measles virus tropism for dendritic cells in vitro. *J Gen Virol* 82, 1835-1844.
- Ohno, S., Seki, F., Ono, N., and Yanagi, Y. (2003). Histidine at position 61 and its adjacent amino acid residues are critical for the ability of SLAM (CD150) to act as a cellular receptor for measles virus. *J Gen Virol* 84, 2381-2388.
- Okada, H., Sato, T.A., Katayama, A., Higuchi, K., Shichijo, K., Tsuchiya, T., Takayama, N., Takeuchi, Y., Abe, T., Okabe, N., and Tashiro, M. (2001). Comparative analysis of host responses related to immunosuppression between measles patients and vaccine recipients with live attenuated measles vaccines. *Arch Virol* 146, 859-874.
- Okuda, S., Nishiyama, N., Saito, H., and Katsuki, H. (1996). Hydrogen peroxide-mediated neuronal cell death induced by an endogenous neurotoxin, 3-hydroxykynurenine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 12553-12558.
- Oldstone, M.B.A. (2009). Modeling Subacute Sclerosing Panencephalitis in a Transgenic Mouse System: Uncoding Pathogenesis of Disease and Illuminating Components of Immune Control. In *Measles - Pathogenesis and Control*, D.E. Griffin, and M.B.A. Oldstone, eds. (Berlin, Springer-Verlag), pp. 31-54.
- Onizuka, S., Tawara, I., Shimizu, J., Sakaguchi, S., Fujita, T., and Nakayama, E. (1999). Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody. *Cancer Res* 59, 3128-3133.

- Ono, N., Tatsuo, H., Hidaka, Y., Aoki, T., Minagawa, H., and Yanagi, Y. (2001). Measles viruses on throat swabs from measles patients use signaling lymphocytic activation molecule (CDw150) but not CD46 as a cellular receptor. *J Virol* *75*, 4399-4401.
- Otaki, M., Sada, K., Kadoya, H., Nagano-Fujii, M., and Hotta, H. (2006). Inhibition of measles virus and subacute sclerosing panencephalitis virus by RNA interference. *Antiviral Res* *70*, 105-111.
- Ovsyannikova, I.G., Reid, K.C., Jacobson, R.M., Oberg, A.L., Klee, G.G., and Poland, G.A. (2003). Cytokine production patterns and antibody response to measles vaccine. *Vaccine* *21*, 3946-3953.
- Palma, J.P., and Kim, B.S. (2004). The scope and activation mechanisms of chemokine gene expression in primary astrocytes following infection with Theiler's virus. *J Neuroimmunol* *149*, 121-129.
- Pan, C.H., Valsamakis, A., Colella, T., Nair, N., Adams, R.J., Polack, F.P., Greer, C.E., Perri, S., Polo, J.M., and Griffin, D.E. (2005). Modulation of disease, T cell responses, and measles virus clearance in monkeys vaccinated with H-encoding alphavirus replicon particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 11581-11588.
- Panitch, H.S., Gomez-Plascencia, J., Norris, F.H., Cantell, K., and Smith, R.A. (1986). Subacute sclerosing panencephalitis: remission after treatment with intraventricular interferon. *Neurology* *36*, 562-566.
- Pappenheimer, A.M., Jr., Harper, A.A., Moynihan, M., and Brockes, J.P. (1982). Diphtheria toxin and related proteins: effect of route of injection on toxicity and the determination of cytotoxicity for various cultured cells. *J Infect Dis* *145*, 94-102.
- Parra, B., Hinton, D.R., Marten, N.W., Bergmann, C.C., Lin, M.T., Yang, C.S., and Stohlman, S.A. (1999). IFN-gamma is required for viral clearance from central nervous system oligodendroglia. *J Immunol* *162*, 1641-1647.
- Partidos, C.D., and Steward, M.W. (1990). Prediction and identification of a T cell epitope in the fusion protein of measles virus immunodominant in mice and humans. *J Gen Virol* *71* (Pt 9), 2099-2105.
- Partidos, C.D., Vohra, P., Jones, D., Farrar, G., and Steward, M.W. (1997). CTL responses induced by a single immunization with peptide encapsulated in biodegradable microparticles. *J Immunol Methods* *206*, 143-151.
- Patterson, C.E., Daley, J.K., Echols, L.A., Lane, T.E., and Rall, G.F. (2003). Measles virus infection induces chemokine synthesis by neurons. *J Immunol* *171*, 3102-3109.
- Patterson, C.E., Lawrence, D.M., Echols, L.A., and Rall, G.F. (2002). Immune-mediated protection from measles virus-induced central nervous system disease is noncytolytic and gamma interferon dependent. *J Virol* *76*, 4497-4506.
- Payne, F.E., Baublis, J.V., and Itabashi, H.H. (1969). Isolation of measles virus from cell cultures of brain from a patient with subacute sclerosing panencephalitis. *N Engl J Med* *281*, 585-589.
- Peng, G., Li, S., Wu, W., Tan, X., Chen, Y., and Chen, Z. (2008). PD-1 upregulation is associated with HBV-specific T cell dysfunction in chronic hepatitis B patients. *Mol Immunol* *45*, 963-970.
- Permar, S.R., Klumpp, S.A., Mansfield, K.G., Kim, W.K., Gorgone, D.A., Lifton, M.A., Williams, K.C., Schmitz, J.E., Reimann, K.A., Axthelm, M.K., Polack, F.P., Griffin, D.E., and Letvin, N.L. (2003). Role of CD8(+) lymphocytes in control and clearance of measles virus infection of rhesus monkeys. *J Virol* *77*, 4396-4400.
- Permar, S.R., Moss, W.J., Ryon, J.J., Monze, M., Cutts, F., Quinn, T.C., and Griffin, D.E. (2001). Prolonged measles virus shedding in human immunodeficiency virus-infected children, detected by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Infect Dis* *183*, 532-538.
- Pette, H., and Döring, G. (1939). Über einheimische Panencephalomyelitis vom Charakter der Encephalitis japonica. *Dtsch Z Nervenheilkd* *149*, 7-44.
- Plempner, R.K., Doyle, J., Sun, A., Prussia, A., Cheng, L.T., Rota, P.A., Liotta, D.C., Snyder, J.P., and Compans, R.W. (2005). Design of a small-molecule entry inhibitor with activity against primary measles virus strains. *Antimicrob Agents Chemother* *49*, 3755-3761.
- Plempner, R.K., Erlandson, K.J., Lakdawala, A.S., Sun, A., Prussia, A., Boonsombat, J., Aki-Sener, E., Yalcin, I., Yildiz, I., Temiz-Arpaci, O., Tekiner, B., Liotta, D.C., Snyder, J.P., and Compans, R.W. (2004). A target site for template-based design of measles virus entry inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 5628-5633.

- Polacino, P.S., Pinchuk, L.M., Sidorenko, S.P., and Clark, E.A. (1996). Immunodeficiency virus cDNA synthesis in resting T lymphocytes is regulated by T cell activation signals and dendritic cells. *J Med Primatol* 25, 201-209.
- Polack, F.P., Auwaerter, P.G., Lee, S.H., Nousari, H.C., Valsamakis, A., Leiferman, K.M., Diwan, A., Adams, R.J., and Griffin, D.E. (1999). Production of atypical measles in rhesus macaques: evidence for disease mediated by immune complex formation and eosinophils in the presence of fusion-inhibiting antibody. *Nat Med* 5, 629-634.
- Pope, J.G., Vanderlugt, C.L., Rahbe, S.M., Lipton, H.L., and Miller, S.D. (1998). Characterization of and functional antigen presentation by central nervous system mononuclear cells from mice infected with Theiler's murine encephalomyelitis virus. *J Virol* 72, 7762-7771.
- Potula, R., Poluektova, L., Knipe, B., Chrastil, J., Heilman, D., Dou, H., Takikawa, O., Munn, D.H., Gendelman, H.E., and Persidsky, Y. (2005). Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) enhances elimination of virus-infected macrophages in an animal model of HIV-1 encephalitis. *Blood* 106, 2382-2390.
- Punnonen, J., Cocks, B.G., Carballido, J.M., Bennett, B., Peterson, D., Aversa, G., and de Vries, J.E. (1997). Soluble and membrane-bound forms of signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) induce proliferation and Ig synthesis by activated human B lymphocytes. *J Exp Med* 185, 993-1004.
- Racaniello, V. (2011). Virology. An exit strategy for measles virus. *Science* 334, 1650-1651.
- Radecke, F., and Billeter, M.A. (1995). Measles virus antigenome and protein consensus sequences. In *Measles Virus*, M.A. Billeter, and V. ter Meulen, eds. (New York, Springer-Verlag), pp. 181-192.
- Radecke, F., Spielhofer, P., Schneider, H., Kaelin, K., Huber, M., Dotsch, C., Christiansen, G., and Billeter, M.A. (1995). Rescue of measles viruses from cloned DNA. *Embo J* 14, 5773-5784.
- Rall, G.F. (2003). Measles virus 1998-2002: progress and controversy. *Annu Rev Microbiol* 57, 343-367.
- Rall, G.F., Mucke, L., and Oldstone, M.B. (1995). Consequences of cytotoxic T lymphocyte interaction with major histocompatibility complex class I-expressing neurons in vivo. *J Exp Med* 182, 1201-1212.
- Rall, G.F., and Oldstone, M.B. (1995). Virus-neuron-cytotoxic T lymphocyte interactions. *Curr Top Microbiol Immunol* 202, 261-273.
- Ransohoff, R.M., Kivisakk, P., and Kidd, G. (2003). Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nat Rev Immunol* 3, 569-581.
- Ravanel, K., Castelle, C., Defrance, T., Wild, T.F., Charron, D., Lotteau, V., and Rabourdin-Combe, C. (1997). Measles virus nucleocapsid protein binds to FcγRII and inhibits human B cell antibody production. *J Exp Med* 186, 269-278.
- Redwine, J.M., Buchmeier, M.J., and Evans, C.F. (2001). In vivo expression of major histocompatibility complex molecules on oligodendrocytes and neurons during viral infection. *Am J Pathol* 159, 1219-1224.
- Reuter, D., and Schneider-Schaulies, J. (2010). Measles virus infection of the CNS: human disease, animal models, and approaches to therapy. *Med Microbiol Immunol* 199, 261-271.
- Reuter, T., Weissbrich, B., Schneider-Schaulies, S., and Schneider-Schaulies, J. (2006). RNA interference with measles virus N, P, and L mRNAs efficiently prevents and with matrix protein mRNA enhances viral transcription. *J Virol* 80, 5951-5957.
- Reymond, N., Fabre, S., Lecocq, E., Adelaide, J., Dubreuil, P., and Lopez, M. (2001). Nectin4/PRR4, a new afadin-associated member of the nectin family that trans-interacts with nectin1/PRR1 through V domain interaction. *J Biol Chem* 276, 43205-43215.
- Riddell, M.A., Moss, W.J., Hauer, D., Monze, M., and Griffin, D.E. (2007). Slow clearance of measles virus RNA after acute infection. *J Clin Virol* 39, 312-317.
- Rima, B.K., and Duprex, W.P. (2011). New concepts in measles virus replication: getting in and out in vivo and modulating the host cell environment. *Virus Res* 162, 47-62.
- Rima, B.K., Earle, J.A.P., Bacsko, K., and Rota, P.A. (1995). Measles virus strains variations. In *Measles virus*, M.A. Billeter, and V. ter Meulen, eds. (Berlin, Springer-Verlag), pp. 65-84.

- Rivailler, P., Trescol-Biemont, M.C., Gimenez, C., Rabourdin-Combe, C., and Horvat, B. (1998). Enhanced MHC class II-restricted presentation of measles virus (MV) hemagglutinin in transgenic mice expressing human MV receptor CD46. *Eur J Immunol* *28*, 1301-1314.
- Roos, R.P., Graves, M.C., Wollmann, R.L., Chilcote, R.R., and Nixon, J. (1981). Immunologic and virologic studies of measles inclusion body encephalitis in an immunosuppressed host: the relationship to subacute sclerosing panencephalitis. *Neurology* *31*, 1263-1270.
- Rouse, B.T., Sarangi, P.P., and Suvas, S. (2006). Regulatory T cells in virus infections. *Immunol Rev* *212*, 272-286.
- Roy, E.J., Takikawa, O., Kranz, D.M., Brown, A.R., and Thomas, D.L. (2005). Neuronal localization of indoleamine 2,3-dioxygenase in mice. *Neurosci Lett* *387*, 95-99.
- Ryon, J.J., Moss, W.J., Monze, M., and Griffin, D.E. (2002). Functional and phenotypic changes in circulating lymphocytes from hospitalized zambian children with measles. *Clin Diagn Lab Immunol* *9*, 994-1003.
- Saito, M., Iwawaki, T., Taya, C., Yonekawa, H., Noda, M., Inui, Y., Mekada, E., Kimata, Y., Tsuru, A., and Kohno, K. (2001). Diphtheria toxin receptor-mediated conditional and targeted cell ablation in transgenic mice. *Nat Biotechnol* *19*, 746-750.
- Sakaguchi, S. (2004). Naturally arising CD4⁺ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* *22*, 531-562.
- Sakaguchi, S. (2005). Naturally arising Foxp3-expressing CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* *6*, 345-352.
- Sakaguchi, S., Miyara, M., Costantino, C.M., and Hafler, D.A. (2010). FOXP3⁺ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol* *10*, 490-500.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., and Toda, M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* *155*, 1151-1164.
- Sandford-Smith, J.H., and Whittle, H.C. (1979). Corneal ulceration following measles in Nigerian children. *Br J Ophthalmol* *63*, 720-724.
- Saravolac, E.G., Wong, J.P., and Cairns, M.J. (2010). Recent patents in antiviral siRNAs. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov* *5*, 44-57.
- Sato, H., Honma, R., Yoneda, M., Miura, R., Tsukiyama-Kohara, K., Ikeda, F., Seki, T., Watanabe, S., and Kai, C. (2008a). Measles virus induces cell-type specific changes in gene expression. *Virology* *375*, 321-330.
- Sato, H., Kobune, F., Ami, Y., Yoneda, M., and Kai, C. (2008b). Immune responses against measles virus in cynomolgus monkeys. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* *31*, 25-35.
- Schadeck, E.B., Partidos, C.D., Fooks, A.R., Obeid, O.E., Wilkinson, G.W., Stephenson, J.R., and Steward, M.W. (1999). CTL epitopes identified with a defective recombinant adenovirus expressing measles virus nucleoprotein and evaluation of their protective capacity in mice. *Virus Res* *65*, 75-86.
- Schneider-Schaulies, J., Niewiesk, S., Schneider-Schaulies, S., and ter Meulen, V. (1999a). Measles virus in the CNS: the role of viral and host factors for the establishment and maintenance of a persistent infection. *J Neurovirol* *5*, 613-622.
- Schneider-Schaulies, J., Schnorr, J.J., Brinckmann, U., Dunster, L.M., Bacsko, K., Liebert, U.G., Schneider-Schaulies, S., and ter Meulen, V. (1995). Receptor usage and differential downregulation of CD46 by measles virus wild-type and vaccine strains. *Proc Natl Acad Sci U S A* *92*, 3943-3947.
- Schneider-Schaulies, J., ter Meulen, V., and Schneider-Schaulies, S. (2001). Measles virus interactions with cellular receptors: consequences for viral pathogenesis. *J Neurovirol* *7*, 391-399.
- Schneider-Schaulies, S., Liebert, U.G., Segev, Y., Rager-Zisman, B., Wolfson, M., and ter Meulen, V. (1992). Antibody-dependent transcriptional regulation of measles virus in persistently infected neural cells. *J Virol* *66*, 5534-5541.

- Schneider-Schaulies, S., Niewiesk, S., and ter Meulen, V. (1999b). Measles Virus. In *Molecular anatomy of viral persistence*, R. Ahmed, and I. Chen, eds. (Sussex, Wiley), pp. 297-318.
- Schneider-Schaulies, S., Schneider-Schaulies, J., Schuster, A., Bayer, M., Pavlovic, J., and ter Meulen, V. (1994). Cell type-specific MxA-mediated inhibition of measles virus transcription in human brain cells. *J Virol* *68*, 6910-6917.
- Schnorr, J.J., Schneider-Schaulies, S., Simon-Jodicke, A., Pavlovic, J., Horisberger, M.A., and ter Meulen, V. (1993). MxA-dependent inhibition of measles virus glycoprotein synthesis in a stably transfected human monocytic cell line. *J Virol* *67*, 4760-4768.
- Schroder, K., Hertzog, P.J., Ravasi, T., and Hume, D.A. (2004). Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* *75*, 163-189.
- Schubert, S., Moller-Ehrlich, K., Singethan, K., Wiese, S., Duprex, W.P., Rima, B.K., Niewiesk, S., and Schneider-Schaulies, J. (2006). A mouse model of persistent brain infection with recombinant Measles virus. *J Gen Virol* *87*, 2011-2019.
- Schwarcz, R., Whetsell, W.O., Jr., and Mangano, R.M. (1983). Quinolinic acid: an endogenous metabolite that produces axon-sparing lesions in rat brain. *Science* *219*, 316-318.
- Sedgwick, J.D., Ford, A.L., Foulcher, E., and Airriess, R. (1998). Central nervous system microglial cell activation and proliferation follows direct interaction with tissue-infiltrating T cell blasts. *J Immunol* *160*, 5320-5330.
- Sellin, C.I., Davoust, N., Guillaume, V., Baas, D., Belin, M.F., Buckland, R., Wild, T.F., and Horvat, B. (2006). High pathogenicity of wild-type measles virus infection in CD150 (SLAM) transgenic mice. *J Virol* *80*, 6420-6429.
- Sellin, C.I., Jegou, J.F., Renneson, J., Druelle, J., Wild, T.F., Marie, J.C., and Horvat, B. (2009). Interplay between virus-specific effector response and Foxp3 regulatory T cells in measles virus immunopathogenesis. *PLoS One* *4*, e4948.
- Shacklett, B.L., Cox, C.A., Wilkens, D.T., Karl Karlsson, R., Nilsson, A., Nixon, D.F., and Price, R.W. (2004). Increased adhesion molecule and chemokine receptor expression on CD8+ T cells trafficking to cerebrospinal fluid in HIV-1 infection. *J Infect Dis* *189*, 2202-2212.
- Shevach, E.M. (2009). Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity* *30*, 636-645.
- Shirato, K., Kimura, T., Mizutani, T., Kariwa, H., and Takashima, I. (2004). Different chemokine expression in lethal and non-lethal murine West Nile virus infection. *J Med Virol* *74*, 507-513.
- Shrestha, B., Wang, T., Samuel, M.A., Whitby, K., Craft, J., Fikrig, E., and Diamond, M.S. (2006). Gamma interferon plays a crucial early antiviral role in protection against West Nile virus infection. *J Virol* *80*, 5338-5348.
- Singethan, K., Hiltensperger, G., Kendl, S., Wohlfahrt, J., Plattet, P., Holzgrabe, U., and Schneider-Schaulies, J. (2010). N-(3-Cyanophenyl)-2-phenylacetamide, an effective inhibitor of morbillivirus-induced membrane fusion with low cytotoxicity. *J Gen Virol* *91*, 2762-2772.
- Solomon, T., Hart, C.A., Vinjamuri, S., Beeching, N.J., Malucci, C., and Humphrey, P. (2002). Treatment of subacute sclerosing panencephalitis with interferon-alpha, ribavirin, and inosiplex. *J Child Neurol* *17*, 703-705.
- Stephenson, J.R., and ter Meulen, V. (1979). Antigenic relationships between measles and canine distemper viruses: comparison of immune response in animals and humans to individual virus-specific polypeptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* *76*, 6601-6605.
- Stohlman, S.A., Bergmann, C.C., Lin, M.T., Cua, D.J., and Hinton, D.R. (1998). CTL effector function within the central nervous system requires CD4+ T cells. *J Immunol* *160*, 2896-2904.
- Stoop, J.N., van der Molen, R.G., Baan, C.C., van der Laan, L.J., Kuipers, E.J., Kusters, J.G., and Janssen, H.L. (2005). Regulatory T cells contribute to the impaired immune response in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* *41*, 771-778.
- Stryer, L., Berg, J.M., and Tymoczko, J.L. (2003). *Biochemie*, 5. edn (Berlin, Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg).

- Stubblefield Park, S.R., Widness, M., Levine, A.D., and Patterson, C.E. (2011). T cell-, interleukin-12-, and gamma interferon-driven viral clearance in measles virus-infected brain tissue. *J Virol* *85*, 3664-3676.
- Suga, S., Yoshikawa, T., Asano, Y., Nakashima, T., Kobayashi, I., and Yazaki, T. (1992). Activation of human herpesvirus-6 in children with acute measles. *J Med Virol* *38*, 278-282.
- Sun, A., Chandrakumar, N., Yoon, J.J., Plemper, R.K., and Snyder, J.P. (2007). Non-nucleoside inhibitors of the measles virus RNA-dependent RNA polymerase complex activity: Synthesis and in vitro evaluation. *Bioorg Med Chem Lett* *17*, 5199-5203.
- Sun, A., Prussia, A., Zhan, W., Murray, E.E., Doyle, J., Cheng, L.T., Yoon, J.J., Radchenko, E.V., Palyulin, V.A., Compans, R.W., Liotta, D.C., Plemper, R.K., and Snyder, J.P. (2006). Nonpeptide inhibitors of measles virus entry. *J Med Chem* *49*, 5080-5092.
- Sun, A., Yoon, J.J., Yin, Y., Prussia, A., Yang, Y., Min, J., Plemper, R.K., and Snyder, J.P. (2008). Potent non-nucleoside inhibitors of the measles virus RNA-dependent RNA polymerase complex. *J Med Chem* *51*, 3731-3741.
- Sutmuller, R.P., van Duivenvoorde, L.M., van Elsas, A., Schumacher, T.N., Wildenberg, M.E., Allison, J.P., Toes, R.E., Offringa, R., and Melief, C.J. (2001). Synergism of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and depletion of CD25(+) regulatory T cells in antitumor therapy reveals alternative pathways for suppression of autoreactive cytotoxic T lymphocyte responses. *J Exp Med* *194*, 823-832.
- Suvas, S., Azkur, A.K., Kim, B.S., Kumaraguru, U., and Rouse, B.T. (2004). CD4+CD25+ regulatory T cells control the severity of viral immunoinflammatory lesions. *J Immunol* *172*, 4123-4132.
- Suvas, S., Kumaraguru, U., Pack, C.D., Lee, S., and Rouse, B.T. (2003). CD4+CD25+ T cells regulate virus-specific primary and memory CD8+ T cell responses. *J Exp Med* *198*, 889-901.
- Suzumura, A., Lavi, E., Bhat, S., Murasko, D., Weiss, S.R., and Silberberg, D.H. (1988). Induction of glial cell MHC antigen expression in neurotropic coronavirus infections. Characterization of the H-2-inducing soluble factor elaborated by infected brain cells. *J Immunol* *140*, 2068-2072.
- Taguchi, O., and Takahashi, T. (1996). Administration of anti-interleukin-2 receptor alpha antibody in vivo induces localized autoimmune disease. *Eur J Immunol* *26*, 1608-1612.
- Takahashi, T., Hosoya, M., Kimura, K., Ohno, K., Mori, S., Takahashi, K., and Shigeta, S. (1998). The cooperative effect of interferon-alpha and ribavirin on subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) virus infections, in vitro and in vivo. *Antiviral Res* *37*, 29-35.
- Takamura, S., Tsuji-Kawahara, S., Yagita, H., Akiba, H., Sakamoto, M., Chikaishi, T., Kato, M., and Miyazawa, M. (2010). Premature terminal exhaustion of Friend virus-specific effector CD8+ T cells by rapid induction of multiple inhibitory receptors. *J Immunol* *184*, 4696-4707.
- Takano, A., Ishikawa, N., Nishino, R., Masuda, K., Yasui, W., Inai, K., Nishimura, H., Ito, H., Nakayama, H., Miyagi, Y., Tsuchiya, E., Kohno, N., Nakamura, Y., and Daigo, Y. (2009). Identification of nectin-4 oncoprotein as a diagnostic and therapeutic target for lung cancer. *Cancer Res* *69*, 6694-6703.
- Takeda, M., Tahara, M., Hashiguchi, T., Sato, T.A., Jinnouchi, F., Ueki, S., Ohno, S., and Yanagi, Y. (2007). A human lung carcinoma cell line supports efficient measles virus growth and syncytium formation via a SLAM- and CD46-independent mechanism. *J Virol* *81*, 12091-12096.
- Takeuchi, K., Miyajima, N., Nagata, N., Takeda, M., and Tashiro, M. (2003). Wild-type measles virus induces large syncytium formation in primary human small airway epithelial cells by a SLAM(CD150)-independent mechanism. *Virus Res* *94*, 11-16.
- Tanabe, M., Kurita-Taniguchi, M., Takeuchi, K., Takeda, M., Ayata, M., Ogura, H., Matsumoto, M., and Seya, T. (2003). Mechanism of up-regulation of human Toll-like receptor 3 secondary to infection of measles virus-attenuated strains. *Biochem Biophys Res Commun* *311*, 39-48.
- Tanaka, K., Xie, M., and Yanagi, Y. (1998). The hemagglutinin of recent measles virus isolates induces cell fusion in a marmoset cell line, but not in other CD46-positive human and monkey cell lines, when expressed together with the F protein. *Arch Virol* *143*, 213-225.

- Tatsuo, H., Ono, N., Tanaka, K., and Yanagi, Y. (2000). SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature* *406*, 893-897.
- Tellez-Negal, I., and Harter, D.H. (1966). Subacute sclerosing leukoencephalitis: ultrastructure of intranuclear and intracytoplasmic inclusions. *Science* *154*, 899-901.
- Thornton, A.M., and Shevach, E.M. (1998). CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* *188*, 287-296.
- Tishon, A., Eddleston, M., de la Torre, J.C., and Oldstone, M.B. (1993). Cytotoxic T lymphocytes cleanse viral gene products from individually infected neurons and lymphocytes in mice persistently infected with lymphocytic choriomeningitis virus. *Virology* *197*, 463-467.
- Tishon, A., Lewicki, H., Andaya, A., McGavern, D., Martin, L., and Oldstone, M.B. (2006). CD4 T cell control primary measles virus infection of the CNS: regulation is dependent on combined activity with either CD8 T cells or with B cells: CD4, CD8 or B cells alone are ineffective. *Virology* *347*, 234-245.
- Toka, F.N., Suvas, S., and Rouse, B.T. (2004). CD4+ CD25+ T cells regulate vaccine-generated primary and memory CD8+ T-cell responses against herpes simplex virus type 1. *J Virol* *78*, 13082-13089.
- Tomoda, A., Shiraishi, S., Hosoya, M., Hamada, A., and Miike, T. (2001). Combined treatment with interferon-alpha and ribavirin for subacute sclerosing panencephalitis. *Pediatr Neurol* *24*, 54-59.
- Urbani, S., Amadei, B., Tola, D., Massari, M., Schivazappa, S., Missale, G., and Ferrari, C. (2006). PD-1 expression in acute hepatitis C virus (HCV) infection is associated with HCV-specific CD8 exhaustion. *J Virol* *80*, 11398-11403.
- Urbanska, E.M., Chambers, B.J., Ljunggren, H.G., Norrby, E., and Kristensson, K. (1997). Spread of measles virus through axonal pathways into limbic structures in the brain of TAP1 -/- mice. *J Med Virol* *52*, 362-369.
- Vahlenkamp, T.W., Tompkins, M.B., and Tompkins, W.A. (2004). Feline immunodeficiency virus infection phenotypically and functionally activates immunosuppressive CD4+CD25+ T regulatory cells. *J Immunol* *172*, 4752-4761.
- van Binnendijk, R.S., Poelen, M.C., Kuijpers, K.C., Osterhaus, A.D., and Uytdehaag, F.G. (1990). The predominance of CD8+ T cells after infection with measles virus suggests a role for CD8+ class I MHC-restricted cytotoxic T lymphocytes (CTL) in recovery from measles. Clonal analyses of human CD8+ class I MHC-restricted CTL. *J Immunol* *144*, 2394-2399.
- van Bogaert, L. (1945). Une leuco-encéphalite sclérosante suaigü. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* *8*, 101.
- von Pirquet, C. (1908). Verhalten der kutanen Tuberkulin-Reaktion während der Masern. *Deutsch Med Wochenschr* *34*, 1297-1300.
- Weidinger, G., Czub, S., Neumeister, C., Harriott, P., ter Meulen, V., and Niewiesk, S. (2000). Role of CD4(+) and CD8(+) T cells in the prevention of measles virus-induced encephalitis in mice. *J Gen Virol* *81*, 2707-2713.
- Weidinger, G., Henning, G., ter Meulen, V., and Niewiesk, S. (2001). Inhibition of major histocompatibility complex class II-dependent antigen presentation by neutralization of gamma interferon leads to breakdown of resistance against measles virus-induced encephalitis. *J Virol* *75*, 3059-3065.
- Weissbrich, B., Schneider-Schaulies, J., and ter Meulen, V. (2003). Measles and its neurological complications. In *Clinical Neurovirology*, A. Nath, and J.R. Berger, eds. (New York, Marcel Dekker Inc), pp. 401-430.
- Wekerle, H., Lington, C., Lassman, H., and Meyermann, R. (1986). Cellular immune reactivity within the CNS. *Trends Neurosci* *9*, 271-277.
- Welstead, G.G., Hsu, E.C., Iorio, C., Bolotin, S., and Richardson, C.D. (2004). Mechanism of CD150 (SLAM) down regulation from the host cell surface by measles virus hemagglutinin protein. *J Virol* *78*, 9666-9674.
- White, L.K., Yoon, J.J., Lee, J.K., Sun, A., Du, Y., Fu, H., Snyder, J.P., and Plemper, R.K. (2007). Nonnucleoside inhibitor of measles virus RNA-dependent RNA polymerase complex activity. *Antimicrob Agents Chemother* *51*, 2293-2303.
- Yalaz, K., Anlar, B., Oktem, F., Aysun, S., Ustacelebi, S., Gurcay, O., Gucuyener, K., and Renda, Y. (1992). Intraventricular interferon and oral inosiplex in the treatment of subacute sclerosing panencephalitis. *Neurology* *42*, 488-491.

- Yamamoto, S., and Hayaishi, O. (1967). Tryptophan pyrrolase of rabbit intestine. D- and L-tryptophan-cleaving enzyme or enzymes. *J Biol Chem* *242*, 5260-5266.
- Yoshikawa, Y., Tsuruoka, H., Matsumoto, M., Haga, T., Shioda, T., Shibuta, H., Sato, T.A., and Yamanouchi, K. (1990). Molecular analysis of structural protein genes of the Yamagata-1 strain of defective subacute sclerosing panencephalitis virus. II. Nucleotide sequence of a cDNA corresponding to the P plus M dicistronic mRNA. *Virus Genes* *4*, 151-161.
- Yu, X.L., Cheng, Y.M., Shi, B.S., Qian, F.X., Wang, F.B., Liu, X.N., Yang, H.Y., Xu, Q.N., Qi, T.K., Zha, L.J., Yuan, Z.H., and Ghildyal, R. (2008). Measles virus infection in adults induces production of IL-10 and is associated with increased CD4+ CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* *181*, 7356-7366.
- Zelinskyy, G., Dietze, K., Sparwasser, T., and Dittmer, U. (2009a). Regulatory T cells suppress antiviral immune responses and increase viral loads during acute infection with a lymphotropic retrovirus. *PLoS Pathog* *5*, e1000406.
- Zelinskyy, G., Dietze, K.K., Husecken, Y.P., Schimmer, S., Nair, S., Werner, T., Gibbert, K., Kershaw, O., Gruber, A.D., Sparwasser, T., and Dittmer, U. (2009b). The regulatory T-cell response during acute retroviral infection is locally defined and controls the magnitude and duration of the virus-specific cytotoxic T-cell response. *Blood* *114*, 3199-3207.
- Zilliox, M.J., Moss, W.J., and Griffin, D.E. (2007). Gene expression changes in peripheral blood mononuclear cells during measles virus infection. *Clin Vaccine Immunol* *14*, 918-923.
- Zilliox, M.J., Parmigiani, G., and Griffin, D.E. (2006). Gene expression patterns in dendritic cells infected with measles virus compared with other pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 3363-3368.
- Zinke, M., Kendl, S., Singethan, K., Fehrholz, M., Reuter, D., Rennick, L., Herold, M.J., and Schneider-Schaulies, J. (2009). Clearance of measles virus from persistently infected cells by short hairpin RNA. *J Virol* *83*, 9423-9431.

10 Posterpräsentationen, Vorträge und Publikationen

- 2007 Teilnahme am *XVII. Measles Meeting* in Würzburg mit der Präsentation „T cell response to persistent measles virus infection in the mouse CNS“
- 2008 Teilnahme am *18th Annual Meeting of the Society for Virology* in Heidelberg mit der Posterpräsentation „Influence of immune competence on establishing a persistent viral infection of the brain“
- 2008 Präsentation „T cell response to persistent measles virus infection in the mouse CNS“ am Institut für Virologie und Immunbiologie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
- 2008 Teilnahme am *Annual Retreat* des Graduiertenkolleg 520 der *Graduate School of Life Sciences* in Rothenburg ob der Tauber mit der Posterpräsentation „T cell response to persistent measles virus infection in the mouse CNS“
- 2008 Teilnahme am *XVIII. Measles Meeting* in Würzburg mit der Präsentation „T cell response to persistent measles virus infection in the mouse CNS“
- 2008 Präsentation „A mouse model of persistent measles virus infection of the brain“ im Rahmen des SFB 479-Seminars am Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
- 2009 Teilnahme am *19th Annual Meeting of the Society for Virology* in Leipzig mit der Präsentation „A mouse model of persistent measles virus infection of the brain“ und Posterpräsentation „Investigating the therapeutic potential of siRNA against persistent measles virus infection“ Zinke, M., Kendl, S., Singethan, K., Fehrholz, M., Reuter, D., and Schneider-Schaulies, J.
- 2009 Präsentation „A mouse model of persistent measles virus infection of the brain“ am Institut für Virologie und Immunbiologie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
- 2009 Veröffentlichung im *Journal of Virology* „Clearance of measles virus from persistently infected cells by short hairpin RNA“ Zinke, M., Kendl, S., Singethan, K., Fehrholz, M., **Reuter, D.**, Rennick, L., Herold, M.J., and Schneider-Schaulies, J.; 2009 Sep; 83(18):9423-31.
- 2009 Teilnahme am *XIX. Measles Meeting* in Würzburg mit der Präsentation „A mouse model of persistent measles virus infection of the brain“
- 2009 Teilnahme am *Annual Retreat* des Graduiertenkolleg 520 der *Graduate School of Life Sciences* im Kloster Schöntal mit der Präsentation „A mouse model of persistent measles virus infection of the brain“

- 2010 Präsentation „A mouse model of persistent measles virus infection of the brain“ am Institut für Virologie und Immunbiologie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
- 2010 Veröffentlichung in *Medical Microbiology and Immunology* „Measles virus infection of the CNS: human disease, animal models, and approaches to therapy“ **Reuter, D.**, and Schneider-Schaulies, J.; 2010 Aug; 199(3):261-71.
- 2010 Teilnahme am *XX. Measles Meeting* in Würzburg mit der Präsentation „Control of persistent virus infection in the brain by regulatory T cells“
- 2011 Teilnahme am *21st Annual Meeting of the Society for Virology* in Freiburg mit der Präsentation „Control of persistent measles virus infection in the brain by regulatory T cells“
- 2011 Teilnahme am *XXI. Measles Meeting* in Würzburg mit der Präsentation „Foxp3⁺ regulatory T cells control persistence of viral CNS infection“
- 2011 Präsentation „Foxp3⁺ regulatory T cells control persistence of viral CNS infection“ am Institut für Virologie und Immunbiologie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
- 2012 Teilnahme am *22nd Annual Meeting of the Society for Virology* in Essen mit der Posterpräsentation „Foxp3⁺ regulatory T cells control persistence of viral CNS infection“
- 2012 Veröffentlichung in *PLoS ONE* „Foxp3⁺ regulatory T cells control persistence of viral CNS infection“ **Reuter, D.**, Sparwasser, T., Hünig, T., and Schneider-Schaulies, J.; 2012; 7(3):e33989. Epub 2012 Mar 20.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich Prof. Dr. Jürgen Schneider-Schaulies für die Überlassung dieses überaus interessanten Themas, für die sehr gute Betreuung und Diskussionsbereitschaft danken.

Prof. Dr. Georg Krohne danke ich für die freundliche Übernahme des Zweit-Gutachtens.

Weiterhin bedanke ich mich bei Prof. Dr. Thomas Hünig für sein Interesse an meiner Arbeit sowie für die freundliche Überlassung des CD28-Antikörpers D665.

Prof. Dr. Tim Sparwasser und Dr. Niklas Beyersdorf danke ich für die Überlassung der DEREK-Mäuse.

Thanks to all guests of our annual Measles Meeting, especially to Paul Duprex and Bert Rima for helpful discussions.

Ein großes Dankeschön an Sabine Kendl, die mich ganz selbstlos in die Welt der Mäuse eingelernt hat und immer `ne Antwort parat hatte – egal wie seltsam die Fragen manchmal waren. Vielen Dank für Deine Geduld und Offenheit.

Ein riesiges Dankeschön an unsere Azubine Christina Strasheim für ihr reges Interesse an der Laborarbeit im Allgemeinen und der Arbeit mit Mäusen im Besonderen. Vielen Dank für Deine tatkräftige Unterstützung bei dieser Doktorarbeit. Ich werde Dich und Dein Engagement vermissen.

Markus Fehrholz danke ich für die langjährige Banknachbarschaft, für seine Hilfe bei allen Computer-relevanten Problemen („Schau doch mal bei Google nach.“), für seine stets witzigen wie auch konstruktiven Kommentare und dafür, dass er meinen Humor verstand. Außerdem war er der einzige, der meinen Musikgeschmack teilte.

Desweiteren ein herzliches Dankeschön an Katrin Singethan für ihr Verständnis und ihre Hilfe bei allen großen und kleinen Sorgen. Einen schönen Gruß von Klein-Petri.

An alle derzeitigen und ehemaligen Kollegen der Arbeitsgruppe JSS, wie z.B. Michael, Doreen, Sandra, Johannes, Bala, Jung, (Ibo), Julia und Julija, sowie Maria, vielen Dank.

Prof. Dr. Sibylle Schneider-Schaulies und ihrer Arbeitsgruppe, insbesondere Elita, Evi, Ibo, Susi, Andi, Alice, Charlene, Caro und Belinda, vielen Dank.

Allen Mitarbeitern des Instituts, insbesondere Karin Elflein und den Kollegen aus dem Tierstall, vielen Dank für die Zusammenarbeit.

Ein riesiges Danke! an Jessi. Du hast zwar nie verstanden, wovon wir Biochemiker gesprochen haben aber Du verstehst MICH. Deine Freundschaft will ich nicht missen.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern und Dominik für ihre langjährige Unterstützung – seelisch, moralisch wie auch kulinarisch. Die letzten Jahre waren sehr turbulent 😊