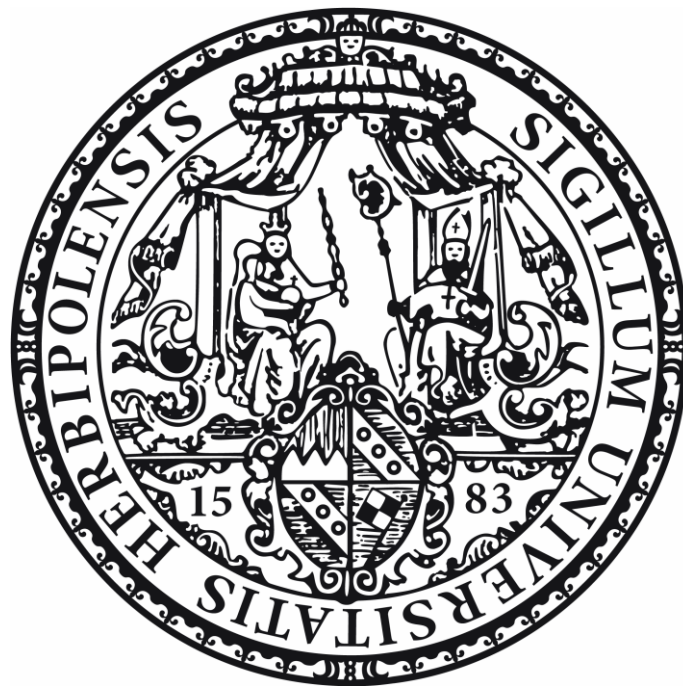


Die Rolle regulatorischer T-Zellen bei der Masernviruspathogenese

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen
Doktorgrades an der Bayerischen Julius-Maximilians-
Universität Würzburg



vorgelegt von
Steffen Schwab

2012

Eingereicht am:

bei der Fakultät für Biologie

1. Gutachter:

2. Gutachter:

der Dissertation

1. Prüfer:

2. Prüfer:

des Öffentlichen Promotionskolloquiums

Tag des Öffentlichen Promotionskolloquiums:

.....

Doktorurkunde ausgehändigt am:

.....

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Das Masernvirus	1
1.1.1. Allgemeines	1
1.1.2. Klinik des MV	2
1.1.3. Komplikationen der MV-Infektion.....	3
1.1.4. Die Masernimpfung	5
1.1.5. Pathogenese der MV-Infektion.....	5
1.1.6. Taxonomie des MV	6
1.1.7. Virusstruktur	7
1.1.8. Die Rezeptoren des MV	9
1.2. Die MV-induzierte Immunsuppression	11
1.3. Regulatorische T-Zellen (Tregs)	14
1.3.1. Was sind regulatorische T-Zellen?	14
1.3.2. Der Stammbaum der regulatorischen T-Zellen	15
1.3.3. Entstehung natürlicher Tregs im Thymus	16
1.3.4. Tregs steuern die Balance des Immunsystems	16
1.3.5. Anergie	17
1.3.6. Gegenüberstellung natürlicher und induzierter Tregs	18
1.3.7. Mechanismen der Treg gesteuerten Suppression	20
1.3.8. Homing und ortsabhängiger Suppressionsmechanismus der Trn	23
1.3.9. Aktivierung und Induktion regulatorischer T-Zellen	24
1.4. Regulatorische T-Zellen in Virusinfektionen.....	25
1.4.1. Natürliche regulatorische T-Zellen.....	25
1.4.2. Induzierte regulatorische T-Zellen	26
1.4.3. Tregs und Masern Virus Pathogenese	27
2. Aufgabenstellung	28
3. Material	30
3.1. Geräte.....	30
3.2. Verbrauchsmaterialien.....	31
3.3. Zellen und Viren.....	31
3.3.1. Zellen	31
3.3.2. Virusstämme	32
3.4. Medien und Lösungen	32
3.5. Antikörper und Reagenzien.....	35
3.6. Verwendete Kits	37
3.7. Ergänzungsmaterialien zu den Kits	37
4. Methoden.....	38
4.1. Kultur.....	38
4.1.1. Kultur von Zelllinien	38
4.1.2. Reinigung von primären humanen Lymphozyten	38
4.1.3. Kultur primärer humaner Zellen.....	43
4.2. Virologische Methoden	44

4.2.1. Zucht des MV-Impfstammes ED.....	44
4.2.2. Zucht des MV-Wildtypstammes WTF	45
4.2.3. Reinigung des MV WTF durch Ultrazentrifugation.....	45
4.2.4. Bestimmung des Virustiters TCID ₅₀	47
4.3. Herstellung von Antikörpern	47
4.3.1. Antikörper Reinigung	48
4.3.2. Biotinylierung von Proteinen (Antikörpern)	48
4.3.3. Bestimmung der Proteinkonzentration	49
4.4. Experimentelle Verfahren.....	49
4.4.1. MACS Separation.....	49
4.4.2. FACS-Färbung	52
4.4.3. T-Zell-Stimulation	54
4.4.4. Proliferationstest.....	55
4.4.5. Experimentelle Infektionsversuche	56
4.4.6. Downregulation, Proliferation und Apoptosemessung bei infizierten T-Zellen	57
4.4.7. IL10 Expression in Patientenproben (induz. Tregs).....	58
5. Ergebnisse	63
5.1. Charakterisierung natürlicher regulatorischer T-Zellen (Trn).....	63
5.1.1. Separation unterschiedlicher T-Zell-Populationen	63
5.1.2. Untersuchung verschiedener Trn Marker	66
5.1.3. Überlebensfähigkeit, Proliferation und suppressive Aktivität von Trn.....	66
5.1.4. Darstellung von Trn in PBMC aus Rhesusaffen	68
5.1.5. Methoden zur Überprüfung der Trn-Aufreinigung	70
5.2. Infektion natürlicher regulatorischer T-Zellen (Trn).....	71
5.2.1. Trn exprimieren CD150 ohne vorherige Aktivierung	72
5.2.2. Trn werden durch MV WT CD150-abhängig infiziert.....	73
5.2.3. Die Infektion von Trn verläuft nur wenig produktiv	75
5.2.4. Der Kontakt mit MV führt zur Downregulation von CD150 auf Trn	76
5.2.5. MV-infizierte Trn können nicht proliferieren und werden apoptotisch	77
5.3. Trn und MV-Pathogenese.....	79
5.3.1. Kinetik von Trn und aktivierten T-Zellen nach MV-Impfung	80
5.3.2. MV-Infektion eines vorimmunisierten Rhesusaffen	81
5.3.3. Trn Kinetiken in Patientenproben.....	82
5.4. Induzierte Tregs	86
5.4.1. IL-10 Produktion in MV-stimulierten peripheren Lymphozyten aus SSPE Patienten	87
5.4.2. Die Induktion von IL-10 nach MV-Stimulation erfolgt in T-Zellen.....	89
6. Diskussion.....	91
7. Zusammenfassung	102
7.1. Summary.....	104
8. Abkürzungsverzeichnis	106
9. Literatur	109

1. Einleitung

1.1. Das Masernvirus

1.1.1. Allgemeines

Erste Berichte über die Masern gehen auf das 7. Jahrhundert zurück und werden dem Arzt Al-Yehudi zugeschrieben (Abb.1.1). Die erste ausführliche Beschreibung der Masern verdanken wir dem persischen Arzt Abu Bakr Mohammad Ibn Zakariya al-Razi, Anfang des 10. Jahrhunderts, der angab, sie würden „mehr gefürchtet als die Pocken“ [1]. Den Namen „Morbilli“, was so viel wie „kleine Pest“ bedeutet, erhielten die Masern während der ausgedehnten Epidemien des Mittelalters [1], da damals viele Kinder infolge der Masern starben. 1882 veröffentlichte der französische Arzt Antoine Louis Gustave Bécélère seine aufsehenerregende Arbeit „Die Ansteckung mit Masern“. 1954 wurde das Virus von Enders und Peebles erstmalig isoliert, ab 1963 war der erste Impfstoff erhältlich. Dieser führte bis 1968 zu einer weitgehenden Eindämmung in den Industrieländern [2]. Zuvor erkrankte aufgrund des hohen Ansteckungspotentials des Erregers beinahe jeder an den Masern. Mehr als die Hälfte der Kinder bekamen die Masern vor dem 6. und 90 % vor dem 15. Lebensjahr. Hatte man die Krankheit überstanden, war man gegen eine erneute Infektion geschützt [2].

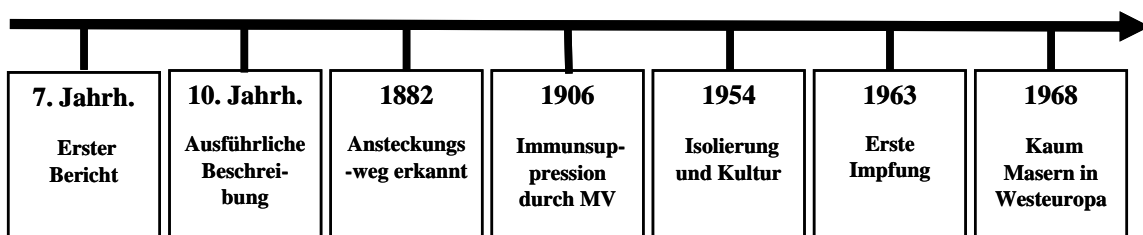


Abb.1.1: Charakterisierung und Bekämpfung des MV

Obwohl es bereits seit den 60er Jahren eine effektive Impfung gegen das MV gibt, gehört es heute noch immer zu den weltweit meistverbreiteten Viren und (rechnet man durch die MV-Infektion begünstigte Sekundärerkrankungen zu den Folgen) zu den zehn häufigsten Todesarten im Kindesalter. Von den jährlich 30 Millionen Infektionen enden immerhin 500.000 tödlich [3]. Aber auch in Deutschland kommt es aufgrund

wachsender Impfmüdigkeit im Abstand einiger Jahre immer wieder zu lokalen Ausbrüchen [4]. Zu den schwerwiegendsten, durch MV verursachten Komplikationen [3] zählt die stets tödlich verlaufende Subakute Sklerotisierende Panenzephalitis (SSPE). Die Masernviruserkrankung ist die erste Viruserkrankung für die eine immunsuppressive Wirkung Anfang des 20. Jahrhunderts erkannt und beschrieben wurde [1].

1.1.2. Klinik des MV

Die MV-Infektion zeichnet sich durch hohe Kontagiosität und eine hohe Manifestationsrate aus. Da es kein Tierreservoir für das Virus gibt, ist dieses für seine Verbreitung völlig auf empfängliche Menschen angewiesen. Die Masern sind eine schwere fiebröse Infektionserkrankung die biphasisch verläuft [1]: Nach einer relativ langen Inkubationszeit von etwa 9 bis 12 Tagen treten die ersten Symptome auf, die Fieber, Appetitlosigkeit, Abgeschlagenheit, ausgeprägte katarrhalische Erscheinungen, trockenen Husten, Schnupfen, Konjunktivitis, Halsschmerzen sowie Photophobie (Lichtscheue) und Tränenfluss einschließen. Etwa drei Tage später kommt es unter erneutem Fieberanstieg zum Auftreten pathognomischer Veränderungen der Mundschleimhaut, welche als *Kopliksche Flecken* bezeichnet werden [5]. Dabei handelt sich um kleine, kalkspritzerähnliche, fest anhaftende Stippchen, die von einem geröteten Hof umgeben sind. Etwa einen Tag später verstärken sich die allgemeinen und die katarrhalischen Erscheinungen und es kommt zum Auftreten eines makulopapulösen Exanthems (Abb.1.2a). Dieses wird hauptsächlich durch die Zerstörung MV-infizierter Epithelzellen durch cytotoxische T-Zellen verursacht und breitet sich vom Kopfbereich binnen drei Tagen langsam über die gesamte Körperoberfläche aus. Insgesamt dauert die symptomatische Phase der Masernerkrankung etwa zehn Tage an. MV infiziert ein breites Spektrum von Organen und Geweben, während es sich in einer Virämie über den Körper verbreitet (Abb.1.2b) [5].

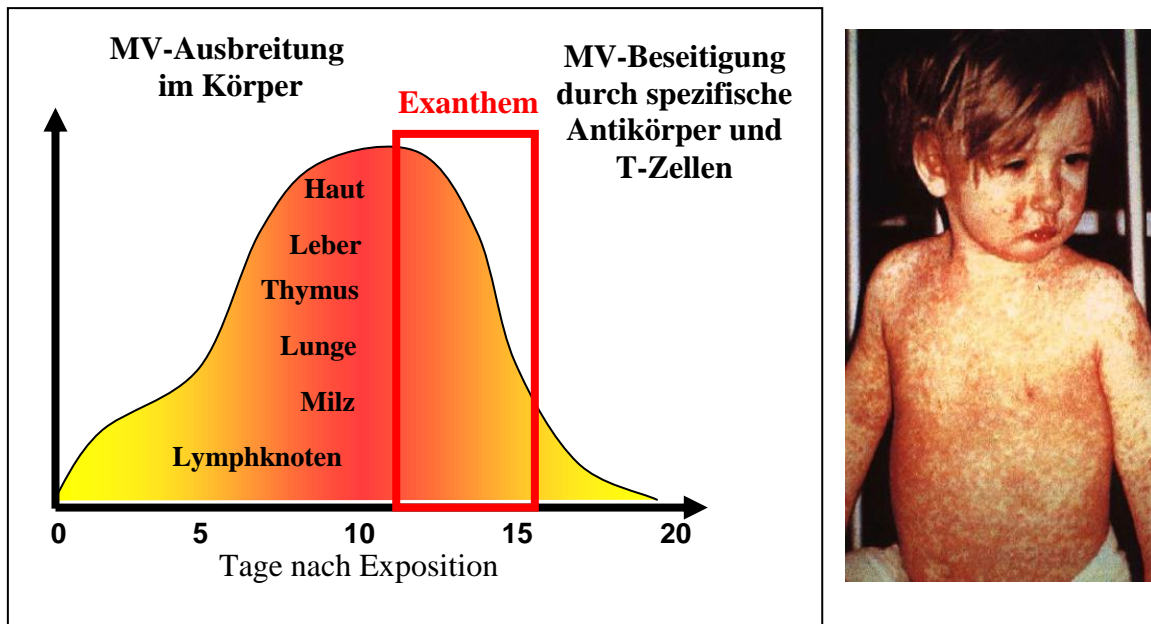


Abb.1.2: Masernexanthem bei einem Kind (rechts) und Grafik des zeitlichen Krankheitsverlaufs (links)

1.1.3. Komplikationen der MV-Infektion

Maserninfektionen gehen in etwa 50 % der Fälle mit elektroenzephalographischen Abnormalitäten einher. Häufig kommt es zu Komplikationen und Sekundärerkrankungen: Zu erwähnen wären hier (mit abnehmender Frequenz) Mittelohrentzündungen (Otitis Media) und Durchfallerkrankungen (Diarrhöe) mit einer Häufigkeit von 8 %, Lungenentzündungen (Pneumonien, ca. 5 %), schwere Augenerkrankungen (Konjunktivitis), sowie die so genannten Schwarzen Masern [5]. Diese Komorbiditäten brechen stets während der akuten Phase aus, und heilen in der Regel zeitnah innerhalb einiger Wochen aus. Die akute Masernenzephalitis und die subakute sklerotisierende Panenzephalitis (SSPE) sind zwar mit ca. 0.1 % bzw. 0.001 % sehr selten, verlaufen jedoch sehr häufig letal. Die Mortalität beträgt etwa 15 % bzw. 100 % [6-8].

1.1.3.1. Akute Masernenzephalitis

Bei der akuten Masernenzephalitis findet man eine Schädigung des perivaskulären Gewebes, eine Zerstörung von Gliazellen (Gliosis), die Anwesenheit von Lipid

beladenen Makrophagen nahe der Blutgefäße und eine Demyelinisierung [9]. Es lassen sich nur eine geringe Plasmazellvermehrung (lymphocytäre Pleocytose) und keine MV-spezifischen Antikörper in der Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit detektieren. Es gibt kaum Hinweise auf das Vorkommen von Virus RNA oder Antigen im Gehirn, so dass es sich hierbei wahrscheinlich um eine virusinduzierte Autoimmunität gegen Gehirnantigene handelt [10, 11]. MBP (Myelin Basis Protein) konnte jedoch in Folge der Myelinzerstörung nachgewiesen werden und *in vitro* eine proliferative T-Zellantwort auslösen [10, 11].

1.1.3.2. Subakute sklerotisierende Panenzephalitis

SSPE hat eine lange Inkubationsperiode von 6-8 Jahren. Sie tritt etwa in einem von 10.000 Fällen akuter Masern auf [12]. Sie entwickelt sich häufiger bei Jungen und in ländlichen Gebieten, außerdem wird vermutet, dass das Alter während der akuten Masern entscheidend ist für die Ausbildung von SSPE. Dem Verlauf nach handelt es sich um eine schleichende chronisch-persistente Virusinfektion. Mutationsbedingt entstehen schließlich keine freien Viruspartikel mehr, das Virus breitet sich wahrscheinlich als RNP-Komplex direkt von Zelle zu Zelle aus [13,14]. Besondere Risikofaktoren und Voraussetzungen für die Entwicklung von SSPE sind außer den bereits genannten (Geschlecht und Alter/ fehlender Impfschutz) nicht bekannt. Die klinischen Symptome umfassen mentalen und intellektuellen Verfall, neurologische Fehlfunktionen (Dyspraxia, Konvulsionen und repetitive Muskelkrämpfe), Augenentzündungen (Retinitis), welche zur Blindheit führen können, progressive cerebrale Degeneration, Koma und letztlich den Tod [12]. Bei einem EEG sind charakteristische Muster (Radermecker Komplexe) zu erkennen. Es lassen sich zudem hohe Mengen MV-spezifischer Antikörper in Serum und Liquor nachweisen (im Liquor sind 20% aller Immunglobuline MV-spezifisch) [16]. Nach dem Tod lässt sich eine massive Präsenz des Virus vor allem in Neuronen aber auch in Gliazellen detektieren. Zudem findet man zahlreiche Läsionen [14]. Zwar gibt es verschiedene Behandlungsmethoden die jedoch, nur kurzzeitig und bei einem Teil der Patienten Wirkung zeigen. Um die Krankheitsprogression zu verlangsamen werden INF-a, Ribavirin und Inosiplex eingesetzt [15, 16].

1.1.4. Die Masernimpfung

Eine Impfung wird normalerweise mit zwei Dosen subkutan durchgeführt, wobei die erste in einem Alter von 12-15 Monaten und die zweite mindestens vier Wochen später, spätestens jedoch vor der Einschulung erfolgt [19, 20]. Wie bei natürlichen Masern produzieren die aktivierten B-Zellen vor allem IG_1 . Zwar sind die Antikörperlevel bei Impfung etwas niedriger und sinken schneller ab, es sind jedoch auch nach 30 Jahren noch Antikörper nachweisbar, ohne dass ein Boost nötig wäre [17]. Bei der Immunität gegen MV dominieren die Th_1 Zellen [18]. Die Aktivierung der zellulären Immunität verläuft ähnlich zu der durch akute Masern ausgelöst [19, 20], sowohl in Bezug auf CD4 als auch CD8 positive T-Zellen. Die CTL-Aktivität ist dagegen niedriger. Wie bei natürlichen Masern entstehen Lymphopenie und Lymphocytose, welche jedoch milder verlaufen als bei jener Erkrankung. Nach Vaccinierung ist ein Anstieg der Cytokine IL-2 und $INF\gamma$ zu verzeichnen [21], jedoch keine erhöhte Expression der suppressiven bzw. einen T-Zell-Klassenshift begünstigenden Cytokine IL-10 und IL-4. Darin unterscheidet sich der Verlauf von einer natürlichen Infektion.

1.1.5. Pathenogenese der MV-Infektion

MV gelangt über den Respirationstrakt in seinen Wirt. Dabei wird es mittels Tröpfcheninfektion von Mund-, Nasen- und Rachenschleimhaut, sowie der Augenbindehaut oder durch direkten Kontakt übertragen [22, 23]. Bei Rhesusaffen sind CD150 exprimierende B- und T-Zellen, insbesondere Gedächtniszellen, das Hauptziel der MV-Infektion [24]. In vivo Versuche in diesem Modellorganismus deuten darauf hin, dass DC als Vehikel für die Infektion des Lymphsystems dienen. Die initiale Virusbildung findet voraussichtlich in den Tonsillen statt. Nach zwei bis vier Tagen beginnt sich das Virus über den Blutstrom auszubreiten. Es bilden sich retikuloendotheliale Riesenzellen (Warthin-Finkeldy-Zellen) genannt [25], die große Mengen Virus freisetzen können. Die erste Virämie beschränkt sich noch weitgehend auf lymphatisches Gewebe. Im Modellorganismus waren sämtliche Lymphgewebe stark infiziert [24]. In einer darauf folgenden Welle, der zweiten Virämie, breitet sich das Virus zu vielen weiteren Organen (z.B. Haut, Niere, Lunge Gastrointestinaltrakt, Leber u.a.) hin aus (Abb.1.2b). Im peripheren Gewebe werden bei Rhesusaffen vor allem Lymphozyten und DC und nur in geringerem Maße Epithelzellen infiziert.

1.1.6. Taxonomie des MV

Die Paramyxoviren sind eine Familie negativsträngiger RNA-Viren mit unsegmentiertem Genom, welche membranumhüllte Partikel bilden. Sie lassen sich in zwei Unterfamilien einteilen, die *Paramyxovirinae* und die *Pneumovirinea* [7] (Tab. 1.1). Taxonomisch lassen sich die verschiedenen Mitglieder der Paramyxovirinae anhand ihrer Proteinexpression gliedern. Paramyxoviren und Rubulaviren besitzen an der Partikeloberfläche ein Hämagglutinin und eine Neuramidase, Rubulaviren (wie z.B. Mumps) codieren außerdem für ein kleines hydrophobes Protein (SH), das mit der Hüllmembran verbunden ist. MV und die anderen Vertreter der Morbilliviren besitzen ein Hämagglutinin ohne Neuraminidaseaktivität, dafür aber ein mit H interagierendes Fusionsprotein F. Sämtliche Vertreter der zweiten Unterfamilie, die Pneumoviren (wie z.B. RSV), besitzen ebenfalls keine Neuramidase und verfügen anstelle des Hämagglutinin über ein sogenanntes G-Protein, welches keine hämagglutinierende Aktivität zeigt.

Zu den Morbilliviren zählen neben dem humanpathogenen MV, fünf Animalpathogene [7]. PPRV (Peste des petits ruminants Virus) ist nahe mit dem Rinderpestvirus (RPV) verwandt und befällt kleine Huftiere, wie z.B. Ziegen und Schafe. Sein Hauptverbreitungsgebiet ist Afrika. Des Weiteren existieren drei Arten des Staupevirus welche entweder Hunde, marderartige Spezies, oder Meeressäuger befallen. Das Phocine-Staupevirus oder Seehund-Staupevirus erhielt seinen Namen dadurch, dass es die Gattungen Phoca (Seehunde) und Phocoena (Schweinswal) infiziert. Obwohl MV serologisch gesehen monotypisch ist, lassen sich verschiedene Genotypen unterscheiden. Die Vaccinierung mit attenuierten Stämmen bietet Schutz gegen alle Stämme und es gibt auch keine Hinweise, dass verschiedene Stämme ein unterschiedliches Erkrankungsmuster zeigen.

Tab. 1.1: Charakteristische Vertreter der Paramyxoviren. Verändert nach: Modrow & Falke, Molekulare Virologie, 1998 [1]

Unterfamilie	Genus	Mensch	Tier
<i>Paramyxo- virinae</i>	Paramyxovirus	Parainfluenzavirus (Typ1+3)	Sendai Virus
	Rubulavirus	Mumpsvirus Parainfluenza (Typ 2+4)	Newcastle-Disease-Virus (Geflügel) Vogelparamyxoviren (Typen 2-9) Hunde- Delfin-
	Morbillivirus	Masernvirus	Phocinestaupevirus Rinderpestvirus und PPRV

1.1.7. Virusstruktur

Die Viruspartikel haben einen Durchmesser von ca. 150 – 200 nm und beinhalten neben der Membran, welche der Wirtszelle entstammt, das Virusgenom und die 6 Strukturproteine des MV [1]. Auf dem viralen Genom liegen die Gene nur von kurzen Zwischensequenzen unterbrochen in enger Folge angeordnet (Abb.1.4). Die Transkription beginnt stets am 3`Ende des Genoms. Nach Transkription und Termination einer kurzen Leader-RNA beginnt die Transkription der Gene. Die kurzen Sequenzen zwischen den Genen sorgen stets für eine Termination des letzten Transkripts und mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit zur Reinitiation und Transkription des folgenden Gens oder zur Ablösung des Polymerasekomplexes. Folglich bildet sich ein Gradient aus, bei dem das Gen öfter abgelesen wird, welches näher am 3` Ende liegt. In seltenen Fällen erfolgt keine Termination zwischen den Genen und es werden bi- oder tricistronische RNAs gebildet. Die genomische RNA liegt stets als Ribonucleoproteinkomplex verpackt vor und bildet das RNP, welches durch das Nucleocapsid-Protein (N), das Phospho-Protein (P) und das Large-Protein (L) vervollständigt wird [1]. Von den die RNA verpackenden Proteinen liegt das N-Protein in der höchsten Konzentration vor. Als die Hauptproteinkomponente des Nucleocapsids

dient es zur Fixierung der viralen RNA und zu deren Schutz, insbesondere vor zellulären Ribonukleasen. Dazu nimmt es eine Funktion als Adaptorprotein beim Zusammenbau des Partikels wahr, indem es mit M Bindungen eingeht und zusammen mit P und L den Replikationskomplex ausbildet. Schließlich besitzt es auch noch immunmodulatorische Fähigkeiten (siehe Kapitel 1.2). In infizierten Zellen kondensiert es oft zu charakteristischen auffälligen Aggregaten. Das große L-Protein (~200 kDa) ist mit seinem Adaptor dem P-Protein assoziiert und besitzt die enzymatische Aktivität einer RNA-abhängigen RNA-Polymerase. Ob es zur Transkription oder zur Replikation kommt hängt von der Menge des bereits gebildeten N und dem daraus folgenden Verpackungsgrad der RNA ab. Beim Zusammenbau des Partikels geht der Ribonucleoproteinkomplex Bindungen mit dem M Protein ein. Das Matrixprotein (M) verbindet das Nucleocapsid außerdem mit der Hüllmembran. Neben dieser Hauptaufgabe hat das M jedoch auch regulatorische Aufgaben, so ist es ein negativer Regulator der Transkription. An der Zellmembran wird das Viruspartikel vervollständigt, indem die membranständigen Komplexe aus dem H und F Protein über M mit dem RNP verbunden werden [1]. Das Fusionsprotein (F) und das Hämagglutinin (H) liegen als H-Tetramere und F-Trimere auf der Oberfläche infizierter Zellen und Viruspartikel vor, wobei das M-Protein mit den zytoplasmatischen Domänen dieser Glykoproteine interagiert und deren Fusionsaktivität reguliert [26]. Das H-Protein ist ein Typ II-Transmembranprotein, welches die Bindung des Virus an den Rezeptor vermittelt und die Membranfusion unterstützt [27]; es ist somit für die Wahl der Zielzelle verantwortlich und bringt durch Rezeptorbindung das F-Protein in eine aktive Konformation. F ist ein Typ-I-Glykoprotein und wird als Vorläuferprotein (Fo) synthetisiert, um im trans-Golgi-Apparat proteolytisch in die F1- und F2-Untereinheiten gespalten [27, 28] zu werden. Die proteolytische Spaltung führt zur Reifung des F-Proteins, sie induziert eine Konformationsänderung, wodurch die stark hydrophobe Fusionsdomäne am N-Terminus des F1-Proteins freigesetzt wird. Diese Domäne vermittelt im Verlauf von Infektions- und Absorptionsprozessen die Fusion der viralen mit der zellulären Membran [29-31]. Eine zweite konformationelle Änderung wird dann wie erläutert durch Rezeptorerkennung und Interaktion mit dem H-Protein induziert [27]. Die Bedeutung der Fusionsdomäne lässt sich experimentell leicht nachweisen. Peptide, die mit der Freisetzung der katalytischen Domäne interferieren, oder diese nach ihrer Ausbildung blockieren, wie etwa das in dieser Arbeit verwendete FIP (Fusionsinhibierendes Peptid), verhindern die Fusion zwischen Viruspartikeln und Zellen und die

Fusion infizierter Zellen untereinander [32]. Die Nichtstrukturproteine C, V und R werden innerhalb desselben Genomabschnitts wie das P-Protein kodiert [33]. C entsteht durch ein mit P überlappendes Leseraster. V teilt sich dagegen den N-Terminus aber nicht den C-Terminus mit P. Dies kommt durch cotranskriptionales RNA Editieren zustande. Es werden nicht kodierte G-Nucleotide eingefügt, was eine intrinsische Fähigkeit der MV-Polymerase darstellt. R entsteht durch einen seltenen Frameshift. Zwar sind das hochbasische C-Protein und das V-Protein für die virale Replikation *in vitro* nicht erforderlich [34], *in vivo* sind sie jedoch von pathogenetischer Bedeutung [34-37]. Ihre Aufgabe als Virulenzfaktoren beinhaltet die Resistenz gegenüber der Interferon gesteuerten Zellabwehr.

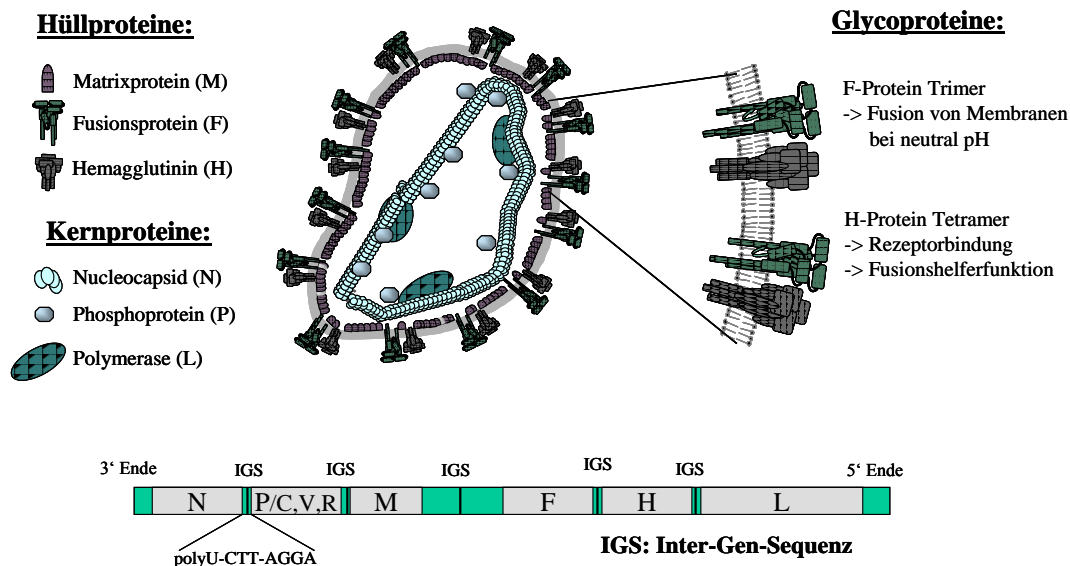


Abb.1.3: Struktur des MV (A: morphologisch, B: genetisch)

Verändert nach: Schneider-Schaulies 2002 [38]

1.1.8. Die Rezeptoren des MV

Der erste identifizierte MV-Rezeptor war CD46 (MCP). CD46 gehört zur Familie der Komplementregulatoren und schützt alle kernhaltigen Zellen vor Komplementlyse, indem es als Cofaktor für den Komplementfaktor I wirkt [39]. CD46 wird ubiquitär auf allen menschlichen kernhaltigen Zellen (nicht aber auf Erythrozyten) exprimiert [40-42]. CD46 ist ein Typ I Transmembranglykoprotein, das aus einer Reihe funktioneller Domänen besteht: vier extrazelluläre Consensus-Domänen (SCR), eine stark

glykosylierte und Serin-Threonin-Prolin reichen Region (STP), eine hydrophobe Transmembrandomäne und eine von zwei, durch differentielles Splicing generierten, zytoplasmatischen Domänen Cyt1 (16 Aminosäuren) und Cyt2 (23 Aminosäuren) (Abb. 1.5). In den unterschiedlichen Geweben werden meist beide Splicevarianten exprimiert [43-47]. Von besonderem Interesse ist hier eine erst vor wenigen Jahren entdeckte Bedeutung von CD46, nämlich die als costimulatorisches Molekül in humanen T-Zellen, wo es mit LAT (Linker of T-cell activation) und p120CBL (adapter regulator) in Verbindung steht [48]. CD46 kann intrazelluläre Signale transduzieren, die zur Freisetzung von intrazellulärem Calcium führen und in Folge zur Tyrosin-Phosphorylierung zweier, in die T-Zell-Aktivierung involvierter Adapterproteine (CBL und LAT) [48-51]. Während die Bindung von MV H-Protein an die zwei distalen extrazellulären SCR-Domänen 1 und 2 erfolgt und von wenigen Aminosäuren im H-Protein determiniert wird [52, 53], bindet der Haupt-Ligand des CD46 (C3b/C4b Komplementkomponente) an die beiden membranproximalen Domänen SCR 3 und 4 [44, 54]. Durch den Kontakt mit einem Liganden, der Bindung von Antikörpern, oder der Wechselwirkung mit Virusoberflächenproteinen, wie etwa von MV oder HSV (Herpes Simplex Virus), kommt es zur Herabregulierung von CD46 [55-59], was zu einer verstärkten Sensitivität gegenüber Komplement vermittelter Zellyse und einer massiven Freisetzung löslichen Eigenantigens führt [60]. Die virusvermittelte CD46-Herabregulierung findet aufgrund der unterschiedlichen Rezeptornutzung nur bei Impfstämmen statt. MV-Wildtypstämme interagieren nicht oder wenig effizient mit CD46 [61]. Eine Internalisierung findet grundsätzlich nicht nur bei der Virusaufnahme, sondern auch durch neu synthetisiertes H-Protein statt. Vaccinestämme besitzen ihre CD46 Affinität vermutlich aufgrund der langen Zellkulturpassagen in Vero-Zellen [53, 62].

Wesentlich später wurde der zweite Rezeptor des Masernvirus entdeckt bzw. als Interaktionspartner des MV H-Protein identifiziert, das humane costimulatorische Protein CD150 (SLAM: *signalling lymphocyte activation molecule*) [63, 64]. Ebenso wie CD46 ist dieses Molekül ein Transmembranglykoprotein vom Typ I und wird infolge des MV-Kontaktes herunterreguliert [65, 66]. Im Gegensatz zu CD46 ist es jedoch nicht ubiquitär exprimiert, sondern ausschließlich auf aktivierten Leukozyten und zwar T- und B-Effektorzellen, Gedächtniszellen, aktivierten Monozyten und dendritischen Zellen [25, 41, 67-70]. Der MV-Rezeptor ist funktionell mit TCR-

Komplexen assoziiert und besteht hauptsächlich aus zwei Immun-globulin-ähnlichen extrazellulären Domänen (Abb. 1.5). Neben einer Transmembrandomäne besitzt CD150 auch eine zytoplasmatischen Region, deren Protein-Tyrosin-Phosphorylierung über die Adaptorproteine SAP (mittels TIYxxV/I-Motif eine typische SAP-bindende Sequenz) und/oder EAT-2 vermittelt wird [71]. Das eine SH2-Domäne-enthaltende Protein SAP ist essentiell für die Vermittlung von Protein-Tyrosin-Phosphorylierungssignalen [72] [71]. Aufgrund dieser Phosphorylierungen könnte die durch Virusbindung induzierte Aktivierung und nachfolgende Herunterregulation des Rezeptors die Immunantwort *in vivo* beeinflussen und eine Suppression vermitteln [73]. Sowohl Wildtypstämme als auch Vakzinestämme benutzen CD150 als Eintrittsrezeptor.

Des weiteren deutet der Tropismus von Wildtyp MV für Zellen, die kein SLAM exprimieren, wie epitheliale, endotheliale und neuronale Zellen (Neuronen, Oligodendrozyten und Astrozyten), auf einen zusätzlichen Rezeptor hin [41, 66, 74-79].

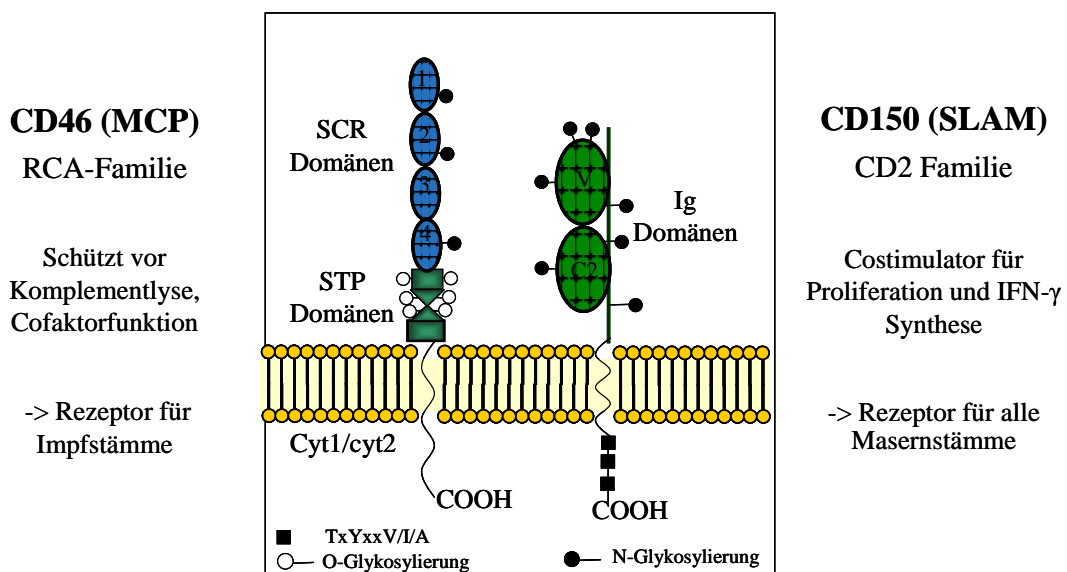


Abb.1.4: Zelluläre MV-Eintrittsrezeptoren. Verändert nach: J. Schneider-Schaulies

1.2. Die MV-induzierte Immunsuppression

Die ausgeprägte Immunsuppression während der MV-Infektion mit Wildtypstämmen erhöht die Empfänglichkeit des Wirtes für opportunistische Infektionen. Die Erkrankung ist verbunden mit einer transienten Lymphopenie und im Speziellen einer

Reduktion in der Anzahl von CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten [7, 80-82]. Es sind jedoch neben Änderungen in der Lymphozytenanzahl noch andere Abnormalitäten beschrieben worden: Darunter fallen etwa die Verschiebung der Zytokinsekretion (IL-4, IL-10 und IL-12) einschließlich der daraus resultierenden Effekte, unzureichende Antigenpräsentation durch infizierte APCs (Antigen präsentierende Zellen) und eine veränderte Interferon α/β Antwort [83, 84]. IL-10 kann von unterschiedlichen Zellen (DC, regulatorischen und T-Helferzellen) synthetisiert werden. Bei MV wird es von CD4 positiven T-Zellen gebildet, welche gleichzeitig nur wenig INF γ synthetisieren [85].

In vitro Untersuchungen zeigen, dass die MV-Infektion die Genexpression [86], Lebensfähigkeit, Reifung und Funktion professioneller Antigen-präsentierender Zellen verändert. Humane DC (periphere DC aus dem Blut und generiert aus CD34+-Vorläuferzellen oder aus Monozyten) und Langerhans-Zellen der Haut sind in Zellkultur permissiv für MV [25, 87-92]. Die Infektion von unreifen dendritischen Zellen mit MV verursacht eine phänotypische Reifung der Zellen, die durch die Expression von MHC-I und -II-Molekülen, CD40, CD80, CD86 und CD83 angezeigt wird [87, 90, 93, 94]. MV verändert *in vitro* die Antigenpräsentation, indem infizierte DCs die Fähigkeit verlieren, naive CD4⁺ T-Zellen zu stimulieren, und während der Kokultivierung mit T-Zellen apoptotisch werden [95]. Des Weiteren zeigen MV-infizierte Monozyten und DC eine verminderte IL-12 Produktion, ein Zytokin, das für die Induktion von T-Helferzellen Typ 1 (Th₁) notwendig ist [96]. Ein weiterer Mechanismus der MV-induzierten Immunsuppression könnte aus der Verschiebung der Zytokinantworten von einer Th₁ Immunantwort in der akuten Phase der Erkrankung hin zu einer IL-4 dominierten Th₂ Antwort während der Rekonvaleszenz resultieren [81, 97]. Außerdem konnte IL-10 in *ex vivo* restimulierten Zellen von MV-infizierten Patienten nachgewiesen werden [80, 81]. IL-10 erniedrigt die Synthese von IL-1, IL-2 und IL-6 und supprimiert die Aktivierung von Makrophagen bzw. Proliferation von DCs sowie T-Zellen. Die erläuterte Verschiebung der Immunantwort kann aber nicht nur Zytokin-bedingt erfolgen. Es wurde gezeigt, dass die Expression des MV-Rezeptor CD150 in Th₁-Zellen hoch, aber sehr niedrig in Th₂-Zellen ist [98]. Studien mit transgenen CD150 *knock-out* Mäusen zeigten, dass CD150 die Funktion von T-Zellen und Makrophagen kontrolliert [99]. Aus einer Infektion mit Wildtyp MV resultiert *in vitro* in eine signifikant verminderte Produktion von Interferon α und β [100-101].

Neuere Studien lassen vermuten, dass die MV Nicht-Strukturproteine V und C mit den Interferon α/β Signalwegen interferieren. Das MV V-Protein inhibiert die STAT1 und STAT2 Phosphorylierung und verhindert die INF-induzierte STAT-Translokation in den Zellkern [102]. Da INF α/β zusätzlich zur anti-viralen Zellantwort auch immunmodulatorische Funktion ausübt (Modulation der Reifung von DCs, Aktivierung von Makrophagen, Ausdehnung der Lebenspanne von T-Zellen), kann eine MV-induzierte Inhibition von INF α/β oder INF-Signalwegen auch einen Einfluss auf die Immunantwort *in vivo* haben [103, 104]. Auch das N-Protein besitzt immunregulatorische Eigenschaften [105]. Ein Hauptkennzeichen der MV-induzierten Immunsuppression ist es, dass aus Patientenblut isolierte Lymphozyten, auf mitogene oder TCR-induzierte Stimulation *ex vivo* nicht mehr proliferieren [38, 83, 106]. Die Proliferationshemmung ist nicht nur auf den zytopathischen Effekt der MV-Infektion zurückzuführen, da der Kontakt von infizierten Zellen, die nach UV-Bestrahlung kein Virus mehr freisetzen, die Proliferation peripherer Blut-Lymphozyten nach Mitozugabe hemmen kann [107, 108]. Dabei ist der Kontakt nicht infizierter Zellen mit dem MV-Glykoproteinkomplex, bestehend aus dem F- und H-Protein, auf der Oberfläche infizierten Zellen bzw. auf viralen Partikeln ausreichend, um eine Proliferationsinhibition der T-Zellen zu induzieren [32, 109]. Bei RSV liegt ein ähnlicher Mechanismus vor, in diesem Fall ist jedoch lediglich das F-Protein für die Inhibition nötig [100]. MV-arretierte T-Zellen sind nicht apoptotisch, die Hochregulation T-Zell-spezifischer Aktivierungsmarker und die Sekretion von Zytokinen nicht beeinflusst. Allerdings bewirkt der Kontakt mit MV-Glykoproteinen ein Arretieren der T-Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus [110, 111]. Auch wenn die Expression des IL-2 Rezeptors unverändert ist, kann die Proliferationshemmung durch exogene Zugabe von IL-2 nicht aufgehoben werden [112]. Infolge des MV-Kontaktes mit T-Zellen werden auch der Membrantransport und die Aktivierung von Proteinen, die für die vermittelten Signale von IL-2 Rezeptor und TCR essentiell sind, verändert. Die MV-Bindung führt innerhalb weniger Stunden nach dem Kontakt zur Hemmung der IL-2 und CD3/CD28 stimulierten Akt-Kinase Aktivierung, aber inhibiert nicht die Aktivierung des Jak/STAT Signalweges [112]. Es wurde gezeigt, dass MV direkt mit spezialisierten Bereichen der T-Zell-Membran (Glykosphingolipid-reiche Domänen, Membran-rafts) interagiert [113]. Bereits eine kurzzeitige Behandlung mit MV ist ausreichend, um den Transport PH-Domänen-enthaltender Proteine wie der Akt-Kinase und des Guaninnukleotid-Austauschfaktors Vav in Membran-rafts zu inhibieren. Die

TCR-stimulierte Degradierung des Negativregulators Cbl-b, welche für den Transport der PI3-Kinase und damit für die Aktivierung der Kinase (und davon abhängiger Signalkomponenten) wichtig ist, wird durch MV verhindert [113]. Es gibt viele Belege welche gegen eine Beteiligung von CD46 und CD150 an der Inhibition der T-Zellproliferation sprechen [65, 66, 74] (Abb. 1.6b).

A: MV-infizierte DCs reduzieren Proliferation Lebensdauer bei T-Zellen

B: Kontakthemmung der Proliferation über MV FH + einen unbekanntem Rezeptor

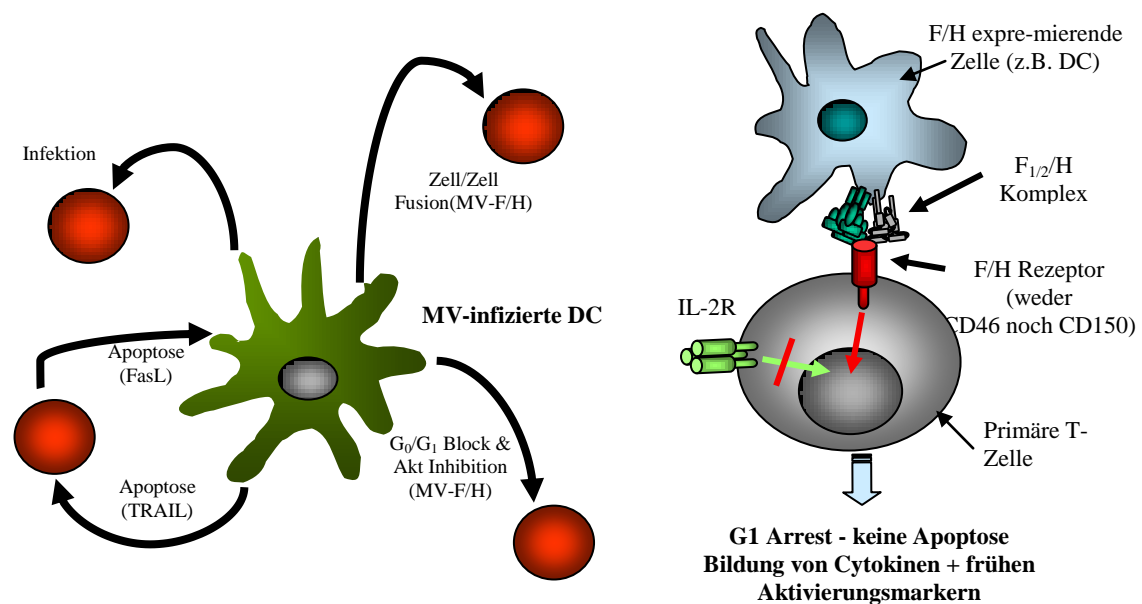


Abb.1.5: Suppression durch das Masernvirus. Verändert nach: Topley + Wilson's Microbiology and microbial infections [8]

1.3. Regulatorische T-Zellen (Tregs)

1.3.1. Was sind regulatorische T-Zellen?

Zu den regulatorischen T-Zellen gehören sehr verschiedene Subpopulationen von T-Zellen. Darunter gibt es neben den so genannten natürlichen regulatorischen T-Zellen und den induzierten regulatorischen T-Zellen, welche verschiedene differenzierbare Subtypen enthalten, noch einige kaum erforschte Populationen auf welche in dieser Arbeit nicht näher eingegangen wird [114, 115]. Diese regulatorischen Zelltypen oder auch Suppressorzellen unterscheiden sich nur gering von „normalen“ T-Zellen,

insbesondere Th-Zellen. Im Gegensatz zu diesen sind sie jedoch nicht ausschließlich dem adaptiven Immunsystem sondern gleichzeitig auch dem angeborenen zuzurechnen [116]. Zunächst wurde ihr Effekt auf cytotoxische T-Zellen (CTL) entdeckt [114], die regulatorischen Zellen selbst wurden erst ab 1990 charakterisiert, als nach der Depletion einer kleinen T-Zellpopulation ($CD25^+CD4^+$) in der Maus die T-Zellaktivität nicht verringert war, sondern die T-Zellen unkontrolliert proliferierten und Autoimmunerkrankungen auslösten [117].

1.3.2. Der Stammbaum der regulatorischen T-Zellen

Manche T-Zellen sind beim Verlassen des Thymus bereits determiniert, als Suppressoren zu wirken; man nennt sie deshalb natürliche Tregs (Trn) und verleiht ihnen den Status einer eigenen Zelllinie [118, 119]. Andere verlassen den Thymus als native Zellen ($nCD4^+$ / $nCD8^+$) und die gegebenen Umstände bestimmen, ob die jeweilige Zelle zu einer normalen Th_1 , Th_2 bzw. CTL Zelle differenziert, oder als periphere regulatorische T-Zelle induziert wird (Abb.1.7) [120]. Die in der Peripherie entstanden Tregs bezeichnet man deshalb als induziert oder adaptiv [121]. Viele typischen T-Zellgene werden in Tregs auf ungewöhnliche Weise exprimiert [122]. Deshalb besitzen sie Eigenschaften, welche für gewöhnliche T-Zellen in verschiedenen Aktivierungsstadien typisch sind.

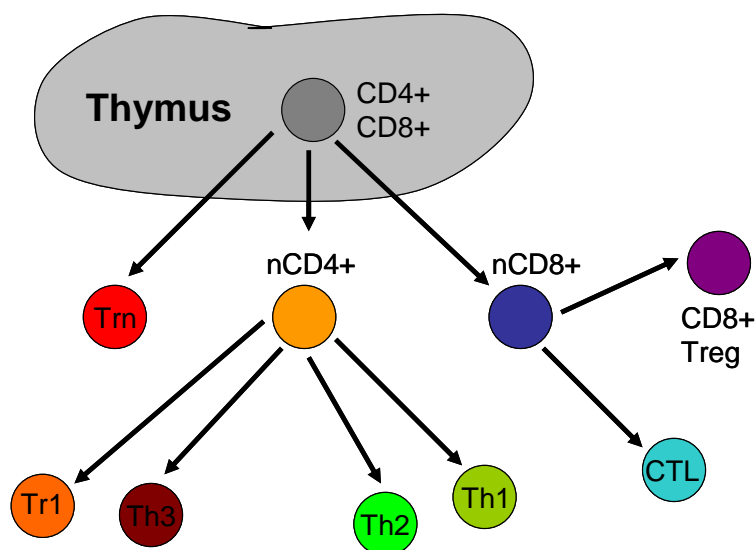


Abb.1.6: Der T-Zell Stammbaum

1.3.3. Entstehung natürlicher Tregs im Thymus

Im Thymus findet während der T-Zellreifung eine Selektion hinsichtlich des exprimierten TCRs (T-cell receptor) statt, dabei werden T-Zellen mit TCRs depletiert, die zu schwach mit MHC-Molekülen interagieren oder eine zu hohe Affinität zu Eigenantigenen zeigen [120, 123]. Die Trn nehmen eine Mittelstellung auf der Affinitätsskala ein und liegen an der Grenzregion zwischen selektierten T-Zellen mit geringer, aber signifikanter Affinität und depletierten T-Zellen mit zu hoher Affinität. Durch die stärkere Affinität (und folglich Stimulation) verlassen sie den Thymus bereits als aktivierte Effektorzellen. So wird effektiv gewährleistet, dass selbstreaktive T-Zellen stets regulatorisch sind (dominante periphere Toleranz) (Abb.1.8) [123, 124]. Induzierte Tregs vermitteln Toleranz gegen fremd eingebrachte Antigene, für die sie spezifisch sind [125]. Aber auch Trn können über Kreuzreaktivität auf spezifische Fremdantigene reagieren [126].

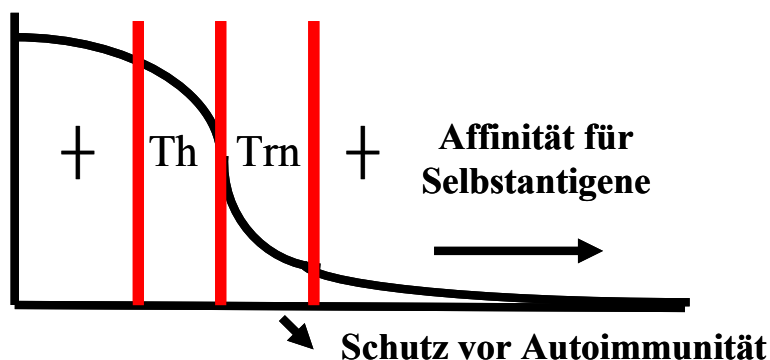


Abb.1.7: Klonale Selektion im Thymus. Verändert nach: Schwarz & Maloy [123, 127]

1.3.4. Tregs steuern die Balance des Immunsystems

Die durch Tregs ausgeübte Aktivitätskontrolle generiert nicht nur eine periphere Selbsttoleranz, sondern hält die schwierige Bilanz zwischen Bekämpfung von fremden bzw. veränderten Stoffen und Zellen und der Immunpathologie [116, 127].

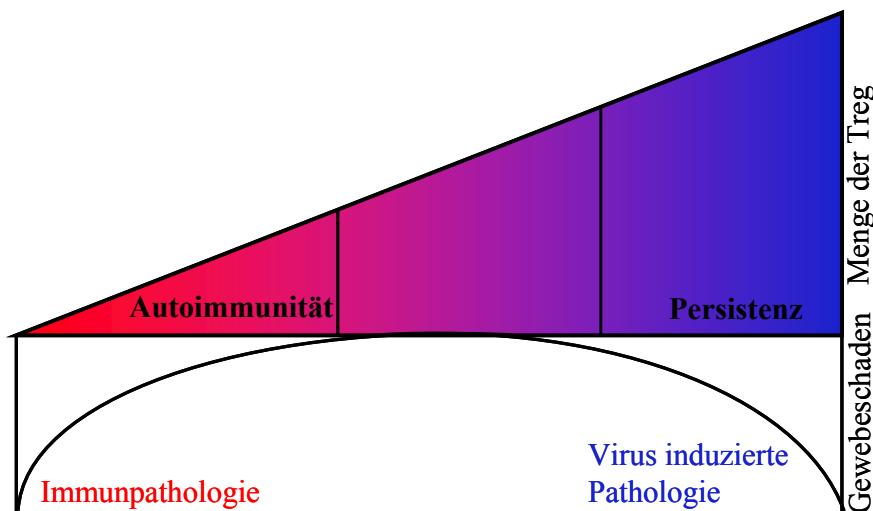


Abb.1.8: Tregs balancieren die Immunreaktion Verändert nach Belkaid [115]

Durch ein Fehlen an Treg vermittelter Suppression kann es demnach zu Autoimmunerkrankungen [128-130], durch das Immunsystem verursachte Gewebeschäden während einer akuten Infektion zur Implantatabstoßung [131] oder zur Ausbildung einer Allergie kommen [132-134]. Dagegen kann ein Übermaß an regulatorischer Aktivität zur Persistenz eines Erregers [135], zu erleichterter Tumorbildung [136, 137], oder zu massiven Gewebeschäden durch Erreger während einer akuten Infektion führen (Abb.1.9). Tregs erfüllen eine teilweise, aber längst nicht vollständig, redundante Aufgaben [135]; zudem spielt die Verteilung der Tregs eine erhebliche Rolle [138].

1.3.5. Anergie

Tregs sind *in vitro* anerg [139] [140], expandieren jedoch *in vivo* etwa nach Stimulation mit Selbstantigen. Ergänzend zu ihrem eigenen reduzierten Proliferationsvermögen regulieren sie die Proliferation von Effektorzellen herab. Dies kommt durch eine Blockierung des Übergangs zwischen der G_0 und der G_1 Phase zustande. Ist ein Individuum tolerant gegen ein Antigen, kann der Transfer seiner Tregs auf ein anderes Individuum dieses ebenfalls tolerant machen. Man nennt dies infektiöse Toleranz [141]. Eine *in vitro* Zugabe von großen Mengen an Il-2 und anderen Cytokinen über so

genannte Feeder Zellen, oder Stimulation mit einem Superagonisten brechen die Anergie der Tregs [142-145]. Während die Proliferation der normalen T-Zellen von der Aktivität der Phospholipase D abhängig ist, gilt dies nicht für die Tregs, was eine spezifische Stimulation dieser Fraktion erlaubt [146]. Weitere Marker für anerge T-Zellen einschließlich Tregs sind die Glycohydrolase CD38, CD5, Neuropilin, LAG3 [147], ein mit CD4 verwandtes Protein, das sich positiv auf die Suppression und negativ auf die Proliferation auswirkt, und die Abwesenheit von CD127 b [148, 149].

1.3.6. Gegenüberstellung natürlicher und induzierter Tregs

Während die natürlichen Tregs (Trn) den Transkriptionsfaktor FoxP3 konstitutiv exprimieren, tun dies die induzierten Tregs (Tr₁ und Th₃), wie normale T-Zellen, allenfalls kurz und schwach nach einer Aktivierung über den TCR. FoxP3 gilt als der Hauptregulator der Gene welche in Trn spezifisch exprimiert werden [119, 150-152]. Er regelt die Expression von CD25, GITR (Glycocorticoid Induced TNTRF Related Gene) und CTLA4 (Cytolytic T Lymphocyte associated Antigen 4) [117]. Die Definition der natürlichen regulatorischen T-Zellen anhand der funktionellen Marker wird jedoch dadurch erschwert, dass alle entsprechenden Genprodukte auch zeitweise auf anderen Zellpopulationen vorkommen können. Entdeckt wurde FoxP3 in so genannten Scurfy Mäusen, die eine Mutation in FoxP3 haben und leicht Autoimmunerkrankungen ausbilden. Manchmal wird diese Krankheit, insbesondere beim Menschen, auch als IPEX (immune dysregulation poliendocrinopathy enteropathy X linked) bezeichnet, da das FoxP3 Gen auf dem X-Chromosom codiert ist.

Ein weiteres Markerprotein, welches konstitutiv auf der Oberfläche von Trn vorkommt, ist **CD25** [153], die alternative und hochaffine α -Kette des aus jeweils drei unterschiedlichen Proteinen bestehenden IL-2 Rezeptors [149]. Trn sind hochgradig abhängig von IL-2, ohne welches sie zwar entstehen können [154], aber schnell an Aktivität verlieren und apoptotisch werden [155, 156]. Für die induzierten Tregs gilt diese Abhängigkeit nicht, sie exprimieren CD25 höchstens kurzzeitig nach Aktivierung [157]. Die Expression von **CD127** dem IL-7 Rezeptor auf Trn ist gering [149]. Dieser ist nämlich ein Aktivator der T-Zell- Proliferation [148].

Im Gegensatz zur Trn-Zelllinie entstehen induzierte Tregs in der Peripherie aus gewöhnlichen CD4 positiven Zellen, haben deshalb keine spezifischen Marker und definieren sich anhand ihrer Cytokinproduktion [157]. Allein die Umstände, unter denen T-Zellen aktiviert bzw. induziert werden, bestimmen, ob sie sich zu Th₁, Th₂, Tr₁ oder Th₃ Zellen entwickeln. Sie sind folglich von einer primären Stimulation abhängig [157].

Bei beiden Typen von Tregs ist die Suppressionswirkung auf andere Zellen Antigen unspezifisch [158]. Die Aktivierung oder Induzierung dieser Zellen kann jedoch sehr wohl spezifisch sein: Die Rezeptoren der Trn sind wie erläutert spezifisch für Selbstantigene, ihre Aktivierung könnte jedoch eher durch einen IL-2 Kreislauf mit negativer Rückkopplung zustande kommen [116]. Induzierte Tregs sind in der Regel spezifisch gegen das Antigen welches durch Stimulation unter tolerogenen Bedingungen zu ihrer Induzierung geführt hat [157] (Tab.1.2, Abb.1.10).

Tab.1.2: Grundlegende Eigenheiten unterschiedlicher Treg-Populationen.

natürliche Tregs (Trn):

- entstehen direkt im Thymus
- FoxP3⁺ CD25⁺, natürlich aktiviert (TCR stimuliert / antigenspezifisch)
- Suppression ist antigenunspezifisch & Kontakt- (und Cytokin-) abhängig

induzierte Tregs (Tr₁, Tr₂ = Th₃)

- konvertiert von peripheren Th-Zellen
- FoxP3⁻ CD25⁻, stimulationsabhängig (TCR stimuliert / antigenspezifisch)
- Suppression ist antigenunspezifisch & rein cytokinabhängig

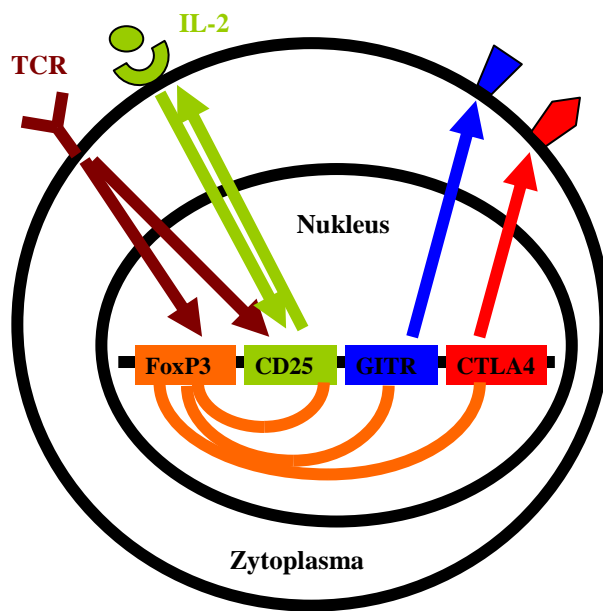


Abb.1.9: Regulation von Treg spezifischen Genen. Verändert nach Sakaguchi [128]

1.3.7. Mechanismen der Treg gesteuerten Suppression

Für die Suppression durch Tregs gibt es grundsätzlich verschiedene Mechanismen [159]: ein kontaktabhängiger Mechanismus (Abb.1.11a), ein cytokinabhängiger Mechanismus der Inaktivierung, das Abtöten von Zielzellen und die Konkurrenz um aktivierende Cytokine. T_{rn} nutzen abhängig von ihrem Aufenthaltsort einen Cytokinsekretion beinhaltenden oder einen rein kontaktabhängigen Mechanismus. Auch wenn der kontaktabhängige Mechanismus noch nicht vollständig verstanden ist, besitzen T_{rn} einige membranständige Proteine mit inhibitorisch signalisierenden Aktivitäten.

CD152, auch als **CTLA-4** (Cytolytic T Lymphocyte associated Antigen 4) bekannt, ist ein Transmembranprotein, das zur TNFR Superfamilie gehört und mit CD28 um die gemeinsamen Bindungspartner B-7 1 und 2 (CD80 und CD86) konkurriert. CTLA-4 wirkt im Gegensatz zu CD28 supprimierend und besitzt eine höhere Affinität [160]. Bei Interaktion werden beide Zellpopulationen, die CD28 / CTLA-4 tragenden T-Zellen und die B7 tragenden APC gehemmt. T-Effektorzellen exprimieren CTLA-4, wenn ihre Aktivität abgeschaltet wird, lediglich T_{rn} exprimieren es konstitutiv. Dabei liegt CTLA-4 in größeren Mengen intrazellulär vor, bis es auf einen Stimulus hin zur Zelloberfläche

transportiert wird [161]. Außerdem ist von CTLA-4 bekannt, dass es die Ausbildung von Lipid Rafts stört und die Produktion von TGF β anregt. Zur CD28 Familie gehören noch einige andere Mitglieder, welche ähnliche Interaktionspaare wie CD28/CTLA4 mit CD80/CD86 bilden [162]. Dies sind das aktivierende ICOS (induzierbarer Costimulator), sowie die hemmend wirkenden Faktoren PD1 (programmed death 1) und BTLA (B + T Lymphozyten Attenuator). Die konstitutive Expression von **B7** auf APCs ist für die kontaktabhängige Suppression und damit für die Trn vermittelte Selbsttoleranz essentiell. Über Stimulation mit Eigenantigenen und B7 wird die Aktivität der Trn aufrechterhalten und deren Apoptose verhindert [160]. **CD27**, der Rezeptor von CD70, ist ebenfalls ein Costimulator, der auf expandierten Trn (sehr suppressiv, schwach proliferierend) stark exprimiert wird [144].

GITR (Glycocorticoid Induced TNTRF Related Gene) ist ein Membranprotein, welches die Apoptose unterbindet und den Resting / Memory- Zustand bei gereiften T-Zellen ermöglicht [163, 164]. Das Protein wird konstitutiv auf Memory-Zellen und Trn exprimiert, sowie transient auf aktivierten Effektor-Zellen. Ox40 (CD134) ein Costimulator [165], 4-1BB und CD27 sind als Mitglieder der TNFR Superfamilie mit GITR verwandt und kommen verstärkt auf Tregs vor.

Trn können **TGF β** zwar unter bestimmten Umständen ausschütten, besitzen jedoch konstitutiv eine Membrangebundene Version. Diese ist neben CTLA-4 eines der beiden Moleküle von denen angenommen wird, dass sie am kontaktabhängigen Suppressionsmechanismus beteiligt sind [166, 167]. Der Rezeptor für TGF β ist konstitutiv auf den meisten Immunzellen exprimiert, während in bestimmten lymphatischen Geweben unreguliert ein geringer Basislevel dieses Cytokins gebildet wird. Der Hauptanteil entsteht jedoch unter tolerogenen Bedingungen [120].

CD154 oder CD40L ist der Ligand von CD40, einem wichtigem Signalmolekül, welches die Aktivierung in Folge einer APC Costimulation reguliert. Möglicherweise ist es ebenfalls an dem kontaktabhängigen Mechanismus beteiligt [168]. **CD45** ist ein Transmembranmolekül welches mit dem TCR-Komplex assoziiert ist und dessen Aktivität reguliert. Es kommt in verschiedenen Splicevarianten vor (RO, RB), die jeweils charakteristisch für einen Aktivierungsstatus der T-Zelle sind und native, Effektor- oder Memory-Zellen charakterisieren [169].

Die Cytokin vermittelte Suppression kommt durch IL-10 und TGF β zustande. Während Tr₁ Zellen vor allem IL-10 produzieren, bilden Th₃ Zellen mehr TGF β (Abb.11) [125]. Unter manchen Umständen tritt eine Inbalanz zwischen Th₁ und Th₂ Zellen auf, welche den gleichen Effekt wie eine Suppression zeigt [170].

Ähnlich wie CTL, NK- (natürliche Killerzellen) und NKT –Zellen (natürliche Killer-T-Zellen) können manche Tregs Zellen über den Granzym-Perforin-Reaktionsweg zerstören. Des Weiteren sind aktivierte T-Zellen sowie Trn auf IL-2 angewiesen. Da Trn durch die CD25 Kette einen weit effektiveren IL-2 Rezeptor besitzen, binden sie einen erhöhten Anteil des produzierten IL-2 und können so theoretisch die Aktivität der Effektor T-Zellen begrenzen [114]. Manche Subsets regulatorischer Zellen verwenden situationsabhängig verschiedene Mechanismen und produzieren unterschiedliche Cytokine [114,171] (siehe Abb.1.11b):

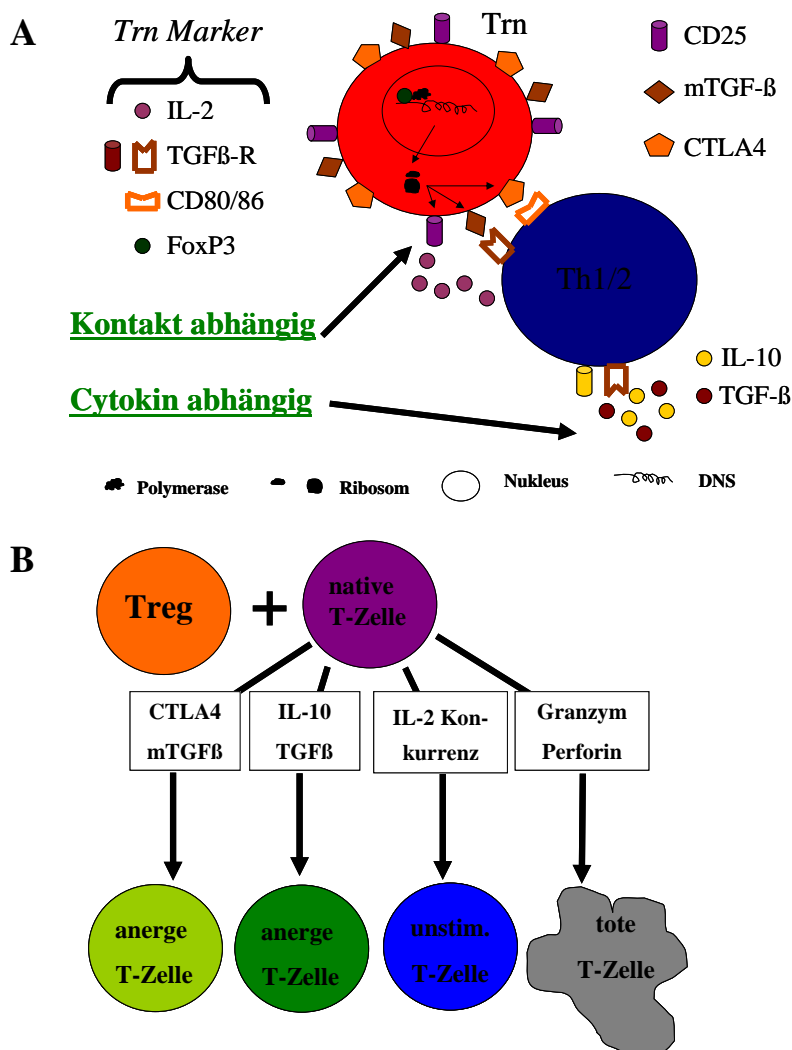


Abb.1.10: Suppressionsmechanismen regulatorischer T-Zellen.

1.3.8. Homing und ortsabhängiger Suppressionsmechanismus der Trn

Während die Trn in sekundärem lymphatischem Gewebe, für die Suppression der Ausreifung nativer T-Zellen zuständig sind, supprimieren sie im infizierten peripheren Gewebe vor allem ausgereifte Effektorzellen. Der Mechanismus im Lymphgewebe ist dabei kontaktabhängig, während er außerhalb sowohl kontakt- als auch cytokinabhängig stattfindet (Abb.1.12) [126]. Zudem findet die Hemmung der T-Zellen im Lymphknoten stets indirekt über eine Dreieckskonstellation aus Dendritischer Zelle, nativer T-Zelle und regulatorischer Zelle statt, in der Peripherie nur sporadisch. Der Übergang von den Lymphknoten in die infizierten Gewebe setzt eine Stimulation des TCRs voraus, gefolgt von einer Aktivierung und einem Integrin- und Chemokinrezeptorswitch (CCR7 → CD103 und CCR5). Kreuzreaktive Trn bilden die Mehrzahl natürlicher Tregs im peripheren Gewebe. In der Haut sind mehr und aktivere Trn zu finden, als in den Schleimhäuten [172]. Die das Homeing beeinflussenden Proteine gehören zur Gruppe der Integrine (CD11a / CD18 / CD49d, CLA, Integrin $\beta 7$ CD103), Selektine (CD62L oder L-Selectin) und Chemokinrezeptoren (CXCR3/5, CCR4/5/6/7/9) [172, 173].

Tr₁ und Th₃ Zellen lassen sich an ihrer Integrinausstattung unterscheiden ($\beta 7$ - Tr₁ / $\alpha 4\beta 7$ - Th₃).

In sekundärem Lymphgewebe:

- Suppression nativer TCs
- kontaktabhängig
- indirekt über DCs

Im periphären Gewebe:

- Suppression von Effektorzellen
- (kontakt-) / cytokinabhängig
- direkt / indirekt über APCs

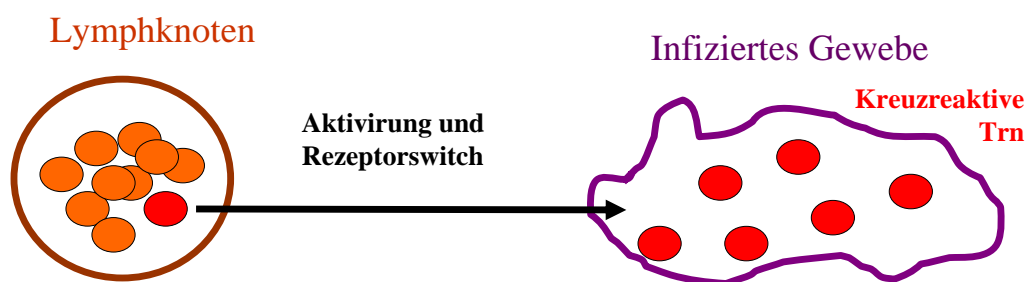


Abb.1.11: Ortsabhängiger Suppressionsmechanismus von Trn

1.3.9. Aktivierung und Induktion regulatorischer T-Zellen

In der Peripherie sind Trn für ihr Überleben und das Aufrechterhalten ihres suppressiven Potenzials auf ständige Aktivierungssignale angewiesen, welche auch deren Expansion auslösen können. Dies wird durch IL-2 und Eigenantigen gewährleistet. Auf eine IL-2 Schwemme oder massive Gewebeerstörung folgt eine rasche Mobilisierung der Trn [153-156]. Eine Aktivierung kann auch durch Kontakt mit unreifen, IL-10 bzw. Vitaminbehandelten oder falsch ausgereiften DCs [174-176] oder mitogen durch applizierte Antikörper zustande kommen [177]. Trn exprimieren im Gegensatz zu normalen T-Zellen die TLRs (Toll like Receptor) 4, 5, 7 und 8 [178]. Diese erkennen allgemeine mikrobielle Bestandteile wie Flagellin und LPS (Lipo-Polysaccharid, Zellwandbestandteil von Bakterien). Eine Stimulation mit LPS etwa fördert Überleben, Proliferation und Suppressionseffizienz der Trn.

Für die Induktion regulatorischer T-Zellen gibt es zahlreiche potenzielle Ursachen [125, 179-182]. Massives Antigen oder ein konstant niedriger Zustrom von Antigenen kann induzierend wirken. Abhängig von Dosis und Expositionsdauer des vorliegenden Antigens kann eine Präsentation durch verschieden stimulierte DC ziemlich unterschiedliche Wirkungen entfalten [183]. Liegt etwa kein Adjuvanz vor, können hohe Dosen an Antigen eher die Abtötung spezifischer T-Zellen anstatt deren Induktion zu Tregs (TR₁ und Th₃) bedingen. Von mit IL-10 und TGFβ stimulierten DC ist bekannt, dass sie selbst zu IL-10 Produzenten werden und Treg expandieren können. Repetitive Stimulation unter Anwesenheit hemmender Cytokine (IL-10, TGFβ) kann ebenso zur Expansion von Treg führen [184, 185]. Vor allem die Erzeugung von Th₃ Zellen und die TGFβ Produktion hängen davon ab. IL-10, IL-4, TGFβ (Rückkopplungseffekt) und INFα/β wirken sich positiv auf die TGFβ-Sekretion, INFγ negativ darauf aus. In vitro wurden bereits Tr₁ Zellen durch eine Coligation von CD3 und CD46 mittels präsentierter MV-Epitope und H-Protein erzeugt [50, 186], worin verschiedenen Kinasen involviert waren [187] (Tab.1.3). (Bedingungen welche durch MV-Infektion beeinflusst werden können sind rot hervorgehoben.)

Tab.1.3: Aktivierung von Tregs

Induktion (Tr1 + Th3): - Immunsuppressiva - massives (Eigen-) Antigen - Trns oder iDCs/ falsch gereifte DCs - repetitive Stimulation + IL-10 (+TGF β) - CD3/CD46 Co-Ligation (Tr1) - IL-10 + INF α/β (Th3) - (Alterung/ vitaminbehandelte DCs)	Aktivierung/ Verstärkung (Trn): - selbst-/ kreuzreaktive Antigene/ TCR - IL-2 (apoptosehemmend) - iDCs/ falsch gereifte mDCs - CD28 + CD3 + IL-2 + Feeder-Zellen - CD28 Superagonist
---	---

1.4. Regulatorische T-Zellen in Virusinfektionen**1.4.1. Natürliche regulatorische T-Zellen**

Trn spielen zumindest bei manchen Virusinfektionen eine zentrale Rolle [115]. In Folge von Infektionen ist mit einem Anstieg von freiem Eigenantigen durch Zellschädigung und mit von aktivierten T-Zellen gebildeten IL-2 zu rechnen. Zudem können die Trn auch durch Infektion oder Regulation direkt zum Ziel der Pathogene werden (Abb.1.13): Bei HIV ist speziell die gewebespezifische Frequenz der Trn verändert. So ist deren Zahl in den Schleimhäuten erhöht, im Blut jedoch nicht [138]. Von verschiedenen Viren wie HIV, HSV und CMV ist bereits bekannt, dass sie Trn direkt durch Infektion beeinflussen [188, 189]. Diese Infektion verläuft bei ihnen, im Vergleich zu anderen T-Zellen, präferenziell und produktiv [190]. Oft sind Viren auf Effektorzellen angewiesen, da diese sich aufgrund ihrer Proliferation nicht in der G₀-Phase, sondern im Zellzyklus befinden. Trn liegen von Natur aus in einer Art aktiviertem Zustand vor und tragen alle typischen Marker gereifter T-Zellen (z.B. den HIV Rezeptor CCR5). Von FIV ist bekannt, dass es infizierte Trn phänotypisch aktiviert und in ihnen persistiert [191, 192]. So unterdrücken die Trn einerseits die Bekämpfung des Virus, andererseits bilden sie ein Reservoir, das ständig neues Virus in den Wirt ausschüttet. Die Zahl der Trn ist in diesem Fall verdoppelt. Es ist eine deutliche Immunsuppression und sehr häufig auch eine Persistenz zu beobachten [135].

Die Infektion von Trn kann demnach zu zwei völlig verschiedenen Ergebnissen führen, nämlich zur Aktivierung, Proliferation und Reservoirbildung, oder zur Depletion und zum funktionellem Verlust der Zellen. Beide Ergebnisse können für den Erreger von Vorteil sein und beide könnten zu Komplikationen führen, die auch für eine Infektion mit dem Masernvirus bekannt sind: auf der einen Seite die Persistenz (SSPE) auf der anderen Seite die Autoimmunerkrankung (Masern Enzephalitis).

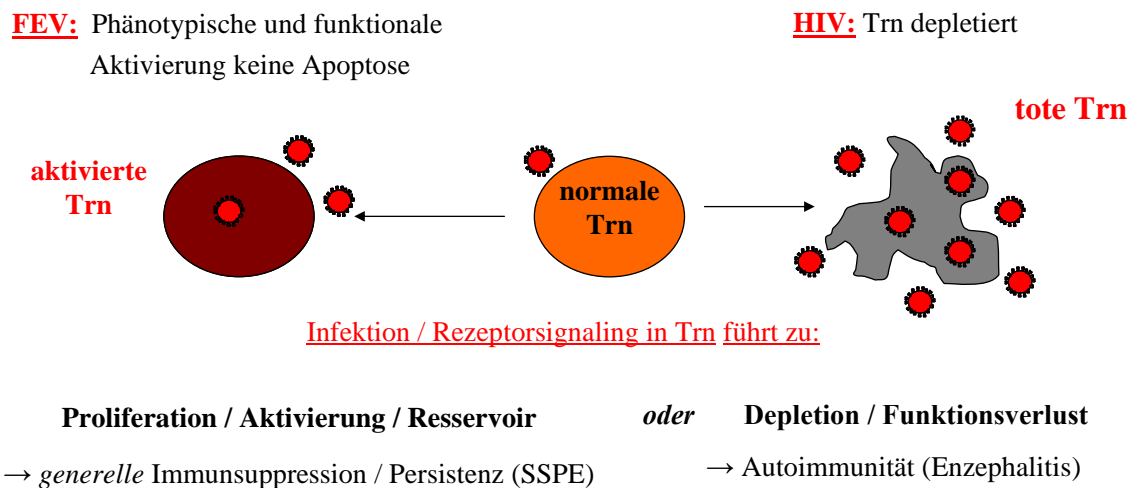


Abb.1.12: Virusinfektion von Trn.

1.4.2. Induzierte regulatorische T-Zellen

Mittlerweile wurde gezeigt, dass Pathogene jeglicher Art, ob Viren, Bakterien [193], Pilze [194, 195] oder Parasiten [196-198] zur Induktion von Tregs (Tr_1) führen können, welche ihren TCR nach pathogenspezifisch sind. Sind diese inhibitorischen Zellen zu zahlreich, fördert dies die Ausbildung chronischer Infektionen. Ebenso wurde gezeigt, dass das von $CD4^+$ T-Zellen produzierte Cytokinmuster (zumindest bei den verglichenen Viren) bei akuten und chronischen Infektionen Unterschiede ausweist [85]. In EBV wurde gezeigt, dass IL-10 produzierende Tregs die Immunantwort gegenüber dem Erreger dominieren [199]. Das Virus ist vom suppressiven Effekt des IL-10 abhängig. Von CMV ist sogar bekannt, dass es selbst ein Homolog zu IL-10 produziert, welches die Immunreaktion einerseits direkt hemmt und andererseits über eine Rückkopplungsschleife IL-10 sezernierende Tregs und pseudounreife DCs entstehen lässt [199].

Ob das Virus von iDCs, Tregs oder beiden abhängig ist, bleibt jedoch noch unbekannt. Bei HCV ist dagegen bekannt, dass die virusspezifischen Th₁-Zellen und induzierten Tregs die selben Epitope erkennen [200]. Es existieren jedoch auch Epitope, welche entweder INF γ oder IL-10 produzierende Zellen induzieren [201].

1.4.3. Tregs und Masern Virus Pathogenese

Während einer MV-Infektion treten wie unter Kapitel 1.2 beschrieben eine ganze Reihe von Umständen auf, die mit einer Induzierung oder Aktivierung von Tregs einhergehen können (vergl. Tab.1.3: Umstände die sowohl Tregs aktivieren bzw. induzieren, als auch mit einer MV-Infektion einhergehen, sind rot hervorgehoben). Ausgehend von diesen Befunden könnte man ein Mitwirken der Tregs an der Immunsuppression und an der Entwicklung einer Enzephalitis postulieren. Denkbar wäre zudem eine direkte Infektion von Trn bzw. eine Trn spezifische Signalgebung über CD150, falls die Trn eine erhöhte Expression von CD150 aufweisen. Bei stimulierten Trn wurde die Expression bereits nachgewiesen [202]. Die Folge könnte ein aktivierender oder depletierender Effekt auf diese Population sein, wie er bereits von anderen Viren bekannt ist (siehe Abb.1.13), und die Ausbildung von SSPE oder einer Enzephalitis begünstigen. Die Interaktion zwischen Trn und Masernvirus wurde zudem in transgenen Mäusen untersucht welche das humane CD150 exprimieren. Die Modellorganismen erwiesen sich als hochempfindlich gegenüber einer intranasalen Infektion, welche mit einer starken Anreicherung von Trn einherging [203].

2. Aufgabenstellung

Regulatorische T-Zellen kontrollieren durch Hemmung anderer Immunzellen den Ablauf von Immunreaktionen und die Toleranz gegenüber Eigenantigenen. Ein Ungleichgewicht bezüglich der Zahl und Aktivität regulatorischer T-Zellen kann mit Immunsuppression, Autoimmunreaktionen und der Ausbildung von Persistenzen einhergehen. Vorangegangene Untersuchungen haben gezeigt, dass Tregs zumindest bei der Etablierung mancher Virusinfektionen eine zentrale Rolle spielen. Es kann sowohl zu einer Depletion von Trn, als auch zu einer Zunahme der Aktivität und Frequenz unterschiedlicher Subtypen regulatorischer T-Zellen kommen.

Das MV ist ein immunsuppressiver Erreger, welcher mit einer Vielzahl von Mechanismen in die Immunantwort seines Wirtes eingreift. Während einer MV-Infektion treten eine ganze Reihe von Umständen auf, die mit einer Induzierung oder Aktivierung von Tregs einhergehen können. Diese beinhalten die Freisetzung von massivem (Eigen-) Antigen, unreife bzw. falsch ausgereifte DCs, repetitive Stimulation unter Gegenwart von IL-10, CD3/ CD46-Coligation sowie die Expression von IL-10 und $\text{INF}\alpha/\beta$. Ein Beitrag der Tregs zur MV-vermittelten Suppression und bei der Ausbildung von Persistenzen (SSPE) ist deshalb denkbar.

Trn befinden sich aufgrund ihrer Affinität zu Eigenantigenen in einem voraktivierten Status und tragen verschiedene Aktivierungsmarker. Falls dies auch den MV-Eintrittsrezeptor CD150 einschließt, könnte es zu einer Rezeptorinteraktion und, wie bereits bei anderen Viren gezeigt, zu einer präferentiellen Infektion von Trn kommen. Dies kann sowohl eine Aktivierung als auch eine Depletion unter Ausbildung einer Autoimmunreaktion zur Folge haben. Eine Korrelation zwischen Trn-Depletion und der MV-Enzephalitis könnte auftreten.

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob es während einer MV-Infektion zu einer Zunahme in der Frequenz und Aktivität oder zu einer Depletion regulatorischer T-Zellen kommen kann, und ob diese Änderungen mit dem Verlauf der Infektion in Zusammenhang stehen.

Zu diesem Zweck wurden in vitro Infektionsversuche mit Trn durchgeführt, sowie Probenmaterial von Patienten mit unterschiedlichem Infektionsverlauf (Vaccinierung, akute Infektion, SSPE, Enzephalitis) auf Vorkommen und Aktivität regulatorischer T-Zellen untersucht.

.

3. Material

3.1. Geräte

- **Beta-Plate**, Perkin Elmer
- (- Bestrahlungskammer)
- **Binokular**, Leitz
- **Brutschrank**, Nuair
- **Elektrophoreseapparat**,
- **Western Blot Kammer und Zubehör**
- aus institutseigener Werkstatt
- ELISA Reader, ELISPOT Reader
- (- Elutra Zentrifuge)
- **FACS Gerät**, BD Calibur / Scan
- **Feinwaage**, Sartorius MC1
- **Heizblock**, Liebisch
- **Laborwaage**, Ohyo Electronic Balance
- **Light Cycler**, Roche
- **Magnetrührer**, GLW M23
- **MACS**: Vario MACS mit Adaptern, Midi MACS, Mini MACS, Auto MACS: Miltenyi
- **Mehrkanalpipetten**, Flow laboratories
- **Mikroskop** (Licht-), Leitz Labovert
- **Mini-Rüttler / Wippe**, Ika Vibrax VXR
- **PCR Gerät** (klassisches), Eppendorf
- Mastercycler
- **Photometer**, Eppendorf
- **Pipetten**, Eppendorf
- **Plattenzentrifuge**, Eppendorf 5403
- **Rotator**, Hartenstein
- **Stablampe**, Leitz
- **sterile Arbeitsbank**, Nuair
- **Trockenschrank**, Köttermann
- **Ultrazentrifuge**, Sorvall 90 SE,
- Schwingrotor Surespin 630
- **Vortexer**, GLW L46
- **Wasserbad**, GFL
- **Wippe**, Edmund Bühler WS5
- **Zellharvester**, Tomtec
- **Zentrifugen** (Tisch- und Stand-), Eppendorf,
- Hettich Rotixa /P und KS,
- Heraeus Biofuge A / 13,
- Beckmann J2MC

3.2. Verbrauchsmaterialien

Die Verbrauchskemikalien wurden von den Firmen Sigma, Gibco, Serva, Merck, Amersham Biosciences und Roth bezogen. Steriles Einwegmaterial wurde von den Firmen Miltenij Eppendorf, Falcon, Greiner, Nunc und Hartenstein bezogen.

3.3. Zellen und Viren

3.3.1. Zellen

Die verwendeten Zelllinien (Tab. 3.1) einschließlich der Hybridome (CD46, CD150, MV-H oder MV-N) standen im Institut zur Verfügung.

Tab. 3.1: Zelllinien.

ZELLINIE	ZELLTYP	HERKUNFT
Vero	Nierenfibroblastenzelllinie	Afrikanische Grüne Meerkatze (ATCC)
BJAB	Lymphoblastoide B-Zelllinie	Human
B95a	Semiadhärente B-Zelllinie	Krallenaffe (ATCC)

Primäre Lymphozyten für die allgemeine Charakterisierung der Tregs und für die Versuchsetablierung wurden vom Institut für Transfusionsmedizin, Würzburg als Leuka-phereseblut bereitgestellt. Gemäß den in Kapitel 4 beschriebenen Protokollen wurden daraus T-Zellen und Monozyten isoliert und gereinigt. In Einzelfällen wurde Vollblut von gesunden Spendern abgenommen und die PBMC über Ficollgradienten aufgereinigt. Patientenzellen sowie juvenile Kontrollen wurden von Prof. Kreth (Kinderklinik Würzburg) und von der Mönchsbergklinik als Vollblut bereitgestellt und nach Erhalt per Ficoll aufgereinigt oder schon als gereinigte PBMC bezogen. Außerdem wurde primäre Zellen vom Affen (*Cynomolgus*) von Rik de Swart (Virologie Rotterdam) für Studien zur akuten MV-Infektion, Vaccinierung und Challenge vaccinierter Individuen bereitgestellt.

3.3.2. Virusstämme

Die Masernvirusstämme ED und WTF waren im Labor vorhanden. Wurden sie mittels Ultrazentrifugation gereinigt, ist dies am Kürzel UZ zu erkennen (z.B. WTF-UZ). ED wurde als attenuierter Impfstamm und CD46 bindendes Virus, WTF als CD150 spezifischer Wildtypstamm verwendet. Für beide wurde jeweils auch eine MOCK-Präparation angesetzt, welche analog zur Viruspräparation aus nicht infizierten Zellen hergestellt wurde.

3.4. Medien und Lösungen

Alle Zellkulturmedien, ATV und PBS stammen aus der hauseigenen Medienküche. Das fetale Kälberserum (FKS) wurde vor der Verwendung 1h zur Inaktivierung des Komplements bei 56 °C erhitzt. Das Antibiotikum PenStrep wurde von Bayer bezogen. Als Ausgangsmedium für die angesetzten Lösungen wurden Tris, PBS oder H₂O verwendet.

Zellkultur:

<u>RPMI</u>	<u>MEM</u>	<u>ATV</u>
RPMI 1640 Basis	MEM Basis	0.05 % w/v Trypsin
2 mM L-Glutamin	2 mM L-Glutamin	0.8 % w/v NaCl
100 IE/ml Penicillin	100 IE/ml Penicillin	0.04 % w/v KCl
100 µg/ml Streptomycin	100 µg/ml Streptomycin	0.1 % w/v D-Glukose
0, 5, 10 oder 20 % FKS	5 % FKS	0.058 % w/v NaHCO ₃
		0.02 % w/v EDTA

Einfrriermedium

90 % FKS & 10 % DMSO

Virusherstellung:NTE-Puffer (1 x)

100 mM NaCl
1 mM EDTA
10 mM Tris pH 7.4

Saccharoselösungen in NTE

25 % w/v Saccharose
30 % w/v Saccharose
54 % w/v Saccharose
60 % w/v Saccharose

Leukapherese:Alsevers / Versene

8.0 g/l w/v Natriumcitrat,
pH 6.1
0.55 g/l w/v Zitronensäure
4.2 g/l w/v NaCl
20.5 g/l w/v D-Glukose

AET

2 % w/v AET in ddH₂O,
pH 9.0 sterilfiltriert
(0,2 µl Filter)

Erythrozyten-Lyse-
Puffer

155 mM NH₄Cl
10 mM KHCO₃
0.1 mM EDTA

Versuche:FACS-Puffer

0,4 % BSA
0,02 % Natriumazid
in PBS (-Mg -Ca)

1,5 mM MgCl₂

TAE 50 x / TBE 10 x

242 g Tris / 216 g Tris
57,1 ml Eisessig /
110 g Borsäure

6 x Probenpuffer

0,5 M Tris pH 6,8
0,4 % SDS

Saponin-Puffer

0,33 % Saponin in
FACS-Puffer, pH 7,4

100 ml 0,5 M EDTA /

80 ml 0,5 M EDTA
mit H₂O auf 1 l, pH 8,0 /
mit H₂O auf 2 l

6 ml Glycerol

0,6 ml β-ME
2,4 mg Bromphenol
Blau

Zellysepuffer

50 mM TrisCl, pH 8,0
140 mM NaCl
0,5 % Nonidet P-40

(Gelpuffer = 1 x TEA /
TBE)

auf 20 ml mit H₂O

BSS-BSA:

Zunächst wurden zwei Basislösungen hergestellt (BSS1 und BSS2). Diese wurden vor Gebrauch gemeinsam in H₂O verdünnt (12,5 % BSS1 12,5 % BSS2 75 % H₂O) und mit 0,2 % BSA versetzt.

BSS1:

50 g Glucose
3 g KH₂PO₄
11,9 g NaH₂PO₄
0,4 g Phenolrot
auf 5 ml mit H₂O

BSS2:

9,25 g CaCl₂
20 g KCl
320 g NaCl
10 g MgCl₂
10 g MgSO₄
auf 5 ml mit H₂O

Percoll-Dichtegradient:

Ein Percoll-Dichtegradient wurde mit Percoll einer Stammkonzentration von 1,129 g/ml (Amersham Biosciences) nach folgendem Schema hergestellt:

für 10 ml 1.076 g/ml: 1 ml 1.5 M NaCl + 5.442 ml Percoll.

für 10 ml 1.059 g/ml: 1 ml 1.5 M NaCl + 4.124 ml Percoll.

für 10 ml 1.045 g/ml: 1 ml 1.5 M NaCl + 3.039 ml Percoll.

Herstellung der AET-SRBC-Lösung:

Zehn Flaschen SRBC wurden in 50 ml Röhren zentrifugiert (2000 rpm, 7 min, RT), anschließend wurden je vier Pellets in Alsevers resuspendiert, mit selbigem auf 50 ml aufgefüllt und erneut zentrifugiert (2000 rpm, 7 min, RT). Das SRBC-Pellet wurde mit AET-Lösung versetzt und für 20 min im Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die SRBC-Lösung mit kaltem PBS auf 50 ml aufgefüllt und zentrifugiert (1500 rpm, 10 min, RT). Der Waschschrift wurde zweimal wiederholt. Die gewaschenen Pellets, je ca. 2 ml SRBC-Lösung, wurden in 48 ml RPMI/10 % FKS resuspendiert, wodurch sich eine 4 %ige AET-SRBC-Lösung ergibt. Die Lösungen wurden bis zum Verbrauch bei 4 °C aufbewahrt und vor jeder Leukapherese frisch angesetzt.

Ansetzen der Zellkulturmedien:

1 Flasche Mediumbasis (ca. 450 ml), 0, 25, 50 oder 100 ml FCS

(vorher inaktiviert: 1 h bei 56 °C)

15 ml Puffer (NaNO₃) + 1 Röhrchen PenStrep oder Ciprobay

(bei Mykoplasmenkontamination)

3.5. Antikörper und Reagenzien**Antikörper:**

Zunächst ist die Spezifität des Antikörpers bzw. der Name der Reagenz dann eine eventuell vorhandene Markierung und schließlich ein Kürzel der Firma (siehe nachfolgende Abkürzungslegende) von der er / sie bezogen wurde aufgeführt:

Firmenabkürzungen:

BD: Becton Dickinson	M: Miltenij
RD: R+D Systems	Ite: Immunotech
BC: Becton Coulter	Ito: Immunotools
PH: Pharmingen	Ca: Caltac
N: Natutec	Tg: Tegenaro

CD 3	PH	CD 25 PE	Ca
CD 3 FITC	PH	CD 27 PE	PH
CD 3 PE	BD	CD 28	PH
CD 4 FITC	BD	CD 28SA	Tg
CD 4 PE	BD	CD 46 (K88)	/
CD 8 FITC	BC	CD 56 PE	PH
CD 11c FITC	PH	CD 69 PE	PH
CD 14 FITC	Ite	CD 80 PE	Ite
CD 14 APC	PH	CD 83 FITC	PH
CD 16 PE	PH	CD 86 FITC	PH
CD 19 FITC	PH	CD 150 (5C6)	/
CD 25 PE	M	CD 152 APC	PH
CD 25 PE	PH	HLA-DR APC	PH

HLA-DR PerCP	BD	TGFβ	PH
HLA-DR FITC	Ite	FoxP3 FITC	N
MV-H (K83)	/	GAM	PH
MV-H Bio	/	GAM FITC	PH
MV-N (S227)	/	GAM PE	Ite
MV-N Bio	/	Strept FITC	PH
GITR	/	Strept PE	PH
GITR PE	RD	Strept APC	PH
IL-2 FITC	BD	Isotyp human	PH
IL-4 PE	PH	Isotyp mouse	PH
IL-10 PE	BD	Isotyp rat	PH
IL-12 FITC PE	PH	Annexin 5 FITC	Ito
INFγ FITC	PH	Annexin 5 FITC	PH
INFγ Bio	PH	Annexin 5 PE	PH

Reagenzien:**Farbstoffe:**

Trypanblau, Merck
 PI, Sigma
 7AAD, Calbiochem
 CFSE, Molecular Probes
 Bromphenolblau, Sigma
 Phenolrot, Merck

Spezielle Färbelösungen:

FoxP3 Puffer, NatuTec
 Annexinpuffer, BD

RNA / DNA Gele:

Ladepuffer (6x / siehe Lösungen)
 1kb Marker, Generuler Fermetas

Cytokine:

IL-2, Promo Cell
 IL-10, Promo Cell
 IL-4, Promo Cell
 GM-CSF, Belex

Sonstiges:

BFA, Sigma
 PFA, Sigma
 LPS, Sigma Aldrich
 FIP, BachemBSA, Appllichem
 FCS, Seromed
 Penicillin, Medienküche
 Streptavidin, Medienküche
 Ciprofloxacin, Bayer
 β-Mercaptoethanol, Appllichem
 NP-40, Calbiochem

PMA, Calbiochem

SDS, Serva

PHA, Sigma

EDTA / EGTA, Sigma

Ionomycin, Calbiochem

3.6. Verwendete Kits

- PCR-Kid, Light Cycler
- puReTaq Ready-To-Go PCR Beads, GE Healthcare
- RNeasy Kit, Qiagen
- Illustra RNAspin RNA Isolation Kit, GE Healthcare
- Omniscript Reverse Transcription Kit, Qiagen
- FoxP3 Staining Kit, NatuTec
- Annexin5 Staining Kit, BD
- 2 ELISA Kits / 3 ELISPOT-Kits, RD:
- für INF γ / IL-10 bzw. IL-2 / IL-10 / TGF β

3.7. Ergänzungsmaterialien zu den Kits

- DNaseI , Fermentas
- OligoT- und Randomprimer, Fermentas
- RNasin RNase Inhibitor, Promega
- ELISA- / ELISPOT –Puffer (nach den Angaben der Kits)

4. Methoden

4.1. Kultur

4.1.1. Kultur von Zelllinien

Vero-Zellen wurden in MEM (5 % FKS) kultiviert, zweimal pro Woche mit 10 ml 37 °C warmen ATV von der Kulturflasche abgelöst, in frischem Kulturmedium resuspendiert und 1:5 verdünnt in einer neuen Kulturflasche ausgesät. BJAB-Zellen wurden in RPMI (10 % FKS) kultiviert. Zum Teilen der Zellen wurden diese zweimal pro Woche zentrifugiert (5 min, 1600 rpm, RT), der Überstand verworfen, das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und 1:10 auf neue Kulturflaschen verteilt. B95a-Zellen wurden in RPMI (5 % FKS) kultiviert und einmal pro Woche durch warmes ATV von der Kulturflasche abgelöst, in Medium resuspendiert und 1:10 auf neue Kulturflaschen verteilt. Hybridom-Zellen wurden in RPMI (10 % FKS) kultiviert und einmal pro Woche durch warmes ATV von der Kulturflasche abgelöst, in Medium resuspendiert und 1:10 auf neue Kulturflaschen verteilt.

4.1.2. Reinigung von primären humanen Lymphozyten

Je nach Herkunft und Verfügbarkeit der Zellen bzw. dem Bedarf an verschiedenen Subpopulationen wurden die primären Zellen auf unterschiedliche Arten gewonnen und aufgereinigt. Die Leukaphereseaufreinigung mittels der Elutra-Zentrifuge war erst im späteren Verlauf verfügbar.

4.1.2.1 Reinigung aus Leukapherese-Präparaten

A) Isolierung von PBMC:

Bei der Isolation von peripheren Blutlymphozyten durch Zentrifugation über einen Ficoll-Hypaque-Dichtegradienten, wird die Trennung mononukleärer Zellen und anderer Komponenten des Blutes aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte genutzt. Aufgrund höherer Dichte lagern sich Erythrozyten, polymorphkernige Leukozyten und

Granulozyten im Zentrifugationsrückstand als Pellet an. Die weniger dichten mononukleären Zellen (PBMC) wie Lymphozyten (B- und T-Lymphozyten), NK-Zellen und Monozyten sammeln sich als Interphase oberhalb der Ficollschicht (siehe Abb.4.1).

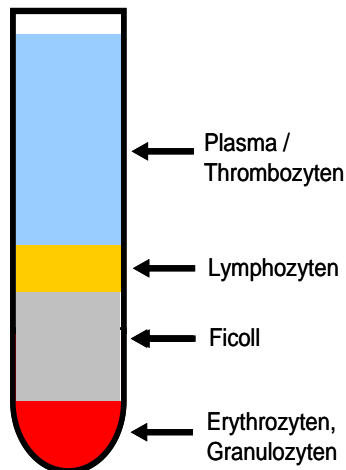


Abb.4.1: Isolation von Blutkomponenten über einen Ficoll-Hypaque-Gradienten

Humane PBMC wurden aus dem Blut gesunder Spender isoliert. Heparinisiertes Blut wurde im Verhältnis 1:2 mit Versen verdünnt und in 50 ml Rörchen in Portionen von 30 ml auf 9 ml Ficoll vorsichtig überschichtet und durch Zentrifugation aufgetrennt (1200 rpm, 30 min, RT, ohne Bremse). Die Interphase oberhalb des Ficoll wurde mit einer Pasteurpipette abgesaugt, in 50 ml Rörchen verteilt, mit PBS aufgefüllt und zentrifugiert (1200 rpm, 10 min, RT). Zum Ausdünnen des mitgeführten Ficolls wurde der Waschschrift zweimal wiederholt. Vor dem letzten Waschschrift wurden 20 μ l als Probe für eine FACS-Färbung und zur Bestimmung der Zellzahl entnommen. Circa 1/3 der PBMC wurden in kaltes Einfriermedium mit einer Zellzahl von 2 oder 5×10^7 /Rörchen in Einfrierboxen bei -80 °C oder 1 h bei -20 °C eingefroren und bei -80 °C aufbewahrt. Die restlichen 2/3 der PBMC-Fraktion wurden zur Isolation von Monozyten und T-Zellen eingesetzt.

B) Isolation von T-Zellen durch Rosettierung:

Die Rosettierung beruht auf dem Prinzip, dass der CD2-Rezeptor auf der Oberfläche von T-Zellen an Schaferythrozyten bindet (SRBC=*sheep red blood cells*) und separiert

somit die Zellen in T-Zellen (E-Rosettierung-positiv) und in nicht-T-Zellen (E-Rosettierung-negativ). Dabei erhöht die Behandlung von SRBC mit 2-Aminoethylisothiuronium-hydrobromid-Lösung (=AET) die Bindung von SRBC an T-Zellen. Für die Rosettierung wurden in 50 ml Röhren je 13 ml 4 % frisch angesetzte AET-SRBC-Lösung + 7 ml eiskaltes PBS + 30 ml PBMC-Suspension (3×10^8 PBMC) zugegeben, durch Invertieren vorsichtig durchmischt und zentrifugiert (1000 rpm, 5 min, 4°C). Anschließend wurden die Pellets auf Eis gestellt und für 1 h inkubiert. Nach beendeter Inkubation wurden die Pellets vorsichtig durch Rollen resuspendiert. Die Suspensionen wurden in 50 ml Röhren auf Ficoll überschichtet und zentrifugiert (120 rpm, 30 min, RT).

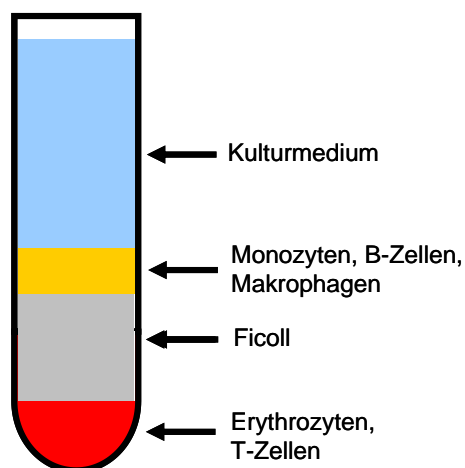


Abb. 4.2: Isolation von SRBC über einen Ficoll-Hypaque-Gradienten.

Durch die Zentrifugation sammeln sich Monozyten in der Interphase oberhalb des Ficoll. Im Pellet befinden sich T-Zellen (Abb. 4.2). Die Interphase wurde mit einer Pasteurpipette abgenommen, in neue 50 ml Röhren überführt, mit PBS verdünnt und zentrifugiert (1200 rpm, 10 min, RT). Die dabei erhaltenen Pellets (Monozyten) und die Pellets aus dem Ficoll-Gradienten (T-Zellen) wurden mit je 3 ml Erythrozyten-Lyse-Puffer versetzt. Nach ca. 5 min bei RT klären sich die Lösungen und die Erythrozyten waren lysiert. Unmittelbar danach wurden die Suspensionen von Monozyten und T-Zellen getrennt in 50 ml Röhren vereinigt und zum Beenden der Lyse mit RPMI/10 % FKS aufgefüllt und zentrifugiert (1200 rpm, 10 min, RT). Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Vor dem letzten Waschschrift wurden 20 µl als Probe für eine FACS-Färbung und zur Bestimmung der Zellzahl entnommen. Die

gereinigten T-Zellen wurden in kaltes Einfriermedium mit einer Zellzahl von $2-5 \times 10^7$ je Röhrchen in Einfrierboxen (oder ohne Boxen zunächst 1 h bei -20 °C) eingefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

C) Reinigung von Monozyten:

Monozyten wurden über einen diskontinuierlichen Percoll-Gradienten gereinigt. Dafür wurden Percoll-Lösungen verschiedener Konzentration vorbereitet (Kap. 3.4). In Rundboden-Polypropylenröhrchen wurden 2 ml Percoll (1,045 g/ml) gegeben, welches mittels einer langen Kanüle zuerst mit 3 ml Percoll (1,059 g/ml) und anschließend wiederum mit 3 ml Percoll (1,076 g/ml) vorsichtig unterschichtet wurde. Die im vorangegangenen Reinigungsschritt erhaltenen Monozyten wurde vorsichtig in PBS resuspendiert und jeder Gradient mit jeweils 2 ml Monozytensuspension überschichtet und zentrifugiert (1200 rpm, 30 min, RT, ohne Bremse). Die Interphase wurde abgenommen, in 50 ml Röhrchen überführt, mit PBS aufgefüllt und zentrifugiert (1200 rpm, 10 min, RT). Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und vor dem letzten Waschschrift wurden $20\text{ }\mu\text{l}$ als Probe für eine FACS-Färbung und zur Bestimmung der Zellzahl entnommen. Monozyten wurden in kaltes Einfriermedium mit einer Zellzahl von 2×10^7 / Röhrchen in Einfrierboxen eingefroren (oder ohne Boxen zunächst 1 h bei -20 °C) und bei -80 °C aufbewahrt.

D) Charakterisierung der gereinigten Zellen durch FACS:

Zur Bestimmung der Reinheit der separierten Proben der Fraktionen von PBMC, T-Zellen und Monozyten wurden die Zellen mit spezifischen Antikörpern gefärbt und mittels Durchflußzytometrie (FACS) analysiert (Kap. 4.4.2).

4.1.2.2. Reinigung aus zentrifugierten Leukapherese-Präparaten

Nach der Leukapherese können die erhaltenen Blutzellen in eine Aufreinigung mittels Elutra-Zentrifuge eingesetzt werden. Dabei wird das Blut in 5 Fraktionen aufgeteilt:

Fraktion 1:	besteht hauptsächlich Erythrozyten + Thrombozyten; wird verworfen
Fraktion 2:	enthält hauptsächlich TCs ist aber noch mit Erythrozyten vermischt
Fraktion 3:	enthält hauptsächlich TCs; wenige Zellen
Fraktion 4:	enthält hauptsächlich TCs; wenige Zellen
Fraktion 5:	enthält hauptsächlich Monozyten

Während Fraktion 5 direkt aliquotiert und eingefroren werden kann, müssen die Fraktionen 2-4 zunächst von Erythrozyten gereinigt werden, dies geschieht wie unter Kap. 4.1.5.1B beschrieben.

4.1.2.3. Isolierung aus Vollblut / Anreicherung primärer Zellen –Ficollgradient

Während für Etablierungen und die generelle Charakterisierung der Tregs Zellen aus der Leukapherese herangezogen werden konnten, waren auch Einzelblutproben von Patienten und Kontrollpersonen aufzureinigen. Diese wurden zum Teil als PBMC oft aber auch als Vollblut in kleinen Mengen erhalten und individuell verarbeitet:

Oft entstanden im Blut Glaskornartige Ausschlüsse, die verworfen wurden. Einige Vollblutproben waren bereits mit Gerinnungshemmern versehen (Heparinblut) andere wurden noch 1:1 mit Versen (auf mindestens 10 ml) verdünnt.

Je nach Menge des erhaltenen Blutes wurden Röhrchen unterschiedlich mit Ficoll bestückt (25 ml Blut auf 9 ml Ficoll: 50 ml Röhrchen, oder 10 ml Blut auf 3 ml Ficoll: 15 ml Röhrchen) und vorsichtig mit Blut überschichtet, um die Phasen nicht zu vermischen. Nach dem Zentrifugieren (30 min / 1350 rpm / 2 min An- und Auslauf / RT) wurden vier Schichten erwartet:

- ein rotes Erythrozytenpellet
- eine gelblich wässrige Schicht (Blutreste)
- eine dünne Zellbande weiß und flockig (enthält die PBMCs)
- eine klare wässrige Schicht

Ein Teil der obersten Schicht wurde abgenommen und verworfen und die Interphase mit einer Pasteurpipette abgesaugt, bis die Zellbande verschwunden war. Mit PBS wurden

die angenommenen Banden auf 50 ml aufgefüllt und so oft gewaschen und resuspendiert, bis die Lösung klar blieb (10 min, 1200 rpm, RT). Oft war die Interphase mit Erythrozyten verunreinigt, die sich nicht absetzten, diese wurden auch beim Waschen kaum weniger. In diesem Fall wurden die Zellen in einem kleinen Volumen Lysepuffer (500 µl bei Patientenzellen) aufgenommen und gut resuspendiert. Nachdem die Lösung einige Minuten später klarer geworden war, wurde mehrfach gewaschen und die Lyse falls nötig wiederholt. Die Zellen wurden gezählt und entweder direkt verwendet oder eingefroren (Einfriermedium, bis 5×10^7 pro Cub). Nach 1 h bei -20°C wurden sie auf -80°C oder in Stickstoff gelagert. Dieses Protokoll wurde auch zum Abtrennen toter Zellen aus alten eingefrorenen Proben verwendet. In diesem Fall wurden die Zellen zunächst aufgetaut und für mehrere Stunden kultiviert, um den Anteil der in den Versuch übernommenen geschädigten Zellen im Vorfeld durch Degradation und Verklumpung zu verringern. Wenn die PBMC weiter aufgetrennt wurden, geschah dies nicht nach den bereits erwähnten Verfahren sondern durch MACS-Separation (4.4.1).

4.1.3. Kultur primärer humaner Zellen

Eingefrorene primäre Zellen wurden für jedes Experiment frisch aufgetaut. Dafür wurden die Zellen im Wasserbad bei 37°C oder in der Hand aufgetaut und rasch in 50 ml warmes RPMI (10 % FKS) überführt. Durch Zentrifugation (5 min, 1600 rpm, 24°C) wurde der DMSO-haltige Überstand entfernt, weitere zweimal mit 50 ml Kulturmedium gewaschen, die Zellen anschließend in eine geeignete Menge Kulturmedium (RPMI +10 % FKS) aufgenommen und in einer Kulturflasche kultiviert. Die aufgetauten T-Zellen wurden spätestens am Folgetag eingesetzt.

4.1.4. Herstellung von DCs aus Monozyten

Zur Generierung von dendritischen Zellen wurden Monozyten wie in Kap. 4.1.6. erwähnt, aufgetaut und in einer 6-well-Platte in einer Zelldichte von $1.5-2 \times 10^6$ / well in je 3 ml RPMI (10 % FKS) ausgesät. Dem Medium wurden 500 U/ml GM-CSF und 250 U/ml IL-4 hinzugefügt. Jeden zweiten Tag wurde das alte Medium vorsichtig von den leicht adhärennten Zellen abgezogen und durch frisches, Wachstumsfaktoren enthaltendes Medium ersetzt. Am Tag 6 wurden die so erhaltenen unreifen DC

entweder eingesetzt, oder zuvor noch durch Zugabe von 100 ng/ml LPS 24-48h ausgereift.

4.2. Virologische Methoden

Für die unterschiedlichen Versuche musste Virus gezüchtet, gegebenenfalls aufgereinigt und seine Infektivität oder der Gehalt von Virusproteinen bestimmt werden. Die eingesetzte MOI (*multiplicity of infection*), welche die Anzahl infektiöser Partikel pro Zelle angibt, wurde wie folgt berechnet und ist an entsprechender Stelle vermerkt:

$$\text{Einzusetzende Virusmenge [ml]} = \text{MOI} \times \frac{\text{Zellzahl [ml]}}{\text{TCID}_{50} \text{ [ml]}}$$

4.2.1. Zucht des MV-Impfstammes ED

Zur Virusanzucht wurden Vero-Zellen am Vortag mit warmen ATV abgelöst und in zehn 250 ml Kulturflaschen mit einer Dichte von 1×10^7 / Kulturflasche in MEM / 5 % FKS ausgesät. Nachdem sich ein konfluenten Zellrasen gebildet hatte, wurde das Kulturmedium entfernt, die Zellen wurden einmal mit MEM ohne FKS gewaschen und mit ED (MOI = 0,01) in MEM-Medium ohne FKS für eine Stunde im Brutschrank bei 37 °C infiziert. Nach beendeter Inkubation wurde das Inokulum entfernt, vollständiges Kulturmedium hinzugefügt und der Ansatz für 1-2 Tage in einen Brutschrank mit einer Temperatur von 37 °C kultiviert, bis sich ein ausgeprägter zytopathischer Effekt entwickelte. Danach wurde das Kulturmedium entfernt, 5 ml steriles PBS / Flasche hinzugefügt und die Infektion über Nacht bei -20 °C eingefroren. Am folgenden Tag wurden die Zellen rasch aufgetaut um durch Klopfen und unter Verwendung eines Zellschabers vom Kulturflaschenboden abgelöst. Die Zelltrümmer wurden in 50 ml Zellkulturröhrchen überführt und für 15 min bei 3000 rpm, 4 °C zentrifugiert. Der Virus-haltige Überstand wurde in ein neues Röhrchen überführt, auf Eis gestellt, rasch in Einfrierröhrchen aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Neben dem Virus wurde eine MOCK-Präparation hergestellt bei der alle Schritte äquivalent, jedoch ohne Zugabe von Virus durchgeführt wurden.

4.2.2. Zucht des MV-Wildtypstammes WTF

Zur Zucht von WTF wurden BJAB-Zellen oder stabil CD150 transfizierte Vero-Zellen verwendet. Auf Vero-SLAM-Zellen erfolgte die Generierung des Virus wie unter 4.2.1 für adhärenzte Zellen beschrieben: BJAB-Zellen wurden in RPMI (10 % FKS) in einer mittleren 250 ml Kulturflasche ausgesät. Für die Präinfektion wurde die dicht gewachsene Kultur von 5×10^7 BJAB-Zellen in einem 50 ml Kulturröhrchen pelletiert (5 min, 1600 rpm, 24 °C). Dann wurde mit 5 ml RPMI ohne FCS resuspendiert, der Ansatz mit WTF einer MOI von 0.01 versetzt und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mittels Zentrifugation wieder pelletiert, in 50 ml Medium überführt und für 1-2 Tage im Brutschrank bei 37 °C bis zur Ausprägung eines zytopathischen Effektes kultiviert. Darauf hin wurden je 5 ml dieser Präinfektion 10 großen Zellkulturflaschen (550 ml) mit BJAB-Zellen für weitere 1-3 Tage hinzugefügt. Die infizierten BJAB-Zellen wurden pelletiert (5 min, 1600 rpm, 24 °C), in 3 ml PBS pro Pellet resuspendiert und über Nacht bei -20 °C eingefroren. Danach wurden die Zellen auf Eis aufgetaut und die Zelltrümmer durch Zentrifugation (15 min, 3000 rpm, 4 °C) abgetrennt. Der gewonnene Überstand wurde auf Eis gestellt, in Einfrierröhrchen rasch aliquotiert und bei -80 °C aufbewahrt. Analog wurde eine MOCK-Präparation hergestellt.

4.2.3. Reinigung des MV WTF durch Ultrazentrifugation

Infizierte Zellen wurden pelletiert und in 5 ml des Überstandes je Pellet resuspendiert. Zur Virusreinigung wurden beide Fraktionen im 4 °C-Kaltraum aufgetaut. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Je 5 ml der aufgetauten Zellpellets wurden durch 10 x *Douncen* homogenisiert und anschließend die Zelltrümmer durch Zentrifugation abgetrennt (15 min, 3000 rpm, 4 °C). Der Überstand wurde mit den vorher gesammelten Zellkulturüberständen vereinigt. Je 5 ml 25 %-iger Saccharoselösung wurde in Ultrazentrifugenröhrchen gegeben, mit je 32 ml Überstand vorsichtig überschichtet und zentrifugiert (90 min, 25.000 rpm, 4 °C). Das Viruspellet wurde in je 1 ml NTE-Puffer resuspendiert, für 15 min auf Eis belassen und bei -20 °C eingefroren (Stufengradient) oder es wurden je neun gelöste Pellets (in je 3 ml) vereinigt (kurzes Protokoll) und die Röhrchen mit 1x NTE (ca. 10 ml) aufgefüllt.

Kurzes Protokoll:

Die Röhrcchen wurden in der UZ (90 min, 4 °C, 26000 rpm Beschl. 9) abzentrifugiert, und die Pellets in je 1 ml PBS +/- gelöst. Anschließend wurden sie vereinigt, aliquotiert und bei -80 °C eingefroren.

Stufengradient:

Am folgenden Tag wurden Ultrazentrifugationsröhrcchen mit Saccharosephasen, wie illustriert (Abb. 4.3), beschickt, mit 7 ml aufgetauter Viruslösung überschichtet und ultrazentrifugiert (120 min, 25 000 rpm, 4 °C).

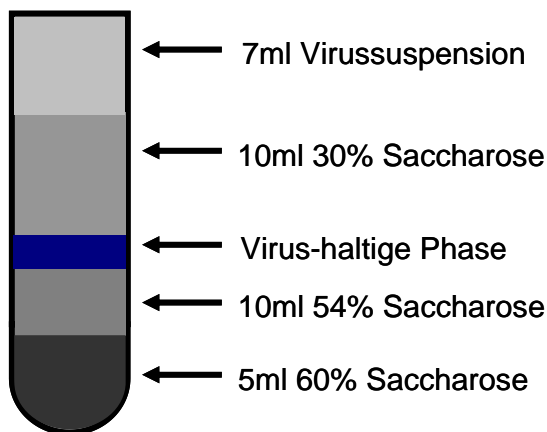


Abb. 4.3: Saccharosegradient zur Anreicherung gereinigter Viruspartikel.

Die Viruspartikel sammeln sich als weiße Bande in der Phase zwischen 30 % und 54 % Saccharose. Der Saccharosegradient wurde mit einer langen Kanüle durchstoßen, die Virus-haltige Phase vorsichtig abgesaugt, in neue Zentrifugenröhrcchen übertragen, zum Ausdünnen der Saccharose mit NTE-Puffer im Verhältnis 1:3 gemischt und durch Ultrazentrifugation pelletiert (90 min, 25000 rpm, 4 °C). Die Überstände wurden verworfen und die Pellets in je 200 µl NTE-Puffer resuspendiert, für 15 min auf Eis belassen und bei -80 °C aufbewahrt. Zur Gewinnung einer MOCK-Präparation wurden zusätzlich zehn große Kulturflaschen einer nicht infizierten BJAB-Kultur wie die Virus-Infizierte Kultur behandelt, über 25 % Saccharose ultrazentrifugiert, in NTE-Puffer resuspendiert und bei -80 °C aufbewahrt.

4.2.4. Bestimmung des Virustiters TCID₅₀

Der TCID₅₀ (*tissue culture infectious dosis*) gibt die Verdünnung einer Virus-haltigen Lösung an, die ausreicht, die Hälfte einer Zellkultur zu infizieren. Zur Bestimmung des Virustiters wurden Vero-Zellen (für ED) oder B95a-Zellen bzw. stabil transfizierte Vero-SLAM-Zellen (für WTF) in einer 96-well-Platte mit einer Dichte von 1×10^5 Zellen / well in Kulturmedium ausgesät. Am folgenden Tag wurde eine Virusverdünungsreihe in je 1 ml MEM bzw. RPMI ohne FCS von 10^{-1} bis 10^{-10} hergestellt. Je 100 µl / well der jeweiligen Verdünnungen wurde in 8-fach Ansatz zu den Zellen gegeben und der Infektionsansatz für eine Stunde im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit je 200 µl / well Kulturmedium versetzt. Die Ausbildung des zytopathischen Effektes wurde im Verlauf von mehreren Tagen beobachtet und der Titer nach drei bis sechs Tagen gemäß der Formel von Read & Münch berechnet:

Formel zur Berechnung des Virustiters TCID₅₀:

(positiv über 50 %) – 50 % = x

(positiv über 50 %) – (positiv unter 50 %)

$\log \text{TCID}_{50} = (\log \text{Verdünnung über } 50 \%) + x * \log \text{Verdünnungsfaktor}$

Da Vero-SLAM-Zellen viel leichter durch MV WTF infiziert werden als B95a-Zellen war der auf diesen Zellen ermittelte Titer stets höher. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde bei allen Experimenten der mit B95a-Zellen errechnete Titer angegeben.

4.3. Herstellung von Antikörpern

Für die Versuche war es nötig, verschiedene laboreigene Antikörper in Hybridomen zu züchten und zu isolieren, sowie einen Teil davon mit einer Markierung zur Detektion im FACS zu versehen.

4.3.1. Antikörper Reinigung

Zunächst wurde der Überstand von Hybridomen gesammelt und eine gesättigte $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung (SAS) hergestellt, indem knapp 1 l PBS +/- mit 761 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ mehrere Stunden unter leichter Erwärmung gerührt wurde. Der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt und die Lösung auf 1 l aufgefüllt. Im Vorfeld des Versuchs wurde außerdem noch das Volumen des Überstands bestimmt und eine Tropfapparatur (Scheidetrichter, Kolben im Eisbad, Rührapparatur darunter) aufgebaut. Der Zellüberstand wurde auf Eis langsam (einzelne Tropfen) mit SAS 1:1 verdünnt, und anschließend mindestens 6 h oder über Nacht gerührt. Es bildete sich eine flockig trübe Lösung, welche anschließend zentrifugiert wurde (15 min, 6000 rpm, 4 °C). Das Pellet wurde getrocknet und in wenig PBS +/- aufgenommen. Anschließend wurde das Volumen auf das halbe Ausgangsvolumen eingestellt und der Antikörper erneut wie beschrieben gefällt. Schließlich wurde die Fällung nochmals im halbierten Volumen wiederholt, aber diesmal 90 %-ige SAS verwendet. Nach einem letzten Abzentrifugieren wurde das Protein für 1 h in möglichst wenig PBS gelöst (1-5 ml) und in einen autoklavierten Dialyseschlauch gefüllt. Die Dialyse erfolgte in 5 l PBS +/- im Kühlraum, wobei das Medium über 24 h dreimal gewechselt wurde. Nach Entnahme wurde der Antikörper aliquotiert und bei -20 °C eingefroren oder mit Natriumazid versetzt und bei 4 °C gelagert. Der Erfolg der Reinigung wurde durch Proteinmengenbestimmung und durch FACS-Färbung überprüft.

4.3.2. Biotinylierung von Proteinen (Antikörpern)

Berechnungsformeln:

$$\text{ml Protein} \cdot \frac{\text{mg Protein}}{\text{ml Protein}} \cdot \frac{\text{mmol Protein}}{\text{mg Protein}} \cdot \frac{20\text{mmol Biotin}}{\text{mmol Protein}} = \text{mmol Biotin}$$

$$\text{mmol Biotin} \cdot \frac{1000000\mu\text{l}}{1\text{L}} \cdot \frac{\text{L}}{\text{x mmol}} = \mu\text{l Biotin}$$

Der AK wurde mit Puffer (PBS +/-) in einem Glasröhrchen verdünnt. Biotin-NHS (Pierce) wurde an der Feinwaage abgewogen und in H_2O frisch gelöst. Ein Teil der Biotinlösung wurde im Verhältnis 1: 12-20 (AK: Biotin) zu dem AK gegeben und auf

dem Vortexer (schwache Stufe) in die AK-Lösung langsam eingetropt. Anschließend wurde unter gelegentlichem Rühren 1-2 h bei RT inkubiert; wobei der pH-Wert nicht unter 7 sinken durfte. Der markierte AK wurde in einen Dialyseschlauch überführt und 24 h in dreimal erneuertem PBS +/- bei 4 °C inkubiert. Schließlich wurde der AK entnommen, aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Die Bindung des AKs wurde am FACS (Kap. 4.4.2) und seine Proteinmenge (Kap. 4.5.1) am Spektrometer bestimmt.

4.3.3. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde mit dem BCA-Test (Sigma) durchgeführt. Lösung I (Bicistronische Säure) wurde mit Lösung II (Kupfer-II-Sulfat) im Verhältnis 1:50 gemischt. 5 µl der Probe bzw. einer Standardproteinlösung wurden zu 995 µl BCA-Lösung gegeben, und mit einem Leerwert aus BCA-Lösung abgeglichen. Die BCA-Proben wurden für 15 min bei 60 °C inkubiert, anschließend in Einmalküvetten gefüllt und die optische Dichte des entstandenen Farbstoffes bei 562 nm einem Eppendorf-Photometer mit integrierter Standardkurve gemessen.

4.4. Experimentelle Verfahren

4.4.1. MACS Separation

Bei der MACS-Separation werden Zellen unter der Verwendung spezifischer magnet-partikel-konjugierter Antikörper gegen Oberflächenproteine aufgetrennt. Die so markierten Zellen haften an Magnetkügelchen, welche sich in einem Magnetfeld befinden, während die ungebundenen durch die Säule gespült werden (siehe Abb. 4.4). Der Versuch wurde vollständig auf Eis bzw. bei 4 °C durchgeführt, das DMSO wurde im Vorfeld zweimal gründlich aus den getauten Zellen ausgewaschen, die anschließend zur Erholung mehrere Stunden im Brutschrank inkubiert wurden. Während dieser Zeit sonderte sich zudem ein Teil der abgestorbenen Zellen ab.

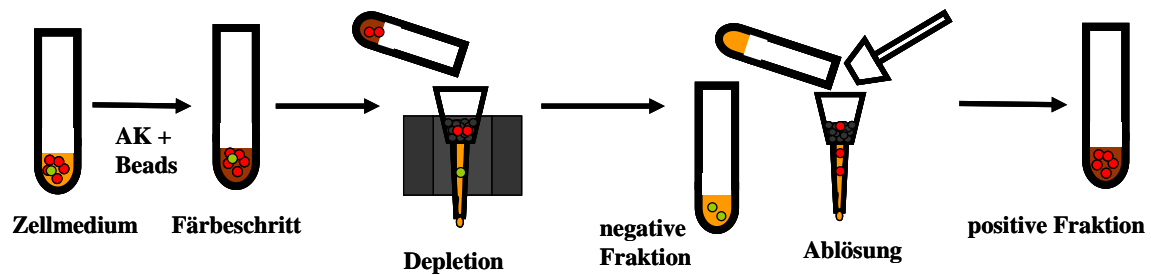


Abb. 4.4 : Prinzip der MACS-Separation.

A) CD4 Selektion:

Nach Bestimmung der Zellzahl (max. 10^8 Zellen bei LD-Säulen bzw. 2×10^8 bei AutoMACS) wurde zentrifugiert (1600 rpm, 5 min, 4°C) und das Pellet in kaltem Puffer (entgastes BSS / BSA 1 %) aufgenommen (je $90\ \mu\text{l}$ pro 10^7 Zellen). Je $10\ \mu\text{l}$ Biotin Antibody Cocktail pro $90\ \mu\text{l}$ Puffer wurde zugeben, gut vermengt und 10min im Kühlschrank inkubiert. Danach wurden je $20\ \mu\text{l}$ Anti Biotin Microbeads zugegeben, gut resuspendiert und 15 min im Kühlschrank inkubiert. Der Ansatz wurde mit Puffer auf das 10-20 fache Volumen verdünnt, zentrifugiert (10 min, 4°C , 1360 rpm) und in $500\ \mu\text{l}$ frischem Puffer resuspendiert. Die Aufreinigung erfolgte zunächst mittels LD-Säulen:

Diese wurden in den Separator Magnet eingesetzt, 2x mit 1 ml Puffer gespült und anschließend mit der vorbereiteten Zelllösung beschickt. Ungebundene Zellen wurden gesammelt und sobald das Reservoir der Säule leer war, sofort 2x mit 1 ml Puffer nachgespült. Das Eluat wurde vereinigt. Sollten auch die depletierten Zellen entnommen werden, wurde die Säule aus dem Magnet entfernt, und 5 ml Puffer zugegeben um die gebundenen Zellen zu lösen und auszuwaschen.

Alternativ erfolgte die Aufreinigung am Automacs mittels voreingestellter Separationsprogramme (Depl: Ausbeute steht im Vordergrund / Depl05: Reinheit steht im Vordergrund). Die Proben wurden eingesetzt und die aufgetrennten Fraktionen in frischen Greinerröhrchen aufgenommen. Zwischen den Messungen wurde je nach Anforderung an die Reinigungsprogramme Q-Rinse, Rinse oder Clean gefahren.

B) CD25 Selektion:

Die CD4⁺ Fraktion wurde zentrifugiert (1600 rpm, 5 min, 4 C) und der Überstand vollständig abgenommen. Dann wurden die Zellen wie beschrieben gefärbt, die Menge des Puffers und der Microbeads jedoch variiert:

Puffer:

Standard:	90 µl je 10 ⁷ Ausgangszellen
für erhöhte Ausbeute:	300 µl je 10 ⁸ Zellen 90 µl
bei Proben mit >>10 ⁷ Zellen:	90 µl Puffer

CD25 Microbeads:

Depletion/ normale Separation:	10 µl je 10 ⁷ Ausgangszellen
für höchste Reinheit:	2 µl je 10 ⁷ Ausgangszellen

Waren nur sehr wenige Zellen vorhanden, wurden die Tregs bei der Aufreinigung depletiert und die depletierte mit der vollständigen Fraktion verglichen. Bei ausreichender Zellmenge wurden die Tregs positiv selektioniert und selbst in die Experimente eingesetzt. Bei der Depletion wurden 40 % der Zellen nicht auf die Säule gegeben. Bei der Verwendung von MS (LS) Säulen wurde mit 500 µl (3 ml) vorgewaschen und nach dem Durchlauf der Zellen mit 3x mit 500 µl (1 ml) Puffer nachgespült. Die gebundenen Zellen wurden mit 1 ml (5 ml) Puffer abgelöst. Für größere Reinheit der positiven Zellen wurden sie noch auf eine zweite Säule geladen.

Bei Verwendung des AutoMACS wurde nach der ersten Auftrennung

(Depletion: Depl / Depl05; größere Reinheit / Ausbeute -

Selektion: PosselD2 / u.U. auch Depl)

die CD25 schwache Fraktion weiter in dimm und hoch negativ getrennt (Depl 0,5).

4.4.2. FACS-Färbung

4.4.2.1. Oberflächenfärbung

Die vorbehandelten Zellen wurden kräftig resuspendiert und zentrifugiert (1600 rpm, 5 min, 4 °C), mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen, der Überstand dekantiert und das Pellet durch kurzes Vortexen gelöst. Die Antikörper wurden (falls verwendet) in folgender Reihenfolge zugegeben:

unmarkierter AK → Sekundär-AK → direkt markierte(r) AK

Jeder AK wurde 30 min bei 4 °C inkubiert, die Zellen anschließend ein- bis zweimal (je nach Anforderung an die Genauigkeit) gewaschen und mit der nächsten Färbung fortgeföhren. Im Anschluss wurde die für die Messung gewünschte Puffermenge zugeben, sowie 10 min vor Messbeginn eventuell 7AAD oder PI (1/1000) für eine Vitalitätsfärbung. Beides sind DNA-Farbstoffe, die nur in tote Zellen eindringen können. Gemessen wurde am FACS Calibur von BD und die Auswertung erfolgte mit CellQuest, CellquestPro oder FlowJo.

4.4.2.2. Intrazelluläre Färbung

Nach dem ersten Waschen (1600 rpm, 5 min, 4 °C) mit FACS-Puffer wurden die Zellpellets gevortext, in 200 µl 4 % PFA aufgenommen und 20 min auf Eis fixiert. Danach wurden sie mit FACS-Puffer gewaschen, gevortext und in Saponinpuffer aufgenommen (je 1 ml). Nach 10 min Inkubation bei RT waren die Zellen ausreichend permeabilisiert. Sie wurden abzentrifugiert und der **Saponin**puffer vorsichtig abgesaugt. Anschließend wurde die Färbung wie eine Oberflächenfärbung fortgeföhrt. Statt FACS-Puffer wurde jedoch stets Saponin-Puffer verwendet und ein letzter Waschschrift mit FACS-Puffer vor der Messung ergänzt. Da eine normale Fixierung Antikörper Epitope oder die Struktur empfindlicher Zellen schädigen oder Hintergrund erzeugen kann, wurde manchmal auch mit milderem Detergenzien gearbeitet.

Bei der Fixierung und Färbung mit **Serotec Leukoperm** wurden die Zellen in PBS -/- oder FACS-Puffer aufgenommen (kleine Mengen in 50 µl, bis 10^7 Zellen in 1 ml). Anschließend wurde 1 (Ausgangs-) Volumen Reagenz A zugeben und für 15 min inkubiert. Mit 3 ml PBS wurde die Fixierung gestoppt und die Zellen abzentrifugiert (5 min, 300 g, RT). Der Überstand wurde dekantiert und AK1 in ein Volumen Reagenz B zugegeben. Nach schwachem Vortexen und 30 min Inkubation wurde gewaschen und eventuell mit einem Sekundär-AK gefärbt. Die ganze Färbung erfolgte bei RT. Die **Cytokinfärbung** wurde wie eine intrazelluläre Färbung durchgeführt. Der einzige Unterschied bestand darin, dass 4-6 h vor Beginn der Färbung BFA (10 mg/ml) oder Golgistop (1:250) in jedes Well gegeben und mit dem Medium darin resuspendiert wurde.

Bei der **FoxP3 Färbung** wurden die Zellen gevortext und in je 1ml frisch angesetzttem Fixierungs-/ Permeabilisierungspuffer aufgenommen. Nach abermaligem Vortexen und einer Inkubation von 30 min-1 h bei 4 °C wurden die Zellen dreimal gewaschen (1x mit FACS- und zweimal mit Permeabilisierungspuffer). Danach erfolgte ein optionaler Blockschritt mit 2 % Rattenserum in Permeabilisierungspuffer (in 50 µl für bis zu 2×10^5 oder in 100 µl für bis zu 1×10^6 Zellen; für 15 min bei 4 °C). Der FoxP3 AK wurde zugegeben (10 µl für bis zu 2×10^5 Zellen, 20 µl für bis zu 1×10^6 Zellen bzw. 5 / 10 µl Isotyp-AK in je 50 / 100 µl Permeabilisierungspuffer). Es wurde bei 4 °C, 30 min im Dunklen inkubiert und die Zellen erneut gewaschen (zweimal mit Permeabilisierungspuffer und einmal mit FACS-Puffer).

Populationsfärbung in PBMCs:

Zur Bestimmung der Zusammensetzung von PBMC wurden die Zellen mit Anti-CD3 (TCR), Anti-CD19 (BC-Corezeptor), Anti-CD14 (TLR Partner, erkennt LPS), Anti-CD16 (F-Rezeptor auf NK-Zellen), Anti-CD56 (NK-Marker) und Anti-HLA-DR (APC-Marker) gefärbt und mittels Durchflußzytometrie (FACS) analysiert. CD14 wurde 1:30, alle übrigen Antikörper wurden im Verhältnis 1:50 eingesetzt.

4.4.2.3. CFSE-Färbung

Nach MACS Aufreinigung (wie in Kap. 4.4.2.1 beschrieben) wurden alternativ zu einem radioaktiven Proliferationstest Färbungen mit CFSE durchgeführt. Die Zellen wurden zu Ansätzen von 3×10^6 aliquotiert und abzentrifugiert (1600 rpm, 5 min, RT). Um das FKS gründlich auszuwaschen wurde jeder Ansatz dreimal in 50 ml PBS -/- gewaschen. CFSE wurde von 5 mM auf $2,5 \mu\text{M}$ (1:2000) in PBS -/- verdünnt und die Zellen nach dem letzten Waschgang in je 1 ml dieser Lösung aufgenommen. Nach einer Inkubation von 3 min bei 37°C wurde die Färbereaktion durch Zugabe von $500 \mu\text{l}$ FKS gestoppt. Die Ansätze wurden abzentrifugiert, der Überstand verworfen und ein weiteres Mal mit RPMI 10 % gewaschen. Die Zellzahl wurde bestimmt und die entsprechende Menge an Zellen in die gewünschte Stimulation eingesetzt. Schließlich erfolgte die FACS-Färbung zusätzlicher Marker (für CFSE blieb der grüne Kanal reserviert) und die Messung und Auswertung am FACS-Gerät wie beschrieben (Kap. 4.4.2.2). Anhand von diskreten Peaks abnehmender Farbtintensität konnte auf die Zahl der Zellteilungen geschlossen werden.

4.4.3. T-Zell-Stimulation

Tris (50 mM) wurde auf pH 9 eingestellt und steril filtriert, GAM verdünnt ($5\text{-}10 \mu\text{g/ml}$ je $150 \mu\text{l}$) und in den Wells der Kulturplatte inkubiert (1 h bei 37°C oder über Nacht bei 4°C). Währenddessen wurden die Zellen abzentrifugiert und in Eppendorfcaps mit PBS -/- aufgenommen (1ml , maximal 10^7 Zellen). Die Stimulations- AK (z. B. **CD3, CD28 und CD46**) wurden zugegeben ($1\text{-}5 \mu\text{l}$ pro Ansatz), die Eppendorfcaps 30min bei 4°C gedreht, abzentrifugiert (8000 rpm, 2 min, 4°C) und der Antikörper wieder abgenommen. Die gecoatete Platte wurde dreimal mit PBS -/- gewaschen und je $100 \mu\text{l}$ RPMI 10 % FKS vorgelegt. Falls benötigt wurden dem Medium IL-2 und Feeder Zellen oder FIP zugefügt. Als Feeder-Zellen wurden T-Effektorzellen durch Strahlung soweit inaktiviert, dass sie nicht proliferieren, aber noch Cytokine produzieren können. Das Zellpellet wurde in je $100 \mu\text{l}$ Medium (pro Well) resuspendiert, aliquotiert (1×10^4 - 5×10^5 pro Well) und inkubiert.

Der **CD28 Superagonist** wurde nicht mit Zellen vorinkubiert, sondern gleichzeitig mit ihnen in die Wells geben. Die Zellen mussten vor dem Splitten (starke Proliferation ca. 1000 % in 9 Tagen) bzw. der Verwendung durch intensive ATV Behandlung abgelöst werden (ca. 15 min bei 37 °C, stark klopfen). Zur Induktion von Tr₁ Zellen wurden: CD3- (10 µg/ml) und CD46- (5 µg/ml) AK verwendet. Alternativ wurde statt mit Antikörpern durch Zugabe von **LPS** (100 ng/ml), **PHA** (2,5 µg/ml), oder **PMA / Ionomycin** (50 ng/ml / 0,5mM) ins Medium stimuliert.

Bei einer **Stimulation mittels DCs (MLR)** wurden die TCs in einer 96-well Flachboden Platte (weniger Hintergrund als bei Rundboden) ausgesät (100 µl / 5x10⁴ je well) und eine Verdünnungsreihe der vorbereiteten DCs angesetzt: Es wurden 5x10⁴ DCs in 600 µl Medium in das erste Cap eingesetzt und in 5 weitere je 400 µl Medium gegeben. Dann wurden je 3x100 µl der gut durchmischten DC Lösung zu den TCs ins Well gegeben und 200 µl ins nächste Cap überführt. Nach 72 h Inkubation wurde eine Markierung mit Thymidin (1:500) für ca. 16 h durchgeführt und die Proliferation gemessen (Kap. 4.5.2).

4.4.4. Proliferationstest

Nach der Stimulation und Inkubation der untersuchten Zellen unter verschiedenen Bedingungen (Kap. 4.4.3) wurden Proliferationstest durchgeführt. Zur Markierung wurde Tritiumthymidin 1/100 in RPMI verdünnt und 50 µl der Verdünnung in jedes Well gegeben (Gesamtverdünnung 1:500). Das Medium wurde durch vorsichtiges Schwenken der Platte vermischt. Anschließend wurde im Brutschrank über Nacht oder bis zu 24 h inkubiert. Die Messung erfolgte mittels β-Plate und β-Counter: Die Proben wurden auf eine Fiberglasmatte gesaugt und 1 h im Inkubator bei 50 °C getrocknet. Die Matte wurde in einer Folientasche bündig eingeschweißt, ein Loch geschnitten und 5 ml Messlösung zugeben. Die Matte wurde ganz benetzt, Luftblasen und die überschüssige Flüssigkeit auf Papier ausgestrichen. Anschließend wurde die Folientasche bündig zugeschweißt und in eine dazu passende Kassette eingesetzt. Für die Messung wurde das zum β-Counter gehörende Programm verwendet und jeder Ansatz für 5 oder 30 min gezählt.

4.4.5. Experimentelle Infektionsversuche

Bei der Standardmethode wurden die Zellen gezählt, aliquotiert abzentrifugiert (5 min, 1600 rpm, RT), anschließend in Virus (MOI 0,1, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,5 oder 2) und einem geringen Restvolumen RPMI ohne FKS aufgenommen. Die Zellen (2×10^5 bis 1×10^7 Zellen je nach Versuch) wurden für 1 h bei 37 °C im Rotator infiziert bzw. mit UV-inaktiviertem Virus stimuliert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert und in RPMI (mit 10 % FKS) resuspendiert, welches bei manchen Versuchen FIP (Fusion inhibierendes Peptid) enthielt. FIP unterbindet die Zellfusion zwischen infizierten Zellen. Die infizierten Zellen wurden in Platten ausgesät und im Brutschrank inkubiert. Als Messzeitpunkt wurden 0 h (Kontrolle) 6 h, 12 h, 24 h und/ oder 48 h gewählt.

Aus Monozyten erzeugte DC wurden wie gewohnt für die Infektion vorbereitet, aufgrund der Adhärenz gründlich vom Plattenboden abgelöst und die Reinheit der Population im Mikroskop bestimmt. Zur Infektion wurden sie in einer Dichte von 1×10^6 / ml gehalten, aufgetautes Virus / Mock in der entsprechenden MOI (meist 2) zugeben und 1-4 h bei 37 °C infiziert. Während der ersten Stunde wurde alle 15 bis 20 min geschüttelt, im Anschluss das Infektionsmedium durch RPMI Medium mit 10 % FKS, Cytokinen (IL-4 / GM-CSF: 250 U/ml / 500 U/ml) und FIP (1/1000) ersetzt. Bei der LPS Kontrolle wurde anstelle von FIP 100 ng/ml LPS zum Medium gegeben.

Bei manchen Versuchen fand vor der Infektion ein **Block** der Rezeptoren durch AK statt: Die Zellen wurden in je 1 ml PBS +/- ohne AK, mit α -CD 46 (1:10) oder α -CD 150 (1:2) aufgenommen. Die AK-Bindung fand 1 h bei 4 °C im Rotator statt. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert und nochmals mit PBS +/- gewaschen. Die Infektion wurde wie beschrieben durchgeführt (MOI = 1, ED oder WTF je nach Versuch, 20000/ 100000 Zellen bei Tregs / normalen T-Zellen).

Um die **Produktivität einer Infektion** in T-Zellen zu messen wurden diese wie beschrieben infiziert (MOI = 1, 24 bzw. 48 h, 10^6 Zellen in 1 ml). B95a Kulturzellen wurden mit ATV abgelöst vereinigt und in der Neubauerkammer gezählt Die benötigte Menge (50.000 Zellen / 100 μ l pro well) wurde in Medium aufgenommen, anschließend ausgesät und einen Tag in 96-Well-Platten kultiviert. Die infizierten T-Zellen wurden aus der Platte entnommen, zum Aufschließen ohne DMSO eingefroren und

anschließend sofort wieder aufgetaut. Nach gründlichem Vortexen wurden die Zelltrümmer abzentrifugiert und der Überstand in die Titration eingesetzt. Die Verdünnungsreihe, Inkubation und Auswertung wurde durchgeführt wie unter Kap. 4.2.5 beschrieben, die ersten Wells jedoch mit unverdünntem Virus behandelt beschriftet.

4.4.6. Downregulation, Proliferation und Apoptosemessung bei infizierten T-Zellen

Die Infektion wurde für die Bestimmung der **Downregulation** wie beschrieben durchgeführt (MOI = 2, ED oder WTF je nach Versuch, 20.000/ 100.000 Zellen bei Tregs / normalen T-Zellen) und zu diskreten Zeitpunkten in einer Kinetik erfasst (0, 1, 3, 6, 21, 24, 27, 44, 48 h). Zu den gewählten Zeitpunkten wurden die Proben resuspendiert, abgenommen und für 20 min in 4 % PFA fixiert. Anschließend wurden die Proben mit FACS-Puffer gewaschen und bis zur FACS-Färbung und Messung bei 4 °C gelagert. Als Antikörper wurden α -CD46 (13/42, 1 zu 50) bzw. α -CD150 (K87 1 zu 15) und GAM-FITC (1:50) verwendet. Bei der **Proliferationsmessung** schloss sich an die Infektion (MOI = 1, 10^5 Zellen) ein Proliferationstest (48 h Inkubation & 16 h Markierung) wie beschrieben an.

Bei der **Apoptosemessung** wurde die Infektion (1×10^5 Zellen, 24 bzw. 48 h, MOI = 1,5, ED bzw. WTF) und FACS-Färbung der Oberflächenproteine wie beschrieben durchgeführt. Im Anschluss wurde mit einem Antikörper gegen Annexin 5 gefärbt: Dabei wurden die Zellen in je 200 μ l Bindepuffer (PBS mit 2x Calcium) gewaschen, kalt zentrifugiert (4 °C, 5 min, 1600 rpm) und in 70 μ l Puffer resuspendiert. 5 μ l (1:15) α -A5-FITC wurden dazugeben und die Lösung bei RT 15 min im Dunkeln inkubiert. Schließlich wurde mit FACS-Puffer gewaschen und gemessen. Zur Diskriminierung zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen wurde zuweilen auch eine Propidiumiodid- (1:1000/ 0,05 mg) oder 7 AAD- (1:83/ 0,3 μ g) Färbung durchgeführt, indem nach der letzten AK-Färbung 5-10 min mit dem Reagenz inkubiert und sofort gemessen wurde. Vor der Infektion von Tregs wurde die A5-Färbung durch mitogen- bzw. UV-induzierte Apoptose etabliert:

Verwendete Methoden:

- H₂O₂ (0,5 – 10 mM, 2-8 h, 1x10⁵ bis 1x10⁶ Zellen pro Well)
- UV-Bestrahlung (1,5 J/cm² anschließend zwei Stunden Inkubation)
- CD 3 Stimulation (wie beschrieben aber ohne CD 28)
- Bestrahlung: (20-30 Cy = TCID₅₀)

4.4.7. IL10 Expression in Patientenproben (induz. Tregs)

Zur **Induktion** der Cytokinsekretion wurden die Patientenproben und Kontrollen wie beschrieben getaut, ein bis zweimal gewaschen und in wenig Medium aufgenommen (2 bis 4x 10⁶ Zellen pro ml). Die Zellen wurden für ca. 17 h im Brutschrank inkubiert, erneut gezählt und mit frischem Medium ohne IL-2 auf 4x10⁶ Zellen pro ml (abzüglich der Menge des zuzugebenden Virus) eingestellt. Alle Patienten- und die gleiche Menge an Kontrollzellen (meist zwischen 10⁶ und 10⁷) wurden verwendet. Anschließend wurde das Virus getaut (UZ-WTF) und mit Medium auf ein Volumen von 1 ml aufgefüllt. Die UV-Inaktivierung erfolgte mit 1,5 J/cm² (ca. 3 min), dann wurde das Virus gut resuspendiert und die der Zellzahl entsprechenden Mengen (Zielkonzentration 14 µg/ml) zu jedem Ansatz geben. Vor der folgenden Extraktion wurden die Zellen für 22 h stimuliert.

Zum **Nachweis** wurde die gebildete RNA zunächst unter Verwendung verschiedener Protokolle aus den stimulierten Zellen isoliert und der Erfolg der Extraktion quantifiziert. Die Ausbeute wurde photometrisch ermittelt. Auf eine mögliche Degradation wurde mittels einer Gelelektrophorese unter Betrachtung rRNA typischen Banden getestet. Anschließend wurden 2 µg der RNA bzw. das höchst mögliche Volumen von 12 µl in eine Omniskript RT-Reaktion mit OligoTT und Randomprimern eingesetzt. Die erhaltene DNA wurde entweder in eine klassische oder eine etwas sensitivere und leichter zu quantifizierende Light-Cycler PCR eingesetzt. Im Falle der Light Cycler PCR wurden meist zwei Läufe durchgeführt: Der erste mit dem Haushaltsgen hALAS, um Auskunft über die Menge und Qualität des RT Produkts zu erhalten, der zweite zur Ermittlung der enthaltenen IL-10 Kopien unter Einbeziehung eines Standards. Da die in die PCR eingesetzte DNA-Menge nicht identisch war, wurde

die relative IL-10 Expression anhand der hALAS-Kontrolle bestimmt. Zudem wurden die Ergebnisse mit der Phase der Erkrankung in Relation gesetzt.

A) Extraktion:

Die Zellen wurden abgenommen, auf 50 ml Volumen gebracht und zentrifugiert. Der Überstand wurde gründlich abgenommen und das Pellet bis zur Zugabe von Lysispuffer zur Vermeidung von Degradation auf Eis gestellt. Die Extraktion wurde mit dem Kit von GE gemäß enthaltenem Protokoll mit folgenden Abweichungen durchgeführt:

Aufgrund der geringen Zellmengen wurden auf den Homogenisationsschritt mit der Nadel verzichtet. Von der Aufnahme der Pellets in RA1 an bis zur Elution der RNA in Wasser bei 0 °C wurde die gesamte Reaktion bei RT durchgeführt. Für maximale Ausbeute und Konzentration wurde die RNA 2x mit 40 µl eluiert, wobei das durchgetretene H₂O im zweiten Durchgang erneut auf die Säule geladen wurde. Zur Bestimmung der RNA-Ausbeute wurde die eluierte RNA verdünnt (5+95) in UVetten gefüllt und photometrisch bestimmt.

B) Elektrophorese (RNA-Gel / DNA-Gel):

Für die RNA Bestimmung mittels Gelelektrophorese wurde 1x TAE angesetzt, 1 % Agarose zugegeben und das Gemisch mehrmals in der Mikrowelle aufgeköcht, bis die Agarose vollständig gelöst war. Die Flasche wurde unter fließendem Wasser auf 50-60 °C abgekühlt, Ethidium-Bromid hinzugeben (1:10000) und das Gel in den vorbereiteten Schlitten mit Kamm gegossen. Nach der Auspolymerisierung wurde der Schlitten eingesetzt, mit Puffer bedeckt und die Proben aufgetragen: 4 µl Marker/ 0,5 µg RNA in 5 µ H₂O + 2 µl Ladepuffer. Dann wurde das Gel bei 80 V ca. 30 min laufen gelassen und am UV-Tisch fotografiert.

C) RT-Reaktion:

Die RNA wurde auf Eis, alle Reagenzien bei RT getaut, Puffer gevortext und zentrifugiert, Enzyme resuspendiert und auf Eis gelagert. Zu je 12 µl RNA (maximal 2 µg) wurden 1 µl Oligo-dT-Primer aus mindestens 12 Nukleotiden (20 µM), 1 µl Random primer (9 Nukleotide, 10 µM) und falls nötig RNase freies H₂O (bis 14 µl Gesamtvolumen) gegeben und die Ansätze resuspendiert. Es folgte eine Denaturierung der RNA (70 °C, 10 min), eine Abkühlung auf Eis und eine kurze Zentrifugation. Währenddessen wurde ein Mastermix aus je 2 µl 10x RT Puffer, 2 µl dNTPs (5 mM) und 1 µl verdünntem RNase Inhibitor (10 U/ml) pipettiert und je 5 µl zu den Proben gegeben. Nach gründlichem Resuspendieren wurde das Gemisch 2 min bei 37-38 °C inkubiert, schließlich je 1 µl Transkriptase eingebracht und resuspendiert. Nach 1 h cDNA Synthese wurde die Reaktion gestoppt (70 °C, 10 min) die Ansätze auf Eis gekühlt und abzentrifugiert.

Die Proben wurden in die PCR eingesetzt oder bei -20 °C gelagert. Auf einen zusätzlichen Denaturierungsschritt für RNA mit starker Sekundärstruktur wurde verzichtet.

D) PCR-Reaktion:

- Klassische PCR -

Ein Mastermix aus Primern und Wasser wurde hergestellt, jeweils 23 µl Mix (21 µl Wasser, 1 µl Upstream Primer (10 µM), 1 µl Downstream Primer (10 µM)) und 2 µl cDNA in die Caps mit puRE Tag Ready-To-Go-PCR-Beads pipettiert. Erst die vollständigen Ansätze wurden mit den Bestandteilen der Beads vermischt. Letztere wurden durch leichtes Vortexen in Lösung gebracht und die Tropfen vom Gefäßrand kurz abzentrifugiert. Sobald die Lösung durchsichtig wurde, konnte die Reaktion gestartet werden. Nach der Reaktion wurde ein DNA-Gel gefahren.

PCR-Programm:

Für Housekeeping-Gene wurden nur 22 Zyklen gefahren, für schwächer exprimierte Gene einschließlich Zytokinen 30. Innerhalb des verwendeten Gradienten wurden die

Cytokinprimer bei geringer die Kontrollprimer bei hoher Temperatur eingesetzt. Vor dem Start wurden Deckel und Probenbehälter vorgeheizt, das Programm umfasste folgende Schritte:

- Vordenaturierung (5 min bei 95 °C)
- n Zyklen mit
 - Denaturierung (95 °C 30 sec)
 - Annealing (Gradient 58 +/-10 °C 1 min)
 - Elongation (1 min, 72 °C)
- Abschließende Elongation (10 min, 72 °C)
- Hold (4 °C)

Primer:

Die Länge der IL-10 Primer sollte zwischen 15-30 bp der GC-Gehalt bei ca. 50 % und die Annealing Temperatur um 60 °C liegen. komplementäre Sequenzen und Intronsequenzen wurden ausgeschlossen. Folgende Sequenzen wurden verwendet:

IL-10 F: AGC TGA GAA CCA AGA CCC AGA
IL-10 R: GGG CTG GGT CAG CTA TCC
IL-10 FL: CGG CGC TGT CAT CGA TTT CTTT CCC T
IL-10 LC: TGA AAA CAA GAG CAA GGC CGT GGA GC
IL-10 F: AAA TTT GGF TCT AGG CCG GG
IL-10 R: GAG TAC AGG GGC ATG ATA TC

- Light Cyclers Quantitative PCR -

Funktionsweise:

Zwei kurze spezifische / komplementäre Sonden binden nebeneinander an das PCR-Produkt. Durch die Nähe der zwei Fluorochrome kommt ein FRET (Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer) zustande, welcher in jedem Zyklus gemessen wird. Läuft ein Standard mit, lässt sich automatisch die Zahl der Kopien in der Probe bestimmen und die Ausgangsmenge errechnen (Abb. 4.5).

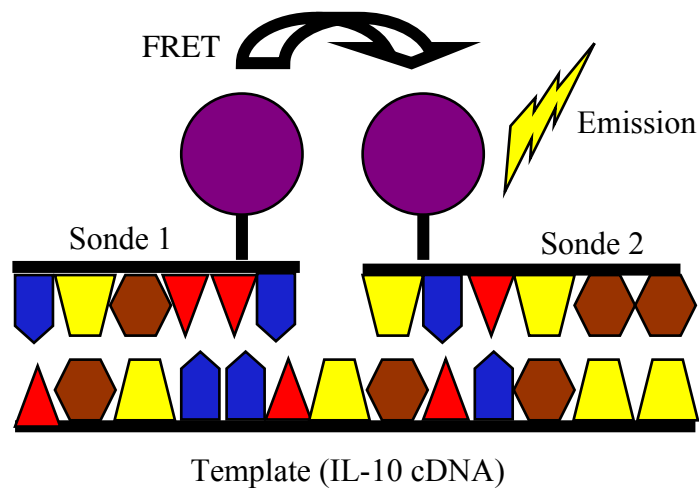


Abb. 4.5: Funktionsweise der Light-Cycler-PCR

Durchführung:

Der Mastermix wurde gemäß dem Kit-Protokoll angesetzt und enthielt abhängig vom Ansatz:

- hALAS: H₂O, MgCl₂, Transkriptase, Detektionsmix
- IL-10: H₂O, MgCl₂, Transkriptase, Primer, Sonden

10 µl (bei IL-10 Bestimmung mit Standard) bzw. 18 µl (bei hALAS oder IL-10 Bestimmung ohne Standard) des Mastermix wurden auf Küvetten aliquotiert. Anschließend wurde mit Standard (5 Verdünnungsstufen), Wasser (Negativkontrolle) oder DNA (Proben bzw. Kontrollen/ 2 µl evtl. mit H₂O auf Sollvolumen verdünnt) auf 20 µl aufgefüllt. Die Küvettenstüpsel wurden verschlossen, (5-10 sec bei 2000 rpm in der Tischzentrifuge) abzentrifugiert, vorsichtig in die Löcher des Messeinsatzes überführt sowie mit dem LightCycler-Programm gemessen und ausgewertet.

5. Ergebnisse

5.1. Charakterisierung natürlicher regulatorischer T-Zellen (Trn)

Um die Änderung in Frequenz und Aktivität der Trn unter den verschiedensten Krankheitsbedingungen *ex vivo* zu untersuchen und *in vitro* den direkten Effekt von Virus auf Trn zu bestimmen, musste im Vorfeld eine Charakterisierung dieser Zellen stattfinden. Diese erfolgte im Bezug auf die Isolierung der Trn mittels MACS, die Expression Trn typischer Gene und die funktionelle Charakterisierung der Trn. Bekannte Eigenschaften der Trn sind die Expression von CD3, CD4 und CD25, ihre Anergie und ihr suppressiver Effekt auf andere T-Zellen [119, 139, 141].

5.1.1. Separation unterschiedlicher T-Zell-Populationen

Es wurden CD4⁺/CD25⁺ T-Zellen mittels MACS aus PBMC angereichert. Unselektiert machen diese bei einer durchflusscytometrischen Charakterisierung ca. 2 % (bei Erwachsenen) bzw. 3 % (bei Kindern und Jugendlichen unter 16 Jahren) der Gesamtpopulation aus (Abb. 5.1A). Im Zuge der Aufreinigung wurden zunächst die CD3⁺/CD4⁺ Zellen aus den PBMCs angereichert, indem die übrigen Zellen mit einem Antikörper-Cocktail (gegen CD8, CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCR γ/δ und Glycophorin A) depletiert wurden. Ausgehend von den CD3⁺/CD4⁺ T-Zellen (ca. 20 % des Ausgangsmaterials, nicht gezeigt) erfolgte eine positive CD25-Selektion der Trn (Abb. 5.1C). Die übrigen Zellen wurden mittels Depletion in CD25^{dim} Zellen (Effektorzellen, nicht gezeigt) und eine CD25⁻ Fraktion (unstimulierte T-Zellen, Abb. 5.1B) aufgetrennt.

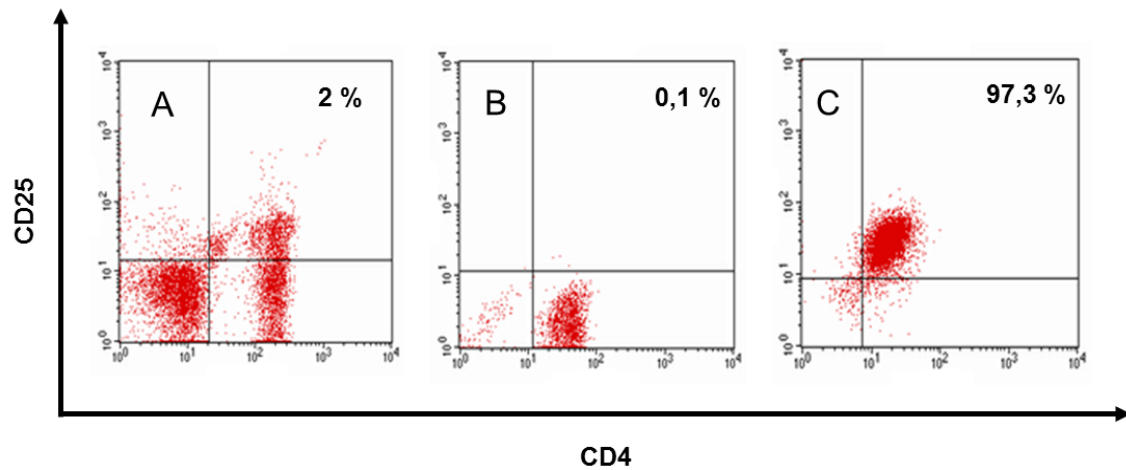


Abb. 5.1: MACS-Aufreinigung von Trn über CD4 und CD25

Trn ($CD3^+$, $CD4^+$, $CD25^+$) wurden mittels MACS aus PBMC isoliert und gegen CD4 (1:50) und CD25 (1:50) gefärbt. Dargestellt sind die nicht selektierte Ausgangspopulation (A), die Trn depletierte ($CD25^-$, B) und die Trn-Fraktion ($CD25^+$, C) nach der Aufreinigung. Der Trn-Anteil der Populationen ist angegeben.

Abhängig von den gewählten Versuchsbedingungen wurden bei der Separation der $CD25^+$ Fraktion unterschiedliche Ausbeuten und Reinheiten erzielt (Abb. 5.2A+B): Bei der klassischen Positivselektion nach CD25 erhielt man (nach zwei Säulendurchläufen) ca. 1,5 % der Ausgangszellen als zu 80 % reine Trn-Fraktion ($CD3^+$, $CD4^+$, $CD25^+$), bei höherer Stringenz (weniger CD25Beads) eine 100 % reine Fraktion von 1 %. Auch eine vollständige Depletion von Trn innerhalb von ca. 3 % der Gesamtpopulation (darin 66 % Trn) war möglich.

Verrechnet man die Frequenz der Trn Population mit deren Reinheit, ergibt sich unter den gewählten Bedingungen eine Ausbeute von 68 %, 50 % und 100 %. Meist wurde die CD4 selektierte und CD25 depletierte Fraktion noch weiter aufgetrennt, da der Durchlauf noch $CD25^{dim}$ Zellen enthielt: Etwa 70-80 % der Fraktion waren $CD25^-$, der Rest (20-30 %) $CD25^{dim}$. Die bei verschiedenen Spendern erhaltene Ausbeute an Trn war relativ konstant. Auffällig war jedoch die Altersabhängigkeit. Spender unter 16 Jahren besaßen einen höheren Anteil an Trn (ca. 50-100 % mehr) (Abb. 5.2B).

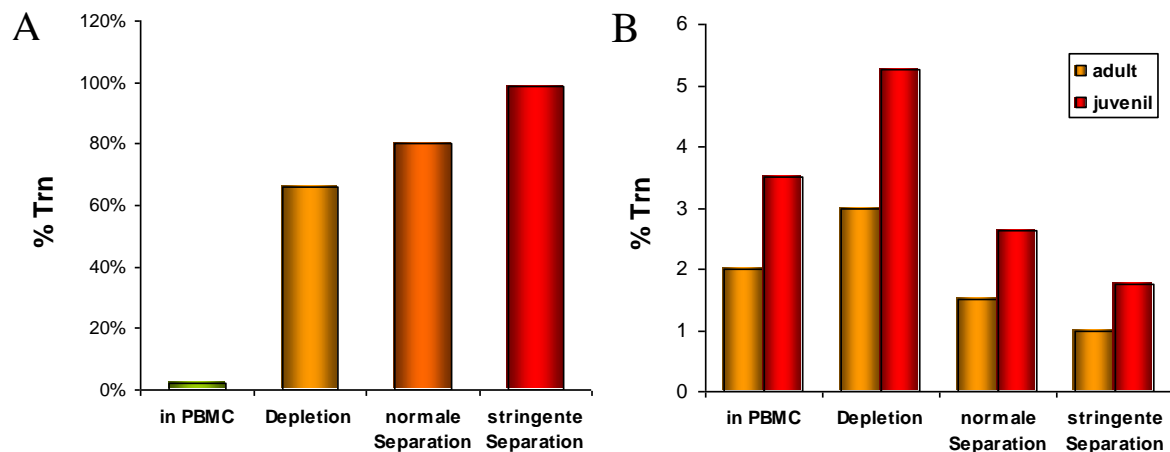


Abb. 5.2: Ausbeute der Trn Separation und Reinheit der erhaltenen Populationen

Trn wurden innerhalb der PBMC oder nach Aufreinigung mittels MACS und Bestimmung der Zellzahl in der Neubauerkammer mit α -CD4 (1:50) / α -CD25 (1:50) gefärbt. (A) zeigt den prozentualen Anteil der Trn innerhalb der Ausgangspopulation (PBMC) und den angereicherten Fraktionen nach Separation. Bei der „normalen Separation“ wurde die vom Hersteller des Trn-Isolationskits (Miltenij) vorgeschlagene Menge an CD25 Microbeads bei der Aufreinigung eingesetzt, bei der stringenten Separation nur 1/5 davon. Bei der „Depletion“ wurden ebenfalls Trn aufgereinigt, allerdings mit den Säulen bzw. Geräteeinstellungen am AutoMACS, welche normalerweise zur Isolation der negativen Fraktion verwendet werden. (B) zeigt die Menge der in der Ausgangspopulation (PBMC) enthaltenen Trn bzw. den prozentualen Anteil der Fraktionen (bezüglich der Ausgangspopulation) nach Aufreinigung. Dabei wurde zwischen juvenilen und adulten Spendern unterschieden. Durch Verrechnung von Reinheit (A) und Ausbeute (B) erhält man die Menge der enthaltenen Trn (siehe Text).

5.1.2. Untersuchung verschiedener Trn Marker

Die Trns wurden anhand der Expression bekannter Marker [121] phänotypisch charakterisiert: Nach Literaturangaben sind dies, neben CD4/CD25 (Abb. 5.1), GITR, CTLA4 und der intrazellulär exprimierte Transkriptionsfaktor FoxP3. Bei GITR-Färbungen wurden fast ausschließlich CD4⁺/CD25⁺ Trns (Abb. 5.3C), nicht aber die depletierte Fraktion (Abb. 5.3B) angefärbt. FoxP3-Färbungen eigneten sich gut zur Darstellung von Trn innerhalb der PBMC. Alle FoxP3⁺ Zellen waren CD4⁺ (Abb. 5.3A) und CD25⁺ (nicht gezeigt).

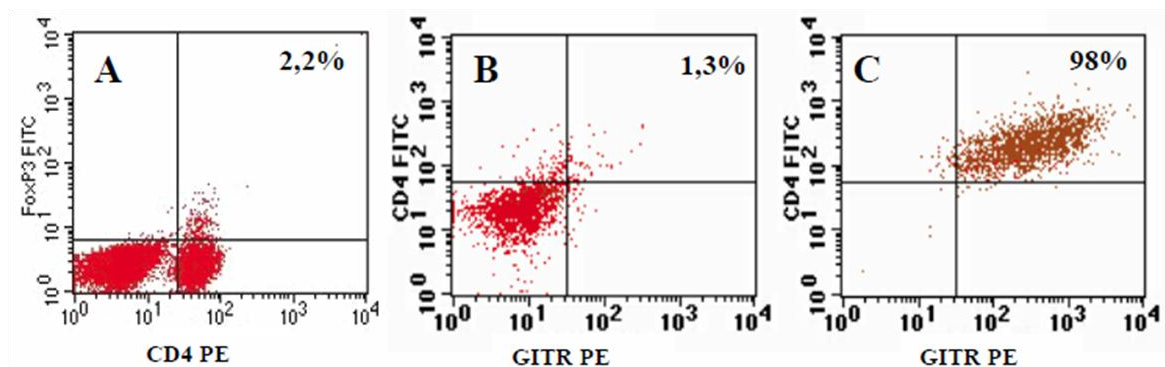


Abb. 5.3: Phänotypische Charakterisierung von Trn

Die Trn-Fraktion innerhalb der PBMC wurde mittels CD4 (1:50) und FoxP3 (1:5) Färbung dargestellt (A). Aufgereinigte CD25⁻ T-Zellen (B) und CD25⁺ T-Zellen (Trn, C) wurden gegen CD4 und GITR (je 1:50) gefärbt. Angegeben ist jeweils der prozentuale Anteil doppelt positiver Zellen.

5.1.3. Überlebensfähigkeit, Proliferation und suppressive Aktivität von Trn

Da die Vitalität der Trn von exogener Cytokinsynthese abhängig ist (insbesondere von IL-2) [154-156], wurde erstgenannte mittels Annexin V Bindung (bei apoptotischen Zellen) unter verschiedenen Bedingungen ermittelt (Abb. 5.4). In einer vollständigen PBMC- oder T-Zell-Fraktion blieben die Trn einige Tage vital, als reine Population wurden sie ohne TCR-Stimulation und / oder Cytokinzugabe sehr schnell apoptotisch. Wurde lediglich IL-2 zugegeben (alle 2 Tage je 50 U/ml) erhöhte dies die Vitalität nur wenig. Nach vier Tagen waren bereits 70 % der Zellen apoptotisch.

Durch Zugabe von IL-2 und eine α -CD3/28 TCR oder CD28SA Stimulation verlängerte sich die Vitalität am deutlichsten.

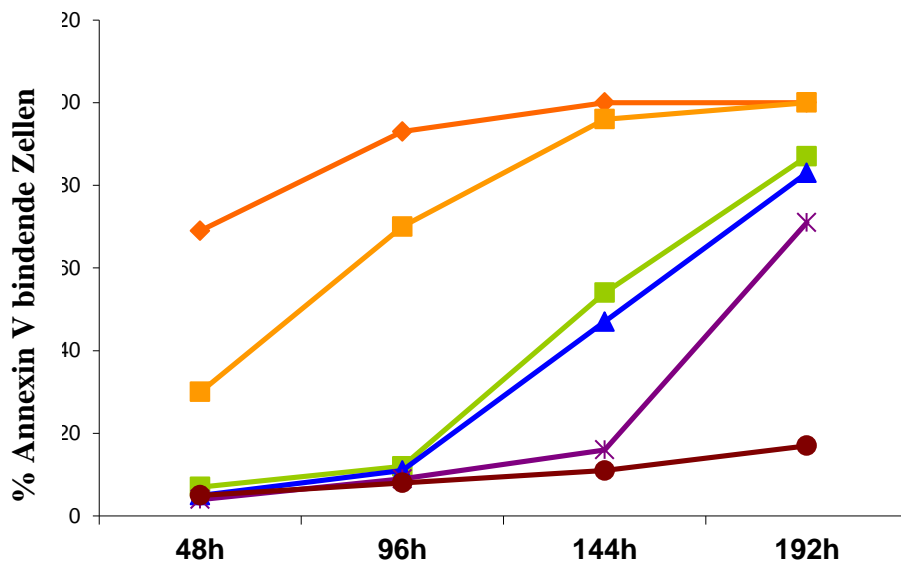


Abb. 5.4: Vitalität von Trn

Der prozentuale Anteil Annexin V (1:50) bindender Trn ($CD4^+ CD25^+$) wurde über einen Zeitraum von acht Tagen unter folgenden Bedingungen ermittelt: Innerhalb einer hochreinen Population in Abwesenheit exogener Cytokine (dunkel orangene Linie) bzw. nach IL-2 Zugabe (je 50 U alle 2 Tage, hell orangene Linie); in Kokultur mit Feeder-Zellen (T-Zellen / PBMCs, grüne/ blaue Linie); in einer reinen Population unter IL-2 Zugabe (50 U) und Stimulation mit α -CD3/28 (je 1:1000 lila Linie) bzw. CD28 Superagonist (1:5000, braune Linie). Als Feeder-Zellen wurden durch Bestrahlung inaktivierte T-Zellen/ PBMCs im Verhältnis 10:1 mit Trn gemischt.

Das *in vitro* geringe Proliferationsvermögen der Trn und die Suppression anderer Zellen [139, 141], ermöglicht funktionelle Assays. Aufgereinigte Trns zeigten nach CD3/CD28 Stimulation erwartungsgemäß einen (*in vitro*) anergen Charakter. Die $CD25^-$ T-Zellen proliferierten mehr als 10-mal stärker (Abb. 5.5A). Zwar erhöhte sich die Proliferation der Trn durch Zugabe von IL-2 und Feeder-Zellen deutlich, blieb jedoch weit hinter der $CD25^-$ -T-Zellen zurück. Mischte man die $CD25^-$ -T-Zellen und die Trn im Verhältnis 1:1 wurde die Proliferation der erstgenannten fast völlig unterdrückt. Trns konnten durch einen Vergleich der Expansion von $CD4^+$ T-Zellen nach $CD25$ -Depletion mit der Ausgangspopulation auch indirekt nachgewiesen werden (Abb. 5.5B). Die depletierte

Fraktion proliferierte ca. 40 % stärker als die (in einem natürlichem Verhältnis von ca. 1:15) mit Trn versetzte Fraktion. Dieser indirekte Nachweis der suppressorischen Aktivität eignet sich, wenn aufgrund kleiner Ausgangszellmengen nicht genügend Trn zur Verfügung stehen.

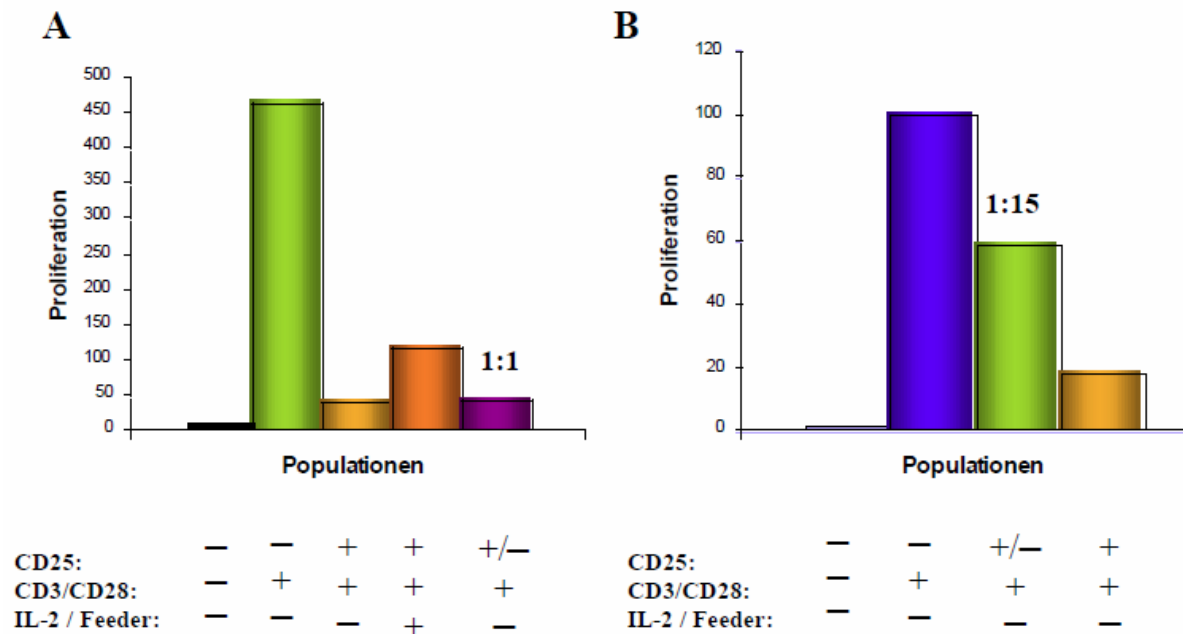


Abb. 5.5: Anergie und Suppressionsvermögen von Trn

Trn wurden durch Positivselektion (A) oder Depletion (B) von den CD25⁻ T-Zellen abgetrennt. Die Ausgangspopulation (CD25⁻/CD25⁺ 1:15) und die erhaltenen Fraktionen, CD25 depletierte T-Zellen (CD25⁻) und Trn (CD25⁺) wurden rein bzw. im Mischungsverhältnis 1:1 mit Antikörpern (α -CD3/ CD28, je 1:1000, 72 h) stimuliert, mit Tritiumthymidin markiert (1:500, 16 h) und der ³H-Einbau gemessen. Zu einem Teil der Ansätze wurden IL-2 (50 U) und Feeder-Zellen (bestrahlte T-Zellen, 1x10⁵) gegeben. Gezeigt ist nicht die absolute Proliferation sondern das Vielfache des Wertes unstimulierter CD25⁻ T-Zellen.

5.1.4. Darstellung von Trn in PBMC aus Rhesusaffen

Aufgrund der Durchimpfungsrate stehen in den Industrienationen nur wenig Patientenproben zur Verfügung, insbesondere gilt dies für serielle Proben. Rhesusaffen können jedoch als Tiermodell herangezogen werden, um die Entwicklung der Trn

Population über eine akute Infektion, Impfung oder Challenge hinweg zu untersuchen [204]. Wie beschrieben waren die PBMCs von Rhesusaffen mit MV WT infizierbar [204] (nicht gezeigt). Voraussetzung für die Arbeit mit Zellmaterial aus Rhesusaffen war die Verfügbarkeit kreuzreaktiver Antikörper. Für die FACS-Färbung wurden Antikörper gegen CD3, CD4, CD25, GITR, CTLA4 und FoxP3 verwendet (Abb. 5.6A+B / nicht gezeigt). Während im Zuge der MACS Aufreinigung die CD4⁺ Isolierung möglich war (Abb. 5.6C), ließ sich die Isolation von Trn aufgrund mangelnder Kreuzreaktivität des CD25 Antikörpers nicht durchführen. Was jedoch gelang war eine Depletion der CD25⁺ Zellen (unter Verwendung einer dreifach höheren Antikörperkonzentration und des stringentesten Depletionsprogrammes am AutoMACS) gefolgt von einer Stimulation mit humanem α -CD3/ α -CD28 (Abb. 5.6D). Obwohl die Proliferation schwach ausfiel (cpm etwa 1000), war die erwartete Relation zwischen der vollständigen und der depletierten T-Zellfraktion sichtbar.

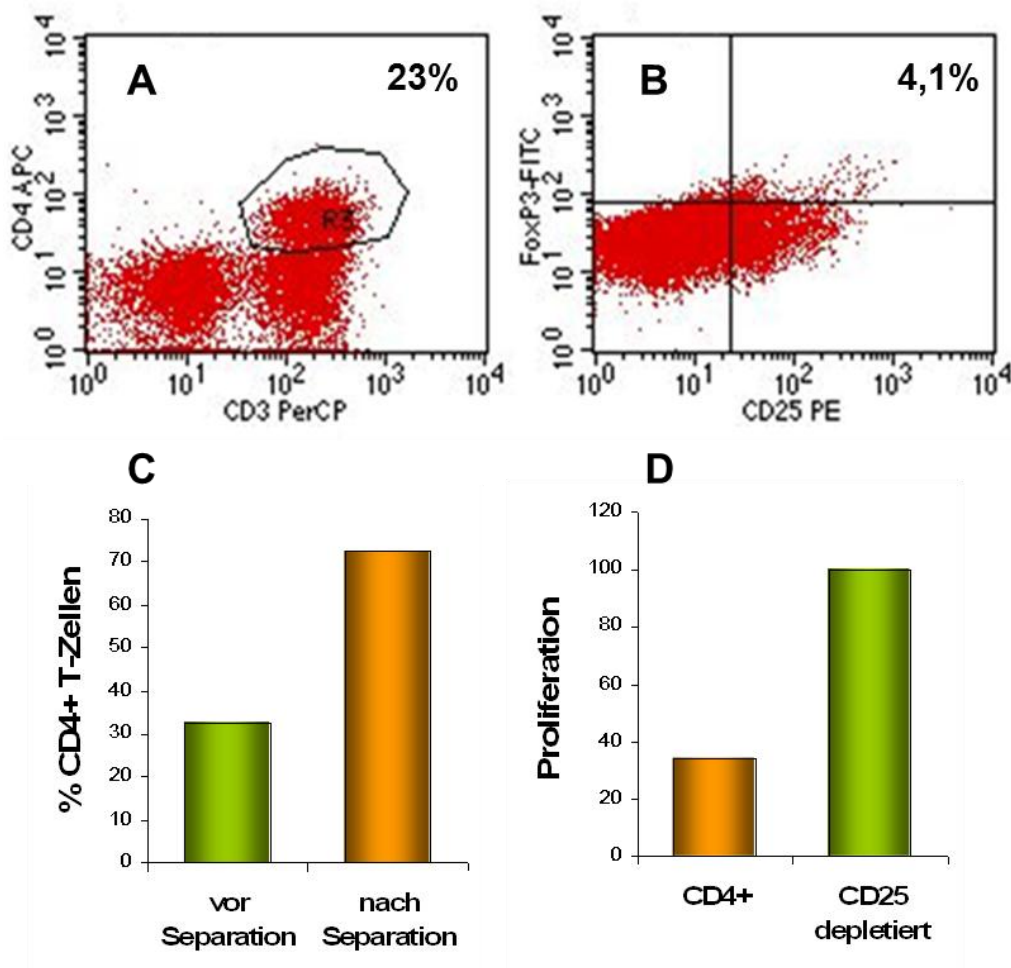


Abb. 5.6: Darstellung von Trn in aus Rhesusaffen isolierten PBMCs

Eine FACS-Färbung mittels kreuzreaktiver Antikörper gegen CD3, CD4, CD25 je (1:50) und FoxP3 (1:5) wurde für die Bestimmung der Trn-Häufigkeit bei Rhesusaffen herangezogen (A+B). Angegeben ist der Anteil doppelt positiver Zellen. CD4⁺ T-Zellen (CD4⁺) wurden mittels MACS separiert (CD4 Färbung, 1:50), die Reinheit vor und nach Separation ist angegeben (C). Nach einer CD25-Depletion konnten die erhaltenen Fraktionen mit α -CD3 / CD28 (1:500/ 72 h) stimuliert, mit Tritiumthymidin (1:500, 16 h) markiert und die Proliferation gemessen werden (D). Die Proliferation in der Trn depletierten Fraktion ist gleich 100 gesetzt.

5.1.5. Methoden zur Überprüfung der Trn-Aufreinigung

Es existiert eine Reihe potenzieller Trn-Marker, doch keiner der Oberflächenmarker ist auf diesen Zelltyp beschränkt [121]. Funktionelle Tests auf die Anergie oder die suppressive Wirkung der Trn, können daher zur Überprüfung herangezogen werden, ob die durch MACS aus PBMCs isolierte oder im FACS innerhalb der PBMCs ermittelte Population wirklich aus Trn besteht.

Hierfür wurde die separierte Fraktion (CD4⁺, CD25⁺) im FACS betrachtet und überprüft, ob die Markerexpression in diesen Zellen mit der in unseparierten PBMCs als Trn bestimmten Population übereinstimmte (Abb. 5.7A). Dies war stets bei ca. 2/3 der Zellen der Fall. (Die etwa 3 % große Fraktion enthielt die 2 % im FACS ermittelten Trn.) Anschließend wurden die CD25 depletierte und die nicht CD25 selektierte Population, mit α -CD3/ CD28 stimuliert und in einen radioaktiven Proliferationstest mit Tritiumthymidin oder eine CFSE Färbung eingesetzt, um die suppressive Wirkung der CD4⁺CD25⁺ Zellen auf die vollständige Fraktion darzustellen (Abb. 5.7B+C). Durch CD25-Depletion stieg die Proliferation um etwa 40 % gegenüber der Ausgangspopulation. FACS-Analyse und Proliferationstest nach der MACS-Separation bestätigten somit die Darstellung innerhalb der PBMC.

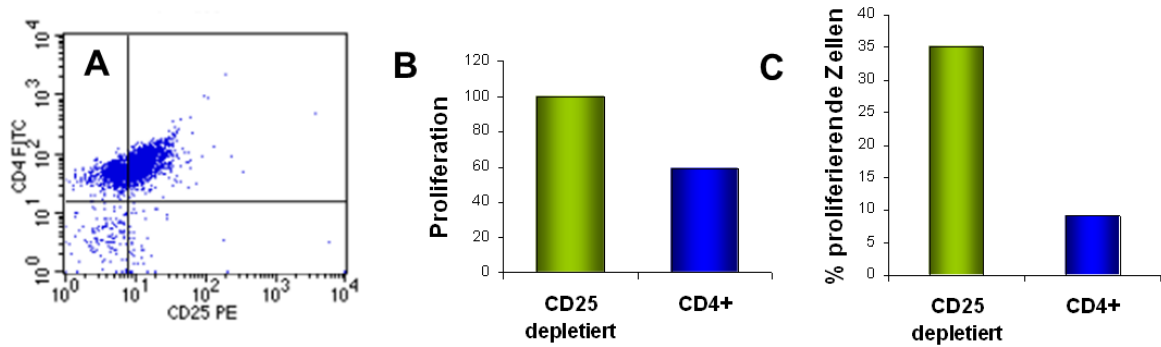


Abb. 5.7: Überprüfung der Trn Färbung in PBMC durch Aufreinigung und Proliferationstest:

Die durchflusscytometrische Bestimmung der Trn innerhalb von PBMC aus Patientenproben (vergleiche Abb. 5.14, 5.17 und 5.18) wurde folgender Maßen kontrolliert: Die CD4⁺/CD25⁺ Zellen wurden mittels MACS separiert, gegen CD4 (1:50), CD25 (1:50) und FoxP3 (1:5) gefärbt und der CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ Phänotyp mittels Durchflusscytometrie überprüft (A/ nicht gezeigt). Die CD25 depletierte und die undepletierte Fraktion (CD4⁺) wurden mit α -CD3/CD28 (1:1000, 72 h) stimuliert und mit Tritiumthymidin markiert (1:500, 16 h) (B) bzw. vor der Stimulation mit CFSE gefärbt (C) und die Proliferation zum Nachweis der suppressorischen Aktivität der Trn verglichen. (B) enthält die Ergebnisse von 39 Patienten und 22 Kontrollen, die Proliferation in der Trn depletierten Fraktion ist gleich 100 gesetzt. (C) zeigt ein repräsentatives Experiment von 3 (je 2 Patienten und 1 Kontrolle).

5.2. Infektion natürlicher regulatorischer T-Zellen (Trn)

Trn exprimieren aufgrund ihrer TCR-Affinität für Eigenantigene verschiedene Aktivierungsmarker [124]. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob dies auch auf CD150 zutrifft und gegebenenfalls zu einer präferentiellen Infektion von Trn führt. Der Einfluss einer Infektion auf die Aktivität und Vitalität dieser Zellen sollte beschrieben werden.

5.2.1. Trn exprimieren CD150 ohne vorherige Aktivierung

Aktivierte Trn exprimieren CD150 [202], unbekannt war jedoch, ob auch frisch isolierte Trn dieses Molekül tragen. In dieser Arbeit wurde mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen, dass frisch isolierte Trn tatsächlich CD150 exprimieren. 94 % der aufgereinigten Trn färbten doppelt positiv für CD150 und CD25 (Abb. 5.8A), bei CD150 und GITR waren es 82 % (Abb. 5.8C). In der CD25⁻ Fraktion waren nur 2,1 (Abb. 5.8B) bzw. 1,6 % (Abb. 5.8D) doppelt positiv. Bei der beobachteten CD150⁺ GITR⁻-Population handelt es sich möglicherweise um Effektorzellen. Während die MFI der CD25⁻-Fraktion etwa bei 10 lag, schwankte die der Trn-Fraktion abhängig vom Spender zwischen 65 und 105 (Abb. 5.8E).

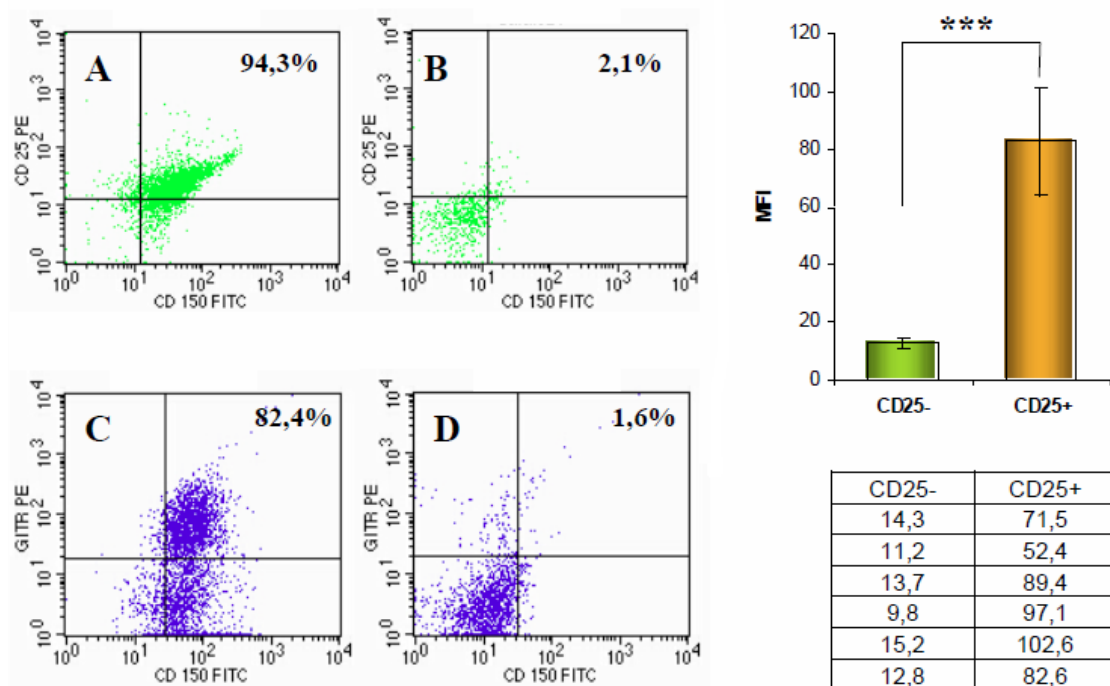


Abb. 5.8: Expression von CD150 auf unstimulierten Trn.

T-Zellen verschiedener gesunder Spender wurden in Trns (CD4⁺/CD25⁺, A+C) und CD25⁻ T-Zellen (B+D) aufgereinigt, nach Expression von CD150 (1:30) und den Trn Markern CD25 (1:50, A+B) bzw. GITR (1:50, C+D) gefärbt und mittels quantitativer Durchflusszytometrie gemessen. Trn (CD25⁺) exprimieren deutlich mehr CD150 als CD25⁻ T-Zellen (A+B). Die Expression von CD150 korreliert gut mit der von GITR

(C+D). Unter (E) ist die Expression von CD150 auf CD25⁻ T-Zellen (CD25⁻) und Trn (CD25⁺) für sechs unabhängige Experimente zusammengefasst. Der Unterschied in der CD150 Expression erwies sich in einem T-Test (gepaart, 99%, ein- / zweiseitig) als signifikant (***; 0,00075/ 0,0015).

5.2.2. Trn werden durch MV WT CD150-abhängig infiziert

Um zu prüfen, ob Trn durch MV WT präferentiell infiziert werden, wurden Trn und CD25⁻ T-Zellen mittels MACS aufgereinigt und mit WTF, ED oder MOCK infiziert. Es zeigte sich kein Unterschied in der Infektionsrate bei dem (in beiden Populationen hohen) Anteil der mit ED infizierten Zellen, bei WTF-Infektion jedoch wurden deutlich mehr Trn als CD25⁻ T-Zellen infiziert (Abb. 5.9A). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit dem unterschiedlichen Tropismus der Virenstämme. ED nutzt vor allem das ubiquitär exprimierte CD46 als Rezeptor, während WTF auf den Rezeptor CD150 angewiesen ist. Die Infektion mit WTF wurde mit verschiedenen MOIs wiederholt und es zeigte sich stets ein deutlicher Unterschied zwischen der Infektionsrate von Trn und CD25⁻ T-Zellen (Abb. 5.9B).

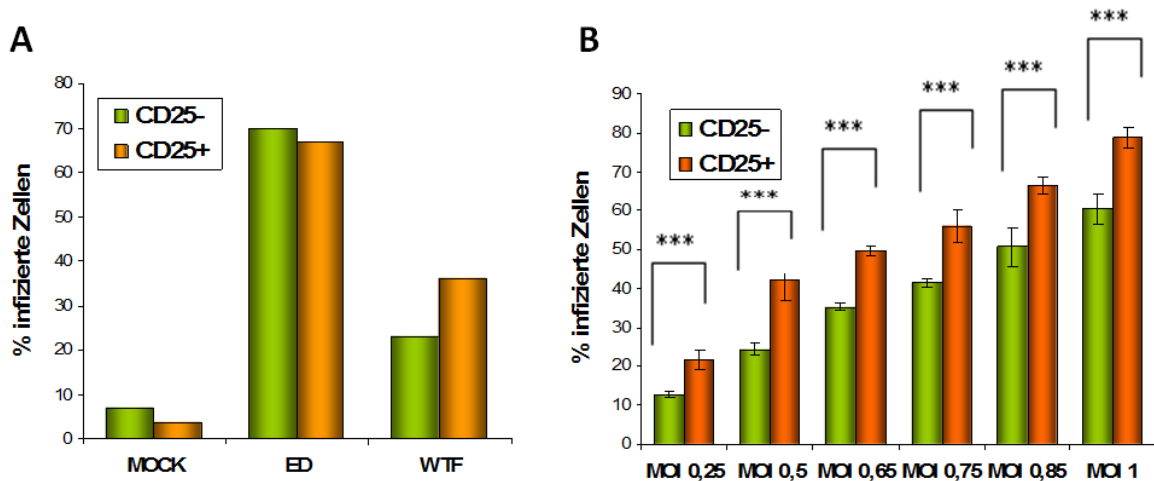


Abb. 5.9: Erhöhte Infektionsrate in Trn.

Aufgereinigte CD25⁻ T-Zellen (CD25⁻) und Trn (CD25⁺) gesunder Spender wurden für 24 h mit WTF (MOI = 0,5/ unterschiedliche MOIs) (A/ B) bzw. ED (MOI = 0,75) (nur B) infiziert und gegen MV-H (1:50) gefärbt. Nach WTF-Infektion wurde bei jeder verwendeten Infektionsdauer und MOI ein höherer Anteil infizierter Trn als CD25⁻ T-

Zellen gemessen. Dargestellt sind ein repräsentatives Experiment von dreien (A) bzw. die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten (B). Der Unterschied in der Infektionsrate erwies sich in einem T-Test (gepaart, 99 % einseitig bzw. 95 % zweiseitig) bei jeder verwendeten MOI als signifikant (***) 0,0078, 0,0078, 0,0016, 0,0075, 0,0059, 0,0011 bzw. 0,016, 0,016, 0,0032, 0,015 0,012, 0,0022) (B).

Um einen Zusammenhang zwischen CD150-Expression und der präferentiellen Infektion von Trn herzustellen, sollte die Virusaufnahme durch Zugabe von Antikörper gegen den Rezeptor gehemmt werden. Zunächst wurde der Effekt einer Infektionshemmung durch Antikörper bei der Infektion von CD25⁻ T-Zellen untersucht (Abb. 5.10A). Die Infektion von CD25⁻ T-Zellen mit ED erwies sich als α -CD46 sensitiv, der beobachtete Hemmeffekt war konzentrationsabhängig. Anschließend wurde die Hemmwirkung von α -CD150 auf die Infektion von Trn und CD25⁻ T-Zellen mit WTF untersucht (Abb. 5.10B). Der Anteil mit WTF infizierter Zellen sank bei α -CD150 Zugabe deutlich ab. Die präferentielle Infektion von Trn (gegenüber CD25⁻ T-Zellen) ist somit CD150 abhängig.

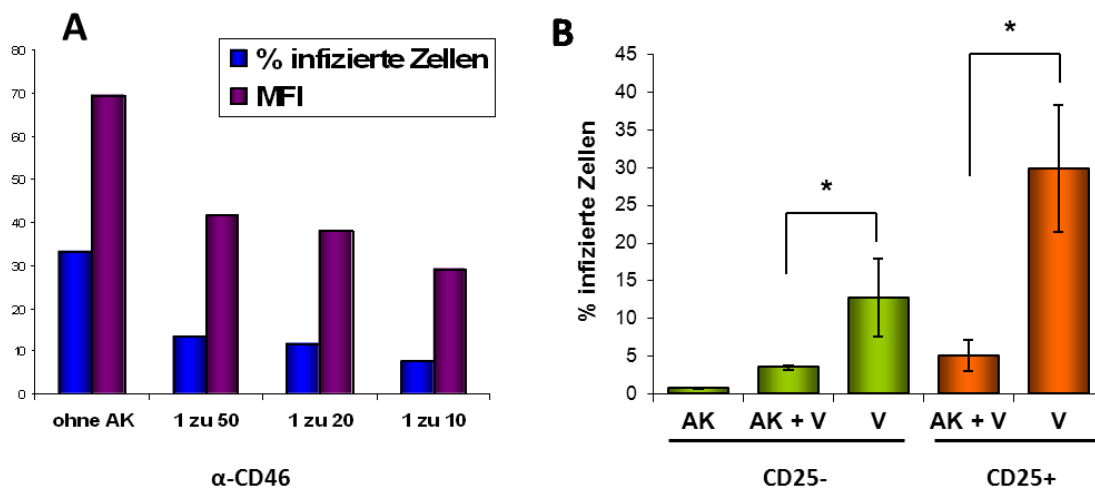


Abb. 5.10: Hemmung der MV-Infektion mittels Rezeptor spezifischer Antikörper.

Die Infektion gereinigter CD25⁻ T-Zellen (CD25⁻) (A+B) und Trn (CD25⁺) (B) gesunder Spender mit MV (V) der Stämme ED (MOI = 0,5, 24 h) (A) bzw. WTF (MOI = 0,5, 24 h) (B) wurde durch Zugabe von Antikörpern (AK) gegen den Eintrittsrezeptor CD46 (A) bzw. CD150 (1:2) (B) gehemmt. Infizierte Zellen wurden durch α -MV-H (1:50) Färbung bestimmt, die Auftrennung in CD25⁻ und CD25⁺ T-

Zellen durch CD4/ CD25 Färbung (je 1:50) überprüft. Unter (B) sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Der Hemmeffekt erwies sich in einem T-Test (gepaart, 95 % einseitig bzw. zweiseitig) für beide Zellfraktionen als signifikant (*; 0,028, 0,020 bzw. 0,043, 0,039).

5.2.3. Die Infektion von Trn verläuft nur wenig produktiv

In MV-infizierten CD25⁻ T-Zellen entsteht kein, in aktivierten T-Zellen nur wenig Virus [7]. Um zu ermitteln ob, infizierte Trn infektiöses Virus produzieren, wurden Titrationsexperimente auf B95a Zellen durchgeführt. Im Vorfeld wurde mit stimulierten CD4⁺ T-Zellen ermittelt, welche Versuchsbedingungen sich zur Detektion des T-Zell-generierten Virus eignen. Nach 48 h und zellassoziiert wurde am meisten Virus detektiert (Abb. 5.11A). Darauf hin wurde das zellassoziierte Virus aus Trn und CD25⁻ T-Zellen titriert (Abb. 5.11B). Die Virusproduktion in Trn und CD25⁻ T-Zellen war vergleichbar gering.

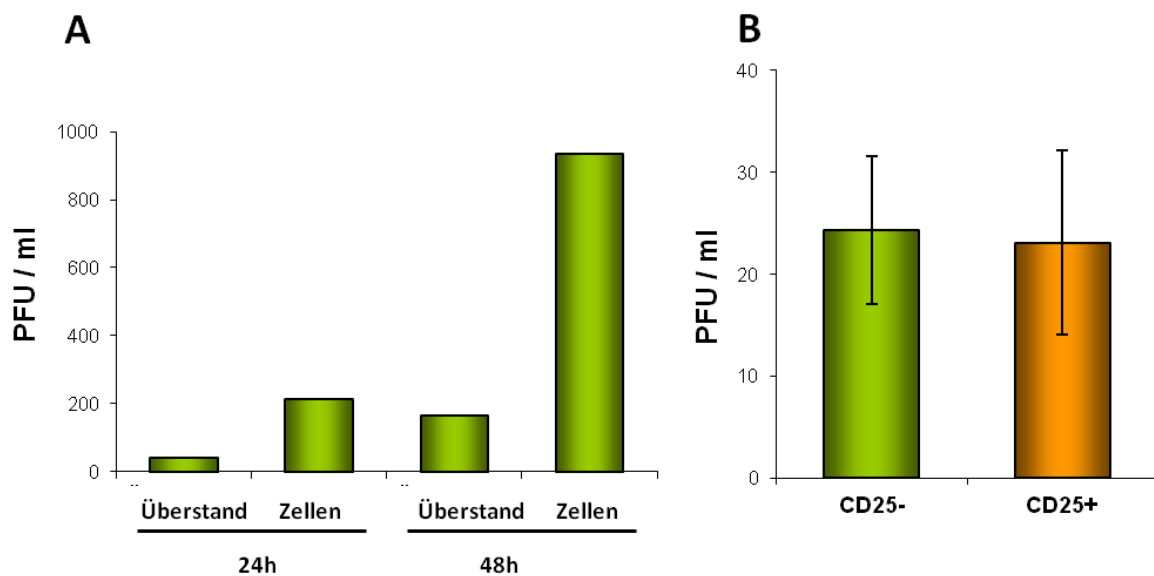


Abb. 5.11: Titration von in T-Zellen produziertem Virus.

Stimulierte CD4⁺ T-Zellen (α -CD3 / CD28 je 1:1000, 48 h) (A) bzw. gereinigte Trn (CD25⁺) und CD25⁻ T-Zellen (CD25⁻) (B) gesunder Spender wurden mit WTF (MOI = 1 (A) bzw. 2 (B)) infiziert und für 24 h (nur A) bzw. 48 h inkubiert. Unter (A) wurden die T-Zellen abzentrifugiert und entweder der Überstand oder das zellassoziierte Virus (nach Homogenisierung des Pellets) in die Titration eingesetzt. Unter (B) wurde nur das

zellassozierte Virus verwendet. Die Titration erfolgte auf B95a-Zellen (je 1×10^5 , 96 h) und die Zahl der infektiösen Partikel wurde berechnet. Unter (B) sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt.

5.2.4. Der Kontakt mit MV führt zur Downregulation von CD150 auf Trn

Nach Bindung des MV an seine Rezeptormoleküle, CD46 bzw. CD150 erfolgt eine Herunterregulierung des Rezeptors [55, 66]. Die Infektion der Trn über CD150 als Eintrittsrezeptor sollte zumindest eine transiente Verringerung der Oberflächenexpression zur Folge haben. Als Vergleichsbasis wurde der Effekt einer MV-Infektion auf die Rezeptorexpression bei $CD25^-$ T-Zellen mit oder ohne vorausgegangene Stimulation untersucht (Abb. 5.12A).

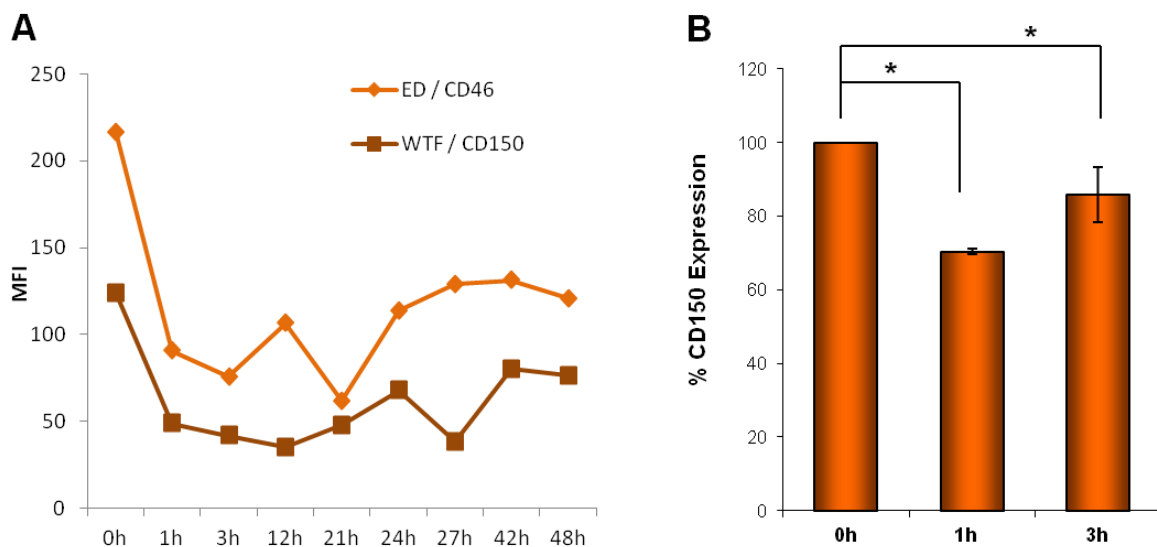


Abb. 5.12: Rezeptordownregulation nach MV-Kontakt.

Unstimulierte (grün) oder stimulierte $CD25^-$ T-Zellen (α -CD3 / CD28 je 1:1000, 48h) (orange) (A) und gereinigte Trn (B) wurden mit ED (A) bzw. WTF (A+B) infiziert (MOI = 1, 48 h) und die Expression des Rezeptors CD46 (A) bzw. CD150 (A+B) über den Infektionsverlauf auf der Zelloberfläche durchflusszytometrisch (α -CD46 1:50 bzw. CD150 1:20) bestimmt. Unter (B) sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Die Abnahme der Rezeptorexpression nach 1 h bzw. 3 h erwies sich gegenüber dem 0-Wert in einem T-Test (gepaart, 95 % einseitig und

zweiseitig bzw. nur einseitig) für beide Zellfraktionen als signifikant (*; 0,00011, 0,020 bzw. 0,042).

Die unstimulierten T-Zellen wurden mit ED infiziert und die Expression von CD46 beobachtet, die stimulierten wurden mit WTF infiziert und die Expression von CD150 verfolgt. In beiden Fällen wurde innerhalb der ersten drei Stunden nach Kontakt ein Rückgang der Rezeptorexpression von ca. 60-70 % detektiert. Die Infektion von Trn mit WTF führte zu einer schwächeren, aber konsistenten Verringerung der CD150-Konzentration auf der Zelloberfläche (ca. 35 %) (Abb. 5.12B). Nach 3 h war die Rezeptorkonzentration bereits wieder angestiegen.

5.2.5. MV-infizierte Trn können nicht proliferieren und werden apoptotisch

Nach Infektion von Trn und CD25⁻ T-Zellen mit MV (WTF bzw. ED) wurde deren Proliferationsverhalten untersucht. Dazu erfolgte eine α -CD3 / CD28-Stimulation, welche bei beiden Zellfraktionen nur zu einer geringfügigen Proliferation führte (Abb. 5.13). Bei den MOCK behandelten Zellen kam es zu einer deutlich stärkeren Expansion. Ausgehend von der Betrachtung infizierter Trn im Lichtmikroskop und Durchflusscytometer, welche auf eine verminderte Vitalität hinwies, wurden Apoptosetests durchgeführt. Mittels Annexin V Bindung lies sich nachweisen, dass infizierten Zellen ausnahmslos innerhalb von drei Tagen apoptotisch werden (Abb. 5.14). Gegenfärbung mit einem MV H-spezifischen Antikörper zeigen, dass sich die erhöhte Apoptose auf infizierte Zellen beschränkte (MV-H+) und nicht bei uninfizierten Zellen aus dem gleichen Ansatz (MV-H-) auftrat (Abb. 5.14A).

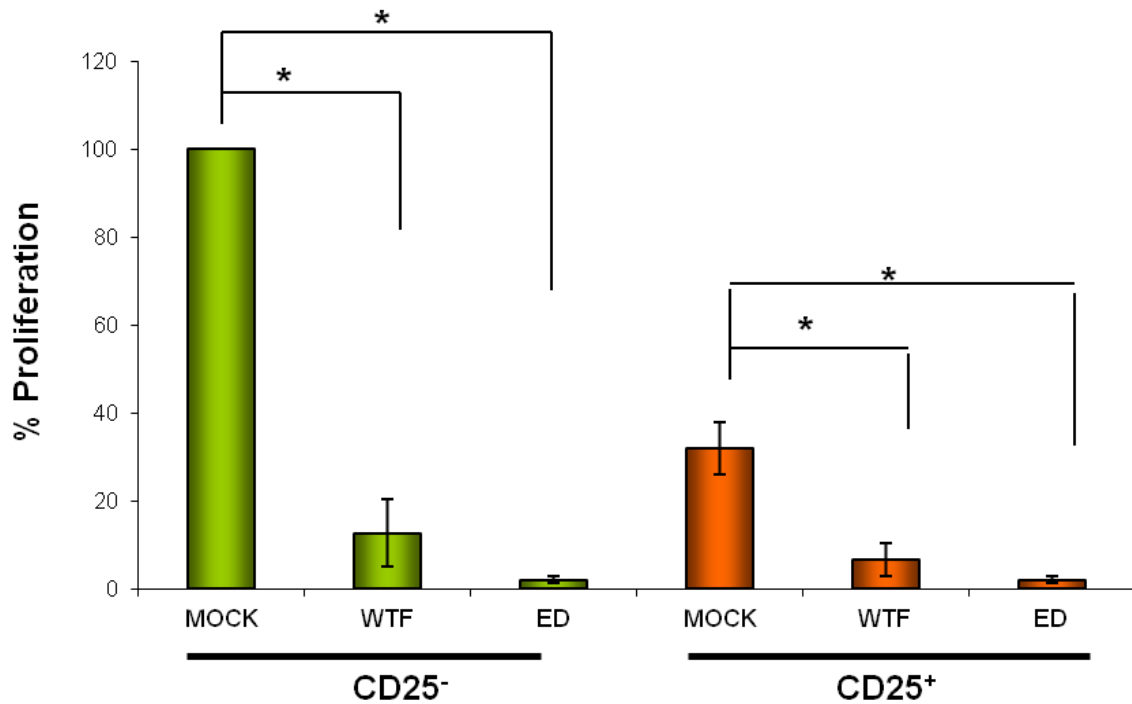


Abb. 5.13: Proliferationsinhibition in infizierten T-Zellen.

CD25⁻ T-Zellen (CD25⁻) und Trn (CD25⁺) gesunder Spender wurden mit MOCK inkubiert oder mit ED bzw. WTF infiziert (MOI = 0,5) und mit α -CD3 / CD28 (je 1:1000) und IL-2 (50U) für drei Tage stimuliert. Anschließend wurde mit Tritiumthymidin markiert (1:500, 16 h) und die Proliferation gemessen. Angegeben ist die relative Proliferation der Populationen, wobei die Proliferation der MOCK behandelten CD25⁻ T-Zellen gleich 100 gesetzt ist. Die Daten setzen sich aus drei unabhängigen Experimenten zusammen. Die Unterschiede in der Proliferationsrate zwischen infizierten (WTF/ED) und nicht infizierten Zellen erwiesen sich in einem T-Test (gepaart, 95 % einseitig und zweiseitig) für beide Zellfraktionen (CD25⁺/CD25⁻) als signifikant (*; CD25⁻: 0,012, 0,024 (ED); 0,010, 0,021 (WTF) / CD25⁺: 0,0071, 0,014 (ED); 0,015, 0,03 (WTF))

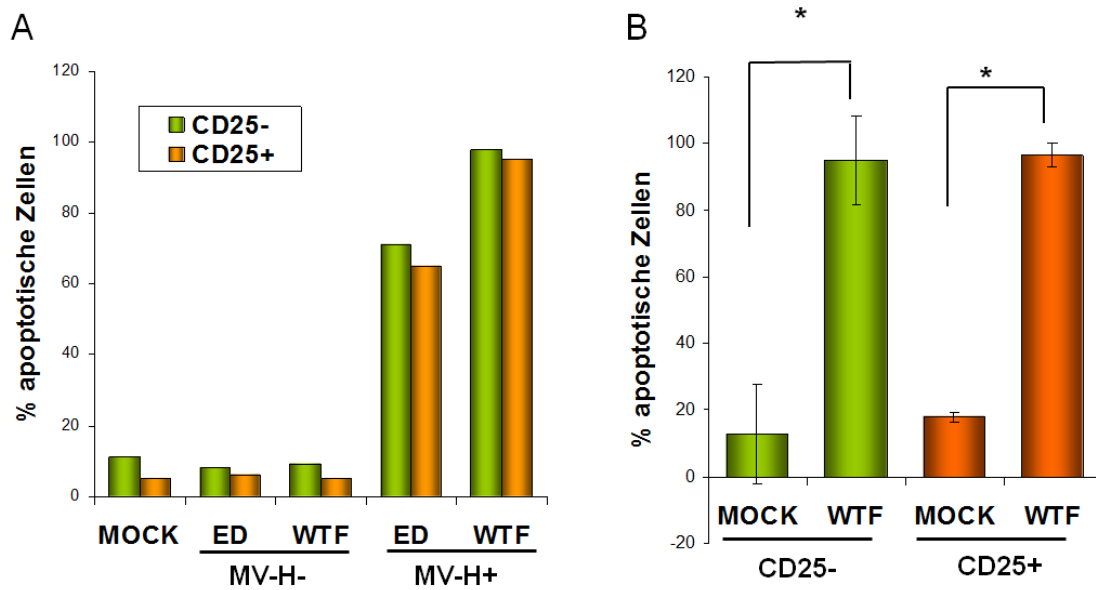


Abb. 5.14: Apoptose in infizierten Trn.

CD25⁻ T-Zellen (CD25⁻) und Trn (CD25⁺) gesunder Spender wurden mit MOCK inkubiert oder mit WTF (A+B) bzw. ED (A) infiziert (MOI = 2, 48 h) und anschließend durchflusscytometrisch gegen Annexin V Bindung (1:50) und MV-H (1:50) (nur A) getestet. (A) zeigt ein repräsentatives Experiment von dreien, (B) die Mittelwerte dreier unabhängiger Experimente. Die Unterschiede im Anteil apoptotischer Zellen zwischen infizierten (WTF) und nicht infizierten Zellen (MOCK) erwiesen sich in einem T-Test (gepaart, 99 % einseitig und 95 % zweiseitig) für beide Zellfraktionen (CD25⁺/CD25⁻) als signifikant (*; CD25⁻: 0,0069, 0,014/ CD25⁺: 0,0069, 0,014).

5.3. Trn und MV-Pathogenese

Ein Hauptziel der Arbeit war es herauszufinden, ob sich die Häufigkeit der Trn bei der MV-Infektion abhängig vom Krankheitsverlauf verändert. Untersucht werden sollte dies anhand von PBMCs aus Patienten mit SSPE und Enzephalitis. Von Interesse war auch, wie sich die Trn über den Verlauf einer akuten Infektion verhalten. Da serielle humane Proben sehr rar sind, wurde hier zum Teil auf immunisierte, WT infizierte, oder nach Immunisierung mit dem WT-infizierte Affen zurückgegriffen.

5.3.1. Kinetik von Trn und aktivierten T-Zellen nach MV-Impfung

Es stand ein seronegativer Spender zur Verfügung, dem vor und zu unterschiedlichen Intervallen nach monovalenter Immunisierung Blutproben entnommen wurden. Die Frequenz der in den PBMCs enthaltenen Trn ($CD4^+/CD25^+$) bzw. aktivierten T-Zellen ($CD4^+/CD25^{dim}$) wurde mittels Marker-Analyse und Zellmorphologie ermittelt. (Trn hatten bei der durchflusscytometrischen Charakterisierung einen FSC-Wert unter 200, aktivierte T-Zellen über 300). Außerdem wurden die Färbungen durch einen funktionellen Suppressionstest überprüft (vergl. Abb. 5.1-3 und 5.6). Es ergab sich eine mehrphasige Zeitkurve welche die Schwankungen in der Häufigkeit beider untersuchter Fraktionen beschrieb (Abb. 5.15):

Nach einem kurzen Anstieg der Trn-Frequenz in den ersten Tagen nach Impfung, der simultan mit einer Zunahme aktivierter T-Zellen erfolgte, war eine intermediäre Reduktion der Trn Fraktion zu verzeichnen. Diese Phase wurde durch einen späten Anstieg beendet, der in einem Abfall hin zu normalen Werten mündete. Der frühe starke Anstieg in der Frequenz aktivierter T-Zellen führte zu einem Maximum nach fünf Tagen und mündet im Anschluss in einen zunächst schnell und dann langsamer erfolgenden Abfall hin zur Ausgangsfrequenz.

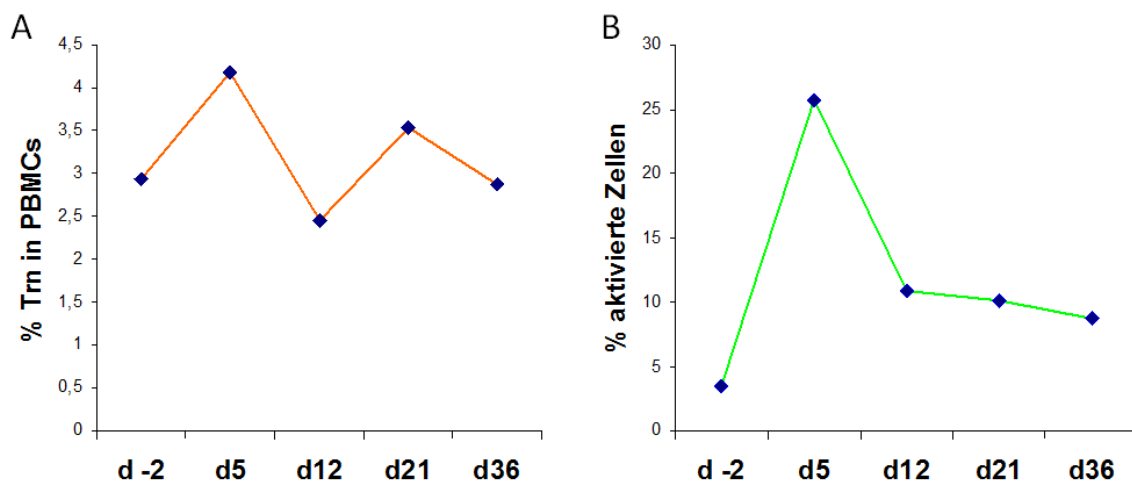


Abb. 5.15: Trn Kinetik nach MV-Impfung.

Einem gesunden adulten Spender wurde vor und an mehreren Zeitpunkten nach MV-Vaccinierung Blut entnommen und mittels Ficollgradienten aufgereinigt. In den

erhaltenen PBMCs wurde mit FACS-Färbung (FoxP3 1:10, CD25 1:50, CD4 1:50) und anhand der Zellgröße (FSC) der Anteil an Trn (A) bzw. aktivierten T-Zellen (B) durchflusscytometrisch ermittelt. Zur Verifizierung der Populationen wurde ein Suppressionstest durchgeführt: Dieser bestand in einer Depletion der Trn durch MACS, Stimulation der depletierten und einer vollständigen T-Zellfraktion mit α -CD3/ CD28 (je 1:1000, 72 h) und Bestimmung der Proliferation nach Tritiumthymidinmarkierung (1:500, 16 h) (vergl. Abb.5.6).

5.3.2. MV-Infektion eines vorimmunisierten Rhesusaffen

Einem sechs Monate zuvor immunisierten Rhesusaffen wurden 2×10^5 PFU WTF intranasal verabreicht und die Frequenz der Trn über einen Verlauf von ca. sieben Wochen bestimmt. Dabei wurde verfahren wie unter 5.3.1 beschrieben. Die Trn-Frequenz zeigte eine sehr ausgeprägte Kinetik: Während der ersten Woche blieben der prozentuale Anteil an Trn stabil bei ca. 4 % (für Rhesusaffen typischer Wert), um im Verlauf der zweiten Woche auf die Hälfte abzusinken. Darauf folgte ein starker Anstieg welcher nach weiteren zwei Wochen seinen Scheitelpunkt bei 12 % erreichte. Sechs Wochen nach MV-Exposition hatte sich die Menge der Trn noch nicht vollständig normalisiert (Abb. 5.16).

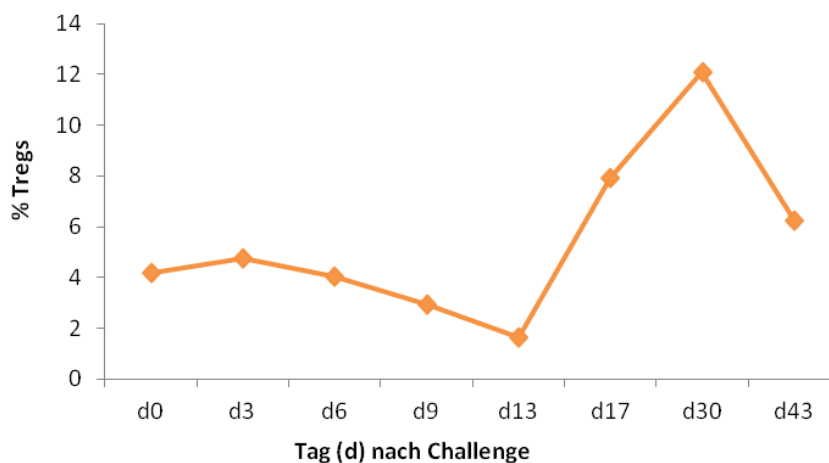


Abb. 5.16: Infektion eines vorimmunisierten Rhesusaffen.

Einem sechs Monate vor dem Experiment immunisierten Affen wurde eine Dosis MV (2×10^5) intranasal verabreicht und an mehreren Zeitpunkten nach MV-Exposition Blut entnommen. In den erhaltenen PBMCs wurde mittels Marker-Färbung (FoxP3 1:10, CD25 1:50, CD4 1:50, CTLA4 1:50) der Anteil an Trn ermittelt.

5.3.3. Trn Kinetiken in Patientenproben

Die als PBMCs vorliegenden Patientenproben wurden in Gruppen mit ähnlichem Alter der Spender getaut und zusammen mit altersgleichen Kontrollen charakterisiert. Ein Aliquot der Zellen wurde jeweils für die FACS-Färbung der typischen Marker abgenommen, der Rest in funktionelle Versuche eingesetzt.

Die Frequenz der Trn wurde nicht nur zur Gesamtpopulation (PBMC) in Relation gesetzt, sondern auch das Mengenverhältnis gegenüber $CD25^+CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen betrachtet. Während der frühen Phase der Enzephalitis war das Verhältnis von $CD4^+$ zu $CD8^+$ T-Zellen invertiert (statt 2:1 ($CD4:CD8$) nun 1:2), der Gesamtanteil der T-Zellen innerhalb der PBMCs blieb jedoch konstant. In einer späteren Phase war diese Verschiebung nicht mehr zu beobachten (Abb. 5.17). Beim Bullösen Pemphigoid, einer Autoimmunerkrankung der Haut, war der Anteil der $CD4^+$ T-Zellen innerhalb der PBMC stark verringert, die B-Zellen ($CD19^+$) jedoch vermehrt. Diese Änderung in der PBMC-Zusammensetzung war auch bei der SSPE Erkrankung zu erkennen, fiel jedoch schwächer aus.

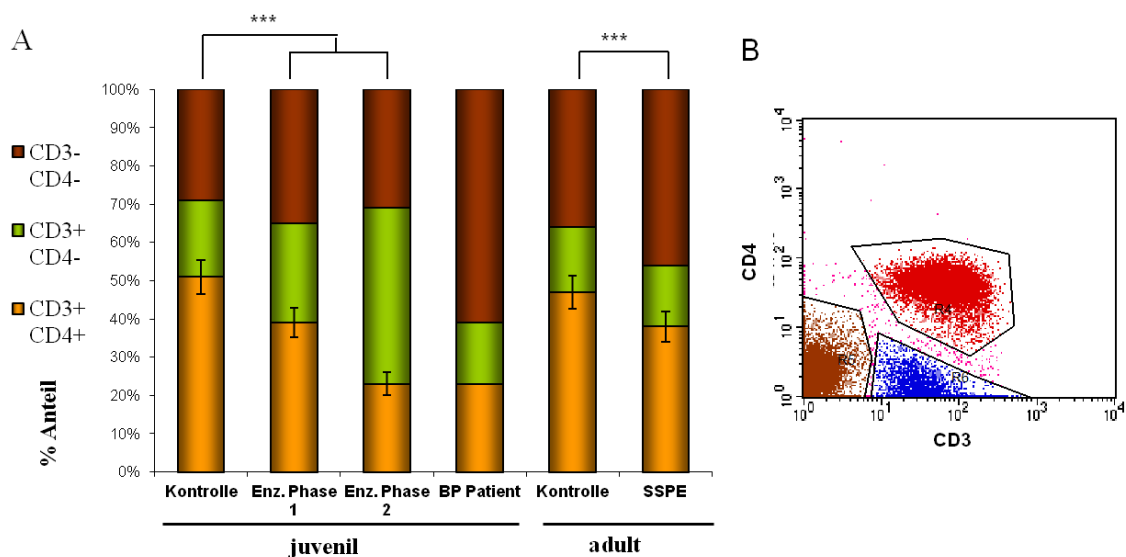


Abb. 5.17: Veränderung der PBMC-Zusammensetzung bei verschiedenen Erkrankungen.

Die Zusammensetzung der PBMC wurde bei Patienten mit verschiedenen Erkrankungen untersucht: MV-Enzephalitis (Enz.), Bullöses Pemphigoid (BP) und SSPE. (A)

Charakterisierung mittels FACS-Färbung gegen CD3 (1:50), CD4 (1:50) und CD25 (1:50) bzw. CD3 (1:50), CD14 (1:30), CD16, CD19, CD56 und HLA-DR (je 1:50). Aufgeführt ist der ermittelte Anteil an CD4⁺ T-Zellen (CD3⁺ CD4⁺), CD8⁺ T-Zellen (CD3⁺ CD4⁻) und Nicht T-Zellen (CD3⁻ CD4⁻). Die Nicht T-Zellen waren zum Großteil CD19⁺. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte von zehn Spendern bzw. altersgleiche Kontrollen (juvenil / adult), außer beim bullösen Pemphigoid für das nur eine Probe zur Verfügung stand. Die Differenzen im Anteil der CD3⁺CD4⁺-Zellen zwischen den juvenilen Kontrollen und den Enzephalitispatienten bzw. den adulten Kontrollen und den SSPE-Patienten erwiesen sich in einem T-Test (gepaart, 99 %, zweiseitig) als signifikant (***) $6,27 \times 10^{-6}$ / $7,33 \times 10^{-8}$ bzw. 0,0094). (B) zeigt eine typische CD3 / CD4 Färbung.

5.3.3.1 Analyse der Trn Kinetik in MV-Enzephalitis Patienten

Die Frequenz der Trn (CD4⁺/CD25⁺/FSC < 200) bzw. aktivierter T-Zellen (CD4⁺/CD25^{dim}/FSC > 300) wurde in einer Zeitkinetik analysiert. Dabei wurden starke Frequenzschwankungen beobachtet, welche verschiedenen zeitlich unterteilten Phasen zugeordnet werden konnten (Abb. 5.18):

Während der ersten Phase (d1-6) zwischen Ausbruch der Masernerkrankung und Auftreten der Enzephalitis typischen Symptome stieg die Frequenz aktivierter T-Zellen an, die Trn verblieben noch auf dem Niveau der Kontrollen. Während die Effektorzellen ihr Maximum erreichten, nahm die Frequenz der Trn für einige Tage (Phase 2, d7-10) um ca. 50 % ab. Im Anschluß erholte sich die Population und verblieb für mehrere Wochen auf dem Ausgangsniveau (Phase 3, d15-42). Gleichzeitig nahm die Frequenz aktivierter T-Zellen allmählich ab, verblieb aber noch auf einem hohen Niveau. Es folgte ein zeitlich sehr begrenzter starker Anstieg der Trn (Phase 4, d45-49) nach dem sowohl die Trn als auch die aktivierten T-Zellen auf ihr normales Niveau absanken und dort verblieben (Phase 5, d51-92).

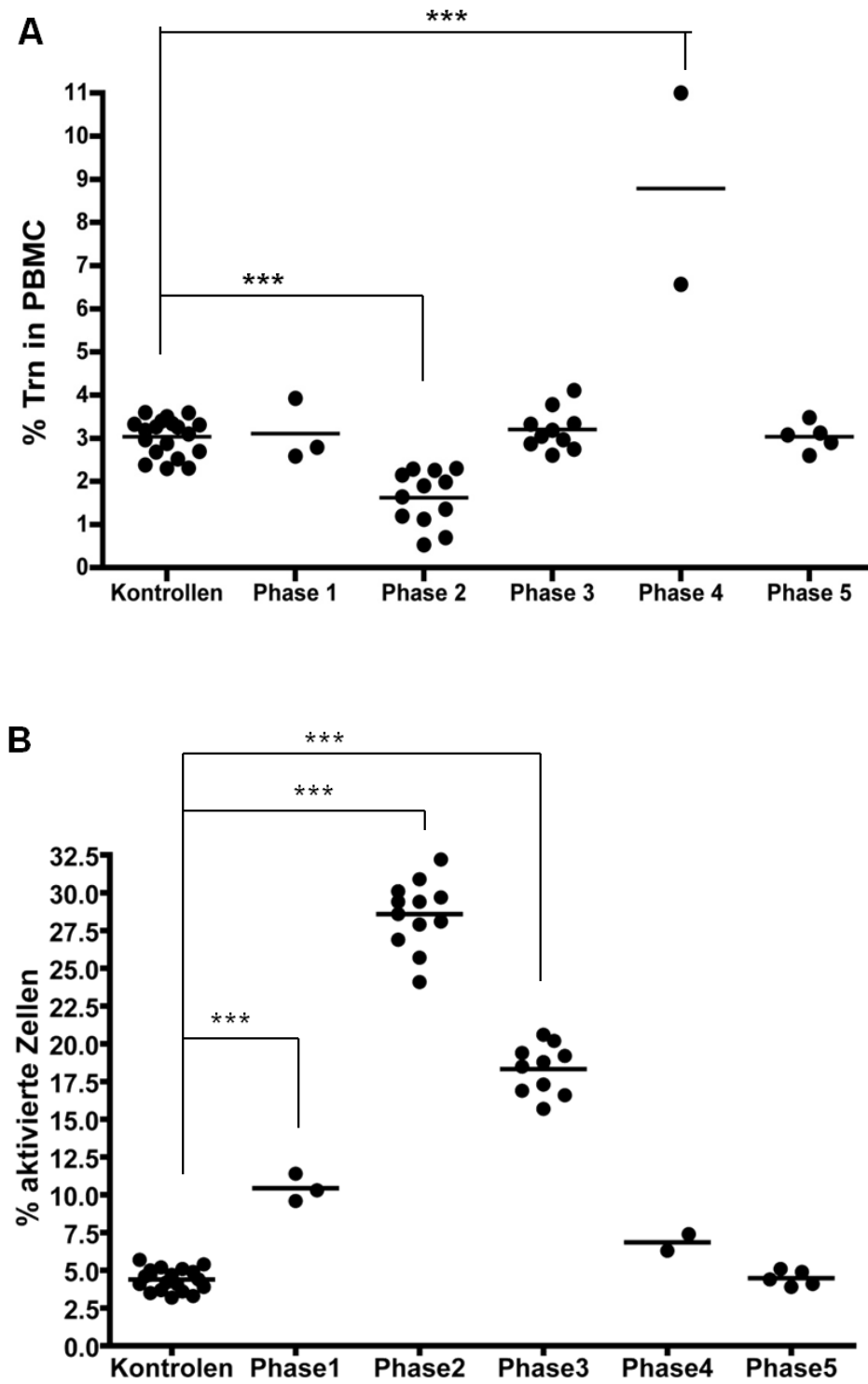


Abb. 5.18: Kinetik der Trn und aktivierten T-Zellen während einer MV-Enzephalitis.

Patientenproben (32) wurden zusammen mit altersgleichen Kontrollen (19) mittels Marker-Färbung gegen FoxP3 (1:5), CD4 (1:50) und CD25 (1:50) und anhand der

Morphologie (FSC) im Durchflusscytometer charakterisiert, um den Anteil der Trn (FoxP3⁺, CD25⁺, CD4⁺, FSC <200) (A) und der aktivierten T-Zellen (FoxP3⁻, CD25^{dim}, CD4⁺, FSC <200) (B) zu ermitteln. Zur Verifizierung der Populationen wurde ein Suppressionstest durchgeführt: Dieser bestand in einer Depletion der Trn durch MACS, Stimulation der depletierten und einer vollständigen T-Zellfraktion Fraktionen mit α -CD3 / CD28 (je 1:1000, 72 h) und Bestimmung der Proliferation nach Tritiumthymidinmarkierung (1:500, 16 h) (vergl. Abb. 5.6). Die ermittelten Frequenzen der Trn und der aktivierten T-Zellen wurden mit dem Krankheitsverlauf in Relation gesetzt, woraus eine Aufteilung in 5 Phasen resultiert (Phase 1: d1-6; Phase 2: d7-10; Phase 3: d15-42; Phase 4: d45-49; Phase 5: d51-92). Die Zeiträume d11-14, d43-44 und d50 wurden keiner Phase zugeordnet, da für sie keine Messwerte vorliegen und sie zwischen zwei Phasen angesiedelt sind.

Die starke Abweichung der Trn-Frequenzen bei Patienten der Phasen 2 und 4 sowie die Frequenzen aktivierter T-Zellen der Phasen 1, 2 und 3 (verglichen mit den Kontrollen) erwies sich in einem T-Test (ungepaart, two-tailed, 99 %) als signifikant (***). Die Kinetik der Trn und der aktivierten T-Zellen korrelierte (A+B).

5.3.3.2 Häufigkeit von Trn innerhalb der PBMCs von SSPE Patienten

Für die zu SSPE verfügbaren Patientenproben wurde der Anteil an Trn auf gleiche Weise ermittelt wie für die Patienten mit akuter Masernenzephalitis (Abb. 5.19). Dabei wurden in 23 Patienten reduzierte Frequenzen an Trn festgestellt, in 5 Patienten waren die Mengen jedoch vergleichbar mit den Kontrollen. Die Patienten welche eine den altersgleichen Kontrollen ähnliche Trn Frequenz innerhalb der PBMCs zeigten unterschieden sich weder bezüglich des Alters, der Krankheitsstadiums, der Schnelle des Krankheitsverlaufs (bei manchen SSPE-Patienten schreitet die Erkrankung ungewöhnlich schnell oder langsam voran), der Qualität des Probenmaterials oder der Therapie von den anderen SSPE Patienten. In einem T-Test erwies sich die Trn Frequenz in PBMCs aus SSPE Patienten als signifikant niedriger, verglichen mit den Kontrollen. Damit liegt die Frequenz der Trn bei SSPE zwar allgemein niedriger, dies lässt sich jedoch nicht stadienspezifisch, altersspezifisch oder anhand der Therapie korrelieren.

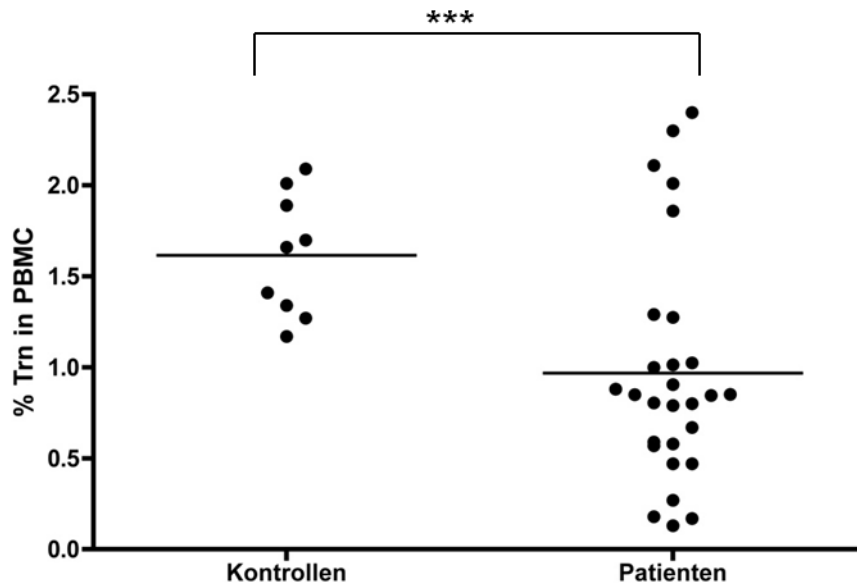


Abb. 5.19: Trn Häufigkeit bei SSPE-Patienten.

Die Trn-Frequenz in Ficoll gereinigten PBMC aus SSPE-Patienten (28) und altersgleichen Kontrollen (9) wurde mittels FACS-Färbung gegen FoxP3 (1:5), CD4 (1:50) und CD25 (1:50) bestimmt, die Ergebnisse mit funktionellen Tests (Proliferation der CD25 depletierten bzw. nicht depletierten PBMCs nach α -CD3 / CD28 Stimulation und Tritiumthymidinmarkierung (vergl. Abb. 5.6)) überprüft. Die verwendeten Proben / Kontrollen stammten zum Teil von Erwachsenen und zum Teil von Kindern, deren höhere Trn Frequenzen im Rahmen einer Alterskorrektur mit einem Faktor von 0,65 verrechnet wurden. Die niedrigeren Trn-Frequenzen bei Patienten gegenüber den Kontrollen erwiesen sich in einem T-Test (gepaart, two-tailed, 99 %) als signifikant (***) .

5.4. Induzierte Tregs

Induzierte Tregs lassen sich anhand ihrer Cytokinproduktion (IL-10 / TGF β) nachweisen. Zur Bestimmung der Gesamtmenge der gebildeten Cytokin mRNA wurden PCR-Experimente durchgeführt. Zahl und Art der Cytokinproduzenten wurde mittels intrazellulärer FACS-Färbung bestimmt.

5.4.1. IL-10 Produktion in MV-stimulierten peripheren Lymphozyten aus SSPE

Patienten

Nach Verfügbarkeit wurden bis zu 1×10^7 Zellen in eine RT-PCR eingesetzt. Die Zahl der in einem Probenaliquot enthaltenen lebenden Zellen bewegte sich in der Regel zwischen 1×10^5 und 4×10^6 . Soweit vorhanden wurden deshalb mehrere Datums gleiche Aliquots eines Patienten gepoolt. Vor Aufschluss wurden die Zellen 24 h mit gereinigtem UV-inaktiviertem WTF stimuliert (24 h / 14 $\mu\text{g/ml}$). Die Ausbeute nach Extraktion lag bei etwa 1 μg RNA pro 10^6 Zellen. Die RNA Qualität bzw. Menge wurde durch Elektrophorese oder im Photometer ermittelt.

In der RT-Reaktion wurde möglichst viel RNA verwendet (14 μl aber höchstens 2 μg), um eine hohe Ausbeute zu erhalten. Die Verwendung unterschiedlicher Mengen von Ausgangsmaterial fand bei der Datenauswertung Berücksichtigung. Das Produkt wurde in eine RT-PCR oder Light-Cycler PCR eingesetzt. Eine Kontroll-PCR mit dem Haushaltsgen hALAS erlaubte Rückschlüsse auf die Qualität und die Mengenunterschiede der eingesetzten cDNA (Abb. 5.20A). In der PCR gegen IL-10 (Abb. 5.20B) wurde meist ein Standard eingeschlossen.

Im Rahmen der Auswertung wurde, unter Zuhilfenahme einer Eichreihe, die zu Beginn in der Probe enthaltene Kopienzahl der IL-10 cDNA errechnet. Diese wurde mithilfe der Kontroll-PCR in Relation zur cDNA Gesamtmenge gesetzt. Die zu Beginn eingesetzte Zellzahl und die nach der Extraktion erhaltene RNA-Menge wurden ebenfalls berücksichtigt.

Ohne Stimulation wurde in den Blutlymphozyten kaum IL-10 mRNA gebildet (nicht gezeigt), stimulierte man die Zellen hingegen mit MV-Antigenen fand eine starke Erhöhung der Produktion statt. Die Patientenproben wiesen eine hohe Streuung auf. Die Proben mit der höchsten IL-10 Expression waren stets Patientenproben. Jedoch war die Expression nicht in allen Patientenproben höher als in den Kontrollen (Abb. 5.20C). Die Verrechnung des vorhandenen IL-10 mit der Gesamtmenge der gebildeten cDNA oder der Ausbeute der RNA-Extraktion führte zu keiner wesentlichen Änderung. Die IL-10 Expression korrelierte nicht mit dem Stadium der SSPE-Erkrankung oder der Schnelle des Verlaufs. Zwei Patientenproben mit besonders hoher IL-10 Expression wiesen hinsichtlich der klinischen Verlaufsform bzw. anderer Parameter wie Medikamentation und Alter keine definierten Besonderheiten auf.

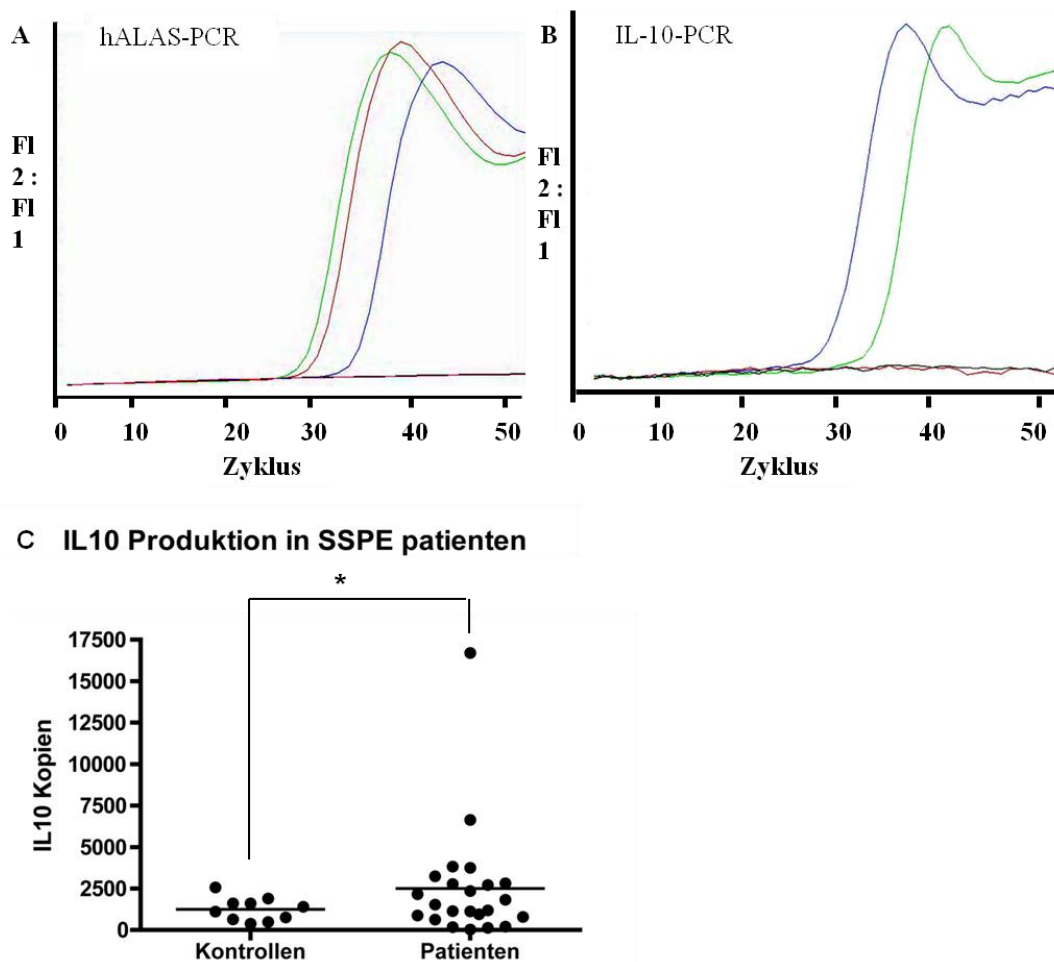


Abb. 5.20: IL-10 RNA in MV-stimulierten Patientenzellen.

PBMC (je $1 \times 10^6 - 1 \times 10^7$) aus SSPE Patienten und Proben gleichaltriger gesunder Spender wurden mit inaktiviertem WTF ($14 \mu\text{g/ml}$, $1,5 \text{ J/cm}^2$) für 16 h stimuliert. Nach der RNA-Extraktion wurden $14 \mu\text{l}$ des Produkts (aber maximal $2 \mu\text{g}$ RNA) in eine RT-Reaktion überführt. $2 \mu\text{l}$ (10 %) der cDNA wurden mittels Light-Cycler PCR mit dem Haushaltsgen hALAS bzw. IL-10 analysiert. (A+B) Dargestellt ist das Verhältnis der Fluoreszenz der verwendeten Sonden (FI2: FI1 im Abhängigkeit vom PCR-Zyklus (repräsentatives Einzelexperiment). Mit Zunahme der Produktmenge (blaue Linie SSPE, grüne Linie stimulierte Kontrolle, rote Linie unstimulierte Kontrolle) steigt dieses durch einen FRET-Effekt an. (C) Darstellung aller analysierter Proben (23 Patientenproben und zehn Kontrollen) Die Differenz in der IL-10 Expression zwischen den Kontrollen und Patientenproben erwies sich in einem T-Test (gepaart, one-tailed, 95 %, $P = 0.0475$) als knapp signifikant.

5.4.2. Die Induktion von IL-10 nach MV-Stimulation erfolgt in T-Zellen

Um darzustellen, welche Zellpopulationen (nach MV-Exposition) IL-10 exprimieren, wurden intrazelluläre FACS-Färbungen (α -IL-10, 1:10) durchgeführt. Aufgrund der geringen Zahl zur Verfügung stehender Patientenproben wurde auf PBMCs seropositiver gesunder Spender zurückgegriffen. $CD4^+$ T-Zellen, $CD8^+$ T-Zellen und Nicht-T-Zellen wurden mittels CD3 (1:50)/CD4 (1:50) Doppelfärbung voneinander abgegrenzt. Nach Exposition mit UV-inaktiviertem Virus (WTF, 14 μ g/ml, 1,5 J/cm²) war in etwa 6 % der Zellen (nach 6 bzw. 24 h) IL-10 Expression nachweisbar, nach CD3/CD28 Stimulation waren es etwa 3 bzw. 4 % (Abb. 5.21A). Die IL-10 Expression beschränkte sich fast ausschließlich auf $CD4^+$ T-Zellen.

Zur Abgrenzung von Th₂-Zellen und induzierten Treg wurden CD25 (1:50)/ IL-4 (1:50) Doppelfärbung durchgeführt. Nach 6 h war die Zahl der IL-10 und IL-4 produzierenden Zellen (Th₂) noch gering, nach 24 h jedoch stark angestiegen. Demnach wurde IL-10 nach 6 h hauptsächlich von Tregs nach 24 h vor Allem von Th₂-Zellen exprimiert (Abb. 5.21B).

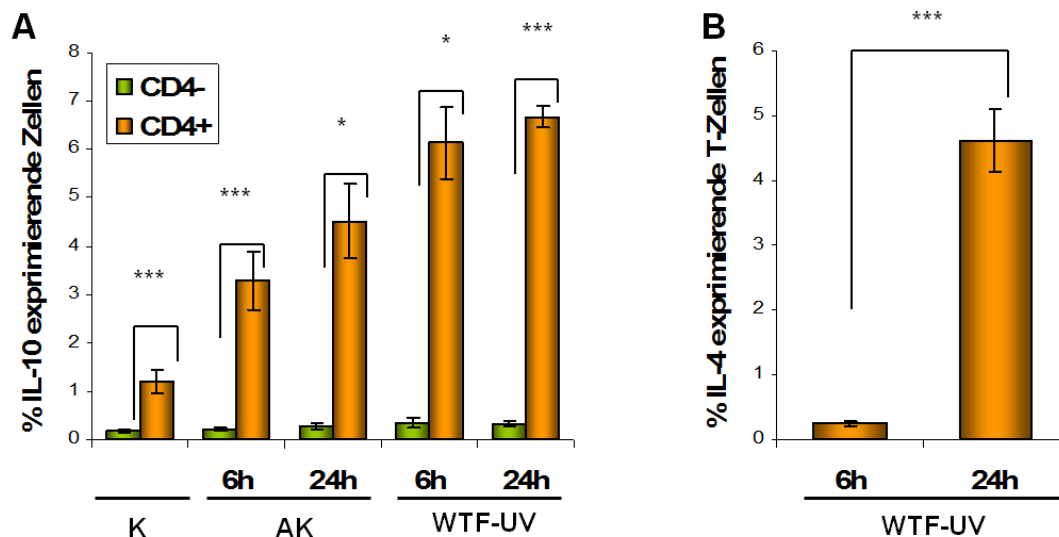


Abb. 5.21: IL-10 FACS-Färbung in MV-stimulierten PBMC.

PBMC (je 1×10^6) von MV-seropositiven gesunden Spendern wurden unbehandelt (Kontrolle: K) nach Virus- (WTF-UV) (14 μ g/ml, 1,5 J/cm²) (A+B) oder Antikörperstimulation (AK) (α -CD3 / CD28 je 1:1000) (A) gefärbt (IL-10 (1:10), CD3 (1:50), CD4 (1:50), CD25 (1:50) und IL-4 (1:50)) und durchflusscytometrisch

analysiert. Gezeigt sind die Expression von IL-10 in CD4⁺ und CD4⁻-Zellen (A) sowie die Expression von IL-4 in CD4⁺-Zellen (B). Aufgeführt sind die Mittelwerte von je drei unabhängigen Experimenten, sowie die Standardabweichung. Die Unterschiede in der Frequenz IL-10 exprimierender Zellen zwischen der CD4⁺ und der CD4⁻-Fraktion (A) sowie in der Frequenz IL-4 exprimierender Zellen nach 6 und nach 24 h (B) erwiesen sich in einem T-Test (gepaart, two-tailed, 95 bzw. 99 %,.) als signifikant (A: ***/ * ; $5,6 \times 10^{-4}$, $7,8 \times 10^{-7}$, 0,014, 0,011, $5,4 \times 10^{-5}$ // B: ***/ 0.0053).

6. Diskussion

Ein Kennzeichen des MV ist die Vielzahl von Mechanismen zur Immunsuppression seines Wirts [80]. Tregs besitzen ebenso suppressorische Aktivität. Sie balancieren die Immunreaktion, um Immunpathogenität und Autoimmunität zu verhindern [116, 127]. Manche Pathogene nutzen das Suppressionspotential dieser Zellen, um der Wirtsabwehr zu entgehen [193, 194, 196, 199, 200]. Durch die Expression von Reifungsmarkern auf Trn [119] kann es zu einer präferentiellen Infektion dieser Population kommen [190]. Führt diese Infektion zu einer Depletion von Trn kann dies zur Ausbildung einer Autoimmunerkrankung beitragen [117].

Der Tropismus des MV wurde im Rhesusaffen-Modell untersucht. Dabei wurde beobachtet, dass in erster Linie CD-150⁺ Lymphozyten und nur in geringerem Maße Epithelzellen infiziert wurden [24]. Falls der Reifungsmarker und Rezeptor des MV CD150 auf humanen Trn exprimiert wird, könnte es demnach zu einer präferentiellen Infektion dieser Zellpopulation durch MV kommen. Bei transgenen Mäusen welche das humane CD-150 exprimieren, wurde bereits gezeigt, dass Trn durch MV infiziert werden. Im Zuge der MV-Infektion kommt es in diesem Modelloganismus zu einer Störung der T-Zell-Homesostase durch Anreicherung der Trn [203]. Zudem wurden erhöhte Mengen von Trn auch im Gehirn nachgewiesen, was auf einen Einfluß der Trn bei der Ausbildung von SSPE hindeuten könnte. Dagegen führten zwei Untersuchungen bei Patienten mit akuter Maserninfektion zu widersprüchlichen Ergebnissen [205, 206]. Während in einer Studie eine Vermehrung von Trn und erhöhte IL-10 Spiegel im Plasma ermittelt wurden, zeigte die andere keine Hinweise auf eine Anreicherung oder Induktion regulatorischer T-Zellen.

Ziel dieser Arbeit war es zu ermitteln, inwiefern das immunsuppressive MV mit Tregs bei Impfung bzw. akuten Infektionen und bei Komplikationen wie SSPE und MV-Enzephalitis interagiert, und ob dadurch die Pathogenese des MV beeinflusst wird. Dazu sollten jeweils die Größe und Aktivität unterschiedlicher Treg Populationen untersucht werden. Die zahlreichen Subpopulationen regulatorischer T-Zellen waren in jüngster Zeit Ziel intensiver Forschung, sind aber noch immer nicht hinreichend charakterisiert [114, 115]. In dieser Arbeit berücksichtigt wurden die Trn, durch deren Depletion Autoimmunerkrankungen entstehen können [117] und die induzierten Tregs,

welche durch Fremdartigene unter tolerogenen Bedingungen induziert werden und deshalb bei Persistenzen von Bedeutung sein können [157]. Voraussetzung für die Darstellung der entsprechenden Populationen war die Adaption zuverlässiger Charakterisierungsmethoden. Trn lassen sich anhand bestimmter Oberflächenmarker darstellen, welche meist auf aktivierten Zellen exprimiert werden und mit dem suppressiven Charakter assoziiert sind, oder aus dem besonderen Reifezustand dieser Zellen resultieren [119]. Anhand zweier dieser Marker (CD4 / CD25) kann auch eine Aufreinigung mittels magnetischer Zellseparation erfolgen [153].

Nach einer methodischen Abstimmung auf die Menge der eingesetzten Zellen und die spenderspezifische Expressionsstärke der Zielmoleküle konnten bei der magnetischen Zellseparation hohe Reinheiten und Ausbeuten erzielt werden (Abb. 5.1 + 5.2). Als Anteil der Trn in der Ausgangspopulation wurden, übereinstimmend mit der Literatur [153], 2 % bzw. 3,5 % bei Personen unter 16 Jahren in PBMC ermittelt. Die übrigen T-Zellen ließen sich weiter in eine CD25 negative und eine leicht positive Fraktion („dim“ oder „low“) auftrennen. Letztere enthielt, wie mittels Durchflusszytometrie ermittelt, Memory-, und aktive Effektor-Zellen.

Für die Darstellung der Trn mittels Oberflächenmarker wurden CD3 und CD4, die als Treg Marker geltenden Genprodukte CTLA4, GITR, CD25, FoxP3 [114, 121] und das bekanntlich auf stimulierten Trn exprimierte CD150 [202] herangezogen. Die Färbungsmuster der Trn Marker deckten sich weitgehend. Vereinzelt erwiesen sich beim Abgleich jedoch nur für einen Teil der Marker positiv. In stimulierten Zellproben (z.B. mit α -CD3 / CD28) ließ sich die Trn-Population in Übereinstimmung mit dem beschriebenen Expressionsprofil der verwendeten Marker [119] nur noch mit verringerter Genauigkeit von den aktivierten Zellen abtrennen. Am aussagekräftigsten erwies sich die verhältnismäßig starke und spezifische Färbung des Transkriptionsfaktors FoxP3 [150], welche keine physiologischen Tests zur Verifizierung verlangte. Die bei magnetischer Zellseparation und durchflusszytometrischer Messung ermittelten Trn-Frequenzen stimmten überein (Abb. 5.3).

Zur funktionellen Darstellung von Tregs eignen sich deren suppressive Wirkung auf T-Zellen [141], welche ein Arretieren im Zellzyklus zur Folge hat, die Abhängigkeit von

fremd produzierten Cytokinen wie IL-2 [155, 156], sowie die Expression von Anergie-Markern und der *in vitro* anerge Charakter von Trn [139, 140].

Im Rahmen funktioneller Tests hemmten unstimulierte Trn die Proliferation stimulierter T-Zellen in einem Verhältnis von 1:1 völlig, in einem natürlichen Verhältnis um etwa ein Drittel (Abb. 5.4). Die Trn selbst proliferieren infolge einer mitogenen TCR Stimulation nur etwa 1/10 so stark wie normale T-Zellen. Dies stimmt mit publizierten Daten überein [141]. Während die Trn in einer gemischten Population oder nach Zugabe von IL-2 und Feeder-Zellen für einige Tage vital blieben, wurden sie als reine Population, wie bereits beschrieben [155], nach wenigen Tagen apoptotisch. IL-2 und Cytokin produzierende Zellen (die aufgrund einer Bestrahlung nicht selbst proliferieren konnten) erhöhten den Nucleotidabbau nach TCR Stimulation.

Die funktionellen Tests dienten nicht nur der Beschreibung der Trn, sondern eigneten sich auch zur Verifizierung von magnetischen Separationen oder durchflusscytometrischen Messungen (Abb. 5.6) sowie zur Beurteilung der Probenqualität. Die Patientenproben juveniler und adulter Spender aus unterschiedlichen Quellen enthielten meist nur wenige und lange gelagerte Zellen, waren jedoch meist noch in gutem Zustand. Durch konstante Ergebnisse bei der Darstellung, Aufreinigung, Quantifizierung und Aktivitätsbestimmung von Trn sowie die ausreichende Probenqualität waren die Voraussetzungen für eine Beschreibung der durch MV-Infektion auftretenden Veränderungen in der Frequenz und Aktivität humaner Trn erfüllt.

Aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit von Patientenproben sollten auch Proben von Rhesusaffen analysiert werden. Dies setzte die Infizierbarkeit der Affen durch MV, sowie den Einsatz kreuzreaktiver Antikörper für Aufreinigung, Darstellung und Stimulation voraus. In Übereinstimmung mit publizierten Daten konnte die Suszeptibilität von Rhesusaffen PBMCs gegenüber MV-Infektion [204] bestätigt werden (nicht gezeigt). Mittels magnetischer Zellseparation waren eine Aufreinigung der CD4⁺ T-Zellen sowie eine Depletion der CD25⁺ Zellen möglich. Unter Verwendung von humanem α -CD3 / α -CD28 oder CD28SA konnte eine (aufgrund eingeschränkter Kreuzreaktivität im Vergleich zu humanen T-Zellen schwache) Proliferation ausgelöst werden, welche in der CD25 depletierten Population deutlich stärker ausfiel als in der

vollständigen (Abb. 5.5 C+D). Eine Aufreinigung der CD25⁺ Zellen war dagegen nicht möglich. Zur Darstellung im Durchflusscytometer wurden geeignete Antikörper gegen FoxP3, CD25, CD3, CD4 und CTLA4 ermittelt (Abb. 5.5 A+B). Damit konnten sowohl humane als auch Proben von Rhesusaffen zur Untersuchung der Treg-Virus-Wechselwirkung herangezogen werden.

Die Untersuchung von Patientenproben wurde durch Infektionsexperimente mit Trn gesunder Spender ergänzt. Ausgangspunkt war die konstitutionelle Expression bestimmter Reifungsmarker aufgrund der Affinität von Trn zu Eigenantigen [123, 127]. Manche dieser Marker (z.B. CCR5) dienen immunsuppressiven Viren wie HIV und FIV als Eintrittsrezeptoren und führen zu einer präferentiellen Infektion von Trn [188-191]. CD150, der Eintrittsrezeptor des MV WT, ist ebenfalls ein Reifungsmarker. Nicht aktivierte CD25⁻ T-Zellen exprimieren kein CD150 und sind durch WT MV kaum infizierbar [7]. Dagegen wurde CD150, auf aktivierten T-Zellen, B-Zellen und Dendritischen Zellen und insbesondere auf stimulierten Trn nachgewiesen [202]. Zudem werden Trn in für das humane CD150 transgenen Mäusen infiziert [203]. Ob auch auf unstimulierten humanen Trn CD150 exprimiert wird und dies gegebenenfalls zu einer präferentiellen Infektion führt, war nicht bekannt.

In dieser Arbeit konnte mittels durchflusscytometrischer Analyse gezeigt werden, dass CD150 tatsächlich auf unstimulierten Trn exprimiert wird; die Färbungen lieferten eine mehrfach höhere Intensität (Abb. 5.7) im Vergleich zu den übrigen T-Zellen. Dies korrelierte bei jeder untersuchten MOI mit einer erhöhten Infektion der Trn (Abb. 5.8). Dieser Befund beschränkte sich auf eine Infektion mit dem WT: Bei einer Infektion mit ED, welcher CD46 als Eintrittsrezeptor nutzt, erhielt man vergleichbare Infektionsraten bei Trn und CD25 depletierten T-Zellen.

Zum Nachweis eines CD150 abhängigen Infektionsmechanismus bei der WT-Infektion, wurde die Virusbindung mittels gegen den Rezeptor gerichteter Antikörper inhibiert (Abb. 5.9). Dabei zeigte sich, ein von der Antikörperkonzentration abhängiger Rückgang der Infektionsrate bis auf das bei CD25⁻ T-Zellen beobachtete Niveau. Rezeptorinteraktion lässt sich zudem oft anhand der daraus resultierenden Downregulation nachweisen, etwa bei der Infektion unstimulierter T-Zellen mit ED (für CD46) oder bei mitogen stimulierten T-Zellen nach WTF Infektion (für CD150) [55,

56, 66]. Bei infizierten Trn kam es durch Viruskontakt zu einer deutlichen transienten Reduktion der Oberflächenexpression von CD150 (Abb. 5.11). Die präferentielle Infektion von Trn erfolgt folglich über den Eintrittsrezeptor CD150.

Die Folgen der präferentiellen Infektion von Trn wurden untersucht und in Relation zur Infektion von CD25⁻ T-Zellen [83] gesetzt. Im Rahmen der Experimente verhielten sich die infizierten Trn in jeder Hinsicht wie MV-infizierte CD25⁻ T-Zellen: Es konnte gezeigt werden, dass eine Infektion mit WTF das Proliferationsvermögen von Trn nach Antikörperstimulation des TCR-Komplexes verringert (Abb. 5.12). Im Gegensatz zur in transgenen Mäusen beobachteten Anreicherung [203], deren Mechanismus noch ungeklärt ist, wurde bei der *in vitro* Infektion humaner Trn keine Expansion gemessen. In Folge der Infektion wurde zudem nur wenig Virus gebildet (Abb. 5.10). Innerhalb von 48 h wurden die infizierten Trn apoptotisch, nicht jedoch uninfizierte Zellen im selben Ansatz (Abb.5.13). Damit unterscheidet sich die präferentielle Trn-Infektion durch das MV deutlich von der bei HIV oder FIV beschriebenen. Nach HIV-Infektion werden die Trn in einem frühen Krankheitsstadium depletiert, was zu einer erhöhten Aktivierung von T-Zellen beiträgt. Die Infektion verläuft jedoch im Gegensatz zum MV produktiv [188, 190]. Auch die Infektion durch FIV verläuft produktiv. Es tritt zudem kein Depletionseffekt auf, vielmehr kommt es zur Bildung eines Reservoirs und einer Aktivierung und Expansion infizierter Trn [135, 191, 192].

Die Frequenz, Vitalität und Aktivität der Trn ist nicht nur durch direkte Wechselwirkung mit einem Pathogen Schwankungen unterworfen. Auch die Freisetzung von Eigenantigenen aus zerstörten Zellen und IL-2 Ausschüttung von Effektorzellen im Verlauf einer Immunantwort übt einen Einfluss auf diese Population aus [116]. Th₁-Zellen bilden nach antigen-spezifischer Stimulation große Mengen IL-2, welches die Trn stimuliert, und über die Hemmung der Effektorzellen zu einer negativen Rückkopplung führt. Nach Impfung eines adulten Spenders wurden deutliche Schwankungen in der Zahl der Trn ermittelt, welche aufgrund ihrer zeitlichen Abfolge gut mit der Freisetzung von IL-2 und Eigenantigenen durch (parallel beobachtete) Effektor-Zellen vereinbar sind (Abb. 5.14). Der Rückgang des Anteils aktivierter T-Zellen auf das Ausgangsniveau wird zudem von einem Anstieg in der Trn-Frequenz begleitet. Einem seropositiven Rhesusaffen wurde WT MV-BIL intratracheal verabreicht. Obwohl es keine klinischen Anzeichen einer Infektion gab, fand man wie

beschrieben aktivierte und infizierte Lymphozyten [204]. Die Trn-Häufigkeit war ausgeprägten Schwankungen unterworfen (Abb. 5.15), welche einen kurzen Anstieg und moderaten Rückgang der Trn-Frequenz im Laufe der Immunantwort sowie einen starken Anstieg vor deren Abklingen beinhalteten. Die Befunde stimmen gut mit dem Modell der Rückkopplung überein, es handelt sich jedoch bisher um Einzelexperimente. Bei Impfung und Challenge traten weder eine intensive Depletion der Trn in der frühen Phase noch eine anhaltende Vermehrung der Trn in einer späteren Phase der Immunreaktion auf.

Eine Depletion von Trn würde die Treg vermittelte Balance des Immunsystems stören und könnte zur Ausbildung von Autoimmunerkrankungen führen [128, 129]. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass es *in vitro* durch präferentielle Infektion von Trn zu einem Depletionseffekt kommen kann (Abb. 5.13). Da es sich bei der akuten MV-Enzephalitis vermutlich um eine Autoimmunerkrankung handelt [9, 10, 12], könnte ihre Ausbildung mit einer Depletion von Trn korrelieren.

Übereinstimmend mit dieser These wurden bei der MV-Enzephalitis starke Schwankungen der Trn-Frequenz beobachtet. Diese ließen sich verschiedenen zeitlich recht strikt unterteilten Phasen zuordnen (Abb. 5.17) und beinhalten sowohl einen deutlichen Depletionseffekt zu Beginn der Erkrankung, als auch einen starken Anstieg der Trn Frequenz vor dem Abklingen der Immunantwort. Durch die zufällige Verteilung der Entnahmezeitpunkte konnten manchen Phasen nur wenige Proben zugeordnet werden. Dennoch waren die beobachteten Frequenzunterschiede signifikant. Der deutliche Depletionseffekt, welcher bei den Infektionsversuchen auftrat, konnte demnach, im Gegensatz zur Impfung und Challenge (Abb. 5.14 und 5.15), bei MV-Enzephalitispatienten auch *ex vivo* bestätigt werden (Abb. 5.17). Eine vergleichbare Reduktion der Trn-Frequenz wurde in der Probe eines Patienten mit Bullösem Pemphigoid, einer Autoimmunerkrankung der Haut, festgestellt (nicht gezeigt).

Der Depletionseffekt in Folge der akuten MV-Enzephalitis war auf eine frühe Phase begrenzt, nach der es zu einer raschen Erholung der Trn-Population bis zum Erreichen des Ausgangsniveaus kam. Diese Trn-Frequenz reicht vermutlich nicht aus, um eine bereits gestartete Immunreaktion effektiv zu unterdrücken. Erst zeitgleich mit dem starken Anstieg der Trn-Frequenz ca. sieben bis acht Wochen nach Infektionsbeginn

kam es zu einer Reduktion der Effektorzellen. Der Anstieg fiel deutlich stärker aus als nach MV-Impfung und erfolgte deutlich später. Möglicherweise steht die zeitliche Verzögerung mit dem frühen Depletionseffekt in Zusammenhang. Auf dem Scheitelpunkt der Immunreaktion unterschied sich das Verhältnis zwischen Trn und aktivierten T-Zellen im Gegensatz zur Anfangsphase nicht von dem bei Impfung beobachteten. Dies lässt vermuten, dass die regulierende Wirkung der Trn während der Anfangsphase der Infektion für den weiteren Verlauf von besonderer Bedeutung ist.

Eine verringerte Trn-Frequenz wurde auch bei durch Bakterien ausgelösten Autoimmunerkrankungen, nämlich der durch *Pneumocystis carini* ausgelösten Hyperinflammation der Lunge bei Mäusen und bei der *Helicobacter hepaticus* induzierten Kolitis ermittelt [207, 208]. Ebenso findet man reduzierte Trn-Frequenzen bei einer ganzen Reihe weiterer Autoimmunerkrankungen, etwa bei IPEX (Immunderegulierung, Polyendocrinopathie, Enteropathie und X-abhängige Vererbung) [209, 210], welches durch Mutationen in FoxP3 verursacht wird, Autoimmun-Encephalomyelitis [211], Kolitis [212] und Autoimmun-Diabetes [213]. Dagegen wurden bei rheumatischer Arthritis keine verringerte Trn-Frequenzen festgestellt [128]. Autoimmunerkrankungen gehen demnach häufig aber nicht immer mit reduzierten Trn-Frequenzen einher. Ob die Depletion von Trn ursächlich für die Ausbildung der MV-Enzephalitis ist oder eine Begleiterscheinung darstellt, ließe sich im Tiermodell untersuchen [214-218], indem man in Zuge einer MV-Infektion die Frequenz der Trn mitogen beeinflusst und die Tiere auf die Ausbildung einer Enzephalitis hin untersucht. Bereits bekannt ist, dass ein erhöhter Anteil von Trn eine generalisierte Immunsuppression im Maus-Modell hervorrufen und Hypersensitivitätsreaktionen hemmen kann [203].

Nachdem die Ausbildung einer MV-Enzephalitis mit der Depletion von Trn korreliert, stellte sich die Frage, ob sich auch persistierende MV-Infektionen auf die Frequenz der Trn auswirken. Neben der Depletion durch präferentielle Infektion könnte es im Rahmen einer MV-Infektion, etwa durch falsch ausgereifte DCs [86], zu einer Expansion oder Aktivierung von Trn kommen. Es sollte untersucht werden, ob sich SSPE mit durch präferentielle Infektion reduzierter Trn Aktivität vereinbaren lässt, oder es evtl. zu einer Expansion dieser Population kommt.

In den meisten, jedoch nicht allen, SSPE Proben wurden deutlich reduzierte Trn-Frequenzen festgestellt (Abb. 5.18). Die Messwerte konnten zwei abgegrenzten Ergebnis-Populationen bzw. Patientengruppen zugeordnet werden. Insgesamt war die Differenz in der Trn-Frequenz zwischen Patienten und Kontrollen signifikant. Im Gegensatz zu den Befunden bei der MV-Enzephalitis gab es keine Korrelation zwischen der Trn-Frequenz und dem Krankheitsstadium. Gleiches galt für die Probenqualität, die Geschwindigkeit der Krankheitsprogression und die Art der medikamentösen Behandlung.

Die Befunde zeigen, dass die Ausbildung von SSPE nicht auf das Vorliegen normaler oder erhöhter Frequenzen von Trn und die daraus folgende Begrenzung der Effektorzellfunktion angewiesen ist. Darin unterscheidet sich SSPE von der persistierenden HIV- und CMV-Infektion, bei denen erhöhte Trn-Frequenzen zur Immunsuppression beitragen [188]. Bei HIV ist die Frequenz der Trn in den Schleimhäuten, aber nicht in der Peripherie, stark erhöht [138], obwohl Trn präferentiell infiziert und nach Infektion depletiert werden [190]. SSPE geht im Gegensatz dazu häufig mit einer Reduktion der Trn-Frequenz einher die sich jedoch nicht erkennbar auf den Verlauf der Erkrankung auswirkt. Damit steht das Auftreten von SSPE entweder mit anderen Populationen regulatorischer T-Zellen in funktionellem Zusammenhang oder ist nicht auf deren suppressives Potential angewiesen.

Induzierte Tregs, welche ihre supprimierende Wirkung durch Expression von IL-10 und TGF β entfalten [157], sind für viele Infektionen von großer Bedeutung. Aus jeder Klasse von Pathogenen (Viren, Bakterien, Pilze und Parasiten) sind Vertreter bekannt, welche bei der erfolgreichen Infektion ihres Wirts auf eine Aktivierung oder Induzierung von Tregs angewiesen sind [193, 194, 196]. Die Induktion von Tregs erfolgt unter anderem durch Stimulation der pathogenspezifischen TCRs mit ihren Antigenen unter tolerogenen Bedingungen [157] und kann zur Ausbildung von Persistenzen [135] beitragen. Während einer MV-Infektion herrschen Bedingungen vor, welche zur Induktion / Aktivierung von Tregs führen, oder aus deren Aktivität resultieren [50, 125, 174-176] und die Entstehung von SSPE begünstigen könnten: Diese sind das Vorhandensein unvollständig ausgereifte DCs, massive Freisetzung von Eigenantigenen, Ausschüttung von IL-10 und Interferonen und die Möglichkeit einer CD3/CD46 Co-Ligation.

In dieser Arbeit wurden die Aktivität und Frequenz induzierter Tregs bei SSPE Patienten anhand der Cytokinexpression mittels RT-PCR auf der RNA-Ebene bzw. intrazellulärer FACS-Färbung auf der Proteinebene untersucht. Ohne Stimulation wurde in den peripheren PBMC abseits des Infektionsherdes nur wenig, nach MV-Stimulation physiologisch bedeutsame Mengen IL-10 RNA gebildet (Abb. 5.19). Die Proben in denen vermehrt IL-10 RNA gebildet wurde, gehören der Patientengruppe an, es trat jedoch eine starke Streuung in dieser Gruppe auf, die sich nicht mit dem Stadium der Erkrankung oder der Geschwindigkeit der Krankheitsprogression korrelieren lies. Dennoch war der Unterschied signifikant. Das Abrufen des MV-Gedächtnisses kann also IL-10 produzierende PBMC aktivieren. Ob dies für den Verlauf der Infektion von Bedeutung ist, kann sich möglicherweise eher an gewebsresidierenden Zellen analysieren lassen.

Um zu eruieren, ob es sich bei den nach MV-Exposition IL-10 exprimierenden Zellen, tatsächlich um T-Zellen handelt, wurden intrazelluläre Cytokinfärbungen durchgeführt (Abb. 5.20). Da keine Patientenproben mehr zur Verfügung standen, musste auf gesunde seropositive Spender zurückgegriffen werden. Etwa 6% der MV-stimulierten T-Zellen exprimierten nach 6 und 24 h IL-10. Der Anteil an IL-10 exprimierenden Zellen war damit etwa doppelt so hoch wie in einem parallelen Ansatz mitogen (CD3/CD28) stimulierter T-Zellen. Während IL-10 nach MV-Stimulation fast ausschließlich von CD4⁺ T-Zellen produziert wurde, schwankte der Beitrag induzierter Tregs über den Messzeitraum: Die frühe IL-10 Expression wurde von Tregs (IL-10⁺/IL-4⁻) dominiert, aber innerhalb von 24 h zu Th₂-Zellen (IL-10⁺/IL-4⁺) hin verschoben.

Falls die IL-10 Kinetik in den PBMC von SSPE-Patienten denen in gesunden seropositiven Spendern entspräche, müsste die Stimulationsdauer vor der RT-PCR reduziert werden, um die IL-10 Expression durch Treg auf dem Scheitelpunkt zu messen und von der Expression von durch Th₂-Zellen abzugrenzen. Vielleicht ließe sich die starke Streuung auf diese Weise verringern und die nur geringe Signifikanz in der Differenz der IL-10 RNA Expression zwischen Patienten- und Kontrollzellen erhöhen.

In Lymphknoten residierende Trn supprimieren nach dem Modell von Rudensky und Campbell ausschließlich kontaktabhängig, gewebsständige Trn auch durch

Cytokinbildung [126]. Aus Blutproben aufgereinigte Trn verhielten sich entsprechend der Trn aus Lymphknoten. Es konnte keine IL-10 Expression nachgewiesen werden. Damit ist gezeigt, dass zumindest bei seropositiven Spendern ein Teil der durch MV-Antigen hervorgerufenen IL-10 Expression durch induzierte Tregs erfolgt. Das Cytokinmuster kann zwischen akuter und chronischer Immunantwort bekanntlich Unterschiede aufweisen [85]. Um zu prüfen, ob auch bei SSPE die *ex vivo* erhöhte IL-10 Expression nach MV-Stimulation auf induzierte Tregs zurückzuführen ist, wäre die Analyse weiterer Patientenproben nötig. Eine Treg dominierte für die Persistenz des Virus essentielle IL-10 Expression wurde bereits für CMV und EBV nachgewiesen [199, 200].

Regulatorischen T-Zellen kommt bei der Ausbalancierung von Immunreaktionen eine zentrale Bedeutung zu [116, 127]. Sie können im Rahmen von Infektionen großen Einfluss auf die Pathogenese ausüben [193, 194, 196, 199, 200]. Besonders Trn und induzierte Tregs wurden auf ihre Bedeutung in diesem Zusammenhang hin untersucht. Darüber ob bzw. wie das MV mit diesen Zellpopulationen interagiert lagen bisher nur Ergebnisse aus Tiermodellen sowie widersprüchliche Ergebnisse von chinesischen Patienten mit akuter MV-Infektion vor [203, 205, 206].

In dieser Arbeit ließen sich die Trn, welche vor allem vor Autoimmunität schützen [117], sowohl im Menschen als auch im Affen zuverlässig darstellen. Es konnte gezeigt werden, dass Trn aktivierungsunabhängig CD150 exprimieren. Wie schon für andere immunsuppressive Viren (HIV und FIV) [188, 190, 191] beschrieben, können Trn *in vitro* durch MV präferentiell infiziert werden. Dies führt in Fall des MV zur Apoptose infizierter Zellen und einem deutlichen Depletionseffekt.

Im Rahmen einer balancierten Immunantwort folgen die Trn einer Kinetik, welche zu Beginn eine begrenzte Aktivierung von Effektorzellen erlaubt, diese Population jedoch im späteren Verlauf nach Expansion der Trn supprimiert [116]. Diese typische Kinetik wurde bei einer mit MV ED vaccinierten Person und nach MV-BIL WT Infektion eines seropositiven Affen bestätigt. Es kam zu keiner signifikanten Depletion von Trn. Im Gegensatz dazu wurden bei Enzephalitispatienten eine frühe Depletion von Trn und ein verzögerter Anstieg der Trn-Frequenz im späteren Verlauf festgestellt. Dies korreliert mit der hohen Zahl von Effektorzellen und dem verzögerten Abklingen der Symptome im Vergleich zu akuten Infektionen.

Bestimmte Viruspersistenzen setzen eine erhöhte Trn-Frequenz oder die Induktion von Tregs [201, 213], welche durch Stimulation unter tolerogenen Bedingungen entstehen [157], voraus. In manchen SSPE Patienten wurde dagegen eine deutliche Depletion von Trn beobachtet, die unabhängig vom Fortschritt der Erkrankung, jedoch nicht in allen Fällen auftrat. Dies könnte eine Folge der präferentiellen Infektion von Trn darstellen, scheint aber nicht mit dem Krankheitsverlauf zu korrelieren. Nach Stimulation von Patientenproben mit MV-Antigen wurde eine erhöhte Expression von IL-10 RNA detektiert, welche sich trotz starker Streuung als signifikant erwies. Durchfluszytometrische Messungen mit Proben gesunder seropositiver Spender deuten darauf hin, dass IL-10 nach MV-Stimulation zumindest anteilig von induzierten Tregs exprimiert wird. Durch weitere Experimente mit Patientenmaterial könnten die IL-10 Produzenten in der Probe selbst ermittelt und geprüft werden, ob sich die Signifikanz durch Optimierung der Versuchsparameter noch erhöhen lässt.

Die klare Korrelation zwischen der MV-Enzephalitis und reduzierten Trn Frequenzen, sowie die erhöhte IL-10 Expression in MV-stimulierten Proben von SSPE-Patienten erhärten die These, dass regulatorische T-Zellen für die Ausbildung dieser Komplikationen der MV-Infektion von Bedeutung sind. Der Nachweis TGF β exprimierender Zellen steht noch aus.

Um zu eruieren, ob die beobachteten Wechselwirkungen zwischen MV-Infektion und Trn von pathogenetischer Bedeutung sind oder lediglich Begleiterscheinungen des Krankheitsverlaufs darstellen, sind weitere Versuche nötig. Es stehen mehrere Tiermodelle zur Verfügung welche sich für diese Untersuchung eignen könnten. Dies sind Mäuse, Frettchen, Hamster und Primaten [214-218]. Denkbar wäre die Depletion von Trn durch eine Expansion mittels stimulatorischer Antikörper zu kompensieren bzw. die Produktion von IL-10 mittels RNAi zu verringern und den Effekt dieser Maßnahmen auf die Pathogenese zu verfolgen.

7. Zusammenfassung

Tregs dienen zur Aufrechterhaltung der Balance im Immunsystem. Die Infektion, Aktivierung oder Induktion von Tregs durch Pathogene kann diese Balance empfindlich stören, eine Immunsuppression zur Folge haben und zur Ausbildung von Autoimmunerkrankungen oder Persistenzen beitragen.

Das MV verfügt nicht nur über vielfältige Mechanismen der Immunsuppression, während einer MV-Infektion herrschen zudem Bedingungen vor, welche die Zahl und Aktivität von Tregs beeinflussen könnten. Aufgrund der Expression von Reifungsmarkern auf Trn ist zudem eine präferenzielle Infektion dieser Zellpopulation denkbar. MV-Infektionen können sowohl die akute MV-Enzephalitis, eine Autoimmunerkrankung, nach sich ziehen, als auch die Persistenz SSPE ausbilden. Ob diese Komplikationen mit spezifischen Aberrationen in der Menge und Aktivität von Tregs im Zusammenhang stehen, war bisher nicht bekannt.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass auf unstimulierten Trn der Reifungsmarker und MV-Rezeptor CD150 exprimiert wird und es in Folge dessen *in vitro* zu einer präferentiellen nicht produktiven Infektion und Depletion von Trn kommt. *Ex vivo* ließ sich ein deutlicher Depletionseffekt während der frühen akuten MV-Enzephalitis nachweisen, der nach Vaccinierung eines gesunden Probanden und Challenge eines immunisierten Affen nicht auftrat. Ob dieser Depletionseffekt ursächlich für die Enzephalitis ist, oder es sich um einen Begleiteffekt handelt ließe sich an Modellorganismen durch mitogene Manipulation der Trn während einer MV-Infektion untersuchen.

Auch bei SSPE kann es zu einer Depletion von Trn kommen, dies scheint jedoch nicht mit der Progression dieser Erkrankung im Zusammenhang zu stehen. Wahrscheinlich ist dagegen ein Zusammenhang mit der Induktion von Tregs. In MV-stimulierten Proben von SSPE-Patienten wurde im Mittel signifikant mehr IL-10 exprimiert als in den Kontrollen. In Proben seropositiver gesunder Spender wurde IL-10 in den ersten Stunden nach MV-Stimulation fast ausschließlich von induzierten Tregs exprimiert. Weitere Versuche sind nötig, um die Evidenz zu steigern und zu ermitteln, ob auch in

Patientenproben die frühe IL-10 Expression nach MV-Stimulation von induzierten Tregs dominiert wird.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es sowohl bei der MV-Enzephalitis als auch bei SSPE zu signifikanten Wechselwirkungen mit Tregs kommt. Ob sich eine MV-Enzephalitis auch ohne Depletion von Trn ausbilden kann und ob die Ausbildung von SSPE erhöhte IL-10 Expression voraussetzt, werden weitere Untersuchungen ergründen müssen.

7.1. Summary

Treg are supposed to keep the balance throughout the immune system. Infection, activation and induction of Treg by pathogens can interrupt with this balance. Immunosuppression autoimmunity and viral persistence can result from this interference.

MV does not only cause immunosuppression during infection by multifaceted mechanisms, but also effects circumstances known to interfere with the frequency and activity of Treg. Due to the expression of maturity markers on the surface of Trn a preferential infection of this cell population by MV seems possible. MV-infection can involve both, acute MV-encephalitis, an autoimmune disease, and the virus persistence SSPE. It was not investigated until now, if those complications are associated to specific aberrations in the frequency and activity of Treg.

In this paper it was demonstrated that CD150, which is both a maturity marker and a MV-receptor, is expressed on unstimulated Trn. Due to this expression the Trn are infected preferentially and non productively *in vitro* leading to apoptosis. *Ex vivo* a noticeable depletion effect was detected during the early acute MV-encephalitis. This effect did not occur after vaccination of a healthy proband, and the challenge of an immunised monkey. Mitogenic manipulation of Trn in model organisms during MV-infection could give advice, if this depletion effect is causal to MV-Encephalitis or rather a concomitant effect.

Depletion of Trn can also arise in the presence of SSPE, but this seems not to interfere with the progression of disease. By contrast there is presumable an interrelation of SSPE with the induction of Tregs. In MV-stimulated probes from SSPE-patients the median IL-10 expression was significantly higher than in controls. Probes from seropositive healthy donors were used to identify the IL-10 expressing cells. During the first hours after MV-stimulation IL-10 was mainly expressed by induced Treg. Subsequent investigations are necessary to enhance the evidence and to determine if induced Treg also dominate the early IL-10 expression after MV-stimulation in patient probes.

To give a resume you could claim that there are significant interrelations between MV-encephalitis respectively SSPE and Treg. If a depletion of Trn is necessary for the development of MV-encephalitis and if increased levels of IL-10 expression are required for the formation of SSPE has to be examined in further experiments.

8. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Abschn.	Abschnitt
Abt.	Abteilung
APC	Antigen-presenting cell
ATV	geeichte Trypsin-Versene Lösung
BCA	Bicistronic acid
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CD	Cluster of Differentiation
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl Ester
CPE	cytopathic effect
d	Tag
DC	Dendritic cell
dest.	destilliert
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EBV	Ebstein Barr Virus
ECM	extracellular matrix
ED MV	Vakzinestamm Edmonston
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycerol-bis-(β -Aminoethylether)- N,N,N',N'-tetraessigsäure
F MV	Fusionsprotein
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FIP	Fusion inhibitory peptide
FKS	Fetales Kälberserum
GAM	Goat anti-Mouse IgG
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony stimulating factor
h	Stunde
H MV	Hämagglutininprotein

HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
indTreg	induzierte regulatorische T-Zellen
INF	Interferon
kDa	kilo Dalton
LC-PCR	light cycler per
LPS	Lipopolysaccharid
MACS	magnetic cell separation
MCP	membranständiges Kofaktorprotein (CD46)
MEM	Minimal Essential Medium
MFI	multiplicity of infection
MHC	Major Histocompatibility complex
min	Minute(n)
mind.	mindestens
mM	millimolar
MoDC	Monocyte derived dendritic cell
MOI	Multiplicity of infection
MV	Masernvirus
NK	natural killer cells
NTE	NaCl-Tris-EDTA-Puffer
P-	Phospho-
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PFA	Paraformaldehyd
PFU	Plaque forming units
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minutes
RPV	Rinderpestvirus
RSV	Respiratorisches Synzytial-Virus
RT	Raumtemperatur

SDS	Sodiumdodecylsulfat
SH	small hydrophobe protein
SLAM	Signalling Lymphocyte Activation Molecule
SRBC	Sheep red blood cells
SSPE	Subakute sklerotisierende Panenzephalitis
Tab.	Tabelle
TCID ₅₀	Tissue Culture Infectious Dosis 50 %
TCR	T-cell receptor
Teff-Zellen	T-Effektor-Zellen
Th-Zellen	T-Helfer-Zellen
Th ₁ -Zellen	T-Helfer-Zellen Klasse 1
Th ₂ -Zellen	T-Helfer-Zellen Klasse 2
Th ₃ -Zellen	T-Helfer-Zellen Klasse 3
Tmem-Zellen	Memory-T-Zellen
Tr ₁ -Zellen	induzierte regulatorische T-Zellen vom Typ Tr1
Treg	regulatorische T-Zellen
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Trn	natürliche regulatorische T-Zelle(n)
Triton	Polyethylenglycol-mono- [p-1,1,3,3-tetramethylbutyl)-phenyl]-ether
Tween	Polyoxyethylensorbitanmonolaureat
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
UZ	Ultrazentrifuge
Verd.	Verdünnung
WTF MV	Wildtypvirus Fleckenstein
z.B.	zum Beispiel

9. Literatur

1. Modrow, S.F., D *Molekulare Virologie*. 1998: Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin.
2. Clements, C.J. and F.T. Cutts, *The epidemiology of measles: thirty years of vaccination*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1995. **191**: p. 13-33.
3. *WHO Jahresbericht 2005*.
4. Robert-Koch-Institut, *RKI-Ratgeber Infektionskrankheiten – Merkblätter für Ärzte*. 2005.
5. Koplik, H., *The diagnosis of the invasion of measles from a study of exanthema as it appears on the buccal mucous membrane*. *Arch. Pediatr.*, 1996(12): p. 918-920.
6. Casali, P., Nakamura, M., McChesney, M.B. , *Virus induced immunosuppression*. *Immunosuppression by measles virus*, ed. M.B. S. Spector, and H. Friedmann. 1989, NY/London: Plenum Press. 345-373 Chap. 18.
7. Griffin, D.E., *Fields Virology*. 4 ed. Measles Virus. 2001, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 1401-1442
8. Brian W. J. Mahy, V.t.M., *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections* 10 ed. Capter 34 Morbilliviruses: Measles virus, ed. W.B. Sibylle Schneider-Schaulies. Vol. 1 Virology. 2006, London: Hodder Arnold.
9. Gendelman, H.E., et al., *Measles encephalomyelitis: lack of evidence of viral invasion of the central nervous system and quantitative study of the nature of demyelination*. *Ann Neurol*, 1984. **15**(4): p. 353-60.
10. Johnson, R.T., et al., *Measles encephalomyelitis--clinical and immunologic studies*. *N Engl J Med*, 1984. **310**(3): p. 137-41.
11. Liebert, U.G., C. Linington, and V. ter Meulen, *Induction of autoimmune reactions to myelin basic protein in measles virus encephalitis in Lewis rats*. *J Neuroimmunol*, 1988. **17**(2): p. 103-18.
12. Katz, M., *Clinical spectrum of measles*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1995. **191**: p. 1-12.
13. Schneider-Schaulies, S., et al., *Measles virus gene expression in neural cells*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1995. **191**: p. 101-16.
14. Budka, H., H. Lassmann, and T. Popow-Kraupp, *Measles virus antigen in panencephalitis. An immunomorphological study stressing dendritic involvement in SSPE*. *Acta Neuropathol (Berl)*, 1982. **56**(1): p. 52-62.
15. Nihei, K., *[Up-to-date treatment for subacute sclerosing panencephalitis (SSPE)]*. *No To Hattatsu*, 2006. **38**(2): p. 138-40.
16. Sobczyk, W., et al., *[Comparison of the results of the treatment of patients with SSPE using various immunomodulating preparations]*. *Neurol Neurochir Pol*, 1991. **25**(5): p. 626-33.
17. Dine, M.S., et al., *Persistence of vaccine-induced antibody to measles 26-33 years after vaccination*. *J Infect Dis*, 2004. **189 Suppl 1**: p. S123-30.
18. Howe, R.C., et al., *Induction of CD4 T cell proliferation and in vitro Th1-like cytokine responses to measles virus*. *Clin Exp Immunol*, 2005. **140**(2): p. 333-42.
19. Dhiman, N., et al., *Immune activation at effector and gene expression levels after measles vaccination in healthy individuals: a pilot study*. *Hum Immunol*, 2005. **66**(11): p. 1125-36.

20. Schnorr, J.J., et al., *Immune modulation after measles vaccination of 6-9 months old Bangladeshi infants*. *Vaccine*, 2001. **19**(11-12): p. 1503-10.
21. Li, H., et al., *Induction of cytokine mRNA in peripheral blood mononuclear cells of infants after the first dose of measles vaccine*. *Vaccine*, 2001. **19**(32): p. 4896-900.
22. Riley, E.C., Murphy, G., Riley, R.L. , *Airborne spread of measles in a suburban elementary school*. *Am. J. Epidemiol.* , 1978. **107**: p. 421-432.
23. von Messling, V., D. Milosevic, and R. Cattaneo, *Tropism illuminated: lymphocyte-based pathways blazed by lethal morbillivirus through the host immune system*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(39): p. 14216-21.
24. de Swart, R.L., et al., *Predominant infection of CD150+ lymphocytes and dendritic cells during measles virus infection of macaques*. *PLoS Pathog*, 2007. **3**(11): p. e178.
25. Ohgimoto, S., et al., *The haemagglutinin protein is an important determinant of measles virus tropism for dendritic cells in vitro*. *J Gen Virol*, 2001. **82**(Pt 8): p. 1835-44.
26. Riedl, P., et al., *Measles virus matrix protein is not cotransported with the viral glycoproteins but requires virus infection for efficient surface targeting*. *Virus Res*, 2002. **83**(1-2): p. 1-12.
27. Wild, T.F., E. Malvoisin, and R. Buckland, *Measles virus: both the haemagglutinin and fusion glycoproteins are required for fusion*. *J Gen Virol*, 1991. **72** (Pt 2): p. 439-42.
28. Wild, T.F. and R. Buckland, *Functional aspects of envelope-associated measles virus proteins*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1995. **191**: p. 51-64.
29. Bolt, G. and I.R. Pedersen, *The role of subtilisin-like proprotein convertases for cleavage of the measles virus fusion glycoprotein in different cell types*. *Virology*, 1998. **252**(2): p. 387-98.
30. Richardson, C., et al., *The nucleotide sequence of the mRNA encoding the fusion protein of measles virus (Edmonston strain): a comparison of fusion proteins from several different paramyxoviruses*. *Virology*, 1986. **155**(2): p. 508-23.
31. Varsanyi, T.M., H. Jornvall, and E. Norrby, *Isolation and characterization of the measles virus F1 polypeptide: comparison with other paramyxovirus fusion proteins*. *Virology*, 1985. **147**(1): p. 110-7.
32. Weidmann, A., et al., *Proteolytic cleavage of the fusion protein but not membrane fusion is required for measles virus-induced immunosuppression in vitro*. *J Virol*, 2000. **74**(4): p. 1985-93.
33. Devaux, P. and R. Cattaneo, *Measles virus phosphoprotein gene products: conformational flexibility of the P/V protein amino-terminal domain and C protein infectivity factor function*. *J Virol*, 2004. **78**(21): p. 11632-40.
34. Takeuchi, K., et al., *Stringent requirement for the C protein of wild-type measles virus for growth both in vitro and in macaques*. *J Virol*, 2005. **79**(12): p. 7838-44.
35. Patterson, J.B., et al., *V and C proteins of measles virus function as virulence factors in vivo*. *Virology*, 2000. **267**(1): p. 80-9.
36. Tober, C., et al., *Expression of measles virus V protein is associated with pathogenicity and control of viral RNA synthesis*. *J Virol*, 1998. **72**(10): p. 8124-32.
37. Valsamakis, A., et al., *Recombinant measles viruses with mutations in the C, V, or F gene have altered growth phenotypes in vivo*. *J Virol*, 1998. **72**(10): p. 7754-61.

38. Schneider-Schaulies, S. and V. ter Meulen, *Measles virus and immunomodulation: molecular bases and perspectives*. Expert Rev Mol Med, 2002. **2002**: p. 1-18.
39. Kojima, A., et al., *Membrane cofactor protein (CD46) protects cells predominantly from alternative complement pathway-mediated C3-fragment deposition and cytolysis*. J Immunol, 1993. **151**(3): p. 1519-27.
40. Dorig, R.E., et al., *The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain)*. Cell, 1993. **75**(2): p. 295-305.
41. McQuaid, S. and S.L. Cosby, *An immunohistochemical study of the distribution of the measles virus receptors, CD46 and SLAM, in normal human tissues and subacute sclerosing panencephalitis*. Lab Invest, 2002. **82**(4): p. 403-9.
42. Nanche, D., et al., *Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus*. J Virol, 1993. **67**(10): p. 6025-32.
43. Johnstone, R.W., et al., *Polymorphic expression of CD46 protein isoforms due to tissue-specific RNA splicing*. Mol Immunol, 1993. **30**(14): p. 1231-41.
44. Liszewski, M.K., T.W. Post, and J.P. Atkinson, *Membrane cofactor protein (MCP or CD46): newest member of the regulators of complement activation gene cluster*. Annu Rev Immunol, 1991. **9**: p. 431-55.
45. Marie, J.C., et al., *Linking innate and acquired immunity: divergent role of CD46 cytoplasmic domains in T cell induced inflammation*. Nat Immunol, 2002. **3**(7): p. 659-66.
46. Buchholz, C.J., et al., *Selective expression of a subset of measles virus receptor-competent CD46 isoforms in human brain*. Virology, 1996. **217**(1): p. 349-55.
47. Wang, G., et al., *Membrane cofactor protein (MCP; CD46): isoform-specific tyrosine phosphorylation*. J Immunol, 2000. **164**(4): p. 1839-46.
48. Astier, A., et al., *Cutting edge: CD46, a new costimulatory molecule for T cells, that induces p120CBL and LAT phosphorylation*. J Immunol, 2000. **164**(12): p. 6091-5.
49. Kallstrom, H., et al., *Cell signaling by the type IV pili of pathogenic Neisseria*. J Biol Chem, 1998. **273**(34): p. 21777-82.
50. Kemper, C., et al., *Activation of human CD4+ cells with CD3 and CD46 induces a T-regulatory cell 1 phenotype*. Nature, 2003. **421**(6921): p. 388-92.
51. Kemper, C., et al., *T-cell stimulation and regulation: with complements from CD46*. Immunol Res, 2005. **32**(1-3): p. 31-43.
52. Lecouturier, V., et al., *Identification of two amino acids in the hemagglutinin glycoprotein of measles virus (MV) that govern hemadsorption, HeLa cell fusion, and CD46 downregulation: phenotypic markers that differentiate vaccine and wild-type MV strains*. J Virol, 1996. **70**(7): p. 4200-4.
53. Nielsen, L., et al., *Adaptation of wild-type measles virus to CD46 receptor usage*. Arch Virol, 2001. **146**(2): p. 197-208.
54. Loveland, B.E., et al., *Different membrane cofactor protein (CD46) isoforms protect transfected cells against antibody and complement mediated lysis*. Transpl Immunol, 1993. **1**(2): p. 101-8.
55. Schneider-Schaulies, J., et al., *Differential downregulation of CD46 by measles virus strains*. J Virol, 1995. **69**(11): p. 7257-9.
56. Schneider-Schaulies, J., et al., *Receptor usage and differential downregulation of CD46 by measles virus wild-type and vaccine strains*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(9): p. 3943-7.

57. Schneider-Schaulies, J., V. ter Meulen, and S. Schneider-Schaulies, *Measles virus interactions with cellular receptors: consequences for viral pathogenesis*. J Neurovirol, 2001. **7**(5): p. 391-9.
58. Cozzo, C., J. Larkin, 3rd, and A.J. Caton, *Cutting edge: self-peptides drive the peripheral expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells*. J Immunol, 2003. **171**(11): p. 5678-82.
59. Crimeen-Irwin, B., et al., *Ligand binding determines whether CD46 is internalized by clathrin-coated pits or macropinocytosis*. J Biol Chem, 2003. **278**(47): p. 46927-37.
60. Schnorr, J.J., et al., *Measles virus-induced down-regulation of CD46 is associated with enhanced sensitivity to complement-mediated lysis of infected cells*. Eur J Immunol, 1995. **25**(4): p. 976-84.
61. Manchester, M., et al., *Clinical isolates of measles virus use CD46 as a cellular receptor*. J Virol, 2000. **74**(9): p. 3967-74.
62. Shibahara, K., et al., *Increased binding activity of measles virus to monkey red blood cells after long-term passage in Vero cell cultures*. J Gen Virol, 1994. **75** (Pt 12): p. 3511-6.
63. Ono, N., et al., *Measles viruses on throat swabs from measles patients use signaling lymphocytic activation molecule (CDw150) but not CD46 as a cellular receptor*. J Virol, 2001. **75**(9): p. 4399-401.
64. Tatsuo, H., et al., *SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus*. Nature, 2000. **406**(6798): p. 893-7.
65. Erlenhoefer, C., et al., *CD150 (SLAM) is a receptor for measles virus but is not involved in viral contact-mediated proliferation inhibition*. J Virol, 2001. **75**(10): p. 4499-505.
66. Welstead, G.G., et al., *Mechanism of CD150 (SLAM) down regulation from the host cell surface by measles virus hemagglutinin protein*. J Virol, 2004. **78**(18): p. 9666-74.
67. Cocks, B.G., et al., *A novel receptor involved in T-cell activation*. Nature, 1995. **376**(6537): p. 260-3.
68. Polacino, P.S., et al., *Immunodeficiency virus cDNA synthesis in resting T lymphocytes is regulated by T cell activation signals and dendritic cells*. J Med Primatol, 1996. **25**(3): p. 201-9.
69. Punnonen, J., et al., *Soluble and membrane-bound forms of signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) induce proliferation and Ig synthesis by activated human B lymphocytes*. J Exp Med, 1997. **185**(6): p. 993-1004.
70. Minagawa, H., et al., *Induction of the measles virus receptor SLAM (CD150) on monocytes*. J Gen Virol, 2001. **82**(Pt 12): p. 2913-7.
71. Chan, B., et al., *SAP couples Fyn to SLAM immune receptors*. Nat Cell Biol, 2003. **5**(2): p. 155-60.
72. Howie, D., et al., *Molecular dissection of the signaling and costimulatory functions of CD150 (SLAM): CD150/SAP binding and CD150-mediated costimulation*. Blood, 2002. **99**(3): p. 957-65.
73. Hahm, B., N. Arbour, and M.B. Oldstone, *Measles virus interacts with human SLAM receptor on dendritic cells to cause immunosuppression*. Virology, 2004. **323**(2): p. 292-302.
74. Andres, O., et al., *CD46- and CD150-independent endothelial cell infection with wild-type measles viruses*. J Gen Virol, 2003. **84**(Pt 5): p. 1189-97.

75. Duprex, W.P., et al., *Observation of measles virus cell-to-cell spread in astrocytoma cells by using a green fluorescent protein-expressing recombinant virus*. J Virol, 1999. **73**(11): p. 9568-75.
76. Lawrence, D.M., et al., *Measles virus spread between neurons requires cell contact but not CD46 expression, syncytium formation, or extracellular virus production*. J Virol, 2000. **74**(4): p. 1908-18.
77. McQuaid, S., et al., *Measles virus infection and replication in undifferentiated and differentiated human neuronal cells in culture*. J Virol, 1998. **72**(6): p. 5245-50.
78. Erlenhofer, C., et al., *Analysis of receptor (CD46, CD150) usage by measles virus*. J Gen Virol, 2002. **83**(Pt 6): p. 1431-6.
79. Hashimoto, K., et al., *SLAM (CD150)-independent measles virus entry as revealed by recombinant virus expressing green fluorescent protein*. J Virol, 2002. **76**(13): p. 6743-9.
80. Moss, W.J., M.O. Ota, and D.E. Griffin, *Measles: immune suppression and immune responses*. Int J Biochem Cell Biol, 2004. **36**(8): p. 1380-5.
81. Moss, W.J., et al., *Differential regulation of interleukin (IL)-4, IL-5, and IL-10 during measles in Zambian children*. J Infect Dis, 2002. **186**(7): p. 879-87.
82. Kerdiles, Y.M., et al., *Immunosuppression caused by measles virus: role of viral proteins*. Rev Med Virol, 2006. **16**(1): p. 49-63.
83. Borrow, P. and M.B. Oldstone, *Measles virus-mono-nuclear cell interactions*. Curr Top Microbiol Immunol, 1995. **191**: p. 85-100.
84. Schneider-Schaulies, S., et al., *Regulation of gene expression in lymphocytes and antigen-presenting cells by measles virus: consequences for immunomodulation*. J Mol Med, 2002. **80**(2): p. 73-85.
85. Pauksen, K., et al., *Subsets of T-cells and in vitro cytokine production after measles and varicellae-zoster virus antigen stimulation in allogeneic BMT patients*. Scand J Infect Dis, 1999. **31**(1): p. 43-9.
86. Zilliox, M.J., G. Parmigiani, and D.E. Griffin, *Gene expression patterns in dendritic cells infected with measles virus compared with other pathogens*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(9): p. 3363-8.
87. Dubois, B., et al., *Measles virus exploits dendritic cells to suppress CD4+ T-cell proliferation via expression of surface viral glycoproteins independently of T-cell trans-infection*. Cell Immunol, 2001. **214**(2): p. 173-83.
88. Fugier-Vivier, I., et al., *Measles virus suppresses cell-mediated immunity by interfering with the survival and functions of dendritic and T cells*. J Exp Med, 1997. **186**(6): p. 813-23.
89. Grosjean, I., et al., *Measles virus infects human dendritic cells and blocks their allostimulatory properties for CD4+ T cells*. J Exp Med, 1997. **186**(6): p. 801-12.
90. Klagge, I.M., V. ter Meulen, and S. Schneider-Schaulies, *Measles virus-induced promotion of dendritic cell maturation by soluble mediators does not overcome the immunosuppressive activity of viral glycoproteins on the cell surface*. Eur J Immunol, 2000. **30**(10): p. 2741-50.
91. Schnorr, J.J., et al., *Induction of maturation of human blood dendritic cell precursors by measles virus is associated with immunosuppression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(10): p. 5326-31.
92. Steineur, M.P., et al., *Langerhans cells are susceptible to measles virus infection and actively suppress T cell proliferation*. Eur J Dermatol, 1998. **8**(6): p. 413-20.

93. Klagge, I.M., et al., *Impact of measles virus dendritic-cell infection on Th-cell polarization in vitro*. J Gen Virol, 2004. **85**(Pt 11): p. 3239-47.
94. Klagge, I.M. and S. Schneider-Schaulies, *Virus interactions with dendritic cells*. J Gen Virol, 1999. **80** (Pt 4): p. 823-33.
95. Servet-Delprat, C., et al., *Measles virus induces abnormal differentiation of CD40 ligand-activated human dendritic cells*. J Immunol, 2000. **164**(4): p. 1753-60.
96. Atabani, S.F., et al., *Natural measles causes prolonged suppression of interleukin-12 production*. J Infect Dis, 2001. **184**(1): p. 1-9.
97. Ryon, J.J., et al., *Functional and phenotypic changes in circulating lymphocytes from hospitalized zambian children with measles*. Clin Diagn Lab Immunol, 2002. **9**(5): p. 994-1003.
98. Hamalainen, H., S. Meissner, and R. Lahesmaa, *Signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) is differentially expressed in human Th1 and Th2 cells*. J Immunol Methods, 2000. **242**(1-2): p. 9-19.
99. Wang, N., et al., *The cell surface receptor SLAM controls T cell and macrophage functions*. J Exp Med, 2004. **199**(9): p. 1255-64.
100. Schlender, J., et al., *Inhibition of toll-like receptor 7- and 9-mediated alpha/beta interferon production in human plasmacytoid dendritic cells by respiratory syncytial virus and measles virus*. J Virol, 2005. **79**(9): p. 5507-15.
101. Nanche, D., et al., *Evasion of host defenses by measles virus: wild-type measles virus infection interferes with induction of Alpha/Beta interferon production*. J Virol, 2000. **74**(16): p. 7478-84.
102. Takeuchi, K., et al., *Measles virus V protein blocks interferon (IFN)-alpha/beta but not IFN-gamma signaling by inhibiting STAT1 and STAT2 phosphorylation*. FEBS Lett, 2003. **545**(2-3): p. 177-82.
103. Goodbourn, S., L. Didcock, and R.E. Randall, *Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures*. J Gen Virol, 2000. **81**(Pt 10): p. 2341-64.
104. Stark, G.R., et al., *How cells respond to interferons*. Annu Rev Biochem, 1998. **67**: p. 227-64.
105. Marie, J.C., et al., *Cell surface delivery of the measles virus nucleoprotein: a viral strategy to induce immunosuppression*. J Virol, 2004. **78**(21): p. 11952-61.
106. Schneider-Schaulies, S., et al., *Measles virus: immunomodulation and cell tropism as pathogenicity determinants*. Med Microbiol Immunol (Berl), 2002. **191**(2): p. 83-7.
107. Sanchez-Lanier, M., et al., *Measles virus-induced suppression of lymphocyte proliferation*. Cell Immunol, 1988. **116**(2): p. 367-81.
108. Schlender, J., et al., *Interaction of measles virus glycoproteins with the surface of uninfected peripheral blood lymphocytes induces immunosuppression in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(23): p. 13194-9.
109. Weidmann, A., et al., *Measles virus-induced immunosuppression in vitro is independent of complex glycosylation of viral glycoproteins and of hemifusion*. J Virol, 2000. **74**(16): p. 7548-53.
110. Engelking, O., et al., *Measles virus-induced immunosuppression in vitro is associated with deregulation of G1 cell cycle control proteins*. J Gen Virol, 1999. **80** (Pt 7): p. 1599-608.
111. Schnorr, J.J., et al., *Cell cycle arrest rather than apoptosis is associated with measles virus contact-mediated immunosuppression in vitro*. J Gen Virol, 1997. **78** (Pt 12): p. 3217-26.

112. Avota, E., et al., *Disruption of Akt kinase activation is important for immunosuppression induced by measles virus*. Nat Med, 2001. **7**(6): p. 725-31.
113. Avota, E., et al., *Measles virus interacts with and alters signal transduction in T-cell lipid rafts*. J Virol, 2004. **78**(17): p. 9552-9.
114. Shevach, E.M., *From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells*. Immunity, 2006. **25**(2): p. 195-201.
115. Belkaid, Y. and B.T. Rouse, *Natural regulatory T cells in infectious disease*. Nat Immunol, 2005. **6**(4): p. 353-60.
116. Mills, K.H., *Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection?* Nat Rev Immunol, 2004. **4**(11): p. 841-55.
117. Sakaguchi, S., et al., *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, 1995. **155**(3): p. 1151-64.
118. Jonuleit, H. and E. Schmitt, *The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations*. J Immunol, 2003. **171**(12): p. 6323-7.
119. Ramsdell, F., *Foxp3 and natural regulatory T cells: key to a cell lineage?* Immunity, 2003. **19**(2): p. 165-8.
120. Janeway Charles, T.P., Walport Mark, *Immunologie*. 2 ed. 2002, Heidelberg: Spektrum Verlag.
121. Bluestone, J.A. and A.K. Abbas, *Natural versus adaptive regulatory T cells*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(3): p. 253-7.
122. Zelenika, D., et al., *Regulatory T cells overexpress a subset of Th2 gene transcripts*. J Immunol, 2002. **168**(3): p. 1069-79.
123. Schwartz, R.H., *Natural regulatory T cells and self-tolerance*. Nat Immunol, 2005. **6**(4): p. 327-30.
124. Sakaguchi, S., *Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self*. Nat Immunol, 2005. **6**(4): p. 345-52.
125. Mills, K.H. and P. McGuirk, *Antigen-specific regulatory T cells--their induction and role in infection*. Semin Immunol, 2004. **16**(2): p. 107-17.
126. Rudensky, A.Y. and D.J. Campbell, *In vivo sites and cellular mechanisms of T reg cell-mediated suppression*. J Exp Med, 2006. **203**(3): p. 489-92.
127. Maloy, K.J. and F. Powrie, *Regulatory T cells in the control of immune pathology*. Nat Immunol, 2001. **2**(9): p. 816-22.
128. Cao, D., et al., *Isolation and functional characterization of regulatory CD25brightCD4+ T cells from the target organ of patients with rheumatoid arthritis*. Eur J Immunol, 2003. **33**(1): p. 215-23.
129. Garcia de Tena, J., et al., *Distinctive pattern of cytokine production and adhesion molecule expression in peripheral blood memory CD4+ T cells from patients with active Crohn's disease*. J Clin Immunol, 2006. **26**(3): p. 233-42.
130. Haynes, L.M., et al., *CD8(+) T cells from Theiler's virus-resistant BALB/cByJ mice downregulate pathogenic virus-specific CD4(+) T cells*. J Neuroimmunol, 2000. **106**(1-2): p. 43-52.
131. Cobbold, S.P., et al., *Regulatory T cells in the induction and maintenance of peripheral transplantation tolerance*. Transpl Int, 2003. **16**(2): p. 66-75.
132. Elkord, E., *Role of regulatory T cells in allergy: implications for therapeutic strategy*. Inflamm Allergy Drug Targets, 2006. **5**(4): p. 211-7.

133. Nicolson, K.S. and D.C. Wraith, *Natural and induced regulatory T cells: targets for immunotherapy of autoimmune disease and allergy*. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 2006. **5**(3): p. 141-8.
134. Wing, K. and S. Sakaguchi, *Regulatory T cells as potential immunotherapy in allergy*. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2006. **6**(6): p. 482-8.
135. Iwashiro, M., et al., *Immunosuppression by CD4+ regulatory T cells induced by chronic retroviral infection*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(16): p. 9226-30.
136. Jones, E., et al., *CD25+ regulatory T cells and tumor immunity*. *Immunol Lett*, 2003. **85**(2): p. 141-3.
137. Kis, L.L., et al., *IL-10 can induce the expression of EBV-encoded latent membrane protein-1 (LMP-1) in the absence of EBNA-2 in B lymphocytes and in Burkitt lymphoma- and NK lymphoma-derived cell lines*. *Blood*, 2006. **107**(7): p. 2928-35.
138. Epple, H.J., et al., *Mucosal but not peripheral FOXP3+ regulatory T cells are highly increased in untreated HIV infection and normalize after suppressive HAART*. *Blood*, 2006. **108**(9): p. 3072-8.
139. Jonuleit, H., et al., *Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood*. *J Exp Med*, 2001. **193**(11): p. 1285-94.
140. Soares, L., et al., *Two isoforms of otubain 1 regulate T cell anergy via GRAIL*. *Nat Immunol*, 2004. **5**(1): p. 45-54.
141. Jonuleit, H., et al., *Infectious tolerance: human CD25(+) regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4(+) T helper cells*. *J Exp Med*, 2002. **196**(2): p. 255-60.
142. Stephens, L.A., et al., *Human CD4(+)CD25(+) thymocytes and peripheral T cells have immune suppressive activity in vitro*. *Eur J Immunol*, 2001. **31**(4): p. 1247-54.
143. Levings, M.K., R. Sangregorio, and M.G. Roncarolo, *Human cd25(+)cd4(+) t regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function*. *J Exp Med*, 2001. **193**(11): p. 1295-302.
144. Lin, C.H. and T. Hunig, *Efficient expansion of regulatory T cells in vitro and in vivo with a CD28 superagonist*. *Eur J Immunol*, 2003. **33**(3): p. 626-38.
145. Godfrey, W.R., et al., *In vitro-expanded human CD4(+)CD25(+) T-regulatory cells can markedly inhibit allogeneic dendritic cell-stimulated MLR cultures*. *Blood*, 2004. **104**(2): p. 453-61.
146. Singh, N., et al., *Enrichment of regulatory CD4(+)CD25(+) T cells by inhibition of phospholipase D signaling*. *Nat Methods*, 2006. **3**(8): p. 629-36.
147. Huang, C.T., et al., *Role of LAG-3 in regulatory T cells*. *Immunity*, 2004. **21**(4): p. 503-13.
148. Liu, W., et al., *CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells*. *J Exp Med*, 2006. **203**(7): p. 1701-11.
149. Seddiki, N., et al., *Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells*. *J Exp Med*, 2006. **203**(7): p. 1693-700.
150. Fontenot, J.D., M.A. Gavin, and A.Y. Rudensky, *Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells*. *Nat Immunol*, 2003. **4**(4): p. 330-6.

151. Fontenot, J.D. and A.Y. Rudensky, *A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3*. Nat Immunol, 2005. **6**(4): p. 331-7.
152. Khattri, R., et al., *An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells*. Nat Immunol, 2003. **4**(4): p. 337-42.
153. Dieckmann, D., et al., *Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood*. J Exp Med, 2001. **193**(11): p. 1303-10.
154. D'Cruz, L.M. and L. Klein, *Development and function of agonist-induced CD25+Foxp3+ regulatory T cells in the absence of interleukin 2 signaling*. Nat Immunol, 2005. **6**(11): p. 1152-9.
155. Fontenot, J.D., et al., *A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells*. Nat Immunol, 2005. **6**(11): p. 1142-51.
156. Furtado, G.C., et al., *Interleukin 2 signaling is required for CD4(+) regulatory T cell function*. J Exp Med, 2002. **196**(6): p. 851-7.
157. Roncarolo, M.G., et al., *Type 1 T regulatory cells*. Immunol Rev, 2001. **182**: p. 68-79.
158. Chai, J.G., et al., *CD4+CD25+ T cells as immunoregulatory T cells in vitro*. Eur J Immunol, 2002. **32**(8): p. 2365-75.
159. von Boehmer, H., *Mechanisms of suppression by suppressor T cells*. Nat Immunol, 2005. **6**(4): p. 338-44.
160. Lohr, J., et al., *The inhibitory function of B7 costimulators in T cell responses to foreign and self-antigens*. Nat Immunol, 2003. **4**(7): p. 664-9.
161. Boden, E., et al., *The role of CD28 and CTLA4 in the function and homeostasis of CD4+CD25+ regulatory T cells*. Novartis Found Symp, 2003. **252**: p. 55-63; discussion 63-6, 106-14.
162. Riley, J.L. and C.H. June, *The CD28 family: a T-cell rheostat for therapeutic control of T-cell activation*. Blood, 2005. **105**(1): p. 13-21.
163. Shimizu, J., et al., *Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance*. Nat Immunol, 2002. **3**(2): p. 135-42.
164. Shevach, E.M. and G.L. Stephens, *The GITR-GITRL interaction: co-stimulation or contrasuppression of regulatory activity?* Nat Rev Immunol, 2006. **6**(8): p. 613-8.
165. Valzasina, B., et al., *Triggering of OX40 (CD134) on CD4(+)CD25+ T cells blocks their inhibitory activity: a novel regulatory role for OX40 and its comparison with GITR*. Blood, 2005. **105**(7): p. 2845-51.
166. Read, S., V. Malmstrom, and F. Powrie, *Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation*. J Exp Med, 2000. **192**(2): p. 295-302.
167. Nakamura, K., A. Kitani, and W. Strober, *Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta*. J Exp Med, 2001. **194**(5): p. 629-44.
168. Martin, E., et al., *Antigen-specific suppression of a primed immune response by dendritic cells mediated by regulatory T cells secreting interleukin-10*. Immunity, 2003. **18**(1): p. 155-67.
169. Shimizu, J., et al., *Cross-linking of CD45 on suppressive/regulatory T cells leads to the abrogation of their suppressive activity in vitro*. J Immunol, 2005. **174**(7): p. 4090-7.

170. McGuirk, P. and K.H. Mills, *Pathogen-specific regulatory T cells provoke a shift in the Th1/Th2 paradigm in immunity to infectious diseases*. Trends Immunol, 2002. **23**(9): p. 450-5.
171. Gershon, R.K.E., D.D., Naidorf, K.F., Ptak, W., *Hermaphrocyte-suppressor-helper T-cell*. Symp. Quant. Biol. , 1976. **41**: p. 85-91.
172. Iellem, A., L. Colantonio, and D. D'Ambrosio, *Skin-versus gut-skewed homing receptor expression and intrinsic CCR4 expression on human peripheral blood CD4+CD25+ suppressor T cells*. Eur J Immunol, 2003. **33**(6): p. 1488-96.
173. D'Ambrosio, D., F. Sinigaglia, and L. Adorini, *Special attractions for suppressor T cells*. Trends Immunol, 2003. **24**(3): p. 122-6.
174. Lan, Y.Y., et al., *"Alternatively activated" dendritic cells preferentially secrete IL-10, expand Foxp3+CD4+ T cells, and induce long-term organ allograft survival in combination with CTLA4-Ig*. J Immunol, 2006. **177**(9): p. 5868-77.
175. Mahnke, K., et al., *Induction of CD4+/CD25+ regulatory T cells by targeting of antigens to immature dendritic cells*. Blood, 2003. **101**(12): p. 4862-9.
176. Tan, P.H., et al., *Inhibition of NF-kappa B and oxidative pathways in human dendritic cells by antioxidative vitamins generates regulatory T cells*. J Immunol, 2005. **174**(12): p. 7633-44.
177. Grundstrom, S., et al., *Superantigen-induced regulatory T cells display different suppressive functions in the presence or absence of natural CD4+CD25+ regulatory T cells in vivo*. J Immunol, 2003. **170**(10): p. 5008-17.
178. Caramalho, I., et al., *Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide*. J Exp Med, 2003. **197**(4): p. 403-11.
179. O'Garra, A. and F.J. Barrat, *In vitro generation of IL-10-producing regulatory CD4+ T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by Th1- and Th2-inducing cytokines*. Immunol Lett, 2003. **85**(2): p. 135-9.
180. Wakkach, A., et al., *Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo*. Immunity, 2003. **18**(5): p. 605-17.
181. Seder, R.A., et al., *Factors involved in the differentiation of TGF-beta-producing cells from naive CD4+ T cells: IL-4 and IFN-gamma have opposing effects, while TGF-beta positively regulates its own production*. J Immunol, 1998. **160**(12): p. 5719-28.
182. Granelli-Piperno, A., et al., *HIV-1-infected monocyte-derived dendritic cells do not undergo maturation but can elicit IL-10 production and T cell regulation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(20): p. 7669-74.
183. Jonuleit, H., et al., *Dendritic cells as a tool to induce anergic and regulatory T cells*. Trends Immunol, 2001. **22**(7): p. 394-400.
184. Chen, Z.M., et al., *IL-10 and TGF-beta induce alloreactive CD4+CD25- T cells to acquire regulatory cell function*. Blood, 2003. **101**(12): p. 5076-83.
185. Horwitz, D.A., S.G. Zheng, and J.D. Gray, *The role of the combination of IL-2 and TGF-beta or IL-10 in the generation and function of CD4+ CD25+ and CD8+ regulatory T cell subsets*. J Leukoc Biol, 2003. **74**(4): p. 471-8.
186. Barchet, W., et al., *Complement-induced regulatory T cells suppress T-cell responses but allow for dendritic-cell maturation*. Blood, 2006. **107**(4): p. 1497-504.
187. Zaffran, Y., et al., *CD46/CD3 costimulation induces morphological changes of human T cells and activation of Vav, Rac, and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase*. J Immunol, 2001. **167**(12): p. 6780-5.

188. Aandahl, E.M., et al., *Human CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells control T-cell responses to human immunodeficiency virus and cytomegalovirus antigens*. J Virol, 2004. **78**(5): p. 2454-9.
189. Suvas, S., et al., *CD4⁺CD25⁺ T cells regulate virus-specific primary and memory CD8⁺ T cell responses*. J Exp Med, 2003. **198**(6): p. 889-901.
190. Oswald-Richter, K., et al., *HIV infection of naturally occurring and genetically reprogrammed human regulatory T-cells*. PLoS Biol, 2004. **2**(7): p. E198.
191. Joshi, A., et al., *Preferential replication of FIV in activated CD4(+)CD25(+)T cells independent of cellular proliferation*. Virology, 2004. **321**(2): p. 307-22.
192. Vahlenkamp, T.W., M.B. Tompkins, and W.A. Tompkins, *Feline immunodeficiency virus infection phenotypically and functionally activates immunosuppressive CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells*. J Immunol, 2004. **172**(8): p. 4752-61.
193. McGuirk, P., C. McCann, and K.H. Mills, *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, 2002. **195**(2): p. 221-31.
194. Hori, S., T.L. Carvalho, and J. Demengeot, *CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells suppress CD4⁺ T cell-mediated pulmonary hyperinflammation driven by Pneumocystis carinii in immunodeficient mice*. Eur J Immunol, 2002. **32**(5): p. 1282-91.
195. Montagnoli, C., et al., *B7/CD28-dependent CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells are essential components of the memory-protective immunity to Candida albicans*. J Immunol, 2002. **169**(11): p. 6298-308.
196. Satoguina, J., et al., *Antigen-specific T regulatory-1 cells are associated with immunosuppression in a chronic helminth infection (onchocerciasis)*. Microbes Infect, 2002. **4**(13): p. 1291-300.
197. Xu, D., et al., *CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells suppress differentiation and functions of Th1 and Th2 cells, Leishmania major infection, and colitis in mice*. J Immunol, 2003. **170**(1): p. 394-9.
198. Aseffa, A., et al., *The early IL-4 response to Leishmania major and the resulting Th2 cell maturation steering progressive disease in BALB/c mice are subject to the control of regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells*. J Immunol, 2002. **169**(6): p. 3232-41.
199. Marshall, N.A., M.A. Vickers, and R.N. Barker, *Regulatory T cells secreting IL-10 dominate the immune response to EBV latent membrane protein 1*. J Immunol, 2003. **170**(12): p. 6183-9.
200. MacDonald, A.J., et al., *CD4 T helper type 1 and regulatory T cells induced against the same epitopes on the core protein in hepatitis C virus-infected persons*. J Infect Dis, 2002. **185**(6): p. 720-7.
201. Godkin, A., et al., *Characterization of novel HLA-DR11-restricted HCV epitopes reveals both qualitative and quantitative differences in HCV-specific CD4⁺ T cell responses in chronically infected and non-viremic patients*. Eur J Immunol, 2001. **31**(5): p. 1438-46.
202. Browning, M.B., et al., *The T cell activation marker CD150 can be used to identify alloantigen-activated CD4(+)25⁺ regulatory T cells*. Cell Immunol, 2004. **227**(2): p. 129-39.

203. Sellin, C.I., et al., *Interplay between Virus-Specific Effector Response and Foxp3⁺ Regulatory T Cells in Measles Virus Immunopathogenesis*. PLoS ONE, 2009. **4**(3): p. e4948.
204. van Binnendijk, R.S., et al., *Viral replication and development of specific immunity in macaques after infection with different measles virus strains*. J Infect Dis, 1994. **170**(2): p. 443-8.
205. Yu, XL, et al., *Measles Virus Infection in Adults Induces Production of IL-10 and Is Associated with Increased CD4CD25 Regulatory T Cells*. The Journal of Immunology, 2008. **181**: p. 7356-7366.
206. Li MZ, et al., *Immunosuppression induced by measles virus in adult patients is not related to CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cell induction*. Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi, 2008. **22**: p. 211-213.
207. Hori, S., Carvalho, T.L. & Demengeot, J., *CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells suppress CD4⁺ T cell-mediated pulmonary hyperinflammation driven by Pneumocystis carinii in immunodeficient mice*. Eur.J.Immunol., 2002. **32**: p. 1282-1291.
208. Kullberg, M.C.e.a., *Bacteria triggered CD4⁺ regulatory cells suppress Helicobacter hepaticus-induced colitis*. J. Exp. Med., 2002. **197**: p. 505-515.
209. Chatila, T.A., et al., *JM2, encoding a fork head-related protein, is mutated in X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome*. J Clin Invest, 2000. **106**(12): p. R75-81.
210. Wildin, R.S., et al., *X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy*. Nat Genet, 2001. **27**(1): p. 18-20.
211. Chen, Y., et al., *Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis*. Science, 1994. **265**(5176): p. 1237-40.
212. Groux, H., et al., *A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis*. Nature, 1997. **389**(6652): p. 737-42.
213. Stephens, L.A. and D. Mason, *CD25 is a marker for CD4⁺ thymocytes that prevent autoimmune diabetes in rats, but peripheral T cells with this function are found in both CD25⁺ and CD25⁻ subpopulations*. J Immunol, 2000. **165**(6): p. 3105-10.
214. Bradl, M. and C. Linington, *Animal models of demyelination*. Brain Pathol, 1996. **6**(3): p. 303-11.
215. Ochikubo, F., et al., *Electroencephalogram and evoked potentials in the primate model of viral encephalitis*. Electroencephalogr Clin Neurophysiol, 1993. **88**(5): p. 397-407.
216. Schubert, S., et al., *A mouse model of persistent brain infection with recombinant Measles virus*. J Gen Virol, 2006. **87**(Pt 7): p. 2011-9.
217. Sugita, T., et al., *Induction of acute myoclonic encephalopathy in hamsters by subacute sclerosing panencephalitis virus*. J Infect Dis, 1984. **150**(3): p. 340-7.
218. Thormar, H., et al., *Transmission of measles virus encephalitis to ferrets by intracardiac inoculation of a cell-associated SSPE virus strain*. Apmis, 1988. **96**(12): p. 1125-8.

10. Danksagung und ehrenwörtliche Erklärungen

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. S. Schneider-Schaulies für die Betreuung der Arbeit, die Unterstützung und ihr stetiges Interesse am Fortgang der Arbeit.

Für die Zusammenarbeit und stets freundliche und hilfsbereite Unterstützung bezüglich der Patientenproben bzw. Rhesusaffenproben gilt Prof. Kreth und Prof. De Swart mein besonderer Dank.

Hr. Prof. Löffler und Markus Mezger danke ich für die freundliche Unterstützung bei der Light Cycler PCR und für die Bereitstellung der benötigten Reagenzien und Geräte.

Allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. S. Schneider-Schaulies und des Institutes für Virologie und Immunbiologie danke ich für die hilfsbereite, freundliche und humorvolle Atmosphäre.

Zudem danke ich Dr. Michael Burzler für die wertvolle Unterstützung bei der Formatierung und Fehlerkorrektur.

EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNGEN

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch zu keinem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt.

Ich erkläre, dass ich zuvor keine akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht habe.

Würzburg, den 5. April 2012

Steffen Schwab