

**Das zelluläre Immunsystem
als Ziel des Influenzavirus Typ A**

Dissertation
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

12.11.2007
vorgelegt von
Thorsten Krause
aus Bielefeld

angefertigt
am GSF-Forschungszentrum
für Umwelt und Gesundheit
München

Erstgutachter:

Prof. Dr. Dirk Eick

Zweitgutachter:

Prof. Dr. Elisabeth Weiß

Tag der mündlichen Prüfung:

13.03.2008

Für meine Eltern
Ich vermisse Euch sehr

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Zusammenfassung.....	1
2. Einleitung.....	2
2.1. Das Influenzavirus Typ A als Mitglied der <i>Orthomyxoviridae</i> -Familie.....	2
2.2. Das Influenzavirus Typ A benötigt für den Eintritt in die Zelle das endosomale Kompartiment und für die Replikation den Kern.....	5
2.3. Das Immunsystem und Influenzaviren.....	11
2.3.1. Die Infektion mit dem Influenzavirus Typ A.....	11
2.3.2. Das Immunsystem im Kampf gegen das Influenzavirus Typ A	11
2.3.2.1. Die Schleimhäute und die angeborene Immunität gegen das Influenzavirus Typ A.....	12
2.3.2.2. Die humorale Immunantwort gegen das Influenzavirus Typ A.....	13
2.3.2.3. Die zelluläre Immunantwort gegen das Influenzavirus Typ A.....	13
2.3.2.4. Die Influenzavirusimpfung.....	14
2.3.3. Das Influenzavirus Typ A im Kampf gegen das Immunsystem.....	15
2.3.3.1. Epidemien und Pandemien.....	15
2.3.3.2. Tierseuchen und das Influenzavirus H5N1.....	16
2.3.3.3. Die Unterdrückung der Interferonantwort durch das virale Protein NS1.....	18
2.3.3.4. Antigen- <i>drift</i> und - <i>shift</i> zur Umgehung der humoralen Immunantwort.....	18
2.3.3.5. Unterwanderung der zellulären Immunantwort durch das Influenzavirus Typ A.....	19
3. Ziele der Arbeit.....	21
4. Material.....	22
4.1. Zellkultur-Zellen.....	22
4.2. T-Zellklone.....	23
4.3. Reagenzien für die Zellkultur.....	23
4.3.1. Allgemeine Reagenzien.....	23
4.3.2. Medien.....	24
4.3.3. Puffer.....	24
4.3.4. Transfektion von Zellen.....	25
4.3.5. Aufreinigung von Zellen des peripheren Bluts.....	25
4.3.6. Zytokine.....	25
4.3.7. FACS-Antikörper.....	26
4.4. Reagenzien für proteinbiochemische Methoden.....	27
4.4.1. Medien und Puffer.....	27

4.4.2.	Antikörper.....	27
4.4.3.	Sonstige Reagenzien.....	27
4.5.	Reagenzien für molekularbiologische Methoden.....	28
4.5.1.	Bakterien.....	28
4.5.2.	Medien, Puffer und Lösungen.....	28
4.5.3.	<i>Kits</i> und sonstige Reagenzien.....	28
4.6.	Verbrauchsmaterialien.....	29
4.6.1.	Zellkultur.....	29
4.6.2.	Sonstige Materialien.....	29
4.7.	Chemikalien.....	30
4.8.	Verwendete Geräte.....	31
5.	Methoden.....	32
5.1.	Zellbiologische Methoden.....	32
5.1.1.	Kultivierung von etablierten Zelllinien.....	32
5.1.1.1.	Suspensions-Zelllinien.....	32
5.1.1.2.	Adhärent-wachsende Zelllinien.....	32
5.1.1.3.	Bestimmung der Zellzahl.....	33
5.1.1.4.	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	33
5.1.2.	Herstellung und Verwendung von rekombinantem Influenzavirus Typ A.....	33
5.1.2.1.	Transfektion von 293T-Zellen mit Lipofektamin.....	34
5.1.2.2.	Transfektion von 293T-Zellen mit Polyethylenimin.....	34
5.1.2.3.	Infektion der transfizierten 293T-Zellen.....	34
5.1.2.4.	Passagieren der rekombinanten Viren über MDCK-Zellen.....	35
5.1.2.5.	Bestimmung des Virustiters und Infektion von Zelllinien.....	35
5.1.2.6.	Hitzeinaktivierung des rekombinanten Influenzavirus Typ A.....	35
5.1.2.7.	Inaktivierung des rekombinanten Influenzavirus Typ A durch ultraviolettes Licht.....	36
5.1.3.	Isolation und Analyse von Zellen aus peripherem Blut.....	36
5.1.3.1.	Isolation von PBMC mittels Ficoll-Dichtegradienten.....	36
5.1.3.2.	Isolation von PBL mittels Zentrifugation und Erythrozytenlyse.....	36
5.1.3.3.	Generierung von Dendritischen Zellen aus PBMC.....	37
5.1.3.4.	Isolation von Zellpopulationen aus PBMC durch magnetische Zellseparation.....	38
5.1.3.5.	Analyse von Zellen mit Hilfe des <i>fluorescence activated cell scanning</i>	39
5.1.3.6.	Analyse von Zellen mittels Fluoreszenzmikroskop.....	40
5.1.3.7.	Analyse der Zytokinausschüttung von T-Zellen mittels ELISA.....	40
5.1.4.	Aktivierung und Infektion von CD4 ⁺ T-Zellklonen.....	41
5.1.5.	Aktivierung und Infektion von T-Zellen aus peripherem Blut.....	41

5.1.5.1.	Aktivierung von T-Zellen mittels anti-CD3- und anti-CD28-Antikörpern.....	42
5.1.5.2.	Aktivierung der CD4 ⁺ T-Zellen durch Co-Kultur mit Dendritischen Zellen.....	42
5.1.6.	Aktivierung und Infektion von B-Zellen aus peripherem Blut.....	42
5.1.7.	Beladung von LCL vs. primären B-Zellen mit M1-Protein vs. (UV-inaktiviertem) IVA-GFP und Untersuchung der Antigenpräsentation mit M1-spezifischen CD4 ⁺ T-Zellen..	43
5.2.	Proteinbiochemische Methoden.....	44
5.2.1.	Bestimmung der Proteinmenge mittels Bradford-Analyse.....	44
5.2.2.	Analyse von Proteinen mit SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese und Western-Blot..	44
5.2.2.1.	Probenvorbereitung und Gel-Elektrophorese.....	44
5.2.2.2.	Western-Blot-Hybridisierung und Immundetektion.....	45
5.3.	Molekularbiologische Methoden.....	45
5.3.1.	Transformation von elektrokompenten Bakterien.....	45
5.3.2.	Kultivierung von Bakterien in Flüssigmedium.....	46
5.3.3.	Isolation von Plasmid-DNA und Glycerinkultur.....	46
5.3.4.	Analyse der aufgereinigten Plasmide.....	46
5.3.5.	Agarosegel-Elektrophorese.....	46
6.	Ergebnisse	48
6.1.	Rekombinante Influenzaviren Typ A infizierten etablierte Zelllinien sehr effektiv.....	48
6.2.	Rekombinante Influenzaviren Typ A infizierten verschiedene Zellpopulationen des peripheren Bluts.....	50
6.3.	Aktivierete CD4 ⁺ T-Zellen wurden durch rekombinante Influenzaviren Typ A effektiv infiziert.....	51
6.4.	Die Grünfluoreszenz der Zielzellen wurde durch die produktive Infektion und nicht durch rekombinantes Protein im Virusüberstand verursacht.....	54
6.5.	Parameter der aktivierungsabhängigen Infektion von CD4 ⁺ T-Zellen mit rekombinanten Influenzaviren Typ A.....	55
6.5.1.	Maximale Infizierbarkeit von CD4 ⁺ T-Zellen 60 bis 72 Stunden nach Aktivierung.....	55
6.5.2.	Die Stärke des Stimulus war entscheidend für eine erhöhte Anfälligkeit von CD4 ⁺ T-Zellen für eine Infektion mit rekombinantem Influenzavirus Typ A.....	57
6.5.3.	Die Dauer des Stimulus beeinflusste ebenfalls die Anfälligkeit der CD4 ⁺ T-Zellen für eine Infektion mit rekombinantem Influenzavirus Typ A.....	59
6.5.4.	Bei längerer Infektionsdauer und Einsatz einer höheren MOI stieg die Infektionsrate, aber auch der Anteil an toten CD4 ⁺ T-Zellen.....	60
6.6.	Der Wildtyp des Influenzavirus Typ A induzierte Zelltod in aktivierten, jedoch kaum in ruhenden CD4 ⁺ T-Zellen.....	63

6.7.	CD4 ⁺ Gedächtnis-T-Zellen waren nach Aktivierung deutlich anfälliger für eine Infektion mit rekombinantem Influenzavirus Typ A als naive CD4 ⁺ T-Zellen.....	65
6.8.	CD4 ⁺ T-Zellen, infiziert mit rekombinantem Influenzavirus Typ A, exprimierten das Oberflächenantigen CD25, ohne dass alle CD25 ⁺ T-Zellen infiziert wurden.....	69
6.9.	Auch CD8 ⁺ T-Zellen wurden nach Aktivierung anfällig für eine Infektion mit Influenzavirus Typ A.....	70
6.10.	Auch B-Zellen ließen sich aktivierungsabhängig mit Influenzavirus Typ A infizieren..	74
6.11.	Die Aktivierung von CD4 ⁺ T-Zellen mittels <i>mixed lymphocyte reactions</i> führte zu einer erhöhten Anfälligkeit für eine Infektion mit Influenzavirus Typ A.....	76
6.12.	Die antigenspezifische Aktivierung von CD4 ⁺ T-Zellen führte zu einer gesteigerten Anfälligkeit für eine Infektion mit rekombinantem Influenzavirus Typ A.....	79
6.13.	Nach Infektion mit Influenzavirus Typ A präsentierten primäre B-Zellen die viralen Antigene wesentlich schlechter auf MHC-Klasse II als LCL von demselben Spenders.	82
7.	Diskussion.....	85
7.1.	Influenzavirus Typ A und das zelluläre Immunsystem.....	85
7.1.1.	Influenzavirus Typ A infiziert Zellen mit aktivem NF-κB-Signalweg.....	85
7.1.2.	Influenzavirus Typ A infiziert CD4 ⁺ T-Zellsubpopulationen unterschiedlich effektiv..	87
7.1.3.	Influenzavirus Typ A tötet aktivierte T-Lymphozyten.....	88
7.1.4.	Influenzavirus Typ A infiziert aktivierte B-Lymphozyten.....	89
7.1.5.	Eine zellbasierte Aktivierung macht CD4 ⁺ T-Zellen infektionsanfälliger.....	90
7.1.6.	In nicht-aktivierten Lymphozyten erreichen die Abbauprodukte des Influenzavirus Typ A nicht die Endosomen/Lysosomen.....	91
7.2.	Virale Strategien der Immunevasion.....	92
7.3.	Die angeborene Immunantwort und die virale Immunevasion.....	93
7.3.1.	Große DNA-Viren und deren Bekämpfung der angeborenen Immunität.....	93
7.3.1.1.	DNA-Viren und die Beeinflussung des Zytokin-/Chemokinsystems.....	93
7.3.1.2.	Immunmodulatoren und Adhäsionsmoleküle auf Oberflächen von infizierten Zellen und Viruspartikeln.....	95
7.3.2.	RNA-Viren unterwandern zentrale Mechanismen der angeborenen Immunität: Viren und die antivirale Interferonantwort.....	96
7.4.	Die adaptive, humorale Immunantwort und die virale Immunevasion.....	97
7.5.	Die adaptive, zelluläre Immunantwort und die virale Immunevasion.....	98
7.5.1.	Die adaptive Immunantwort gegen Viren.....	98
7.5.2.	Unterwanderung der adaptiven Immunität durch Viren.....	99
7.5.2.1.	Manipulation der Antigenpräsentation auf MHC-Klasse I und II.....	99
7.5.2.2.	Pro- und anti-apoptotische Aktivitäten von Viren.....	101

7.5.2.3.	Apoptotische Aktivitäten vom Influenzavirus Typ A.....	101
7.5.2.4.	Mögliches Szenario einer Infektion mit Influenzaviren Typ A und Konsequenzen für die menschliche Gesundheit.....	102
8.	Ausblick.....	106
9.	Literatur.....	107

Anhang I: Abkürzungsverzeichnis

Anhang II: Plasmidkarte pHL2251

Ehrenwörtliche Erklärung

Danksagungen

Lebenslauf

1. Zusammenfassung

Die zur Familie der *Orthomyxoviridae* gehörenden Influenzaviren Typ A (IVA) stellen bis heute eine enorme Gefährdung der humanen Gesundheit dar. Im Menschen repliziert IVA vor allem in den Epithelzellen der Lunge, jedoch sind bei besonders aggressiven Varianten auch systemische Infektionen beobachtet worden. Neben der angeborenen, antigenunspezifischen Immunantwort mittels Interferonausschüttung und Aktivierung antiviraler Effektorfunktionen, spielt die adaptive, antigenspezifische Immunantwort eine entscheidende Rolle in der Kontrolle der Infektion. Wie sich IVA der adaptiven Immunantwort entzieht, ist noch weitgehend unbekannt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Frage untersucht, ob und wie IVA humane Lymphozyten gezielt befallen und eliminieren kann. Dazu wurde ein rekombinantes Virus (IVA-GFP) verwendet, welches eine produktiv-infizierte Zelle durch GFP-Expression markieren kann. Aus peripherem Blut isolierte und mit exogenen Signalen stimulierte Lymphozyten zeigten nachfolgend eine vielfach erhöhte Anfälligkeit für eine IVA-Infektion. Dies galt zum einen für $CD4^+$ T-Zellen, wobei Gedächtnis-T-Zellen infektionsanfälliger waren als naive T-Zellen. Eine zellbasierte Stimulation von $CD4^+$ T-Zellen lieferte bezüglich der Infizierbarkeit gleichfalls Unterschiede zwischen aktivierten und nicht-aktivierten T-Zellen. Dies wurde mittels *mixed lymphocyte reactions* (MLR) im autologen und allogenen Kontext und durch die antigenspezifische Aktivierung von T-Zellklonen verifiziert. Zum anderen waren auch $CD8^+$ T-Zellen nach Aktivierung anfälliger für eine IVA-Infektion. Dies manifestierte sich, neben einer produktiven Infektion der Zellen, vor allem in einem gesteigerten Zelltod der $CD8^+$ T-Zellen. Eine verstärkte Eliminierung von aktivierten $CD4^+$ T-Zellen durch IVA konnte ebenfalls nachgewiesen werden. Zudem korrelierte die Expression des Aktivierungsmarkers CD25 auf aktivierten T-Zellen mit deren IVA-Infizierbarkeit. $CD19^+$ B-Lymphozyten waren nach exogener Stimulation über CD40 und den IL-4-Rezeptor ebenfalls mit IVA infizierbar.

Des Weiteren konnten wichtige Parameter bezüglich einer maximalen Infektion von Lymphozyten nach Stimulation definiert und Unterschiede in der Infizierbarkeit von aktivierten und nicht-aktivierten Lymphozyten auf die Ereignisse zwischen rezeptorvermittelter Endozytose des Virus und Transport in die Endosomen eingegrenzt werden.

Insgesamt stellt die aktivierungsabhängige Infektion und Eliminierung von Lymphozyten durch IVA einen möglichen, bisher unbekanntem Mechanismus zur Unterdrückung bzw. Verlangsamung der antiviralen, zellulären Immunantwort dar.

2. Einleitung

2.1. Das Influenzavirus Typ A als Mitglied der *Orthomyxoviridae*-Familie

Das Influenzavirus gehört zur Familie der *Orthomyxoviridae*. Das Genom dieser Virusfamilie besteht aus segmentierter, einzelsträngiger RNA negativer Polarität (Baltimore 1971). Zu den *Orthomyxoviridae* gehören neben den Influenzaviren Typ A (IVA), B (IVB) und C (IVC) auch die weniger bekannten Thogotoviren und Isaviren. Alle Mitglieder dieser Virusfamilie infizieren hauptsächlich Zellen des respiratorischen Systems ihres Wirtes. Dies gilt besonders für die Gattung der IVA, die bei Säugetieren und Vögeln asymptomatische bis letal verlaufende Infektionen verursachen können. Die Segmentierung ihres Genoms ermöglicht den *Orthomyxoviridae* eine hohe genetische Flexibilität und Anpassungsfähigkeit an neue Wirtsspezies durch das sogenannte *Reassortment*, der Durchmischung der unterschiedlichen Segmente verschiedener Subtypen und Mutanten. Dabei stellen die IVA die größte Gefährdung für die menschliche Gesundheit dar. Sie sind in der Lage Speziesbarrieren zu überwinden, wodurch das Wirtsspektrum und damit die Chancen für die Entstehung neuer, genetisch veränderter Mutanten erhöht wird. Das IVA konnte bisher in Menschen, Vögeln, Schweinen, Pferden, Hunden, Katzen, Walen und Seehunden nachgewiesen werden (Wright 2007). Zudem wird dadurch eine vollständige Auslöschung von IVA nahezu unmöglich, da die Viren in der Tierwelt z.T. nicht-pathogen zirkulieren. Hierbei spielen Wasservögel als natürliches Reservoir eine entscheidende Rolle (Webster *et al.* 1992). Dagegen sind IVB und IVC humanspezifisch. Das fehlende Reservoir im Tierreich macht deren Bekämpfung einfacher. Die gute Anpassung an den Menschen verringert zudem die Mutationsraten von IVB und IVC und damit einhergehend deren Pathogenität. Dennoch können auch IVB schwere pulmonale Erkrankungen hervorrufen und eine Komponente des jährlich verabreichten trivalenten Influenza-Impfstoffes ist ein IVB-Stamm (<http://www.who.int/csr/disease/influenza/en/>). Tödlich verlaufende IVB-Infektionen sind jedoch selten (Wright 2007).

Die Namensgebung verschiedener Influenzaviren folgt einer festgelegten Nomenklatur in der Reihenfolge: Typ/Spezies in der das Virus aufgetreten ist (nicht aufgeführt bei humanen Viren)/Ort der Isolierung/Nummer des Isolats/Jahr der Isolierung/im Fall vom IVA Hämagglutinin (HA)- und Neuraminidase (NA)-Subtyp. So ist z.B. das Virus „IVA/Huhn/Hong Kong/220/97 (H5N1)“ das 220ste Isolat des H5N1-Subtyps aus Hühnern im Jahr 1997 in Hong Kong (Palese 2007). HA und NA sind virale Membranproteine, welche große Bedeutung für den Wirtstropismus und die Pathogenität haben (siehe unten). Von beiden Proteinen existieren mehrere Varianten die sich in ihrer Aminosäure-Sequenz unterscheiden. Bislang wurden 16 HA-Subtypen und 9 NA-Subtypen des IVA isoliert (Webster *et al.* 1992; Fouchier *et al.* 2005), wobei nur Wasservögel alle Subtypen beherbergen (Webster *et al.* 1992).

Die Virionenstruktur des IVA ist in Abbildung 1a dargestellt. Die Hülle besteht aus einer Lipidschicht, welche von der Oberflächenmembran der Wirtszelle stammt und bei der Virusfreisetzung mitgenommen wurde. In die Virushülle eingelagert sind die bereits erwähnten viralen Proteine HA und NA, sowie das Matrixprotein M2. Unterhalb der Virushülle folgt eine Proteincapsid, bestehend aus dem Matrixprotein M1. Der Kern des Viruspartikels beinhaltet den sogenannten Ribonukleoprotein (RNP)-Komplex, welcher aus den viralen RNA-Segmenten, den Polymeraseproteinen basische Polymerase 1 (PB1), basische Polymerase 2 (PB2) und saure Polymerase (PA), sowie dem Nukleoprotein (NP) aufgebaut ist (Compans *et al.* 1974). Nicht zum RNP-Komplex gehört das Nukleäre Exportprotein/Nicht-strukturelle Protein 2 (NEP/NS2), das ebenfalls in Virionen nachgewiesen wurde (Richardson and Akkina 1991).

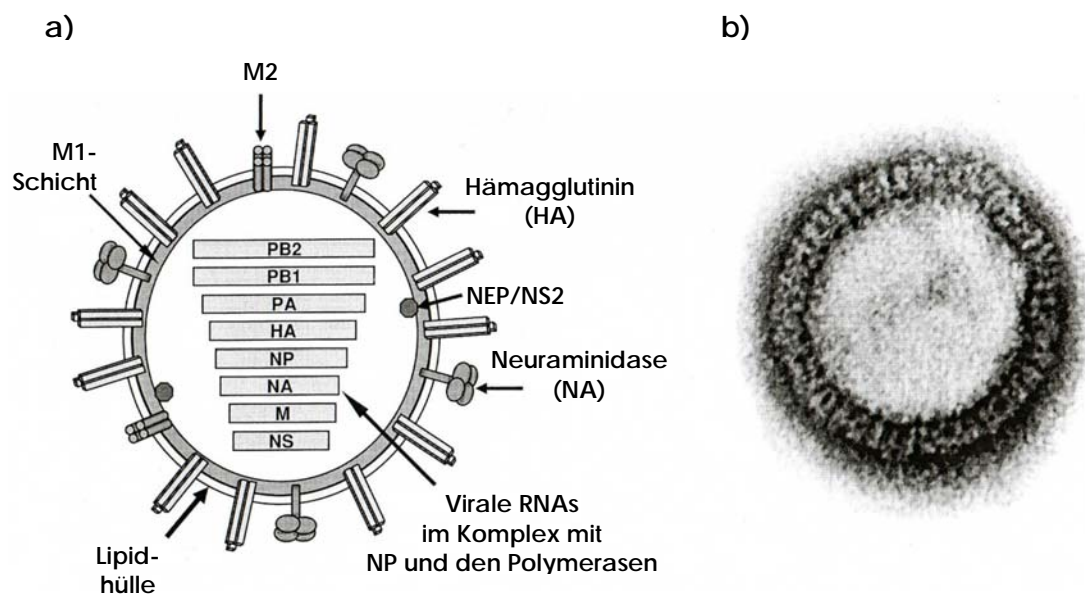


Abbildung 1. Virionenstruktur des Influenzavirus Typ A

a) Gezeigt ist eine schematische Darstellung eines IVA-Partikels. Hämagglutinin (HA), Neuraminidase (NA) und das M2 Protein sind in der vom Wirt stammenden Lipidmembran eingelagert. HA liegt dort als Trimer, NA und M2 liegen als Tetramere vor. Das Matrixprotein M1 befindet sich direkt unter der Lipidhülle. Das nukleäre Exportprotein NEP/NS2 ist ebenfalls in den viralen Partikeln vorhanden. Die viralen RNA-Gensegmente sind mit dem Nukleoprotein NP und dem Polymerasekomplex (bestehend aus PA, PB1 und PB2) assoziiert. **b)** Gezeigt ist ein Elektronenmikrograph eines IVA-Partikels mit sichtbaren HA- und NA-Stacheln auf der Oberfläche.

(Abbildung modifiziert nach Fields 5. Edition, Abbildung 47.2)

Morphologisch sind die Virionen meist rund mit einem Durchmesser von ungefähr 100 nm. In frisch isolierten Viruspräparationen sind jedoch häufig auch filamentöse Partikel mit mehr als 300 nm Länge zu beobachten. Auf der Oberfläche der Virionen befinden sich in elektronenmikroskopischen Aufnahmen sichtbare Stacheln (Abbildung 1b). Dies sind die zwischen 10 und 14 nm herausragenden HA- und NA-Moleküle, welche meist in einem Verhältnis von 4 HA zu 1 NA vorliegen. Im Inneren der Viruspartikel können mit Hilfe der Elektronenmikroskopie die RNP-Komplexe (Compans *et al.* 1972) und die M1-Schicht (Ruigrok *et al.* 2000) sichtbar gemacht werden. Die einzelnen Gensegmente

scheinen dabei einzeln in RNP-Komplexen verpackt zu sein (Noda *et al.* 2006). Das IVA besitzt 8 verschiedene RNA-Segmente, dargestellt in Abbildung 2. Die Nummerierung erfolgt entsprechend der Größe der einzelnen Segmente.

Die Segmente 1 bis 3 kodieren für die viralen Polymerasen (PB2, PB1 und PA), welche wichtige Rollen in Transkription und Replikation spielen (siehe unten). Segment 4 enthält die genetische Information für das HA, welches für das Eindringen des Virus in die Zielzelle und die Freisetzung der viralen RNA ins Zytoplasma verantwortlich zeichnet. Das NP ist auf Segment 5 und die NA auf Segment 6 kodiert. Die M-Gene (M1 und M2) befinden sich auf Segment 7 und die nicht-strukturellen NS-Gene auf Segment 8.

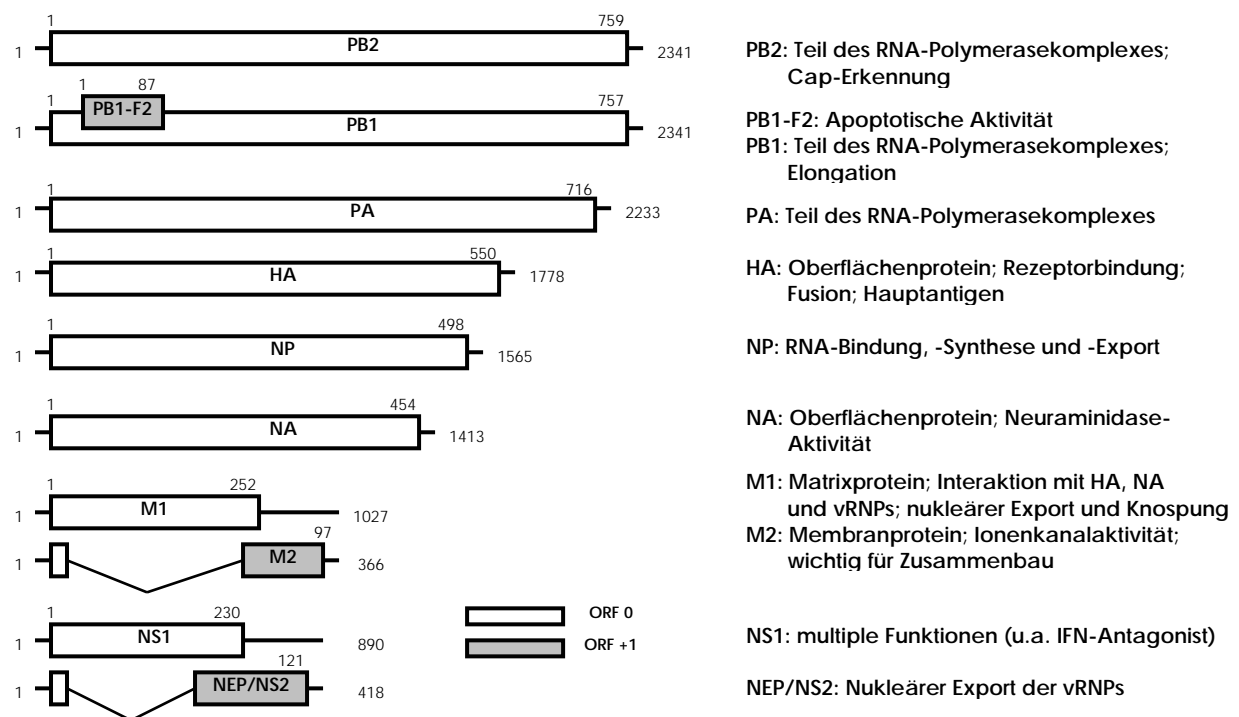


Abbildung 2. Genomstruktur eines Influenzavirus Typ A

Genomstruktur des IVA/Puerto Rico/8/34. Gezeigt sind RNA-Segmente (Zahlen entsprechen Nucleotiden, dargestellt als Positivstrang) und die entsprechenden Proteine, für die sie kodieren (Zahl der Aminosäuren). Die Linien am 5'- und 3'-Ende sind nicht-kodierende Regionen. Das PB1-Segment enthält einen zweiten offenen Leseraster (*open reading frame*, ORF), was in dem Protein PB1-F2 resultiert. M2 und NEP/NS2 werden durch gepleißte mRNAs kodiert (die entsprechenden Introns werden durch V-förmige Linien angedeutet). (Abbildung modifiziert nach Fields 5. Edition, Abbildung 47.4A)

Drei RNA-Segmente kodieren für jeweils zwei Proteine. Im Gensegment für die Polymerase PB1 wurde vor Kurzem ein alternativer offener Leseraster gefunden, aus welchem ein 87 Aminosäure (AS) langes PB1-F2 Polypeptid translatiert wird (Chen *et al.* 2001). Von den Gensegmenten M und NS werden jeweils zwei mRNAs abgelesen, die für die Genprodukte M1 und M2 bzw. NS1 und NS2 kodieren (Lamb *et al.* 1980; Lamb and Choppin 1981).

Neben den kodierenden Sequenzen befinden sich am 5'- und 3'-Ende jedes Gensegments zusätzlich nicht-kodierende, aber hochkonservierte Sequenzen, welche eine große Bedeutung bei der RNA-Replikation, aber auch beim Zusammenbau neuer Viruspartikel haben. Zudem besitzt jedes RNA-Element noch segmentspezifische, nicht-kodierende Regionen, welche möglicherweise eine Rolle bei der korrekten Verteilung der RNA-Segmente auf neue Virionen spielen (Zheng *et al.* 1996).

2.2. Das Influenzavirus Typ A benötigt für den Eintritt in die Zelle das endosomale Kompartiment und für die Replikation den Kern

Die einzelnen Phasen der Virusinfektion sind in Abbildung 3 zusammengefasst. Durch die Bindung von HA an Sialinsäure (N-Acetylneuraminat)-haltige Zuckerreste, welche auf fast allen Zellen vorkommen, erfolgt die Adsorption des Virus an die Wirtszelle. Der Wirtstropismus verschiedener IVA-Subtypen wird dabei durch die bevorzugte Bindung der unterschiedlichen HA-Subtypen an in bestimmter Weise verknüpfte Zuckerreste determiniert.

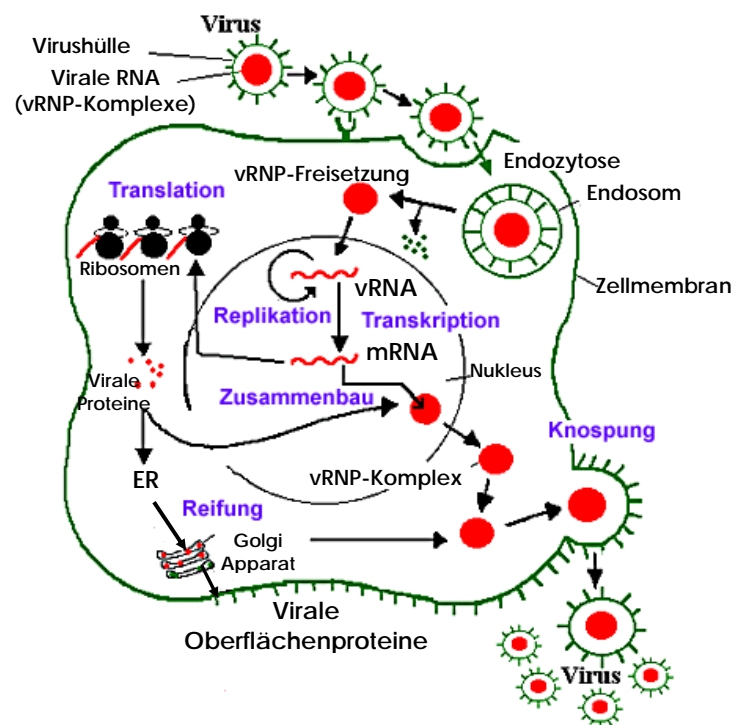


Abbildung 3. Infektionszyklus des Influenzavirus Typ A

IVA dringt mittels rezeptorvermittelter Endozytose in die Zielzelle ein. Durch Fusion von Virusmembran und Endosomenmembran wird der virale RNP-Komplex in das Zytoplasma freigesetzt. Die virale RNA wird nachfolgend in den Zellkern transportiert, wo sie zum einen repliziert und zum anderen transkribiert wird (Nähere Erläuterungen siehe Text und Abbildung 4). Die durch Translation der viralen mRNA im Zytoplasma gebildeten viralen Proteine und die replizierte RNA (in Form des RNP-Komplexes) werden dann zur Zelloberfläche transportiert, dort zusammengebaut und die Virusnachkommen mittels Knospung freigesetzt.

(Abbildung modifiziert nach <http://www.biokurs.de>)

Humanpathogene IVA, bzw. deren HA-Moleküle, interagieren bevorzugt mit N-Acetylneuraminsäuren, welche mit dem vorletzten Galaktosezucker über eine $\alpha 2,6$ -Bindung verknüpft sind (SA $\alpha 2,6$ Gal). Vogelspezifische IVA-Subtypen hingegen bevorzugen eine $\alpha 2,3$ -Bindung (Connor *et al.* 1994). In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen besitzen humane, tracheale Epithelzellen meistens SA $\alpha 2,6$ Gal, während das Darmepithel von Vögeln meist SA $\alpha 2,3$ Gal Zuckerstrukturen aufweist (Couceiro *et al.* 1993; Ito *et al.* 1998). Durch Mutation der Rezeptorbindestelle kann sich IVA jedoch an den infizierten Wirt adaptieren (Mochalova *et al.* 2003). Dies ist wahrscheinlich von großer Bedeutung für das Überspringen einer Speziesbarriere. So bewirkt die Mutation einer einzigen Aminosäure an Position 190 im viralen HA-Molekül den Wechsel der Wirtsspezifität. Eine Glutaminsäure (Glu, E) an dieser Position führt zur präferentiellen Bindung von $\alpha 2,3$ -verbundenen Sialinsäuren (Vogelspezifität), wohingegen Asparaginsäure (Asp, D) an dieser Position eine Spezifität für $\alpha 2,6$ -verknüpfte Sialinsäuren (menschliche Zellen) vermittelt. Aus diesem Grund wird auch vermutet, dass das HA-Gen des für die Spanische Grippe im Jahre 1918 verantwortlichen IVA seinen Ursprung in einem Vogel-IVA-Subtyp hatte, welcher an der Position 190 mutierte (E190D) und so die im Menschen vorherrschenden $\alpha 2,6$ -verknüpften Sialinsäuren erkennen konnte (Glaser *et al.* 2005).

Der zweite Schritt der Virusinfektion beinhaltet den Eintritt in die Zelle. Dazu wird das Virus wahrscheinlich Clathrin-vermittelt über Endozytose aufgenommen (Matlin *et al.* 1981). Der in Endosomen vorherrschende, niedrige pH-Wert bewirkt eine Konformationsänderung des HA, was zur Fusion der Virushülle mit der endosomalen Membran führt (Skehel *et al.* 1995; Chen *et al.* 1999a; Cross *et al.* 2001; Smith and Helenius 2004). Dies ist jedoch nur möglich, wenn das HA0 Vorläuferprotein zuvor proteolytisch in die beiden Untereinheiten HA1 und HA2 gespalten wurde. Dieser Vorgang wird in der Regel durch Wirtsproteasen katalysiert und erhöht die Infektiosität von IVA dramatisch (Klenk *et al.* 1975; Lazarowitz and Choppin 1975).

Zudem kommt es durch das virale Ionenkanalproteins M2 (Pinto *et al.* 1992) zum Einfluss von H^+ -Ionen aus den Endosomen in die Viruspartikel (Chizhnikov *et al.* 1996; Mould *et al.* 2000). Hierdurch werden Protein-Protein-Interaktionen zwischen den RNP-Komplexen und dem viralen Matrixprotein M1 gelöst und die Freisetzung der RNP-Komplexe ins Zytoplasma der Zielzelle initiiert (Martin and Helenius 1991b). Dementsprechend inhibieren Reagenzien, welche die Ionenkanalaktivität von M2 blockieren, die RNP-Freisetzung. Bekannte Beispiele hierfür sind Amantadin und Rimantadin (Holsinger *et al.* 1994; Chizhnikov *et al.* 1996). Beide werden sowohl therapeutisch als auch prophylaktisch zur Bekämpfung von klinischen IVA-Infektionen eingesetzt, führen aber oft zur Ausbildung von Resistenzen durch Mutationen im M2-Protein (Li *et al.* 2004) mit erneut infektiösen, viralen Nachkommen (Sweet *et al.* 1991).

Die Abhängigkeit des IVA von den Zellkernfunktionen der Wirtszelle ist zugleich charakteristisch und ungewöhnlich, denn viele anderen RNA-Viren replizieren außerhalb des Kerns (Palese 2007). Bei IVA ereignen sich jedoch alle wichtigen RNA-Syntheseschritte im Kern der Wirtszelle. Aus diesem

Grund ist der Transport des Virusgenoms vom Zytoplasma in den Nukleus ein essentieller und genauestens regulierter Prozess (Cros and Palese 2003). Da der RNP-Komplex zu groß ist für eine passive Diffusion, muss er aktiv in den Zellkern transportiert werden (Martin-Benito *et al.* 2001). Alle Proteine des RNP-Komplexes besitzen nukleare Lokalisationssignale (NLS) (Jones *et al.* 1986; Smith *et al.* 1987; Wang *et al.* 1997; Weber *et al.* 1998), wobei die drei NLS vom NP (Neumann *et al.* 1997; Bullido *et al.* 2000) wahrscheinlich ausreichen, um die virale RNA in den Kern zu befördern (O'Neill *et al.* 1995; Cros *et al.* 2005). NP interagiert mit einem Mitglied der Karyopherin α -Familie (auch Importin α genannt). Nach Interaktion mit Karyopherin β , bindet dieser Komplex an die Kernpore (Cros and Palese 2003) und wird aktiv in den Kern transportiert. Im Kern angekommen wird die Negativstrang virale RNA [vRNA(-)] in zwei unterschiedlichen Weisen umgeschrieben (Abbildung 4).

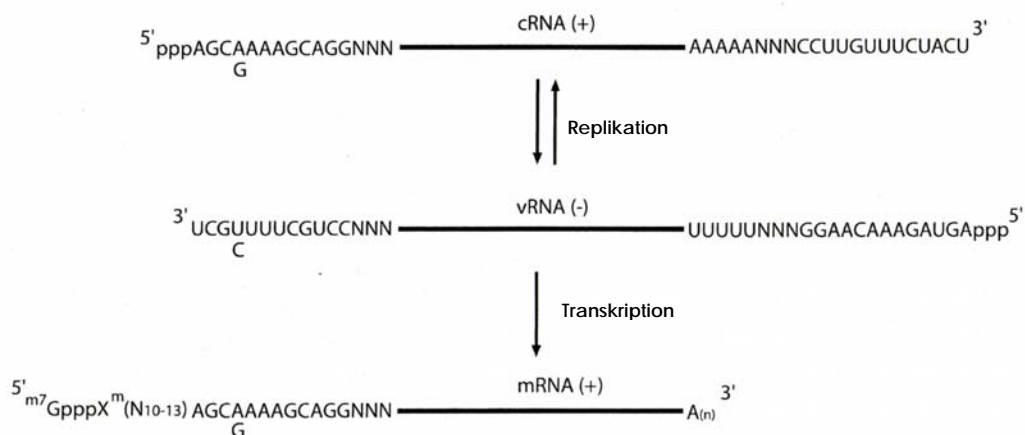


Abbildung 4. RNA-Synthese des Influenzavirus Typ A

Die vom Virus eingebrachte Einzelstrang RNA negativer Polarität [vRNA(-)] ist in der Mitte der Abbildung dargestellt. Zusätzlich sind die konservierten, nicht-kodierenden Regionen und die segmentspezifischen Nukleotide (NNN) an beiden Enden abgebildet. Das Polyadenylierungssignal besteht aus einem PolyU-Abschnitt am 5'-Ende der vRNA, was in einem 3'-PolyA-Schwanz bei der viralen mRNA resultiert (unterer Teil). Die virale mRNA entwendet zudem ihr Cap und 10 bis 13 weitere 5'-Nukleotide von zellulären mRNAs. Die komplementäre (*complementary*) cRNA ist dagegen eine exakte Positivstrang-Kopie der eingebrachten vRNA. Die Variation am 3'-Ende der vRNA (und dadurch auch in der cRNA und mRNA) ist ebenfalls aufgeführt. (Abbildung modifiziert nach Fields 5. Edition Abbildung 47.17)

Zum einen wird die vRNA(-) in einem primerabhängigen Schritt in mRNA umgeschrieben. Die resultierenden mRNAs sind unvollständige Kopien der vRNA-Vorlage, enthalten jedoch mRNA-typische Elemente, wie ein Cap und einen 3'-PolyA-Schwanz und werden nach Transport in das Zytoplasma als Vorlage für die Produktion viraler Proteine verwendet. Zum anderen wird die vRNA repliziert. Dies geschieht mit Hilfe eines Zwei-Stufen-Prozesses bei dem die vRNA zunächst in eine vollständige Positivstrang-Kopie umgewandelt wird, die sogenannte komplementäre RNA (cRNA). Diese cRNA wird dann als Vorlage zur Herstellung neuer vRNAs genutzt. Alle diese Prozesse werden

vom mitgebrachten viralen RNA-Polymerasekomplex katalysiert, wobei verschiedene Funktionen des Komplexes in den unterschiedlichen Schritten genutzt werden (Neumann *et al.* 2004). Die Polymerasen des IVA interagieren mit der großen Untereinheit der zellulären RNA-Polymerase II, insbesondere mit der aktiven Form (Engelhardt *et al.* 2005). Dies reflektiert die Notwendigkeit der viralen Polymerasen in der Nähe von zellulären mRNAs zu agieren, da die Cap-Struktur der viralen mRNAs von zellulären pre-mRNAs entwendet und als Primer für die virale Transkription verwendet wird (sogenanntes *cap snatching*). Mit dem Anfügen einer Base (Guanin oder Cytosin) an den Cap-Primer, geleitet durch das vorletzte Cytosin bzw. Guanin am 3'-Ende der vRNA, beginnt die Transkription (Beaton and Krug 1981; Fodor *et al.* 1995). Die durch PB1 katalysierte RNA-Kettenverlängerung wird fortgeführt bis zu einem 5 bis 7 Basen langen poly-Uracil-Abschnitt am 5'-Ende der vRNA (Li and Palese 1994). Dies ist das Zeichen für die Polyadenylierung der neu synthetisierten viralen mRNA. Anscheinend werden jedoch nicht alle mRNAs in gleichen Mengen bzw. zum gleichen Zeitpunkt produziert, was auf eine zeitliche Regulation der Genexpression hindeutet (Smith and Hay 1982). Proteine wie NP und NS, die wichtige Funktionen in der Replikation bzw. in der Unterdrückung einer antiviralen Antwort haben, werden eher exprimiert als Strukturproteine wie HA, NA und M1, welche für den Zusammenbau der Virionen benötigt werden (Shapiro *et al.* 1987; Hatada *et al.* 1989).

Nach der Translation der viralen Proteine beginnt die Replikation der viralen RNA. Wie das Umschalten von Transkription auf Replikation erfolgt, ist bisher nicht bekannt. Es wird vermutet, dass die viralen Polymerasen transkriptionskompetente und replikationskompetente Domänen beinhalten, welche für den jeweiligen Prozess eingesetzt werden (Gonzalez and Ortin 1999). Zudem ist es wahrscheinlich, dass die nach viraler mRNA-Synthese produzierten viralen Proteine die Umstellung von Transkription auf Replikation einleiten. Hierbei scheint das Nukleoprotein NP eine wichtige Rolle zu spielen, da es neu synthetisierte vRNA bindet und stabilisiert (Medcalf *et al.* 1999; Vreede *et al.* 2004).

Nach der Replikation werden neue RNP-Komplexe im Kern gebildet, was durch das virale Protein M1 katalysiert wird (Martin and Helenius 1991a; Huang *et al.* 2001). M1 bindet dabei sowohl NP, als auch die vRNA (Baudin *et al.* 2001; Nayak *et al.* 2004) und unterstützt zudem die Ablösung des RNP von der nukleären Matrix (Zhironov and Klenk 1997; Garcia-Robles *et al.* 2005). Für den Transport der RNP-Komplexe aus dem Kern in das Zytoplasma spielt M1 ebenfalls eine wichtige Rolle. Dies ist ein aktiver Prozess und erfordert zudem die Mithilfe des viralen Proteins NEP/NS2, welches mit dem Exportrezeptor Crm1 (Elton *et al.* 2001; Iwatsuki-Horimoto *et al.* 2004) und anderen Nukleoporinen interagiert. Da NEP/NS2 auch mit M1 wechselwirken kann, scheint sich im Kern ein Komplex vRNA/NP-M1-NEP/NS2 zu bilden, welcher aktiv aus dem Kern exportiert wird (O'Neill *et al.* 1998; Neumann *et al.* 2000). Die späte Expression von M1 im Infektionszyklus verhindert zudem, dass unreife RNP-Komplexe den Kern verlassen können. Außerdem scheint NEP/NS2 im Zytoplasma das

nukleäre Lokalisationssignal von M1 zu maskieren und so einen Wiedereintritt des RNP-Komplexes in den Kern zu verhindern (Akarsu *et al.* 2003).

Abschließend wird in einer Reihe von Schritten der Zusammenbau der Viruspartikel und die Freisetzung initiiert. Die während der Translation an membrangebundenen Ribosomen synthetisierten, integralen Membranproteine HA, NA und M2 multimerisieren im Endoplasmatischen Retikulum (ER) (Doms *et al.* 1993) und gelangen anschließend über „Sortierungssignale“ zur apikalen Seite der infizierten, polarisierten Zelle (z.B. Lungenepithel), dem Ort der Virusfreisetzung (Schmitt and Lamb 2005). Durch Sequenzmotive in ihren Transmembran-Domänen lokalisieren HA und NA in sogenannte *lipid rafts* (Kundu *et al.* 1996; Scheiffele *et al.* 1997). Dies sind detergentienresistente Mikrodomänen mit spezifischer Protein- und Lipidzusammensetzung auf der Plasmamembran fast aller Säugetierzellen. Diese Mikrodomänen sind reich an Cholesterol, gesättigten Fettsäuren, Sphingomyelin und Glycosphingolipiden und unterscheiden sich von der sie umgebenden fluideren Membran (Simons and Ikonen 1997). Untersuchungen der Lipidzusammensetzung von Viruspartikeln zeigen, dass IVA bevorzugt aus diesen Domänen freigesetzt wird (Scheiffele *et al.* 1999; Zhang *et al.* 2000).

Um vermehrungsfähige Viren zu erhalten, müssen alle 8 RNA-Gensegmente in einen Viruspartikel verpackt werden. Der Mechanismus hierfür ist nicht völlig klar. Geschieht dies zufällig, müssten mehr als 8 Segmente pro Viruspartikel verpackt werden, um eine annehmbare Anzahl funktioneller Viren zu erhalten (Bancroft and Parslow 2002). Jedoch ist es bisher nicht gelungen die RNA-Menge pro Viruspartikel exakt genug zu quantifizieren, um diese Frage abschließend beantworten zu können (Palese 2007). Ein anderes Modell postuliert ein konserviertes, für jedes Segment spezifisches „Verpackungssignal“ in den kodierenden 5'- und 3'-Regionen der einzelnen RNA-Segmente und dieses Signal wurde für HA, NA, NS und die Polymerasen bereits gefunden (Fujii *et al.* 2003; Fujii *et al.* 2005; Liang *et al.* 2005; Muramoto *et al.* 2006).

In einem letzten Schritt erfolgt die Abschnürung der Viruspartikel von der zellulären Membran (Nayak *et al.* 2004; Schmitt and Lamb 2005). Dieser ATP-abhängige Prozess (Hui and Nayak 2001) erfordert die Interaktion von M1 mit zellulären Faktoren (Gomez-Puertas *et al.* 2000; Hui *et al.* 2003; Hui *et al.* 2006) und bestimmt zudem über die Form der Viruspartikel (Roberts *et al.* 1998; Elleman and Barclay 2004). Darüber hinaus spielt die Neuraminidase eine wichtige Rolle bei der Virusfreisetzung. Durch die enzymatische Aktivität dieses Proteins werden Sialinsäuren von den Zuckerresten auf der Oberfläche der Zelle und auch der mitgenommenen Virusmembran abgetrennt. Dadurch wird verhindert, dass freigesetzte Viren über die Bindung von HA an Sialinsäuren mit der Zelloberfläche verklumpen. Unterbindung der NA-Aktivität durch Inhibitoren (Palese and Compans 1976) oder Mutationen (Palese *et al.* 1974; Liu *et al.* 1995) führt dementsprechend zur Retention der Viruspartikel auf der Zelloberfläche und zum Verlust der Infektiosität. All dies macht die Neuraminidase zu einem geeigneten und wichtigen Ziel für die Entwicklung von antiviralen Medikamenten (Garman and Laver 2004; McKimm-Breschkin 2005). Bekannteste Beispiele hierfür sind die Neuraminidase-Inhibitoren

Oseltamivir und Zanamivir, besser bekannt unter ihren Handelsnamen Tamiflu® und Relenza®. Beide sind sehr effektiv, wenn sie prophylaktisch oder kurz nach der Infektion mit IVA appliziert werden (Hayden *et al.* 1999; Moscona 2005). Da sie jedoch nur die Virusfreisetzung und nicht die Virusreplikation verhindern, sinkt die Wirksamkeit mit der Zeit nach Infektion. Unter Selektionsdruck können zwar ebenfalls Virusvarianten entstehen, die resistent sind gegen diese Inhibitoren, jedoch im Vergleich zu den M2-Ionenkanalinhibitoren mit viel geringerer Frequenz (Gubareva *et al.* 2000) und meist auch geringerer Infektiosität. Die Gefährlichkeit des Influenzavirus-Subtyps H5N1 wird jedoch unter anderem durch das Auftauchen von infektiösen Varianten deutlich, welche gegen NA-Inhibitoren resistent sind (de Jong *et al.* 2005a; de Jong *et al.* 2005b; Le *et al.* 2005; Parry 2006).

Erstaunlich ist die Geschwindigkeit mit welcher eine Infektion mit IVA erfolgt. Bereits 25 Minuten nach Inkubation von Zielzellen mit IVA ist der Großteil der Viren in die Zelle eingedrungen und kaum 10 Minuten später sind die RNP-Komplexe im Nukleus zu finden (Martin and Helenius 1991b; Roy *et al.* 2000). Die Synthese der viralen mRNAs und der viralen Proteine dauert bis ca. 3 Stunden nach Infektion an. Danach wird im Zellkern von mRNA-Produktion auf Replikation des viralen Genoms umgeschaltet, begleitet von einer signifikanten Akkumulation neu-synthetisierter NP-Proteine im Nukleus. Anschließend werden die neuen viralen RNP-Komplexe im Kern zusammengebaut und zur Membran transportiert. Bereits 5 bis 6 Stunden nach Infektion sind die ersten Virusnachkommen im umgebenden Medium zu detektieren. Die Virusfreisetzung steigt in den nachfolgenden Stunden stark an. Nach 8 bis 10 Stunden ist der gesamte Replikationszyklus durchlaufen. Durch virusinduzierte Apoptose stirbt eine Zelle zirka 12 Stunden nach Infektion. Leben Zellen länger, ist dies wahrscheinlich auf limitierende zelluläre Ressourcen während der Infektion zurückzuführen (Sidorenko and Reichl 2004).

2.3. Das Immunsystem und Influenzaviren

2.3.1. Die Infektion mit dem Influenzavirus Typ A

Die Ansteckung mit IVA erfolgt beim Menschen meist in Form einer Tröpfcheninfektion. Durch die Bindung an SA α 2,6Gal-Sialinsäurerezeptoren (Shinya *et al.* 2006) werden Epithelzellen der Atemwege infiziert, was zu einer raschen Ausbreitung der Infektion auf den gesamten respiratorischen Trakt führt. Die Inkubationszeit beträgt je nach Virusmenge, Virusroute und Immunstatus des Wirts zwischen 1 und 5 Tagen (Eccles 2005). Nach der Infektion kommt es zu einem raschen Anstieg des Virustiters. Die Höhe des Titers korreliert dabei mit der Schwere der resultierenden Erkrankung. Diese kann von einer asymptomatischen Infektion über eine Krankheit mit Erkältungsmerkmalen bis zur viralen Lungenentzündung mit tödlichem Ausgang reichen. Pathologisch zeigen die unteren Atemwege die meisten Veränderungen mit Entzündungen bis hin zur Bildung von Ödemen (Hers and Mulder 1961). Die Krankheit beginnt fast immer sehr plötzlich, verbunden mit Kopfschmerzen, Frösteln, trockenem Husten, gefolgt von hohem Fieber (bis zu 40°C innerhalb von 24 Stunden), sowie Unwohlsein und Appetitlosigkeit. Hinzu kommen auf die Atemwege begrenzte Krankheitszeichen wie Schnupfen und Rachenentzündung. Ältere Menschen und kleine Kinder weisen oft verstärkte Krankheitssymptome auf. Das Fieber klingt im Allgemeinen nach dem 2. bis 3. Tag ab. In dieser Phase nehmen die Atemwegssymptome zunächst noch zu, obwohl die Virusproduktion schon abfällt (Richman *et al.* 1976). Aus trockenem wird schleimiger Husten mit eitrigem Auswurf. Die Verbreitung der Viren auf neue Wirte erfolgt in dieser Phase in Form der abgegebenen Aerosole. Nach dem 5. Tag sind mitotische Aktivitäten in den Atemwegen zu sehen und die Regeneration beginnt. In dieser Phase können regenerative und pathologische Prozesse gleichzeitig ablaufen. Die Krankheitsmerkmale nehmen meist nach dem 6. Tag ab. Zu diesem Zeitpunkt werden auch keine neuen Viren mehr produziert (Richman *et al.* 1976; Eccles 2005). In dieser Phase führt der während der Erkrankung entstandene Verlust der schützenden Schleimhautdecke zu einer erhöhten Gefahr für eine nachfolgende, bakterielle Infektion.

2.3.2. Das Immunsystem im Kampf gegen das Influenzavirus Typ A

Das Immunsystem des Wirts spielt bei der Bekämpfung einer Infektion mit IVA eine entscheidende Rolle und leitet den Heilungsprozess ein. Die hierbei wichtigen, protektiven Komponenten umfassen sowohl angeborene, unspezifische als auch adaptive, spezifische Komponenten (Tabelle 1).

Teile der Immunität	Komponenten der Immunabwehr	Wirkung	Abschnitt
<i>Angeborene Immunität</i>	Schleimhäute, Wimpernhärchen, Proteaseinhibitoren	Schutzbarriere gegen eindringende Keime, Verhinderung der Spaltung von HA0	2.3.2.1.
	Neutrophile und alveoläre Makrophagen	Detektion der Pathogene, Ausschüttung von pro-inflammatorischen Mediatoren	
	Detektion von Pathogenen durch TLR in Epithelzellen und Dendritischen Zellen	Induktion einer Typ I-IFN-Antwort, Aktivierung antiviraler Mechanismen, Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine	
	(Pro-inflammatorische) Zytokine	Induktion von angeborenen und adaptiven Immunmechanismen	
<i>Humorale, adaptive Immunität</i>	Reifung von virusspezifischen B-Zellen zu Plasmazellen und Ausschüttung von virusspezifischen Antikörpern	Inhibition von Funktionen der viralen Proteine (vor allem HA und NA), Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses	2.3.2.2.
<i>Zelluläre, adaptive Immunität</i>	Antigenpräsentierende Zellen	Aktivierung von spezifischen T- und B-Zellen	2.3.2.3.
	Zytotoxische CD8 ⁺ Zellen (CTL)	Eliminierung von virusinfizierten Zellen und Ausschüttung von Zytokinen, Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses	
	CD4 ⁺ T-Helferzellen	Unterstützung von CTL und B-Zellen, teilweise eigene zytolytische Aktivität, Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses	

Tabelle 1. Immunmechanismen zur Bekämpfung einer Infektion mit Influenzavirus Typ A

2.3.2.1. Die Schleimhäute und die angeborene Immunität gegen das Influenzavirus Typ A

Die Schleimhäute der Atemwege bilden die erste Barriere gegen eine IVA-Infektion. Diese umfassen nicht-spezifische Schutzmechanismen in Form von Schleimschicht und Wimpernhärchen (Zilien), welche den Zelleintritt der Viren reduzieren können. Zudem verhindern Proteaseinhibitoren die proteolytische Spaltung des Hämagglutinin-Vorläuferproteins HA0 in die Untereinheiten HA1 und HA2, was die Infektiosität von IVA dramatisch minimiert (Zhirnov *et al.* 1984; Zhirnov *et al.* 1996). Darüber hinaus spielen zelluläre Komponenten des angeborenen Immunsystems, besonders Neutrophile und alveoläre Makrophagen, eine wichtige Rolle bei der Begrenzung der Infektion (Tumpey *et al.* 2005). Durch die Erkennung von Viruskomponenten mittels sogenannter *Toll-like* Rezeptoren (TLR) wird im Rahmen der IVA-Infektion zudem eine Typ I-Interferon (IFN)-Antwort in Gang gesetzt. Mindestens 2 TLR sind bei der Erkennung von IVA wichtig. TLR3 in Epithelzellen bindet doppelsträngige RNA (dsRNA), was zu einer Aktivierung des TRIF-IRF3-Signalwegs und damit zu einer IFN-Antwort führt (Guillot *et al.* 2005). Die Bindung von einzelsträngiger RNA an

TLR7 bzw. 8 in Dendritischen Zellen (DC), welche ebenfalls von IVA infiziert werden (Strobel *et al.* 2000; Nimmerjahn *et al.* 2003), löst gleichfalls eine IFN-Antwort aus und stimuliert zudem die Produktion von weiteren pro-inflammatorischen Zytokinen (Lund *et al.* 2004; Barchet *et al.* 2005). Über die IFN-Antwort werden mehrere antivirale Mechanismen aktiviert. Dazu zählt z. B. die Induktion von Mx-Proteinen (Kochs *et al.* 2005), die eine effiziente Replikation des IVA unterbinden, indem sie unter anderem den Transport der viralen RNP-Komplexe in den Kern hemmen (Haller and Kochs 2002). Darüber hinaus trägt die IFN-Antwort zur Induktion einer antigenspezifischen Immunantwort bei, die für eine erfolgreiche Kontrolle und Elimination der IVA-Infektion notwendig ist (siehe Abschnitt 2.3.2.3.).

2.3.2.2. Die humorale Immunantwort gegen das Influenzavirus Typ A

Innerhalb der adaptiven Immunität spielt die humorale Immunantwort in Form von Serumantikörpern gegen virale Proteine eine bedeutende Rolle. Dies zeigt allein die Tatsache, dass die von der Mutter auf das Kind übertragenen IVA-spezifischen Antikörper dem Kind eine gewisse Zeit Schutz vor einer Ansteckung bieten (Puck *et al.* 1980). Während einer Infektion werden Antikörper gegen HA, NA, NP und die M-Proteine produziert (Potter and Oxford 1979). Aufgrund ihrer Lokalisation auf der Virus- und Zelloberfläche stellen HA und NA die bedeutendsten Ziele der humoralen Immunantwort dar. Entsprechend verleihen transferierte anti-HA- und anti-NA-Antikörper Schutz gegen eine IVA-Infektion, anti-NP- und anti-M1-Antikörper jedoch nicht (Virelizier 1975). Ein hoher Titer an anti-HA- und anti-NA-Antikörpern gilt zudem als Hinweis für eine bestehende Immunität gegen IVA (Clements *et al.* 1986). Die Antikörper wirken, indem sie die wichtigen Funktionen der viralen Proteine inhibieren. Anti-HA-Antikörper verhindern die Infektion (Virelizier 1975), wohingegen anti-NA-Antikörper die Virusfreisetzung minimieren.

2.3.2.3. Die zelluläre Immunantwort gegen das Influenzavirus Typ A

Neben den B-Zellen gelten T-Zellen als wichtigste zelluläre Komponente der antiviralen Immunabwehr. Diese werden durch Antigenpräsentierende Zellen (APC), insbesondere DC, aktiviert, die entweder selbst durch IVA infiziert wurden, oder IVA-Proteine durch Endozytose aufgenommen haben. Innerhalb der Hauptgruppe an T-Zellen, welche einen T-Zellrezeptor bestehend aus einer α - und einer β -Kette exprimieren, werden zwei Untergruppen unterschieden. $CD8^+$ T-Zellen erkennen Peptide, die auf *major histocompatibility complex* (MHC)-Klasse I-Molekülen präsentiert werden, wohingegen $CD4^+$ T-Zellen Antigen im Kontext von MHC-Klasse II-Molekülen detektieren. $CD8^+$ zytotoxische T-Zellen (CTL) sind in der Lage, virusbefallene Zellen direkt zu erkennen und zu

eliminieren, und zugleich durch Zytokinausschüttung weitere Effektormechanismen zu initiieren (Moskophidis and Kioussis 1998; Hogan *et al.* 2001a; Lawrence *et al.* 2005). Humane, MHC-Klasse I-restringierte, CD8⁺ zytotoxische T-Zellen erkennen vor allem Peptide von HA, M, NP und NS2 (Fleischer *et al.* 1985).

CD4⁺ T-Zellen spielen eine zentrale Rolle in der Koordination einer Immunantwort gegen IVA. Durch die Bereitstellung von Zytokinen und membranständigen Liganden unterstützen sie die Proliferation und Funktion von CTL und die Antikörperantwort von B-Zellen (Lamb *et al.* 1982; Hogan *et al.* 2001b; Roman *et al.* 2002; Mozdzanowska *et al.* 2005). Durch diese Funktionen sind sie essentiell für die Initiation und Aufrechterhaltung der adaptiven Immunantwort gegen IVA. Zusätzlich besitzen CD4⁺ ähnlich wie CD8⁺ T-Zellen zytolytische Aktivität und sind in der Lage virusinfizierte Zellen zu eliminieren (Jellison *et al.* 2005). Die Bedeutung von CD4⁺ T-Zellen für die Immunität gegen IVA konnte in CD8⁺ T-Zell-defizienten Mäusen nachgewiesen werden. Diese konnten eine IVA-Infektion über einen CD4⁺ T-Zell-abhängigen Mechanismus erfolgreich bekämpfen (Eichelberger *et al.* 1991a). Passiv gegebene, spezifische CD4⁺ T-Zellen benötigten hierfür jedoch B-Zellen, was darauf hindeutet, dass die Hauptfunktion von CD4⁺ T-Helferzellen die Aktivierung von antikörperproduzierenden B-Zellen ist (Scherle *et al.* 1992; Topham and Doherty 1998; Mozdzanowska *et al.* 2005). Auf der anderen Seite scheinen auch CD8⁺ T-Zellen ohne CD4⁺ T-Zellhilfe eine IVA-Infektion erfolgreich kontrollieren zu können (Eichelberger *et al.* 1991b). Versuchstiere ohne CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen erliegen jedoch einer IVA-Infektion. Dies verdeutlicht, dass die angeborene Immunantwort alleine nicht ausreicht, um eine IVA-Infektion erfolgreich zu bekämpfen (Bot *et al.* 1998; Epstein *et al.* 2000; Wright 2007). Nach überstandener Primärinfektion entsteht ein sogenanntes immunologisches Gedächtnis (*memory*) in Form von Gedächtnis-T- und Gedächtnis-B-Zellen. Eine sekundäre Infektion mit dem gleichen Virus führt dann zu einer ungleich schnelleren Immunantwort, verbunden mit einem bei weitem milderem Krankheitsbild. Dies wird ausgenutzt, um Menschen prophylaktisch gegen Influenzaviren zu impfen.

2.3.2.4. Die Influenzavirusimpfung

Die aktuell eingesetzten Impfstoffe enthalten entweder ein Gemisch aus verschiedenen, inaktivierten Subtypen des Influenzavirus oder Bestandteile derselben. Zum Einsatz kommen jeweils 2 Stämme des IVA und einer des IVB. Aufgrund der hohen Mutationsrate der Viren und des kurzen Immunschutzes muss die Impfung gegen das Influenzavirus jährlich verabreicht werden. Damit nimmt sie unter allen Impfungen eine Sonderstellung ein. Die Stämme für die jährliche Immunisierung werden von der WHO und dem *US Public Health Service* entsprechend den jeweils vorherrschenden Virussubtypen empfohlen (Harper *et al.* 2005). Die verfügbaren Impfstoffe werden vorzugsweise intramuskulär (Belshe *et al.* 2004) und in besonderen Fällen auch subkutan verabreicht. Der Impfschutz ist nach

7 - 14 Tagen voll ausgeprägt und besteht in der Regel 6 – 12 Monate. Die Immunisierung sollte vor Beginn der jährlichen Saison, also jeweils im Herbst, erfolgen. Empfohlen wird die Impfung für ältere Personen über 60 Jahren, Menschen mit bestimmten Grunderkrankungen und medizinisches Personal, welches aufgrund des häufigeren Kontakts besonders gefährdet ist und zudem eine mögliche Infektionsquelle für betreute, ungeimpfte Risikogruppen darstellt. Des Weiteren wird die Impfung für Personen mit direktem Kontakt zu Geflügel und Wildvögeln empfohlen und zudem oft von Arbeitgebern angeboten, um Arbeitsausfälle der Arbeitnehmer prophylaktisch zu vermeiden. Da die Impfstoffe bisher direkt aus Hühnereiern gewonnen werden, dürfen Personen mit Überempfindlichkeit gegen Bestandteile des Impfstoffes, wie zum Beispiel Reste von Hühnereiweiß, nicht geimpft werden. Diese benötigen Prophylaxe und gegebenenfalls eine Therapie mit NA-Hemmern (Quelle: Empfehlungen der Ständigen Impfkommission (STIKO) des Robert-Koch-Instituts (www.rki.de bzw. <http://influenza.rki.de/>)). Abhilfe könnte hierbei die zellkulturbasierte Herstellung von Impfstoffen gegen das Influenzavirus schaffen, welche seit kurzem zugelassen ist (www.novartis-behring.de/).

2.3.3. Das Influenzavirus Typ A im Kampf gegen das Immunsystem

2.3.3.1. Epidemien und Pandemien

Das Immunsystem hat eine Vielzahl an Mechanismen entwickelt, um virale Infektionen zu kontrollieren. Trotzdem gibt es jährlich Zehntausende von Toten und Millionen von Erkrankten durch IVA. In den USA verursacht IVA jedes Jahr 50 Millionen Erkrankungen, zwischen 50.000 und 100.000 Krankenhausaufenthalte und 20.000 bis 40.000 Todesfälle. Die dabei entstehenden wirtschaftlichen Schäden werden auf 1 Milliarde Dollar direkte Kosten in Form von Medikamenten und Behandlung, sowie 2 bis 4 Milliarden Dollar indirekte Kosten durch Fehltag beziffert (Wright 2007). In Deutschland erkranken jährlich bis zu 7 Millionen Menschen an IVA und 5.000 bis 15.000 Menschen sterben an den Folgen der Infektion (Quelle: Robert-Koch-Institut; www.rki.de). Insgesamt sind während einer normalen, saisonalen Epidemie 10 bis 20 % der Bevölkerung betroffen. Dies kann jedoch in bestimmten Altersgruppen bis zu 50 % erreichen. Besonders anfällig für eine IVA-Infektion sind oft Schulkinder, da sie aufgrund ihres geringen Alters nur eine eingeschränkte Immunität gegen IVA besitzen und Kontakt zu einer großen Zahl Gleichaltriger haben, was eine schnelle Ausbreitung der Krankheit begünstigt. Daneben gelten ältere Menschen als besonders gefährdet, da eine IVA-Infektion oftmals zu fatalen Komplikationen bei bereits bestehenden gesundheitlichen Vorbelastungen wie Herz-Kreislauf- oder Stoffwechselerkrankungen führt. Dementsprechend ist die Sterblichkeit bei Menschen über 65 Jahre etwa hundertmal höher als bei Menschen unter 65 Jahren (Simonsen 1999). Während der saisonalen Epidemien machen die über 65 Jährigen etwa 90 % der Todesopfer aus (Sprenger *et al.* 1993). Neben den saisonalen IVA-Epidemien traten im letzten Jahrhundert auch mehrere Pandemien in Abständen von 10 - 40 Jahren

auf. Bekanntestes Beispiel hierfür ist die Pandemie von 1918, die auch als Spanische Grippe bezeichnet wird, und der weltweit zirka 50 Millionen Menschen zum Opfer fielen (Johnson and Mueller 2002). Während bei den meisten saisonalen Epidemien vor allem ältere Menschen zu den Todesopfern zählen, zeichnen sich Pandemien durch eine hohe Mortalität auch unter jungen Erwachsenen aus (Wright 2007). Insgesamt ist die Sterblichkeit während einer Pandemie am größten, wird aber von der Summe der Toten in den Jahren zwischen den Pandemien noch überstiegen.

2.3.3.2. Tierseuchen und das Influenzavirus H5N1

Epidemien/Pandemien werden auch in vielen Tierspezies mit oftmals katastrophalen ökonomischen Folgen vor allem im Rahmen von Massentierhaltungen beobachtet und bergen darüber hinaus auch potentielle Gefahren für den Menschen. Bekanntestes Beispiel hierfür ist der für Vögel extrem gefährliche IVA-Subtyp H5N1, der zu den sogenannten hochpathogenen Vogel-IVA (HPAI) gehört, die früher auch als *fowl plague* Virus (FPV) bezeichnet wurden. H5N1 tauchte erstmals 1997 in Hong Kong auf (Shortridge *et al.* 1998), wo 70 bis 100 % der infizierten Hühner verendeten (Suarez *et al.* 1998; Subbarao *et al.* 1998). Durch Keulen des gesamten Geflügels konnte 1997 eine weitere Ausbreitung der Infektion verhindert werden. Trotzdem kann H5N1 mittlerweile auch in Wildvögeln nachgewiesen werden (Guan *et al.* 2002; Li *et al.* 2004) und scheint in domestizierten Enten nicht-pathogen zu replizieren. Diese Tiere könnten ein natürliches Reservoir für H5N1 darstellen (Chen *et al.* 2004). Bis 2005 wurden in Südost-Asien insgesamt mehr als 100 Millionen Tiere durch Keulen oder Infektion getötet. Erstaunlicherweise können selbst Wasservögel, welche IVA normalerweise asymptomatisch weitergeben, daran verenden (Sturm-Ramirez *et al.* 2004). Im April 2005 starben 6000 Gänse, Möwen, Enten und Kormorane an einem See in China durch eine noch pathogenere H5N1-Variante (Chen *et al.* 2005; Liu *et al.* 2005). Dieses Virus konnte nachfolgend in einer Vielzahl von Zugvögeln, Falken aber auch Tauben gefunden werden und breitete sich über die Mongolei, Russland und Kasachstan im Jahr 2006 bis nach Europa aus, wo es bis heute in Wasservögeln vorhanden zu sein scheint. Erst kürzlich konnte es in verendeten Wildvögeln in Deutschland und Tschechien nachgewiesen werden (Juni 2007) und war der Grund für Massentötungen in bayrischen Entenzuchten (August/September 2007). H5N1 hat eine multibasische Schnittstelle zwischen den Domänen HA1 und HA2 des Hämagglutinins. Diese beinhaltet eine Reihe von aufeinander folgenden Argininen bzw. Lysininen und kann von ubiquitär im gesamten Körper vorkommenden Proteasen (wie z.B. Furin) gespalten werden, was die Pathogenität von H5N1 erhöht (Stieneke-Grober *et al.* 1992; Horimoto and Kawaoka 1994; Shortridge *et al.* 1998). Viele andere HA-Subtypen weisen hingegen ein einzelnes Arginin in der Spaltstelle auf. Diese Schnittstelle kann dadurch nur von speziellen Proteasen, wie der Serin-Protease Clara gespalten werden, welche vor allem von Clara-Zellen im Bronchusepithel produziert wird (Skehel and Wiley 2000).

Während der Vogelepidemie im Jahre 1997 in Hong Kong kam es zu ersten Berichten einer direkten Übertragung vom Vogel auf den Menschen (Claas *et al.* 1998; Subbarao *et al.* 1998). Entsprechend dem damaligen Wissensstand war dies bis dahin für undenkbar gehalten worden, da eine Übertragung von Vogel zu Mensch eines Zwischenwirts (z. B. Schweine) bedurfte. Dies unterstreicht jedoch die potentielle Gefahr von Vogel-IVA-Epidemien für die humane Bevölkerung. Alle infizierten Patienten standen in direktem Kontakt mit Geflügel. Die H5N1-assoziierte Sterblichkeit liegt bei 50 - 70 % und hat bislang mehr als 100 Opfer gefordert (Hien *et al.* 2004; Beigel *et al.* 2005). Diese verhältnismäßig geringe Zahl an Opfern wird durch die bisher nur in Einzelfällen beobachtete direkte Übertragung von Mensch zu Mensch erklärt (Tran *et al.* 2004; Ungchusak *et al.* 2005). Trotzdem ist die durch H5N1 vorhandene Bedrohung nicht zu unterschätzen, denn auch der Auslöser der Spanischen Grippe (H1N1) scheint ein HA-Gen besessen zu haben, welches von Vogel-IVA stammte und sich durch wenige Mutationen an den menschlichen Wirt angepasst hatte (Glaser *et al.* 2005; Stevens *et al.* 2006). Insgesamt zeigen H5-, H7- und H9-Subtypen das größte Potential direkt von Vögeln auf Menschen überzuspringen (Peiris *et al.* 1999; Fouchier *et al.* 2004). Ob diese Subtypen dann auch die Fähigkeit einer Mensch-zu-Mensch-Übertragung entwickeln und damit eine Pandemie auslösen können, bleibt abzuwarten, muss aber in Betracht gezogen und genaustens überwacht werden.

Das Auftreten von Epidemien und Pandemien trotz angeborener und erworbener Immunmechanismen impliziert, dass sich IVA einer wirkungsvollen Immunkontrolle entziehen kann. In den letzten Jahren wurden Einblicke in einige der viralen Strategien zur Immunevasion gewonnen. Diese sind in Tabelle 2 zusammengefasst und werden im Text nachfolgend eingehender beleuchtet.

Teile der Immunität	Immunologische, antivirale Strategien	Anti-immunologische Strategien von IVA	Abschnitt
<i>Angeborene Immunität</i>	Alveoläre Makrophagen	Infektion und Eliminierung	2.3.3.5.
	TLR, Typ I-IFN-Antwort und antivirale Effektormechanismen	Unterdrückung der Typ I-Interferon-Antwort durch das IVA-Protein NS1	2.3.3.3.
	(Pro-inflammatorische) Zytokine	Induktion eines Zytokin-Ungleichgewichts (bei H5N1)	2.3.3.5.
<i>Humorale, adaptive Immunität</i>	Inhibition viraler Funktionen durch virusspezifische Antikörper	Entkommen der humoralen Immunantwort durch Antigen- <i>drift</i> und Antigen- <i>shift</i>	2.3.3.4.
<i>Zelluläre, adaptive Immunität</i>	Antigenpräsentierende Zellen	Infektion	2.3.3.5.
	Lymphozyten (B- und T-Zellen)	Lymphozytendepletion	

Tabelle 2. Strategien des IVA zur Eliminierung der antiviralen Immunmechanismen

2.3.3.3. Die Unterdrückung der Interferonantwort durch das virale Protein NS1

Eine Typ I-Interferon (IFN- α und - β)-Antwort ist eines der ersten immunologischen Ereignisse nach einer IVA-Infektion. Das nicht-strukturelle Protein NS1 unterdrückt die durch IVA-Infektion ausgelöste, antivirale Typ I-Interferon-Antwort. NS1-defiziente Viren induzieren in IFN-kompetenten Zellen große Mengen an Interferon, wohingegen die Interferonproduktion der gleichen Zellen mit einem IVA-Wildtyp stark minimiert ist (Garcia-Sastre *et al.* 1998; Geiss *et al.* 2002). NS1 scheint die IFN-Antwort sowohl auf transkriptioneller, wie auch auf post-transkriptioneller Ebene zu unterdrücken (Talon *et al.* 2000; Wang *et al.* 2000; Ludwig *et al.* 2002). Das hochpathogene H5N1 scheint sogar die IFN-Antwort vollständig zu inhibieren, was ebenfalls durch NS1 vermittelt wird (Seo *et al.* 2002; Seo *et al.* 2004). Die dafür verantwortlichen Mechanismen sind nicht vollständig geklärt. Bekannt ist jedoch, dass NS1 die Proteinkinase R (PKR) beeinträchtigt, welche durch doppelsträngige RNA aktiviert wird und durch Phosphorylierung des *eukaryotic initiation factor-2 α* (eIF2 α) die Proteintranslation unterbindet. Dies geschieht über mehrere Wege. Erstens unterdrückt NS1 die Produktion von IFN, welche für die Aktivierung der PKR notwendig ist. Zweitens bindet NS1 den Aktivator von PKR, die dsRNA und verhindert so die Aktivierung der PKR (Lu *et al.* 1995; Hatada *et al.* 1999). Drittens interagiert NS1 direkt mit der PKR (Tan and Katze 1998) und verhindert so deren Aktivierung (Li *et al.* 2006). Ein vierter Weg ist die Induktion des PKR-Inhibitors P58^{IPK} nach IVA-Infektion (Lee *et al.* 1992), wobei allerdings noch ungeklärt ist, ob dies durch NS1 oder ein anderes virales Protein auslöst wird. Für NS1 ist zudem bekannt, dass es in der Wirtszelle die Transkription von zellulären Genen beeinträchtigt (Chen *et al.* 1999b; Shimizu *et al.* 1999). Durch die Interaktion von NS1 mit wichtigen Faktoren der mRNA 3'-Prozessierungsmaschinerie (Nemeroff *et al.* 1998; Krug *et al.* 2003) bleiben zelluläre Transkripte unreif und können den Kern nicht verlassen. Zudem kann NS1 auch das Spleißen von zellulären mRNAs inhibieren (Fortes *et al.* 1994; Lu *et al.* 1994) mit ähnlichen Konsequenzen wie bei der Hemmung der Prozessierung. Dadurch werden wichtige antivirale Mechanismen der Wirtszelle blockiert, da diese von der Transkription und Translation bestimmter zellulärer Gene abhängig sind.

2.3.3.4. Antigen-drift und -shift zur Umgehung der humoralen Immunantwort

Die humorale Immunantwort gegen virale Proteine ist ein weiterer, wichtiger Mechanismus zur Kontrolle einer IVA-Infektion. Zwar schützen Antikörper ein Leben lang vor der Reinfektion mit der gleichen Virusvariante, jedoch sind diese Antikörper oftmals unwirksam gegen andere IVA-Subtypen mit neuen antigenen Determinanten (Sonoguchi *et al.* 1986), welche durch die hohen Mutationsrate entstehen. Hierbei sind 2 Mechanismen von großer Bedeutung. Bei dem als *Antigen-drift* bezeichneten Prozess kommt es zu Antigenveränderungen durch Punktmutationen im Virusgenom. Hiervon sind vor

allem HA und NA betroffen. Wahrscheinlich ist dies das Resultat einer Selektion von spontan entstandenen Mutanten, welche dem Immunsystem entgehen konnten. Der zweite Mechanismus wird als *Antigen-shift* bezeichnet. Hierbei kommt es zur Neukombination von viralen Segmenten nach gleichzeitiger Infektion einer Zelle mit 2 IVA-Stämmen bzw. Subtypen. Besonders gefährlich ist dies im Falle der Kombination eines vogelspezifischen und eines humanspezifischen Subtyps (Webster *et al.* 1992). Enthält das resultierende Virus aviäres HA und NA und führt die nachfolgende Vermehrung im menschlichen Wirt zur Anpassung des HA an die humanen Rezeptoren, so werden komplett neue HA-/NA-Varianten in das dafür naive humane Immunsystem eingeführt. Dies resultiert in sehr hohen Infektionsraten, wie sie bei den Pandemien des letzten Jahrhunderts beobachtet wurden, welche größtenteils auf einem *Antigen-shift* beruhen. Die zweite Möglichkeit eines *Antigen-shifts* beruht auf der Adaptation von Vogel- bzw. Schweine-IVA an den menschlichen Wirt. Dies könnte bei der Spanischen Grippe geschehen sein (Taubenberger *et al.* 1997; Reid *et al.* 2004; Taubenberger *et al.* 2005) und ist höchstwahrscheinlich einer der Gründe für die hohe Pathogenität von H5N1. Gegen H5N1 ist in der Bevölkerung keine Immunität vorhanden. Die nicht-existente Antikörperantwort begünstigt zudem eine systemische Ausbreitung des Virus.

Insgesamt führt die Veränderung des genetischen Materials und der daraus resultierenden viralen Proteine zu Virusvarianten, die neue antigene Strukturen aufweisen, gegen die keine (Teil-)Immunität in Form von neutralisierenden Antikörpern vorhanden ist.

2.3.3.5. Unterwanderung der zellulären Immunantwort durch Influenzavirus Typ A

Bei besonders aggressiven IVA-Subtypen wie H5N1 ist die Infektion nicht auf die Atemwege beschränkt, sondern tritt systemisch auf (Tumpey *et al.* 2000). In diesen Fällen sind, abgesehen von alveolären Schäden mit Fibroseentwicklung, auch Nekrosen in den Nieren und Störungen des hämatopoetischen Systems in Form des hämophagozytischen Syndroms zu beobachten (Wright 2007). Letzteres kann mit einem Zytokin-Ungleichgewicht bzw. einer Hyperzytokinämie und Lymphopenie einhergehen (Yuen *et al.* 1998; To *et al.* 2001). Bei Patienten mit H5N1-Infektion wurden erniedrigte CD3⁺ und CD4⁺ Lymphozytenzahlen beobachtet. Dies war besonders ausgeprägt bei den Patienten, welche der Krankheit erlagen. Eine inverse Korrelation von Viruslast und Lymphozytenzahl könnte entweder Ausdruck einer erniedrigten Lymphozytenproduktion oder einer erhöhten Elimination von Lymphozyten sein (de Jong *et al.* 2006). Apoptotische Aktivitäten in Lymphozyten nach IVA-Infektion konnten bei Vogelzellen (Hinshaw *et al.* 1994), im Mausmodell (Tumpey *et al.* 2000) und bei humanen Zellen (Nichols *et al.* 2001) beobachtet werden. Hiervon waren T-Zellen in besonderem Maße betroffen. Außerdem konnte die Eliminierung von Makrophagen und Monozyten durch IVA bereits nachgewiesen werden (Takizawa *et al.* 1993; Hinshaw *et al.* 1994; Brydon *et al.* 2005). Diese wird wahrscheinlich über verschiedene Mechanismen vermittelt, unter anderem durch PKR (Gil and

Esteban 2000), Fas/FasL-Interaktion (Wada *et al.* 1995), Stressaktivierung (Lin *et al.* 2001; Maruoka *et al.* 2003) und NA-induzierte Ausschüttung von TGF- β (Schultz-Cherry and Hinshaw 1996; Morris *et al.* 1999). Einige virale Proteine sind aktiv an der Induktion der Apoptose beteiligt. Neben der Neuraminidase konnten für die M-Proteine (Morris *et al.* 2002) und NS1 (Schultz-Cherry *et al.* 2001) apoptotische Aktivitäten nachgewiesen werden. PB1-F2 scheint über seine Lokalisation in der Mitochondrienmembran und der Freisetzung von Cytochrom C ebenfalls in apoptotische Vorgänge, vor allem in Leukozyten, involviert zu sein (Chen *et al.* 2001; Chanturiya *et al.* 2004; McAuley *et al.* 2007).

Funktionell kann die Induktion von Apoptose antiviral wirken und durch Elimination infizierter Zellen die Virusausbreitung verhindern. Auf der anderen Seite scheinen prä-apoptische Faktoren wichtig für die Replikation von IVA zu sein (Wurzer *et al.* 2004). Bei IVA-infizierten Patienten werden während oder kurz nach der Infektion zudem oftmals bakterielle Infektionen beobachtet (McAuley *et al.* 2007). Mögliche Ursachen für sekundäre, bakterielle Infektionen könnten die angegriffenen Schleimhautbarrieren sein, welche Nachfolgeinfektionen erleichtern, oder die Eliminierung wichtiger immunologischer Komponenten im Allgemeinen und Lymphozyten im Speziellen (McAuley *et al.* 2007). Die Eliminierung von Lymphozyten würde eine adaptive Immunantwort einschließlich der Produktion neutralisierender Antikörper verzögern bzw. ganz verhindern und der Ausbreitung von IVA und nachfolgenden Bakterien im Wirt auf diesem Wege einen zeitlichen Vorsprung verschaffen (Zamarin *et al.* 2005).

Auf welche Weise das IVA die Unterwanderung der zellulären Immunität im Detail bewerkstelligt und welche Immunzellen im Einzelnen davon betroffen sind ist bisher nicht hinreichend verstanden, um die beobachteten, klinischen Phänomene vollständig erklären zu können. Dies bedarf deshalb genauerer Untersuchungen.

3. Ziele der Arbeit

In Deutschland erkranken jährlich etwa 10 – 20 % der Bevölkerung an einer Influenza und bis zu 15.000 Patienten deutschlandweit und 500.000 Patienten weltweit sterben laut WHO an den Folgen der Infektion. Damit ist die Influenza in Deutschland die Infektionskrankheit mit der höchsten Sterblichkeitsrate und stellt auch weltweit eine enorme Gefährdung für die menschliche Gesundheit dar. Alle 10 – 40 Jahre treten zudem IVA-Pandemien mit einer weit erhöhten Morbidität und Mortalität auf (www.rki.de und www.who.int).

Die Infektion eines erheblichen Prozentsatzes der immunkompetenten Bevölkerung impliziert, dass sich das IVA erfolgreich der Wirtsimmunabwehr entzieht. Welche Mechanismen der Immunevasion das Virus nutzt, ist nur ansatzweise verstanden. Zwar wird durch das virale NS1-Protein die Interferon-Antwort unterdrückt und durch Antigen-*drift* und Antigen-*shift* werden ständig neue Virusvarianten generiert, die der antigenspezifischen Immunantwort entkommen. Diese Mechanismen liefern aber nur bedingt eine Erklärung für die, besonders bei letal erkrankten Patienten oftmals beobachtete, Leukopenie (Yuen *et al.* 1998; de Jong *et al.* 2006) und die bei vielen Patienten auftretende Immunsuppression in Folge einer IVA-Infektion, welche häufig zu opportunistischen Sekundärinfektionen führt. Bakterielle Pneumonien als indirekte Konsequenz der Infektion mit dem Influenzavirus stellen die häufigste Todesursache nach einer IVA-induzierten Erkrankung dar (McCullers 2006; Wright 2007).

Während einer IVA-Infektion werden in lymphoiden Organen vermehrt apoptotische Aktivitäten detektiert (Tumpey *et al.* 2000). Eine IVA-induzierte Eliminierung von Leukozyten und Lymphozyten könnte eine Erklärung für die IVA-assoziierte Leukopenie und Immunsuppression bieten. Humane Lymphozyten werden *ex vivo* jedoch kaum durch IVA infiziert (Nimmerjahn *et al.* 2003). Somit scheint das vermehrte Absterben der Lymphozyten auf indirekten Effekten der IVA-Infektion und nicht auf zytopathischen Aktivitäten des Virus durch direkte Infektion der Zellen zu beruhen. Andererseits ist die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B eine Voraussetzung für die produktive IVA-Infektion von Zellen *in vitro* (Nimmerjahn *et al.* 2004) und sowohl in T- als auch B-Zellen wird NF- κ B durch Antigenkontakt aktiviert (Weil and Israel 2004; Weil and Israel 2006). Im Rahmen dieser Arbeit sollte deshalb die Hypothese überprüft werden, ob IVA in der Lage ist, antigenstimulierte Lymphozyten, einschließlich virusspezifischer T- und B-Zellen, zu infizieren und dadurch zu eliminieren. Dies könnte einen Mechanismus darstellen, wie IVA die adaptive Immunantwort unterwandert und könnte darüber hinaus eine Erklärung für das Auftreten opportunistischer Infektionen in Folge der Influenza liefern.

4. Material

4.1. Zellkultur-Zellen

Lymphoblastoide Zelllinien (LCL)

LCL sind humane B-Zellen, welche durch Epstein-Barr-Virus (EBV)-Infektion *in vitro* zu kontinuierlich wachsenden Suspensions-Zelllinien transformiert wurden. Der HLA-Genotyp (abhängig vom jeweils verwendeten Spender) wurde bestimmt, um die LCL zur spezifischen Stimulation von T-Zellen einsetzen zu können.

Zelllinie	HLA-A	HLA-B	HLA-C	HLA-DRB1	HLA-DQB1	HLA-DPB1
ALF-LCL	0201; 6801	0801; 4901	n.b.	0301; 1101	0201; 0301	n.b.
LCL-JM	0201; 0301	1529; 5101	1203; 1402	0801; 1301	0402; 0603	0401; 1301
LCL-GB	0101	1501	0304; 0602	1101; 1301	0301; 0603	0401; 0402
EBV1.11	2; 26	18; 41	7	1501; 1303	0602; 0301	0301; 0402

n.b. = nicht bestimmt

293T-Zellen

Adhärent wachsende, permanente Zelllinie aus humanen, embryonalen Nieren-Zellen, die durch Infektion mit Adenoviren immortalisiert wurden (Zur Hausen 1967).

Madin-Darby canine kidney (cells) (MDCK)

Adhärent wachsende, permanente Zelllinie, die aus Epithel-Zellen der Hundeniere generiert wurde (Gaush *et al.* 1966).

UI752

Humane Lungenkarzinom-Zelllinie (Bergh *et al.* 1981).

L1-Zelllinie

Diese ursprünglich als L-Zelllinie bezeichnete, adhärent wachsende Mausfibroblasten-Zelllinie wurde stabil mit humanem CD40L (CD154) transfiziert (Garrone *et al.* 1995), die Expression mittels *fluorescence activated cell scanning* (FACS) verifiziert und die L1-Zellen zur Stimulation von CD40⁺ Zellen eingesetzt.

4.2. T-Zellklone

Für die Untersuchungen standen verschiedene T-Zellklone mit bekannter Spezifität zur Verfügung. Die T-Zellen wurden unspezifisch oder spezifisch stimuliert und nachfolgend für eine Infektion mit IVA eingesetzt. M1-E5 wurde zur Detektion der M1-Antigenpräsentation genutzt.

T-Zellklon	Spezifität	HLA-Restriktion	Epitop	Verwendung
GBE3B-3F7	EBNA3B von EBV	HLA-DRB1*1101	AA ₆₆₄₋₆₇₆ -PTWAQIGHIPYQP-	IVA-Infektion nach unspezifischer Stimulation
GFP-3A2	GFP	HLA-DRB1*1301	n.b.	
E3C-5H11	EBNA3C von EBV	HLA-DRB1*0801	AA ₃₂₅₋₃₃₉ - ENPYHARRGIKEHVI-	IVA-Infektion nach unspezifischer bzw. spezifischer Stimulation
GBE2-3C7	EBNA2 von EBV	HLA-DQB1*0301	AA ₂₃₋₃₄ -LGNPSSLVIPSN-	
GBE3C-3H10	EBNA3C von EBV	HLA-DRB1*1101	AA ₆₂₇₋₆₄₀ - VVRMFMRRERQLPQS-	IVA-Infektion nach spezifischer Stimulation
M1-E5	M1 von IVA	HLA-DRB1*1301	AA ₂₃₄₋₂₄₈ - LENLQAYQKRMGVQL-	Detektion der M1-Antigenpräsentation

(n.b. = nicht bestimmt; GFP = grünfluoreszierendes Protein; EBNA = EBV nukleäres Antigen; HLA = *human leukocyte antigen*)

4.3. Reagenzien für die Zellkultur

4.3.1. Allgemeine Reagenzien

Cyclosporin A: 100 µg/mL in RPMI 1640-Komplettmedium (Sigma-Aldrich # C3662);

Doxycyclin (Sigma-Aldrich # D-9891);

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Development System (R&D Systems # DY215E (GM-CSF) und # DY285 (IFN-γ));

OKT3-Antikörper (Stammlösung): 500 µg/mL in 50 % Glycerin (Janssen-Cilag);

Paraformaldehyd zum Fixieren von APC (Merck # 1.04005.1000);

Phytohämagglutinin (PHA) (Murex # HA16/17);

Propidiumiodid (PI) (Sigma-Aldrich # P4170; CAS-# 25535-16-4);

Trypanblau (Gibco BRL # 15250-061)

4.3.2. Medien

DMEM-Komplettmedium

DMEM;
10 % FCS;
2 mM L-Glutamin;
100 U/mL Penicillin;
0,1 mg/mL Streptomycin
und 1 % Fungizone (Amphotericin)

T-Zell-Medium (+/- Interleukin (IL)-2)

AIM-V-Medium;
10 % humanes Serum (hitzeinaktiviert);
10 mM HEPES
optional 50 U/mL IL-2

T-Zell-Stimulationsmedium

T-Zell-Medium;
+/- 50 U/mL IL-2;
+/- 1 µg/mL CD28-Antikörper

Einfriermedium

90 % FCS (Zelllinien) oder humanes
Serum (T-Zellen oder DC) und 10 % DMSO

RPMI 1640-Komplettmedium

RPMI 1640;
10 % FCS;
2 mM L-Glutamin;
1 % nichtessentielle Aminosäuren;
1 mM Na-Pyruvat;
50 µg/mL Gentamycin
und 1 % Fungizone (Amphotericin)

DC-Medium

AIM-V-Medium;
5 % humanes Serum (hitzeinaktiviert);
10 mM HEPES

B-Blasten-Medium

RPMI 1640-Komplettmedium;
40 U/mL IL-4
und 1 µg/mL Cyclosporin A (CsA)

4.3.3. Puffer

PBS-Puffer

0,2 g Kaliumchlorid;
0,2 g Kaliumhydrogenphosphat;
8 g Natriumchlorid;
1,43 g Dinatriumhydrogenphosphat;
auf pH 7,5 einstellen

PBS⁺

PBS mit 1 mM CaCl₂

ELISA-Waschpuffer

PBS mit 0,05 % Tween 20

ELISA-Blockpuffer

PBS mit 1 % BSA; 5 % Sukrose und 0,05 % NaN₃

reagent diluent (RD)

PBS mit 1 % BSA; sterilfiltriert

Salzpuffer zur hypotonischen Lyse

H₂O dest. mit 0,2 % bzw. 1,6 % NaCl

MACS-Puffer

PBS mit 1 % FCS und 2 mM EDTA; Lagerung 4°C

FACS-Puffer

PBS mit 1 % FCS; Lagerung bei 4°C

4.3.4. Transfektion von Zellen

Polyethylenimin (PEI): 1 mg/mL in H₂O pH 7,0 (Ausgangsfeststoff: Sigma-Aldrich # 408727);

Lipofektamin-Reagenz (Gibco BRL # 18324-012)

4.3.5. Aufreinigung von Zellen des peripheren Bluts

Ficoll-PaqueTM Plus (GE Healthcare # 17 1440-03);

MACS-Separationssäulen LS (Miltenyi Biotec # 130-042-401)

MACS-Separationen:

Spezifität	Selektion	Firma	Bestell-Nummer
anti-CD4	Positivselektion	Miltenyi Biotec	130-045-101
anti-CD8	Positivselektion	Miltenyi Biotec	130-045-201
anti-CD19	Positivselektion	Miltenyi Biotec	130-050-301
anti-CD45RA	Positivselektion	Miltenyi Biotec	130-045-901
anti-CD4	Negativselektion*	Miltenyi Biotec	130-091-155

* CD4-T-Zell-Isolations-Kit II

4.3.6. Zytokine

Zytokin	Konzentration	Lagerung	Firma und Bestell-Nr.
Humanes GM-CSF (LEUKINE Liquid Sargramostim)	800.000 U/mL in PBS mit 2 % BSA (sterilfiltriert)	-80°C, nach Auftauen ca. 4 Wochen bei 4°C	Berlex Laboratorien
Humanes IL-4	1.000.000 U/mL in PBS mit 2 % BSA (sterilfiltriert)	-80°C, nach Auftauen ca. 4 Wochen bei 4°C	PAN Biotech GmbH # CB-2130402
Humanes TNF- α	10 μ g/mL in RPMI 1640 mit 0,5% BSA (= 160 U/ μ L)	-80°C, nach Auftauen ca. 4 Wochen bei 4°C	R&D System # 210-TA
Humanes IL-1 β	10 μ g/mL in PBS mit 2 % BSA (sterilfiltriert)	-80°C, nach Auftauen ca. 4 Wochen bei 4°C	PAN Biotech GmbH # CB-2130121
Humanes IL-2 (Proleukin)	1.000.000 U/mL in PBS mit 2 % BSA (sterilfiltriert)	-80°C, nach Auftauen ca. 4 Wochen bei 4°C	Chiron-Novartis
Prostaglandin-E2 (PGE2)	1 μ g/ μ L in absolut Ethanol	-20°C	Sigma-Aldrich # P5640; CAS-# 363-24-6

4.3.7. FACS-Antikörper

Primärantikörper

Spezifität	Kopplung	Firma	Bestell-Nummer
anti-CD3	FITC	BD-Pharmingen	555339
anti-CD4	PE	BD-Pharmingen	555347
anti-CD8	PE	BD-Pharmingen	555367
anti-CD11c	PE	BD-Pharmingen	555392
anti-CD11c	FITC	ImmunoTools	21487113
anti-CD14	PE	ImmunoTools	21270144S
anti-CD19	PE	ImmunoTools	21270194(S)
anti-CD20	FITC	EuroBioSciences	H12155F
anti-CD25	PE	ImmunoTools	21330254
anti-CD28	ungekoppelt	BD-Biosciences	348040
anti-CD45RA	PE	ImmunoTools	21339454
anti-CD45RO	FITC	EuroBioSciences	H12436F
anti-CD56	PE	ImmunoTools	21330564
anti-CD66acde	PE	ImmunoTools	21330664S
anti-CD80	FITC	ImmunoTools	21270803
anti-CD83	PE	BD-Pharmingen	556855
anti-CD86	PE	BD-Pharmingen	555665
anti-CD134 (OX40)	PE	Caltag Laboratories	MHCD13404
anti-CD154 (CD40L)	ungekoppelt	BD-Pharmingen	555698
anti-CD209 (DC-SIGN)	FITC	BD-Pharmingen	551264
anti-HLA-DR	PE	ImmunoTools	21279994
anti- $\alpha\beta$ TCR	PE	BD-Pharmingen	555548

(PE = Phycoerythrin; FITC = Fluorescein-Isothiocyanat; TCR = T-Zellrezeptor)

Sekundärantikörper

Ziege-anti-Maus-IgG+IgM (H+L)-R-Phycoerythrin (Jackson ImmunoResearch; # 115-116-068)

4.4. Reagenzien für proteinbiochemische Methoden

4.4.1. Medien und Puffer

Proteinladepuffer (10 mL)

3 mL 10 %iges SDS;
3 mL Glycerol;
1,5 mL 1 M Tris/HCl pH 6,8;
2,2 mL H₂O;
0,3 mL β-Mercaptoethanol;
0,01 % Bromphenolblau

10 x Elektrophoresepuffer (Polyacrylamidgel-Elektrophorese)

30,2 g (0,25 M) Tris;
144 g Glycin;
1 % SDS;
ad 1000 mL H₂O;
Vor Verwendung 1 : 10 mit H₂O verdünnen

1 M Tris/HCl pH 6,8

121,4 g Tris; pH-Wert 6,8 (mit HCl);
ad 1000 mL H₂O

1 M Tris/HCl pH 8,8

121,4 g Tris; pH-Wert 8,8 (mit HCl);
ad 1000 mL H₂O

10 x Transferpuffer (Western Blot)

30,2 g (0,25 M) Tris;
144 g Glycin;
ad 1000 mL H₂O

1 x Transferpuffer (Western Blot)

800 mL H₂O;
100 mL 10 x Transferpuffer;
100 mL Methanol

4.4.2. Antikörper

Primärantikörper: monoklonaler, muriner anti-GFP-Antikörper (IgG_{2a}) (Santa Cruz Biotech. # sc-9996);

Sekundärantikörper: Ziege-anti-Maus-HRP (GE Healthcare # NXA931)

4.4.3. Sonstige Reagenzien

Bradford-Reagenz: Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad # 500-0006);

Detektionsfilm: Hyperfilm ECL (GE Healthcare # RPN3103K);

ECL Plus Entwickler-Lösung (GE Healthcare # RPN2132 und RPN2133);

Nitrozellulose-Membran: Hybond-ECL (GE Healthcare # RNP303D);

PageRuler Prestained Protein Ladder (Fermentas # SM0671);

Ponceau-Färbelösung (Sigma-Aldrich # P-7170)

4.5. Reagenzien für molekularbiologische Methoden

4.5.1. Bakterien

Escherichia coli (*E. coli*) K12 Bakterien des Bakterienstamms XL1-Blue MRF' (Stratagene)

4.5.2. Medien, Puffer und Lösungen

LB-Medium

10 g NaCl;
10 g Tryton;
5 g Hefe-Extrakt;
ad 1 L H₂O dest;
pH 7,0 mit NaOH;
autoklaviert
(LB-Agar
zusätzlich 20 g Select-Agar)

SOB-Medium

20 g Tryton;
5 g Hefe-Extrakt;
0,5 g NaCl;
2,5 mM KCl;
10 mM MgCl₂;
10 mM MgSO₄;
ad 1 L H₂O dest;
autoklaviert

Ampicillin-Stammlösung (10 mg/mL)

500 mg Ampicillin;
ad 50 mL 70 % Ethanol;
lichtgeschützt bei -20°C aufbewahren

SOC-Medium

SOB-Medium;
0,2 % Glukose;
sterilfiltriert

LB-Amp-Medium

LB-Medium;
100 µg Ampicillin/mL

TE-Puffer

10 mM Tris/HCl pH 7,5;
1 mM EDTA

1 x TAE-Puffer

40 mM Tris/HCl pH 7,8;
5 mM NaAc;
1 mM EDTA

DNA-Ladepuffer

10 mM Tris/HCl pH 7,5;
10 % Glycerin ;
10 mM EDTA;
0,05 % Bromphenolblau

4.5.3. Kits und sonstige Reagenzien

Plasmid Maxiprep Kit/20 von JETStar (GENOMED GmbH # 220020);

Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder (MBI # SM0311);

Ethidiumbromid 1 %ige wässrige Lösung (Merck-Darmstadt # 1.11608.0030)

4.6. Verbrauchsmaterialien

4.6.1. Zellkultur

DMEM-Medium, DMEM high Glucose (Gibco BRL # 41966);
Fötales Kälberserum; FCS (*Fetal Calf Serum*) (PAA # A15-043);
Fungizone, Amphotericin 250 µg/mL (Gibco BRL # 15290-026);
Gentamycin (Gibco BRL # 15750);
L-Glutamin, 200 mM (Gibco BRL # 25030);
HEPES 1 M (Gibco BRL # 15630-056);
Humanes Serum: Aus humanem peripherem Blut mittels Agglutination und Zentrifugation;
Natriumpyruvat (Gibco BRL # 11360);
Nichtessentiellen Aminosäuren (NEAA) (Gibco BRL # 11140-035);
OptiMEM (Gibco BRL # 31985);
Penicillin-Streptomycin (Gibco BRL # 15140-122);
RPMI 1640 (Gibco BRL # 21875);
Trypsin-EDTA (Gibco BRL #25300)

4.6.2. Sonstige Materialien

ELISA-Platten (Corning Incorporated # 2592);
Gestopfte Pipettenspitzen (ART *Molecular Bio Produkts* # 2149P);
Parafilm „M“ (American National Can # PM-996);
Polystyren-Zellkulturschalen zur DC-Generierung (BD-Falcon # 35 1005);
Reaktionsgefäße (15 und 50 mL) (BD-Falcon und Sarstedt);
Sartorius Membran, Porengröße (0,45 µm) (Sartorius # 11306-41BL);
Sartorius minisart membrane (0,2 µm) (Sartorius # SA16532A);
Zellkulturflaschen (Greiner-Bio-One);
Zellkulturplatten (BD-Falcon);
Zellkulturschalen (Nunc)

4.7. Chemikalien

Ampicillin (Roche-Mannheim # 835269);
APS (Merck # 1.01201.0100);
Dimethylsulfoxid (DMSO) (Merck # 1.09678.0100);
Essigsäure (Merck # 1.00063.2511);
Ethanol absolut (Merck-Darmstadt # 1.00983.2500);
Ethylendiamintetraacetat (EDTA) (Merck # 1.08418.1000);
Glycerin (Merck # 8.18709.1000);
Glycin (Roth # 3794.2);
Isopropanol (Merck-Darmstadt # 1.00547);
Kaliumchlorid (KCl) (Merck # 1.04935.1000);
Kaliumdihydrogenphosphat (Merck # 1.04873.5000);
Magermilchpulver (Roth # T145.2);
 β -Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich # M7522);
Methanol (Merck-Darmstadt # 1.06009.2500);
NaCl (Merck-Darmstadt # 1.06404);
NaOH (Merck-Darmstadt # 6498);
Natriumazid (NaN_3) (Sigma-Aldrich # S2002);
Natriumdodecylsulfat (SDS) (ICN Biomedicals # 811032);
Di-Natriumhydrogenphosphat (1.06580.5000);
Polyacrylamid (Roth # 3029.1);
Polyoxyethylen-Sorbitan Monolaurat (Tween 20) (Sigma-Aldrich # P-1379);
Salzsäure (HCl; 32 %) (Merck-Darmstadt # 1.00319);
TEMED (Serva # 35925);
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Merck-Darmstadt # 1.08382.2500 oder Roth # AE15.3)

Soweit nicht anders angegeben wurden Chemikalien der Qualität p.A. eingesetzt. Nicht erwähnte Standard-Chemikalien wurden von den Firmen Merck, Sigma-Aldrich oder Roth verwendet. Weitere Reagenzien und Enzyme wurden von den Firmen Becton-Dickinson (BD), Bio-Rad, GE Healthcare, Integra, Invitrogen, MBI-Fermentas, Millipore, New England Biolabs, Neolab, Perkin Elmer, Promega, Qiagen, Roche und Stratagene bezogen.

Einige zusätzliche Bezugsquellen werden auch im Methodenteil aufgeführt.

4.8. Verwendete Geräte

Bakterieninkubator (Heraeus bzw. New Brunswick Scientific GmbH);
Bestrahlungsanlage (*Gammacell* 40 der Firma AECL mit Cäsium-137 (γ -Strahler));
Brutschrank (Sanyo Mco-17-AI);
Elektrophoresekammern (Amersham Biosciences, Invitrogen bzw. OWL Peqlab);
Elektroporationsgerät Gene Pulser II (Bio-Rad);
ELISA-Reader (Tecan);
FACScan (Becton-Dickinson);
Falcon-Roller (Coulter Electronics Limited);
Gefrierschrank -80°C (Colora bzw. Thermo);
Gefrierschrank -20°C (Liebherr);
Kühlschrank (Liebherr);
Lichtmikroskop (Zeiss);
Millipore-Anlage (Millipore);
Netzgerät Power PAC 300 (Bio-Rad);
Neubauer-Zählkammer (Marienfeld);
pH-Messgerät (Knick);
Pipetten (Gilson und Rainin);
Pipettierhilfe (Integra Biosciences);
Schüttelinkubatoren (New Brunswick Scientific);
Spektrophotometer (Eppendorf);
Sterilbank (BDK);
UV-Stratalinker 1800 (Stratagene);
UV-Transluminator (UVP Inc.);
Vortexer Genie 2 (Scientific Industries);
Zentrifugen (Beckman, Eppendorf, Hettich, Sorvall und Thermo)

5. Methoden

5.1. Zellbiologische Methoden

5.1.1. Kultivierung von etablierten Zelllinien

5.1.1.1. Suspensions-Zelllinien

Die eingesetzten Suspensions-Zelllinien (siehe Material) wurden in RPMI 1640-Komplettmedium in Zellkulturflaschen gehalten und je nach Bedarf alle 3 bis 4 Tage in einem Verhältnis von 1 : 5 (Zellsuspension zu frischem Medium) geteilt. Die verwendeten T-Zellklone wurden in T-Zell-Medium mit 20 U/mL IL-2 gehalten und alle 14 Tage mit humanen *feeder*-Zellen, bestehend aus bestrahlten (40 Gray) mononukleäre Zellen der peripheren Bluts (PBMC) von 3 verschiedenen Spendern, und Phytohämagglutinin (PHA) restimuliert (Adhikary *et al.* 2006).

Alle Zellen wurden, wenn nicht anders angegeben, bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert und bei der Verwendung mit maximal 500 x g für 6 Minuten zentrifugiert.

Isolation, Kultivierung und Nutzung von frisch isolierten T- und B-Zellen ist in Abschnitt 5.1.3.4. beschrieben.

RPMI 1640-Komplettmedium

RPMI 1640 mit 10 % FCS; 2 mM L-Glutamin; 1 % nichtessentielle Aminosäuren; 1 mM Na-Pyruvat und 50 µg/mL Gentamycin

T-Zell-Medium

AIM-V mit 10 % humanem Serum (hitzeinaktiviert); 10 mM HEPES und 50 µg/mL Gentamycin

5.1.1.2. Adhärent-wachsende Zelllinien

Adhärent-wachsende Zelllinien (siehe Material) wurden in DMEM-Komplettmedium kultiviert. Zum Teilen wurden diese durch Trypsinbehandlung von der Zellkulturschale abgelöst. Hierzu wurden die Zellen nach einmaligem Waschen mit PBS mit 1 x Trypsin/EDTA überschichtet und bei 37°C inkubiert bis sich die Zellen ablösen. Danach wurden die Zellen mit DMEM-Komplettmedium von der Zellkulturplatte ab gespült, zentrifugiert, das Pellet in frischem DMEM-Komplettmedium resuspendiert und 1/10 bis 1/20 der Zellen in eine neue Zellkulturschale ausgebracht. Je nach Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen wurde dies alle 3 bis 4 Tage wiederholt.

Die aus monozytären Vorläuferzellen generierten DC werden in Abschnitt 5.1.3.3. näher beschrieben.

DMEM-Komplettmedium

DMEM mit 10 % FCS; 2 mM L-Glutamin; 100 U/mL Penicillin und 0,1 mg/mL Streptomycin

5.1.1.3. Bestimmung der Zellzahl

Aus einer homogenen Zellsuspension (bei adhärenen Zellen nach Trypsinierung und Resuspendieren in frischem Medium) wurden 10 μL entnommen, mit 10 μL Trypanblau vermischt und 10 μL davon in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Trypanblau färbt tote Zellen an, wodurch diese von lebenden Zellen unterschieden werden können. Die Neubauer-Zählkammer besitzt 4 Bereiche mit je 16 Quadranten. Es wurden jeweils alle 4 Bereiche ausgezählt und daraus der Mittelwert pro Bereich errechnet. Aus der Zellzahl pro Bereich kann die Gesamtzellzahl errechnet werden: Zellzahl pro Bereich $\times 2$ (Trypanblau-Verdünnung) $\times 10^4$ (Eichung der Zählkammer) \times Volumen (mL) der gesamten Zellsuspension. Vor dem Zählen durchgeführte weitere Verdünnungen wurden ebenfalls einberechnet. Die Zellen wurden dann über Zentrifugation und Aufnahme in entsprechenden Mengen Medium auf die gewünschte Zellzahl eingestellt und in die nachfolgenden Experimente eingesetzt.

5.1.1.4. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen zunächst geerntet und durch Zellzählung die Anzahl der Zellen bestimmt. Eine definierte Menge an Zellen wurde dann zentrifugiert und das erhaltene Pellet in 1 bis 2 mL Einfriermedium resuspendiert. Die Lösung wurde nachfolgend in ein Kryoröhrchen überführt, verschlossen, mehrfach mit Zellstoff umwickelt und bei -80°C eingefroren. Nach 1 – 2 Tagen wurden die Röhrchen in flüssigem Stickstoff transferiert. Für T-Zellen und DC wurde humanes Serum anstatt FCS zum Einfrieren verwendet.

Eingefrorene Zellen wurden in der Hand oder im 37°C Wasserbad aufgetaut und dann sofort in das entsprechende Medium überführt. Nach Zentrifugation wurde das Pellet in 10 mL neuem Medium aufgenommen und in Zellkulturschalen oder -flaschen ausgebracht.

Einfrier-Medium

90 % FCS (für Zelllinien) oder humanes Serum (für T-Zellen oder DC) und 10 % DMSO

5.1.2. Herstellung und Verwendung von rekombinantem Influenzavirus Typ A

Die Herstellung von rekombinantem IVA erfolgte in Anlehnung an die im Labor von Prof. Hobom (Gießen) entwickelte Methode (Azzeh *et al.* 2001) und umfasste 3 Schritte, welche in den nachfolgenden Abschnitten im Detail beschrieben werden. Zunächst wurden 293T-Zellen mit einem Plasmid, welches das einzubringende Gen in *antisense* Orientierung trug, transfiziert. Hierfür standen 2 verschiedene Transfektionsreagenzien zur Verfügung (Lipofektamin entsprechend Azzeh *et al.* (Abschnitt 5.1.2.1) und Polyethylenimin (PEI)(Abschnitt 5.1.2.2)). In den transfizierten Zellen wurde von dem Plasmid mit Hilfe der zellulären RNA Polymerase I RNA generiert, welche in Struktur und

Funktion den vRNAs von IVA entsprach (Abbildung 2). Im zweiten Schritt wurden die transfizierten Zellen mit Wildtyp-Virus (IVA-wt; genauere Angaben siehe Abschnitt 5.1.2.3) infiziert. Aus transfizierten und nachfolgend infizierten 293T-Zellen freigesetzte Influenzaviren sollten dann einen rekombinanten Phänotyp, in Form einer zusätzlich eingebrachten vRNA mit dem Gen des Interesses, haben. Die im Überstand befindlichen rekombinanten Viren wurden gesammelt, anschließend über MDCK-Zellen passagiert (Abschnitt 5.1.2.4) und der so erhaltene Überstand bis zur Verwendung weggefroren.

Die generierten Viren wurden zudem mittels Infektion von Zelllinien auf Qualität, Titer und zelltodinduzierende Eigenschaften hin untersucht.

5.1.2.1. Transfektion von 293T-Zellen mit Lipofektamin (nach Azzeh et al.)

Am Vortag der Transfektion wurden 293T-Zellen so auf eine 6 cm Kulturschale ausgebracht und über Nacht bei 37°C wachsen gelassen, dass die Zellen am Morgen des nächsten Tages zu 70 % konfluent waren. Das Medium wurde abgenommen und die Zellen mit 3 mL OptiMEM-Medium überschichtet. Anschließend wurde die Transfektionsmischung, bestehend aus 100 µL OptiMEM-Medium und 5 µg Plasmid-DNA [im Falle der rekombinanten, für GFP-kodierenden Influenzaviren Typ A (IVA-GFP): pHL2251 (Anhang II)] in Reaktionsgefäß A und 85 µL OptiMEM-Medium und 15 µL Lipofektamin in Reaktionsgefäß B, vereinigt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Transfektionsmischung in 2,8 mL OptiMEM-Medium überführt und, nach Entfernung des alten OptiMEM-Mediums von der Zellkulturschale, auf die 293T-Zellen gegeben. Nach 6-stündiger Inkubation bei 37°C wurde die Transfektionsmischung entfernt, 4 mL frisches DMEM-Komplettmedium auf die 293T-Zellen pipettiert und die Zellen bis zur Infektion mit IVA (am nachfolgenden Tag) bei 37°C kultiviert.

5.1.2.2. Transfektion von 293T-Zellen mit Polyethylenimin

Die Zellen wurden wie in 5.1.2.1 beschrieben ausgebracht. Die Transfektionsmischung, bestehend aus 250 µL OptiMEM-Medium, 7,5 µg Plasmid-DNA und 11,25 µL PEI-Lösung (1 mg/mL Polyethylenimin in H₂O), wurde zusammengemischt, 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, mit DMEM-Komplettmedium auf 5 mL aufgefüllt und, nach Entfernung des alten Kulturmediums, auf die 70 % konfluenten 293T-Zellen gegeben. Diese wurden für 12 bis 24 Stunden bei 37°C damit inkubiert.

5.1.2.3. Infektion der transfizierten 293T-Zellen

Die transfizierten Zellen wurden einmal mit PBS+ (PBS mit 1 mM CaCl₂) gewaschen und nachfolgend für 1 Stunde mit 2 mL PBS+ und 2 µL Wildtyp IVA-Stock (H7N7; 1 x 10⁹ Wildtyp-Viren/mL; von der Gruppe Hobom) bei 37°C inkubiert. Dann wurde die Infektions-Mischung abgenommen und die Zellen mit 4 mL DMEM-Komplettmedium über Nacht bei 37°C kultiviert. Nach 18 bis 20 Stunden Infektion wurde der Zellkulturüberstand geerntet, tote 293T-Zellen durch Zentrifugation entfernt und der Überstand bei -80°C bis zur Infektion der MDCK-Zellen weggefroren.

5.1.2.4. Passagieren der rekombinanten Viren über MDCK-Zellen

Am Vortag wurden MDCK-Zellen so in einer 6 cm Kulturschale ausgebracht, dass sie am nachfolgenden Tag 70 bis 80 % Konfluenz zeigten. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und dann für 1 Stunde bei 37°C mit 1 mL 293T-Virusüberstand (siehe Abschnitt 5.1.2.3) inkubiert. Dann wurden 3 mL frisches DMEM-Komplettmedium zugegeben und die Zellen über Nacht bei 37°C kultiviert. Nach 18 bis 20 Stunden wurde der Virusüberstand geerntet, mittels Zentrifugation von Zellresten befreit, aliquotiert und bis zur Verwendung bei -80°C eingefroren.

5.1.2.5. Bestimmung des Virustiters und Infektion von Zelllinien

Zur Bestimmung des Virustiters, gleichbedeutend mit der Anzahl an produktiv-infizierenden, rekombinanten Viren pro Volumen, wurden MDCK-Zellen mit limitierenden Mengen IVA-GFP inkubiert. Dadurch sollte sicher gestellt werden, dass jede produktiv-infizierte Zelle mit nur einem rekombinanten IVA-Partikel infiziert worden war. Die Anzahl der grünen MDCK-Zellen wurde 9 Stunden nach Infektion im FACS ermittelt. Über die verwendete Verdünnung der Viren konnte die Anzahl der produktiv-infizierenden IVA-GFP-Partikel pro µL Lösung berechnet werden. In den nachfolgenden Experimenten wurde, wenn nicht anders angegeben, zur Infektion von Zellen eine *multiplicity of infection* (MOI) von 3 verwendet.

Neben MDCK-Zellen wurden auch U1752-Zellen und LCL (siehe Material und Ergebnisse) dazu verwendet, die Qualität der Viren zu testen bzw. die Anfälligkeit verschiedener Zelllinien für eine IVA-Infektion zu untersuchen (Abbildung 5). Hierzu wurde eine definierte Menge an Zellen ausgebracht und mit limitierenden Mengen an IVA-GFP infiziert. Nach einer Infektionszeit von 8 und 16 Stunden wurde im FACS der Anteil an GFP-positiven Zellen bestimmt.

Zur Untersuchung des virusinduzierten Zelltods wurden Zellen für bis zu 30 Stunden mit Virus infiziert. Der Anteil an toten Zellen wurde entweder mikroskopisch, mittels Trypanblau-Färbung oder durch FACS-Analyse via PI-Färbung und -Analyse ermittelt.

5.1.2.6. Hitzeinaktivierung des rekombinanten Influenzavirus Typ A

IVA-GFP wurde durch Inkubation bei 60°C für 60 Minuten inaktiviert und die erfolgreiche Inaktivierung durch Inkubation von MDCK-Zellen mit den behandelten Viren verifiziert.

5.1.2.7. Inaktivierung des rekombinanten Influenzavirus Typ A durch ultraviolettes Licht

Zur Inaktivierung der rekombinanten IVA-Partikel wurden diese mit 10 bis 200 mJ/cm² ultraviolettem (UV)-Licht bestrahlt. Eine nachfolgende Infektion von LCL mit diesen Viren zeigte, dass Dosen ≥ 100 mJ/cm² zu einem vollständigen Verlust der Infektiosität geführt hatten.

5.1.3. Isolation und Analyse von Zellen aus peripherem Blut

Für die Isolation von Leukozyten wurden 2 Methoden verwendet. Zum einen wurden mononukleäre Zellen der peripheren Bluts (PBMC), welche nachfolgend zur MACS-Isolation einzelner Subpopulationen oder zur Generierung von DC genutzt wurden, über eine Zentrifugation mit Ficoll-Dichtegradienten isoliert. Um zusätzlich auch Granulozyten untersuchen zu können, wurden zum anderen periphere Blutleukozyten (PBL) aus heparinisiertem bzw. EDTA-haltigem Blut durch Zentrifugation und hypotonischer Lyse der Erythrozyten gewonnen.

5.1.3.1. Isolation von mononukleären Zellen des peripheren Bluts mittels Ficoll-Dichtegradienten

Zunächst wurde von Spendern venöses Blut entnommen und die Blutgerinnung durch EDTA-Zugabe verhindert (Endkonzentration 5 mM). Zur Isolation der PBMC wurde das Blut in einem Verhältnis von 1 : 1 mit RPMI 1640-Medium verdünnt und je 35 mL davon in einem 50 mL-Reaktionsgefäß mit 13 bis 15 mL einer Ficoll-Lösung (Ficoll-PaqueTM Plus; GE Healthcare) unterschichtet. Nach einer Zentrifugation mit 750 x g für 30 Minuten und ohne Verwendung der Zentrifugenbremse zum Abstoppen der Zentrifugation, hatten sich die PBMC oberhalb der Ficoll-Lösung angesammelt und konnten so problemlos von den restlichen, zellulären Blutbestandteilen (unterhalb der Ficoll-Lösung gelegen) abgetrennt werden. Die PBMC wurden nachfolgend zweimal mit RPMI 1640 gewaschen (Zentrifugation mit 500 x g für zunächst 10 und dann 7 Minuten), in RPMI 1640 aufgenommen und gezählt. Definierte Zellmengen davon wurden dann eingesetzt, um DC zu generieren oder bestimmte Populationen durch MACS-Sortierung aufzureinigen.

5.1.3.2. Isolation von peripheren Blutleukozyten mittels Zentrifugation und Erythrozytenlyse

Mit Hilfe des Ficoll-Dichtegradienten wurden auch Granulozyten von den PBMC abgetrennt. Zur Isolation von Granulozyten und Neutrophilen war diese Strategie deshalb ungeeignet. Stattdessen wurde das heparinisierte Blut ohne Ficoll bei 750 x g für 30 Minuten (ohne Bremse) zentrifugiert. Auch hier bildete sich ein Ring aus PBL oberhalb der Erythrozyten. Da dieser jedoch nicht so scharf abgegrenzt war, wie beim Ficoll-Dichtegradienten, gelangten bei der Isolation auch Erythrozyten in die PBL-Population. Um diese Zellen zu eliminieren, wurde nachfolgend einer Erythrozytenlyse durchgeführt. Hierbei beruht das Prinzip auf hypotonischer Lyse der Erythrozyten während einer 30-sekündigen Inkubation in 20 mL eiskaltem, destilliertem H₂O mit nur 0,2 % NaCl. Nach 30 Sekunden wurden 20 mL 1,6 % NaCl-Lösung in H₂O hinzugegeben, was in einem physiologischen Kochsalzgehalt von 0,9 % resultierte. Alle anderen Zelltypen wurden durch dieses kurz andauernde, hypotonische Milieu nicht geschädigt. Nach zwei- bis dreifacher Wiederholung der Lyse waren nahezu alle roten Blutkörperchen eliminiert. Die verbliebenen PBL (mit Neutrophilen und Granulozyten) konnten dann direkt eingesetzt (Abbildung 6) oder daraus Subpopulationen isoliert werden.

5.1.3.3. Generierung von Dendritischen Zellen aus PBMC

DC wurden aus PBMC mittels Plastikadhärenz und nachfolgender Reifung mit Zytokinen generiert. Dazu wurden Polystyren-Zellkulturschalen (BD-Falcon) zunächst für 15 Minuten bei Raumtemperatur mit 10 mL einer humanen IgG-Antikörperlösung (10 µg/mL in PBS) beschichtet. Die Platten wurden nachfolgend dreimal mit PBS gewaschen und dann mit 10 mL PBMC-Lösung (7×10^6 PBMC pro mL in RPMI 1640) für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. In dieser Zeit banden die monozytären Vorläuferzellen über ihre Fc-Rezeptoren an die mit IgG-beschichtete Oberfläche. Nicht-adhärenente Zellen wurden durch dreimaliges Waschen mit RPMI 1640 entfernt und die zurückbleibenden Zellen über Nacht bei 37°C in DC-Medium kultiviert.

Am Nachfolgetag (Tag 1) wurde das alte Medium entfernt, 10 mL frisches DC-Medium mit humanem GM-CSF (800 U/mL) und humanem IL-4 (500 U/mL) hinzugegeben und die Zellen für 48 Stunden bei 37°C kultiviert. An Tag 3 wurden pro Platte 3,5 mL neues DC-Medium mit GM-CSF (5400 U/13,5 mL = 400 U/mL) und IL-4 (6750 U/13,5 mL = 500 U/mL) hinzugefügt und für weitere 48 Stunden bei 37°C inkubiert. Am Tag 5 hatten sich die unreifen DC von der Platte abgelöst, wurden geerntet, gezählt, 10 Minuten bei maximal 200 x g zentrifugiert und 5×10^5 unreife DC pro mL Reifungsmix aufgenommen. Dieser bestand aus DC-Medium mit humanem GM-CSF (40 U/mL), IL-4 (200 U/mL), IL-1 β (1 ng/mL), TNF- α (1,25 ng/mL = 20 U/mL) und Prostaglandin E₂ (PGE₂; 0,5 µg/mL). Innerhalb von 24 Stunden (Tag 6) reiften die DC. Der Phänotyp wurde durch Färbung mit

oberflächenspezifischen, Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern im FACS untersucht (Abbildung 29) und die DC dann in *mixed lymphocyte reactions* (MLR) eingesetzt (Abschnitt 5.1.5.2.).

DC-Medium

AIM-V Medium mit 5 % humanem Serum (hitzeinaktiviert); 10 mM HEPES; 50 µg/mL Gentamycin

5.1.3.4. Isolation von Zellpopulationen aus PBMC durch magnetische Zellseparation

Um einzelne Subpopulationen aus den PBMC zu isolieren, wurde auf die magnetische Zellseparation (*magnetic cell sorting/separation*; MACS) der Firma Miltenyi Biotec zurückgegriffen. Die Aufreinigung erfolgte den Herstellerangaben entsprechend. Die zu sortierenden Zellen wurden zunächst einmal mit 10 mL 4°C kaltem MACS-Puffer gewaschen und nachfolgend für 6 min bei 500 x g zentrifugiert. Pro 1×10^7 Zellen wurden 80 µL MACS-Puffer und 20 µL antikörpergekoppelte MACS-*Beads* (im Falle der CD4-, CD8-, CD19- bzw. CD45RA-MACS-Positivselektion) zum Pellet gegeben und gut resuspendiert. Die Zellen wurden nachfolgend für 15 Minuten auf Eis (bei 4°C bis 8°C) inkubiert, dann einmal mit 10 mL kaltem MACS-Puffer gewaschen, zentrifugiert (500 x g, 6 Minuten) und das Pellet in 500 µL kaltem MACS-Puffer resuspendiert. Während des Waschschritts wurde eine MACS-Säule vom Typ LS an den MACS-Magneten angebracht und mit 3 mL kaltem MACS-Puffer äquilibriert. Die in 500 µL aufgenommenen Zellen wurden dann auf die Säule gegeben. Nach Einlauf der Flüssigkeit in die Säule wurde dreimal mit je 3 mL kaltem MACS-Puffer gewaschen, die Säule nachfolgend vom Magneten entnommen und die gebundenen Zellen durch zweimaliges Durchdrücken von 5 mL MACS-Puffer von der Säule eluiert. Die erhaltenen Zellen wurden pelletiert (500 x g, 6 Minuten) und in entsprechendem Medium aufgenommen (CD4⁺, CD8⁺ und CD45RA⁺ T-Zellen in T-Zell-Medium ohne IL-2, CD19⁺ B-Zellen in RPMI 1640-Komplettmedium). Die Qualität der Aufreinigung wurde mittels FACS verifiziert (Abbildung 8 und 24) und die Zellen dann für die entsprechenden Experimente eingesetzt.

Der Durchlauf der MACS-Sortierung wurde meist verworfen. Ausnahmen stellten zum einen die Untersuchung des Durchlaufs der CD4-MACS-Positivselektion (Abbildung 8) und zum anderen der Durchlauf der CD45RA-MACS-Sortierung dar. Letzterer enthielt die CD45RA⁻, CD45RO⁺ Zellen (Abbildung 20a) und wurde genau wie die gebundenen Zellen pelletiert, in T-Zell-Medium ohne IL-2 aufgenommen, gezählt und nachfolgend verwendet.

Der CD45RA-MACS-Sortierung ging eine CD4-MACS-Negativselektion voraus. Hierbei wurden alle nicht-CD4⁺ Zellen markiert und mittels MACS-*Beads* an die Säule gebunden. Die dafür notwendigen Reagenzien stammten ebenfalls von der Firma Miltenyi Biotec und wurden nach Herstellerangaben verwendet. Die Zellen wurden zunächst einmal mit 10 mL kaltem MACS-Puffer gewaschen und abzentrifugiert (500 x g, 6 Minuten). Pro 1×10^7 verwendeter Zellen wurden dann 40 µL MACS-Puffer und 10 µL biotinyliertes Antikörpergemisch zum Pellet hinzugefügt, dieses resuspendiert, für 10 Minuten auf Eis inkubiert, nachfolgend pro 1×10^7 Zellen 30 µL MACS-Puffer und 20 µL anti-

Biotin-MACS-*Beads* zugesetzt und für weitere 15 Minuten auf Eis inkubiert. Dann wurde einmal mit 10 mL kaltem MACS-Puffer gewaschen, die Zellen pelletiert und wie oben bereits beschrieben mittels MACS-Säule und MACS-Magnet separiert. Da es sich um eine Negativselektion handelte, enthielt der Durchlauf die gewünschten CD4⁺ T-Zellen, welche noch unmarkiert waren und so für eine weitere MACS-Positivselektion (im vorliegenden Fall CD45RA-MACS) oder direkt zur T-Zellstimulation eingesetzt werden konnten. Die Qualität der aufgereinigten Zellen wurde ebenfalls mittels FACS verifiziert.

Frisch isolierte B-Zellen wurden innerhalb von 3 Tagen, frisch isolierte T-Zellen innerhalb von ≤ 5 Tagen nach Isolation verwendet. Die aus B-Zellen generierten B-Blasten wurden in B-Blasten-Medium kultiviert, alle 5 bis 7 Tage restimuliert und dann für die angegebenen Experimente verwendet (Abschnitt 5.1.6.).

MACS-Puffer

1 % FCS; 2mM EDTA in PBS; Lagerung bei 4°C

5.1.3.5. Analyse von Zellen mit Hilfe des fluorescence activated cell scanning

Zum Nachweis einer Oberflächenprotein- oder GFP-Expression wurden Zellen durchflusszytometrisch mittels FACS analysiert. Hierzu stand ein FACS-Gerät (FACScan) der Firma Becton-Dickinson zur Verfügung.

Grünfluoreszierende Zellen konnten direkt, ohne zusätzliche Färbung, untersucht werden. Dafür wurden diese einmal in 10 mL kaltem FACS-Puffer gewaschen und dann in 200 bis 400 μ L FACS-Puffer aufgenommen, der 1 μ g/mL Propidiumiodid (PI) enthielt. Tote Zellen nehmen PI über ihre defekte Zellmembran auf, lagern es in ihre DNA ein und können so von lebenden Zellen unterschieden werden. Die Proben wurden dann sofort durchflusszytometrisch untersucht. Die Auswertung der FACS-Messungen erfolgte mit Hilfe der Software CellQuest der Firma Becton-Dickinson.

Die Oberflächenexpression von Proteinen wurde durch Färbung mit spezifischen, Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern (siehe Material) analysiert. Hierzu wurden pro Ansatz 1 bis 2×10^5 Zellen mit 1 mL 4°C kaltem FACS-Puffer gewaschen, 6 Minuten bei 500 x g zentrifugiert und das Pellet in 100 μ L kaltem FACS-Puffer aufgenommen. Nach Zugabe von 2 bis 4 μ L (Verdünnung 1 : 50 bis 1 : 25) Farbstoff-gekoppeltem, spezifischem Antikörper wurden die Zellen für 15 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert, dann erneut zweimal mit 1 mL kaltem FACS-Puffer gewaschen, in 200 bis 400 μ L kaltem FACS-Puffer mit 1 μ g/mL PI resuspendiert und durchflusszytometrisch untersucht.

Alternativ zu Marker-gekoppelten Antikörpern wurden teilweise auch ungekoppelte Primärantikörper verwendet (Verdünnung 1 : 50 in FACS-Puffer; Inkubation 15 bis 30 Minuten auf Eis), die nach zweimaligem Waschen mit 1 mL FACS-Puffer mit Hilfe von PE-gekoppelten Sekundärantikörpern

(Verdünnung 1 : 1000 in FACS-Puffer; Inkubation 15 Minuten auf Eis) detektiert wurden. Zellzahlen, Vermessung und Analyse entsprachen der Färbung mit Marker-gekoppelten Antikörpern.

FACS-Puffer

1 % FCS in PBS

5.1.3.6. Analyse von Zellen mittels Fluoreszenzmikroskop

Um die erhaltenen Ergebnisse zu visualisieren, wurden CD4⁺ T-Zellen, die über 60 Stunden aktiviert worden waren, für 10 bzw. 24 Stunden mit IVA-GFP (MOI = 3) infiziert (Abschnitt 5.1.5) und mittels Fluoreszenz- und Durchlichtmikroskop analysiert. Die mikroskopischen Bilder wurden nachfolgend mit der Software Openlab 3.08 bearbeitet (Abbildung 9a und 15).

5.1.3.7. Analyse der Zytokinausschüttung von T-Zellen mittels enzyme-linked immunosorbent assay

Zur Untersuchung der IFN- γ -Ausschüttung durch T-Zellen nach anti-CD3-Antikörper (OKT3)-Aktivierung wurde ein *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) nach Angaben des Herstellers (R&D Systems) durchgeführt. Zunächst wurde eine ELISA-Platte über Nacht bei Raumtemperatur pro Vertiefung mit 100 μ L IFN- γ -capture-Antikörperlösung beschichtet (Verdünnung 1 : 180 Maus-anti-Human IFN- γ -Antikörper in PBS). Am Folgetag wurde die Platte nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer für 1 bis 2 Stunden bei Raumtemperatur mit 300 μ L Blockpuffer pro Loch inkubiert. Nach erneutem, dreimaligem Waschen mit Waschpuffer wurde T-Zellkulturüberstand (Abschnitt 5.1.5.1.) in die IFN- γ -ELISA-Platte transferiert (100 μ L pro Loch) und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Entfernen des Überstandes durch mehrfaches Waschen mit Waschpuffer wurden pro Loch 100 μ L eines biotinylierten, IFN- γ -spezifischen Detektionsantikörpers (Stock 1 : 180 verdünnt in *reagent diluent*) zugegeben und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Dann erfolgte ein weiteres dreimaliges Waschen mit Waschpuffer und eine anschließende 20-minütige Inkubation bei Raumtemperatur mit 100 μ L Avidin-gekoppelter *horseradish peroxidase* (HRP) pro Loch (1 : 200 in *reagent diluent*). Nachfolgend wurde erneut dreifach mit Waschpuffer gewaschen und pro Vertiefung 100 μ L Substratlösung hinzugegeben. Die sich entwickelnde Verfärbung der Lösung wurde nach 5 bis 10 Minuten mit 50 μ L 2 N Schwefelsäure (H₂SO₄) abgestoppt und die Absorption bei 450 nm in einem ELISA-reader der Firma Tecan vermessen.

Waschpuffer

0,05 % Tween 20 in PBS

Blockpuffer

1 % BSA; 5 % Sukrose und 0,05 % NaN₃ in PBS

reagent diluent (RD)

1 % BSA in PBS; sterilfiltriert

Substratlösung

Frisch angesetzte 1 : 1 Mischung der Reagenzien A (H₂O₂) und B (Tetramethylbenzidin)

5.1.4. Aktivierung und Infektion von CD4⁺ T-Zellklonen

CD4⁺ T-Zellklone wurden unspezifisch mit humanen *feeder*-Zellen, PHA und 20 U/mL IL-2 stimuliert und an den nachfolgenden Tagen bis hin zu Tag 18 für 9 Stunden mit IVA-GFP infiziert (MOI = 3). Der Anteil grünfluoreszierender T-Zellen wurde mittels FACS bestimmt (Abbildung 31). Schnell wachsende T-Zellklone wurden zwischenzeitlich mit neuem, IL-2-haltigem T-Zell-Medium versorgt. Zudem wurden T-Zellklone an Tag 5 nach Stimulation für 0 bis 20 Stunden mit IVA-GFP infiziert und der Anteil der grünfluoreszierenden Zellen im FACS ermittelt (Abbildung 32).

Zur spezifischen Stimulation der CD4⁺ T-Zellklone wurden peptidbeladene LCL mit definiertem HLA-Status verwendet (siehe Material und Ergebnisse). Hierzu wurden pro Ansatz 1 x 10⁵ LCL in 200 µL T-Zell-Medium ohne IL-2 mit 1 µg relevantem (vom jeweiligen T-Zellklon im HLA-Kontext erkannten Epitop) oder 1 µg irrelevantem (von T-Zellklon nicht erkannten) Peptid über Nacht bei 37°C inkubiert. Nachfolgend wurden die LCL entweder mit 80 Gray bestrahlt (γ-Strahlenquelle: Cäsium-137) oder mit Paraformaldehyd fixiert. Bei Letzterem wurden die Zellen zunächst einmal mit PBS gewaschen und bei 500 x g für 6 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde nachfolgend in 100 µL 0,5 %iger Paraformaldehyd-Lösung in PBS für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde erneut abzentrifugiert und das Pellet zunächst mit 15 mL PBS, dann mit 15 mL RPMI 1640-Medium und dann mit 15 mL RPMI 1640-Komplettmedium gewaschen. Hierbei war darauf zu achten bei jedem Waschschrift möglichst den gesamten Überstand abzunehmen, um noch vorhandene Paraformaldehyd-Kontaminationen zu entfernen.

Die fixierten LCL wurden nachfolgend mit spezifischen CD4⁺ T-Zellklonen in einem Verhältnis von 1 : 1 (je 1 x 10⁵ Zellen in 500 µL RPMI 1640-Komplettmedium) für 24 Stunden bei 37°C co-kultiviert. Nachfolgend wurde die Co-Kultur für 9 Stunden mit IVA-GFP (MOI = 3) infiziert, die T-Zellen mit anti-CD4-PE-Antikörper gefärbt und dann die GFP- bzw. PE-positiven Zellen mittels FACS detektiert. Als Kontrolle wurden IVA-GFP-infizierte T-Zellklone ohne vorhergehende Co-Kultur verwendet (Abbildung 33).

5.1.5. Aktivierung und Infektion von T-Zellen aus peripherem Blut

T-Zellen aus peripherem Blut wurden zum einen durch den CD3-spezifischen Antikörper OKT3 in T-Zell-Medium mit IL-2 aktiviert, zum anderen durch Co-Kultur mit zuvor generierten DC (Abschnitt 5.1.3.3) desselben, autologen oder eines unverwandten, allogenen Spenders (*mixed lymphocyte reaction*; MLR).

5.1.5.1. Aktivierung von T-Zellen mittels anti-CD3- und anti-CD28-Antikörpern

Zur Aktivierung der CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen, sowie der CD45RA⁺ oder CD45RO⁺ CD4⁺ T-Zellen aus peripherem Blut wurde eine 96-Loch-ELISA-Platte über Nacht bei Raumtemperatur mit definierten Mengen an OKT-3-Antikörpern beschichtet. Wenn nicht anders angegeben, wurde pro Ansatz 0,3 µg OKT3-Antikörper in 100 µL PBS verwendet. Vertiefungen mit PBS alleine dienten als Kontrolle. Am folgenden Tag wurden die ELISA-Platte dreimal mit Waschpuffer gewaschen, für 1 Stunde mit 300 µL Blockpuffer inkubiert und danach erneut dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Dann wurden 1 x 10⁵ bis 2 x 10⁵ frisch isolierte T-Zellen in 200 µL T-Zell-Medium mit oder ohne 20 U/mL IL-2 in die Vertiefungen gegeben und für 0 bis 84 Stunden bei 37°C inkubiert. In einigen Fällen wurde vor Beginn der Stimulation zusätzlich 1 µg anti-CD28-Antikörper pro mL T-Zell-Medium hinzugefügt.

Die T-Zellen wurden nach Aktivierung mit IVA-GFP und IVA-wt infiziert, die Hintergrundfärbung durch IVA-GFP direkt nach Infektion (< 1 Stunde), die Infektionsrate nach ≤ 10 Stunden und die Infektionsrate in Kombination mit der Zelltodinduktion durch IVA nach > 10 Stunden im FACS ermittelt.

Waschpuffer

0,05 % Tween 20 in PBS

Blockpuffer

1 % BSA; 5 % Sukrose und 0,05 % NaN₃ in PBS

OKT3-Antikörperlösung

Zwischen 0 und 2 µg OKT-3-Antikörper in PBS (OKT3-Stock 500 µg/mL in 50 % Glycerin)

T-Zell-Stimulationsmedium

T-Zell-Medium mit oder ohne 20 U/mL IL-2 und mit oder ohne 1 µg/mL anti-CD28-Antikörper

5.1.5.2. Aktivierung der CD4⁺ T-Zellen durch Co-Kultur mit Dendritischen Zellen

Um eine zellbasierte Aktivierung zu erzielen, wurden CD4⁺ T-Zellen aus peripherem Blut mit zuvor generierten DC vom gleichen (autologen) oder von einem unverwandten (allogenen) Spender stimuliert. Dazu wurden 2 x 10⁵ CD4⁺ T-Zellen und 2 x 10⁴ DC für 60 Stunden bei 37°C co-kultiviert. Anschließend wurden die T-Zellen mit einem PE-gekoppelten Antikörper gegen den T-Zellrezeptor markiert und die Grünfluoreszenz der PE-positiven Zellen im FACS untersucht (Abbildung 30).

5.1.6. Aktivierung und Infektion von B-Zellen aus peripherem Blut

B-Zellen aus peripherem Blut wurden mittels CD40-CD40L-Interaktion und IL-4 aktiviert. Hierzu wurden pro Vertiefung einer 96-Loch-Platte 1 x 10⁴, mit 100 Gray bestrahlte, L1-Zellen in 100 µL RPMI 1640-Komplettmedium ausgebracht. Diese adhären, murinen Zellen sind stabil mit humanem CD40L transfiziert und können so humane B-Zellen über CD40L-CD40-Interaktion

stimulieren. Am nachfolgenden Tag wurde eine Verdünnungsreihe der isolierten B-Zellen von 5×10^4 bis 45 Zellen pro 100 μL in B-Blasten-Medium hergestellt. Aus der L1-beschichteten Platte wurde das Medium entfernt und pro Vertiefung 100 μL B-Blasten-Medium und 100 μL einer B-Zellverdünnung hinzugegeben. Nach 7 Tagen Kultur bei 37°C wurden die B-Blasten in den Löchern, die bei der niedrigsten eingesetzten Zellzahl noch eine Proliferation in Form von Klumpenbildung zeigten, durch Verdünnung mit neuem B-Blasten-Medium (1 : 2 bis 1 : 3) und Transfer auf neue L1-Zellen restimuliert. Hierbei wurde darauf geachtet, dass den Zellen ca. 25 % des alten, autokrine Faktoren enthaltenden Mediums erhalten blieb. Weitere Restimulationen erfolgten alle 5 bis 7 Tage. Die B-Blasten wurden dabei von der 96-Loch-Platte bis auf eine 12-Loch-Platte expandiert. Die Anzahl an eingesetzten L1-Zellen blieb unabhängig davon bei insgesamt 1×10^6 pro verwendeter Platte.

Zur Untersuchung der Infektion mit IVA-GFP wurden B-Blasten 7 Tage nach der letzten Stimulation entweder alleine mit CD40L oder IL-4 bzw. mit beiden zusammen stimuliert. Zudem wurden nicht stimulierte B-Blasten und frisch isolierte B-Zellen aus peripherem Blut als Negativkontrolle und LCL als Positivkontrolle mitgeführt. 2 Tage danach wurden die Zellen für 9 Stunden mit IVA-GFP infiziert. Um die B-Blasten von potentiell noch vorhandenen L1-Stimulator-Zellen unterscheiden zu können, wurden sie nach der Infektion mittels PE-gekoppeltem, anti-HLA-DR-Antikörper gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht (Abbildung 28b).

Zusätzlich wurden Langzeit-B-Blasten der Gruppe von Dr. Andreas Moosmann an Tag 2 *versus* Tag 9 und Tag 3 *versus* Tag 10 nach Restimulation für 9 Stunden mit IVA-GFP infiziert, mit einem anti-HLA-DR-PE-Antikörper gefärbt und die GFP- und PE-positiven Zellen im FACS vermessen.

B-Blasten-Medium

RPMI 1640-Komplettmedium mit 40 U/mL IL-4 und 1 $\mu\text{g/mL}$ Cyclosporin A (CsA)

5.1.7. Beladung von LCL *versus* primären B-Zellen mit M1-Protein *versus* (UV-inaktiviertem) IVA-GFP und Untersuchung der Antigenpräsentation mit M1-spezifischen CD4^+ T-Zellen

Zur Klärung der Frage, an welchem Punkt die IVA-Infektion in nicht-aktivierten Lymphozyten unterbrochen ist, wurden pro Ansatz 1×10^5 LCL bzw. CD19^+ B-Zellen aus peripherem Blut desselben Spenders für 24 Stunden mit definierten Mengen IVA-GFP, UV-inaktiviertem IVA-GFP und rekombinant-hergestelltem M1-Protein infiziert/beladen. Nach wiederholtem Waschen der Zellen wurden 1×10^5 der virus-/proteinbeladenen B-Zellen mit 1×10^5 M1-spezifischen CD4^+ T-Zellen in 200 μL RPMI 1640-Komplettmedium für 24 Stunden bei 37°C co-kultiviert. Mit 100 μL Überstand der Co-Kultur wurde nachfolgend ein IFN- γ -ELISA durchgeführt, um die Aktivierung der T-Zellen durch die APC und damit die Antigenpräsentationsfähigkeit der Zellen zu bestimmen (Abbildung 34).

5.2. Proteinbiochemische Methoden

5.2.1. Bestimmung der Proteinmenge mittels Bradford-Analyse

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration eines rekombinant-hergestellten GFP wurden zwischen 5 μL und 0,1 μL der GFP-Lösung in 160 μL H_2O Endvolumen verdünnt und nach guter Durchmischung 40 μL Proteinfärbelösung (Bio-Rad) hinzugegeben. Innerhalb der 40-minütigen Inkubationszeit wurde mehrfach gut resuspendiert und dann die Absorption bei 595 nm gemessen. Hieraus ließ sich nachfolgend mit Hilfe einer BSA-Standardkurve die GFP-Menge in der Lösung errechnen.

5.2.2. Analyse von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese und Western-Blot-Hybridisierung

5.2.2.1. Probenvorbereitung und Gel-Elektrophorese

Zur Analyse der vorhandenen Menge an GFP im Virusüberstand wurden definierte Mengen an rekombinantem GFP und definierte Mengen an Virusüberstand in einem Verhältnis von 1 : 1 mit Proteinladepuffer versetzt und 5 Minuten bei 95°C denaturiert. Die Proben wurden nachfolgend in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Neben einem Sammelgel zur Fokussierung der geladenen Proteine diente ein 10 %iges Trenngel zur Auftrennung der Proteine anhand ihrer molekularen Masse. Die Elektrophorese wurde pro Gel mit 30 mA im Sammelgel und ≤ 45 mA im Trenngel in 1 x Elektrophoresepuffer durchgeführt und dauerte 2 bis 3 Stunden. Hierfür wurde eine Gelkammer der Firma Amersham Biosciences verwendet.

Proteinladepuffer (10 mL)

3 mL 10 %iges SDS; 3 mL Glycerol; 1,5 mL 1 M Tris/HCl pH 6,8; 2,2 mL H_2O ; 0,3 mL β -Mercaptoethanol; 0,01 % Bromphenolblau

Sammelgel (5 mL)

830 μL 30 % Polyacrylamid; 1,26 mL 1 x Tris/HCl pH 6,8; 2,77 mL H_2O ; 50 μL 10 %iges SDS; 50 μL 10 %iges Ammoniumpersulfat (APS); 5 μL TEMED

1 M Tris/HCl pH 6,8

121,4 g Tris; pH 6,8 (mit HCl eingestellt); H_2O ad 1000 mL

Trenngel (10 mL; 10 %ig)

3,3 mL 30 % Polyacrylamid; 3,75 mL 1 x Tris/HCl pH 8,8; 2,75 mL H_2O ; 100 μL 10 % SDS; 100 μL 10 %iges APS; 4 μL TEMED

1 M Tris pH 8,8

121,4 g Tris; pH 8,8 (mit HCl eingestellt); H_2O ad 1000 mL

10 x Elektrophoresepuffer

30,2 g (0,25 M) Tris; 144 g Glycin; 1 % SDS; ad 1000mL H_2O ; Vor Verwendung 1 : 10 mit H_2O verdünnen

5.2.2.2. Western-Blot-Hybridisierung und Immundetektion

Zur Detektion der Proteine mittels spezifischer Antikörper wurden die durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine zunächst gelelektrophoretisch auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert (Hybond-ECL; GE Healthcare). Dies erfolgte in einer gekühlten Transferkammer gefüllt mit 1 x Transferpuffer bei 400 mA für 1,5 Stunden.

Nach dem Transfer wurde die Membran für 1 Stunde in Blockpuffer abgesättigt, dann dreimal für 5 Minuten in Inkubationspuffer gewaschen und über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper (muriner anti-GFP-Antikörper; 1 : 500 verdünnt) in Inkubationspuffer auf einem Falcon-Roller inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für 5 Minuten mit Inkubationspuffer wurde ein *horseradish peroxidase* (HRP)-gekoppelter, 1 : 5000 verdünnter Sekundärantikörper (Ziege-anti-Maus) in Inkubationspuffer hinzugefügt und für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur auf den Falcon-Roller inkubiert. Nach erneutem Waschen (dreimal 5 Minuten mit Inkubationspuffer und einmal 5 Minute mit H₂O) wurden die Proteine mittels ECL Plus Detektionssystem (GE Healthcare) und anschließender Autoradiographie detektiert (Abbildung 10).

10 x Transferpuffer

30,2 g (0,25 M) Tris; 144 g Glycin; ad 1000 mL H₂O;

1 x Transferpuffer

800 mL H₂O; 100 mL 10 x Transferpuffer; 100 mL Methanol

Blockpuffer

5 % Magermilchpulver in PBS

Inkubationspuffer

3 % Magermilchpulver in PBS

5.3. Molekularbiologische Methoden

5.3.1. Transformation von elektrokompetenten Bakterien

Die Vermehrung von Plasmiden geschah in *E. coli*-Bakterien des Stammes K12. Die Transformation des verwendeten Bakterienstamms XL1-Blue MRF' (Stratagene) erfolgte durch Elektroporation. Dazu wurden 20 µL auf Eis aufgetaute, elektrokompetente Bakterien mit 1 µL Plasmidlösung vermischt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (1 mm Spaltbreite) gegeben. Dann erfolgte die Transformation bei 1500 V, 25 µF und 100 Ω. Nachfolgend wurden die Bakterien sofort in 1 mL SOC-Medium aufgenommen und unter Schütteln für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Dann wurden circa 30 µL der Kultur auf eine LB-Platte mit 100 µg/mL Ampicillin gegeben und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

5.3.2. Kultivierung von Bakterien in Flüssigmedium

Von den auf der LB-Amp-Platte gewachsenen Kolonien wurde eine einzelne entnommen, in 400 mL LB-Medium mit 100 µg/mL Ampicillin überführt und über Nacht bei 37°C im Bakterienschüttler inkubiert.

5.3.3. Isolation von Plasmid-DNA und Glycerinkultur

Eine am Tag zuvor angeimpfte Übernachtkultur in 400 mL LB-Amp-Medium wurde bei 5000 x g für 10 Minuten zentrifugiert und die Plasmid-DNA aus dem Bakterienpellet über DNA-Adsorptionssäulen nach Herstellerangaben der Firma JETStar (*JETStar Plasmid Purification System*) isoliert.

Vor der Lyse der Bakterien wurden 10 mL der Bakterien entnommen, bei 6000 x g für 5 Minuten zentrifugiert, das Pellet in 1 mL LB-Medium mit 10 % Glycerin aufgenommen und diese Glycerinkultur bei -80°C asserviert.

5.3.4. Analyse der aufgereinigten Plasmide

Nach der Isolation der Plasmid-DNA aus den Bakterienkulturen wurde zunächst photometrisch die Konzentration der DNA bestimmt. Hierzu wurde die Plasmid-DNA-Lösung 1 : 20 mit H₂O verdünnt und mittels Extinktionsmessung bei 260 nm analysiert. Über die Absorption der Probe bei 280 nm konnten zudem Aussagen über die Reinheit der isolierten DNA getroffen werden.

Zur Verifizierung der Plasmididentität wurde die DNA mit 5 verschiedenen Restriktionsendonukleasen in den vom Hersteller (MBI-Fermentas bzw. New England Biolabs) empfohlenen Pufferlösungen und unter den vom Hersteller vorgeschlagenen Bedingungen durchgeführt. Die meisten Spaltungen wurden für 1 bis 2 Stunden bei 37°C ausgeführt, und die eingesetzte Enzymmenge betrug maximal 10 % des Gesamtvolumens. Der Erfolg der Spaltung wurde durch Auftrennung der DNA-Fragmente in einem Agarosegel überprüft.

5.3.5. Agarosegel-Elektrophorese

Mit Hilfe dieser Methode können DNA-Fragmente der Größe nach aufgetrennt und nachfolgend sichtbar gemacht werden. Hierzu wurde ein 1 %iges Agarosegel in 1 x TAE-Puffer hergestellt, indem die Agarose durch kurzes Aufkochen in Lösung gebracht und anschließend auf 60°C abgekühlt wurde. Dann wurde Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,2 µg/mL) hinzugefügt, welches in DNA interkaliert

und diese bei Anregung mit UV-Licht fluoreszieren lässt. Das Gel wurde nachfolgend in eine horizontale Gelapparatur gegossen, Kämme für Geltaschen eingesetzt und für ≥ 15 Minuten ausgekühlt. Dann wurde die Kammer mit 1 x TAE-Puffer gefüllt, die DNA-Proben mit 1/5 bis 1/10 Volumen DNA-Ladepuffer versetzt, in die Geltaschen geladen und bei ≤ 120 Volt elektrophoretisch aufgetrennt. Die ethidiumbromidgefärbte DNA war nachfolgend unter UV-Licht (Wellenlänge 254 nm) detektier- und fotografierbar. Zur Bestimmung der Größen der DNA-Fragmente wurde ein Standard-DNA-Größenmarker (*GeneRuler*TM 1kb DNA Ladder von MBI-Fermentas) mit aufgetrennt. Dies ermöglichte die eindeutige Identifizierung des geschnittenen Plasmids anhand des DNA-Bandenmusters.

1 %iges Agarosegel

1 % Agarose in 1 x TAE-Puffer

1 x TAE-Puffer

40 mM Tris/HCl pH 7,8; 5 mM NaAc; 1 mM EDTA

DNA-Ladepuffer

10 mM Tris/HCl pH 7,5; 10 mM EDTA; 0,05 % Bromphenolblau; 10 % Glycerin

6. Ergebnisse

6.1. Rekombinante Influenzaviren Typ A infizierten etablierte Zelllinien sehr effektiv

Um wichtige Parameter der Infektion von Zellen mit IVA zu definieren, wurden unter Verwendung des in der Arbeitsgruppe von Prof. Gerd Hobom (Justus-Liebig-Universität, Giessen) entwickelten Verfahrens (Azzeh *et al.* 2001) rekombinante, für GFP-kodierende IVA (IVA-GFP) hergestellt.

Durch die Inkubation von MDCK-Zellen, die als Modell-Zielzellen der IVA-Infektion gelten, mit limitierenden Mengen an IVA-GFP, wurde der Titer der rekombinanten Viren bestimmt. Dieser gibt die Anzahl infektiöser, rekombinanter Viren pro Volumen an (siehe Methoden). Wenn nicht anders angegeben, wurde in den folgenden Experimenten eine MOI von 3 verwendet, gleichbedeutend mit 3 infektiösen Viruspartikeln pro eingesetzter Zelle. Auf diese Weise wurde sichergestellt, dass alle anfälligen Zellen wirklich infiziert wurden. Nachfolgend wurden neben MDCK- auch U1752-Zellen eingesetzt, welche ebenfalls als Standard-Zielzellen der IVA-Infektion gelten. Beide Zelllinien wurden unter Einsatz verschiedener MOI mit IVA-GFP infiziert und mittels FACS die GFP-Expression gemessen. Diese diente in allen Experimenten als Marker für eine produktive IVA-Infektion. Wie zu erwarten, waren bei einer MOI von 1 ≥ 50 % der Zellen infiziert und der Anteil der infizierten Zellen wuchs mit steigender MOI weiter an (Abbildung 5a).

LCL wurden durch *in vitro*-Infektion humaner, primärer B-Zellen mit EBV generiert und repräsentierten immortalisierte, transformierte B-Zelllinien. In Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe konnte nachgewiesen werden, dass LCL sehr gut mit IVA-GFP infizierbar sind (Nimmerjahn *et al.* 2003). Um die Qualität der in der eigenen Arbeit generierten Viruspräparationen weiter zu überprüfen, wurden diese Zellen lymphoiden Ursprungs unterschiedlich lange mit IVA-GFP inkubiert und danach mittels FACS die GFP-Expression detektiert. In Abbildung 5b (8 *versus* 16 Stunden Infektionszeit) sind die Ergebnisse für 3 verschiedene LCL (ALF, JM und EBV1.11) dargestellt.

Aus diesen Experimenten wurde ersichtlich, dass sowohl die Infektionsdauer als auch die MOI Einfluss auf die Infektionsrate und GFP-Expression hatten. Bei den ALF- und JM-Zellen stieg die Zahl der GFP-exprimierenden Zellen von 8 bis 16 Stunden nach Infektion deutlich an. Hingegen zeigten MDCK, U1752 und EBV1.11-Zellen schon nach 8 Stunden eine ≥ 90 %ige Infektion. 16 Stunden Infektion mit IVA-GFP steigerte die Infektionsrate dann nicht wesentlich, resultierte aber in einem höheren Anteil toter Zellen (Daten nicht gezeigt). Dementsprechend reichte die eingesetzte MOI aus, um alle Zelllinien innerhalb von 16 Stunden maximal zu infizieren. Geringere Virusmengen führten zu einem niedrigeren Anteil an GFP-positiven Zellen nach 8 Stunden, einem weiteren Anstieg der Infektionsrate nach mehr als 8 Stunden und zu weniger toten Zellen nach Infektion (Daten nicht gezeigt).

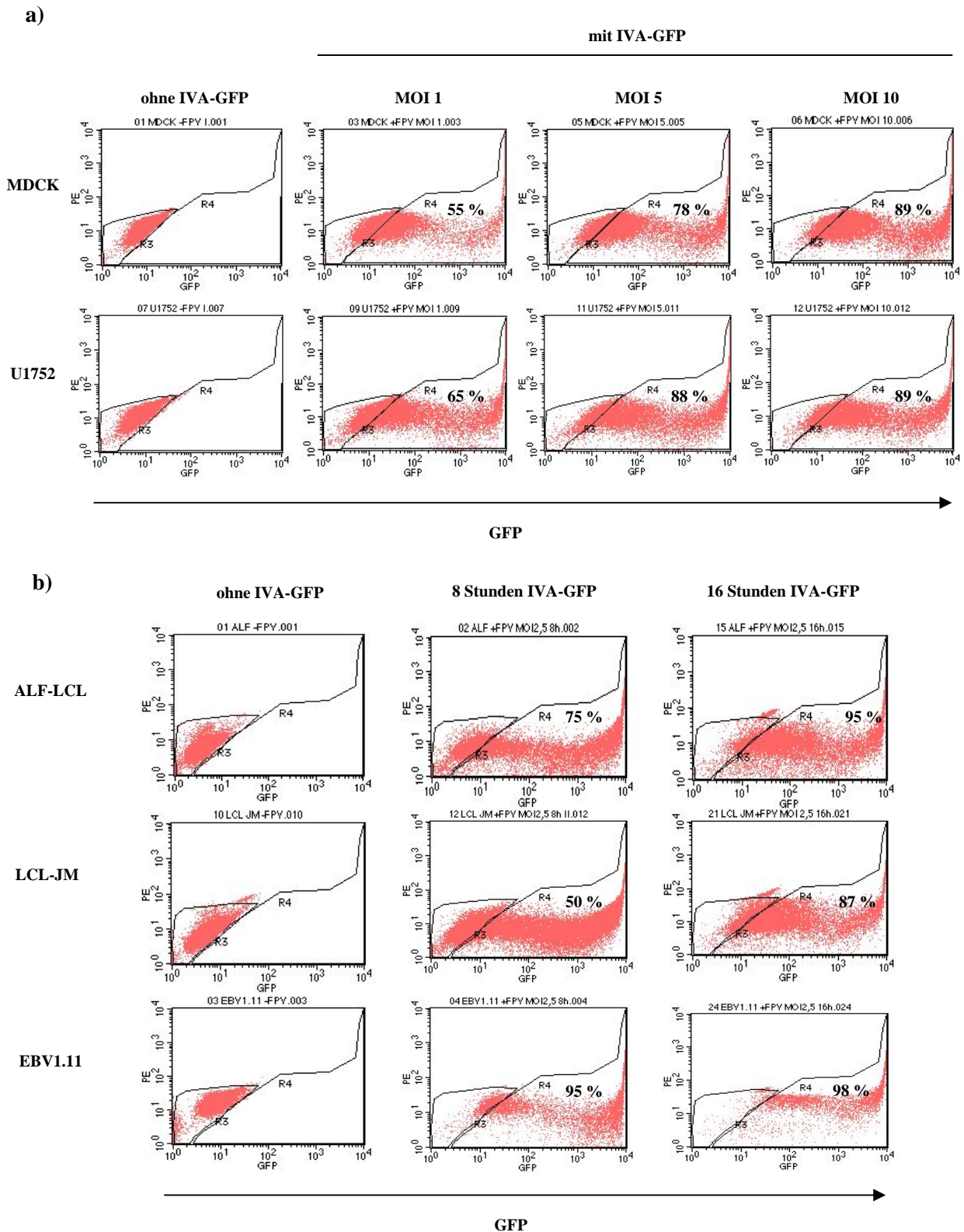


Abbildung 5. Infektion von MDCK, U1752 und verschiedenen, lymphoiden Zelllinien mit rekombinanten, GFP-exprimierenden Influzaviren Typ A

a) MDCK- und U1752-Zellen wurden verwendet, um die rekombinanten IVA-GFP zu testen. Hierzu wurden die Zellen mit verschiedenen MOI infiziert und die Grünfluoreszenz als Maß für die produktive Infektion der Zellen im FACS detektiert. b) LCL von 3 verschiedenen Spendern (ALF, JM, EBV1.11) wurden unterschiedlich lang (8 bzw. 16 Stunden) mit IVA-GFP infiziert (MOI = 3) und die Infektionsrate danach mittels Detektion der Grünfluoreszenz im FACS untersucht (Zahlen in den Diagrammen = % der GFP-positive Zellen im FACS).

Laut Literatur (Sidorenko and Reichl 2004) beträgt der Replikationszyklus von IVA 8 bis 10 Stunden, wobei erste Virionen schon nach 6 bis 8 Stunden freigesetzt werden und infizierte Zellen nach ca. 12 Stunden post Infektion sterben. Um den Anteil toter Zellen zu minimieren, wurde nachfolgend eine Infektionsdauer von 8 bis 10 Stunden gewählt. Für die spätere Untersuchung des IVA-induzierten Zelltods wurde dagegen eine Infektionsdauer von ≥ 12 Stunden verwendet. Da aufgrund des „von Magnus Phänomens“ (v. Magnus 1954) durch den bevorzugten Einbau von GFP-RNA in die Virionen, Viruspartikel mit geringerer Infektivität entstehen, wurden die Untersuchungen zum virusinduzierten Zelltod vorwiegend mit dem H7N7-Wildtyp des IVA (IVA-wt) durchgeführt.

6.2. Rekombinante Influenzaviren Typ A infizierten verschiedene Zellpopulationen des peripheren Bluts

Um die Anfälligkeit von PBL für eine Infektion mit IVA-GFP zu untersuchen, wurden PBL aus frischem Vollblut durch Zentrifugation und anschließender Lyse der Erythrozyten mittels Salzpuffer aufgereinigt. Nachfolgend wurden die PBL für 9 Stunden mit IVA-GFP infiziert, die einzelnen Populationen mit Hilfe von Oberflächenmolekül-spezifischen, Phycoerythrin (PE) -gekoppelten Antikörpern gefärbt und mittels FACS untersucht (Abbildung 6).

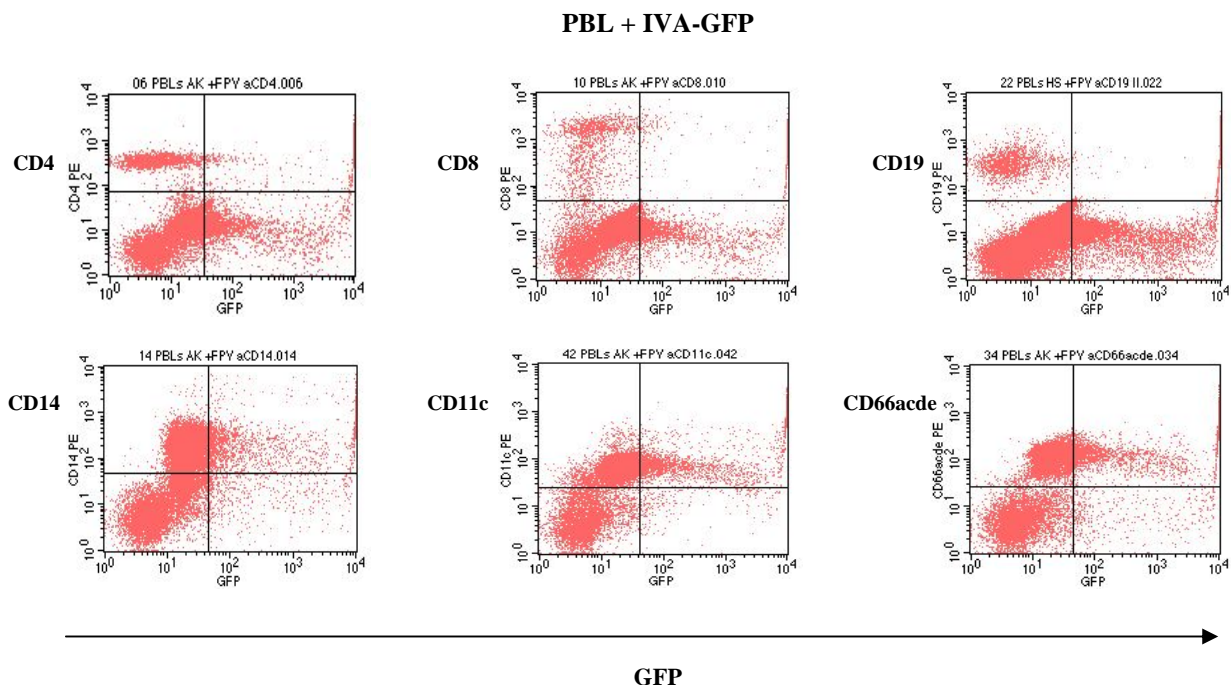


Abbildung 6. Infektion von peripheren Blutleukozyten mit rekombinanten, GFP-exprimierenden Influenzaviren Typ A

Aus peripherem Blut wurden mittels Zentrifugation und anschließender Salzpuffer-Lyse der Erythrozyten PBL isoliert und für 9 Stunden mit IVA-GFP infiziert (MOI = 3), anschließend wurden verschiedene Oberflächenmarker mit spezifischen, PE-gekoppelten Antikörpern gefärbt und im FACS untersucht.

Keiner der untersuchten lymphoiden Zellpopulationen, weder $CD4^+$ oder $CD8^+$ T-Zellen noch $CD19^+$ B-Zellen, waren *ex vivo* mit IVA-GFP infizierbar. Dagegen zeigten monozytäre, $CD14^+$ Zellen genau wie myeloische, $CD11c^+$ Zellen (z. B. DC und Makrophagen) und $CD66acde^+$ Zellen (Neutrophile) eine Anfälligkeit für eine Infektion.

6.3. Aktivierte $CD4^+$ T-Zellen wurden durch rekombinante Influenzaviren Typ A effektiv infiziert

Da die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B eine Voraussetzung für die produktive Infektion von Burkitt-Lymphom-Zelllinien durch IVA ist (Nimmerjahn *et al.* 2004), und der NF- κ B-Signalweg in primären Lymphozyten erst nach Antigenerkennung angeschaltet wird (Weil and Israel 2006), beruhen die niedrigen Infektionsraten von lymphoiden Zellen womöglich auf einer niedrigen oder fehlenden Aktivierung der Zellen. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden aus peripherem Blut über Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation PBMC isoliert und mit Hilfe einer MACS $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen aufgereinigt. Diese wurden dann durch anti-CD3- und anti-CD28-Antikörper aktiviert (3 Tage) und anschließend mit IVA-GFP infiziert (10 Stunden). Um bei den so behandelten T-Zellen zwischen $CD8^+$ und $CD4^+$ T-Zellen unterscheiden zu können, wurde das Gemisch unter Verwendung eines PE-gekoppelten anti-CD4-Antikörpers gefärbt und nachfolgend einer FACS-Analyse unterzogen (Abbildung 7).

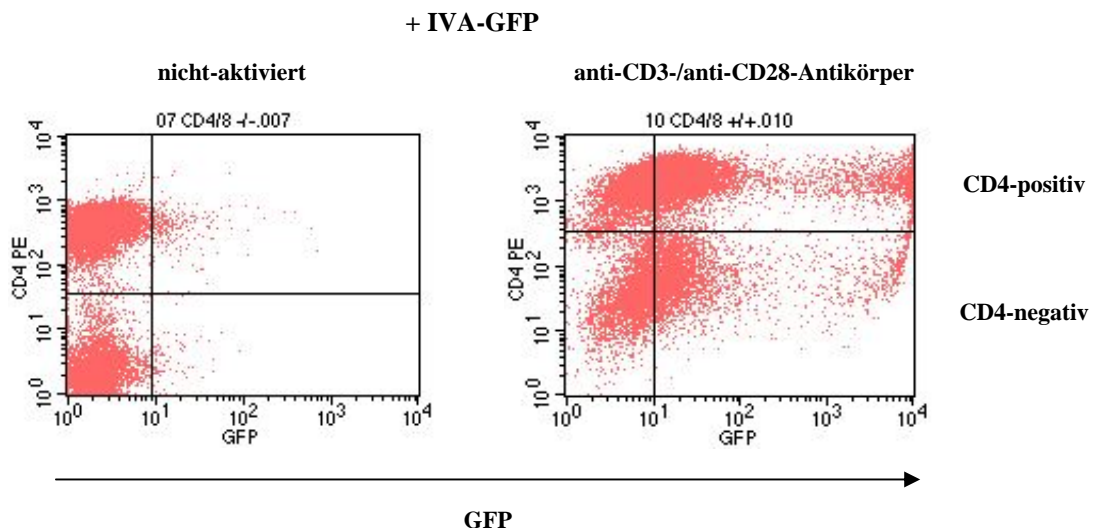


Abbildung 7. Über den CD3 und CD28 stimulierte T-Zellen des peripheren Blutes zeigten eine weitaus höhere GFP-Fluoreszenz als nicht-aktivierte T-Zellen

Aus PBMC wurden $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen mittels MACS isoliert, durch anti-CD3- und anti-CD28-Antikörper aktiviert (3 Tage) und anschließend mit IVA-GFP infiziert (10 Stunden). Dann wurden die Zellen mit anti-CD4-PE-Antikörper gefärbt und im FACS untersucht.

Beide Populationen zeigten nach Aktivierung eine deutlich erhöhte GFP-Fluoreszenz, gleichbedeutend mit einer gesteigerten Anfälligkeit für eine Infektion mit IVA-GFP. Für $CD4^+$ T-Zellen war dieser Effekt noch ausgeprägter als für $CD8^+$ T-Zellen. Aus diesem Grund wurden anschließend zunächst die Eigenschaften von $CD4^+$ T-Zellen im Kontext einer Aktivierung und Infektion mit Hilfe des rekombinanten IVA-GFP näher untersucht. Dafür wurden $CD4^+$ T-Zellen mit Hilfe einer CD4-MACS aus PBMC isoliert und die Effizienz dieser Aufreinigung durch Färbung der isolierten Zellen mit T-Zell-spezifischen Antikörpern und nachfolgendem FACS überprüft. Abbildung 8 zeigt, dass mehr als 98 % der isolierten Zellen die T-Zellmarker CD3 und CD4 exprimierten. Diese Kontrollen wurden bei allen nachfolgenden T-Zellexperimenten durchgeführt und belegten eine Reinheit der T-Zellen von > 97 %. In der ebenfalls getesteten Durchlauffraktion der MACS befanden sich hingegen kaum noch $CD4^+$ T-Zellen. Eine $CD3^{\text{medium}}/CD4^{\text{medium}}$ -Population blieb zudem in der Durchlauffraktion zurück. Des Weiteren konnte durch die Färbung der Durchlauffraktion ausgeschlossen werden, dass die im FACS verwendeten Antikörper alle PBMC-Populationen unspezifisch anfärbten.

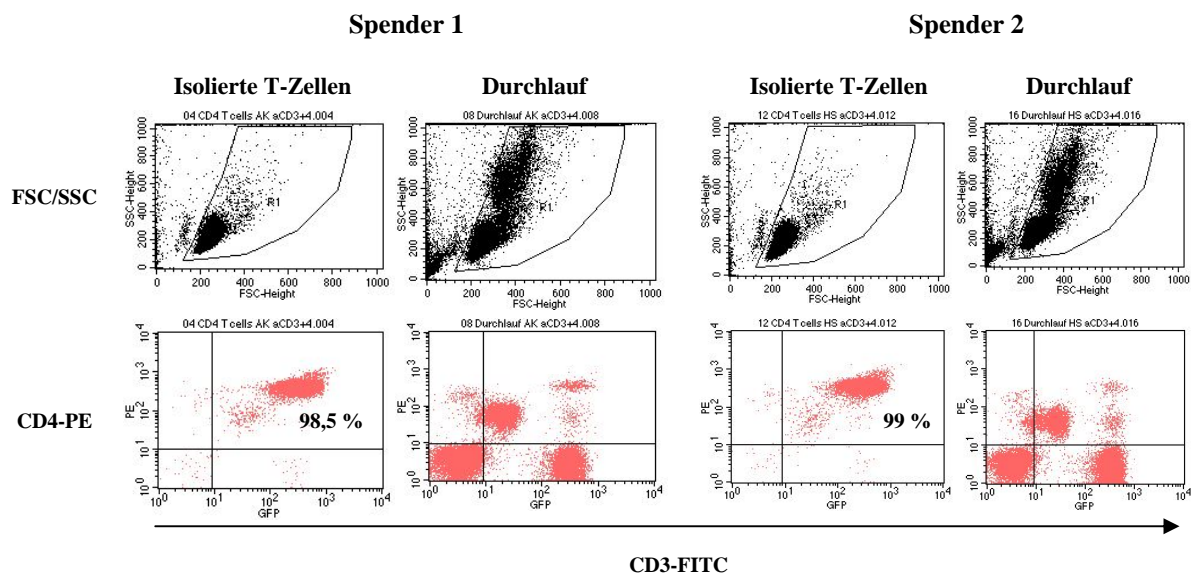


Abbildung 8. Die isolierten T-Zellen waren zu ≥ 97 % $CD3^+$ und $CD4^+$

Die aus PBMC durch CD4-MACS isolierten Zellen wurden mit CD3- und CD4-spezifischen Antikörpern gefärbt und, wie exemplarisch für 2 Spender gezeigt, im FACS untersucht. Auf gleiche Weise wurde die CD4-MACS-Durchlauffraktion analysiert (FSC/SSC = *forward scatter/side scatter*).

Durch Stimulierung des T-Zellrezeptors (TCR) mit Hilfe des CD3-spezifischen Antikörpers OKT3 und Kultivierung in IL-2-haltigem Medium (wenn nicht anders angegeben auch in den nachfolgenden Experimenten verwendet), wurden die $CD4^+$ T-Zellen anschließend aktiviert. Nach 72-stündiger Aktivierung der T-Zellen mit OKT3 stiegen die IVA-GFP-Infektionsraten dramatisch an. Als Kontrolle verwendete ruhende, nicht-aktivierte oder ausschließlich mit IL-2 behandelte T-Zellen zeigten diese Anfälligkeit jedoch nicht (Abbildung 9).

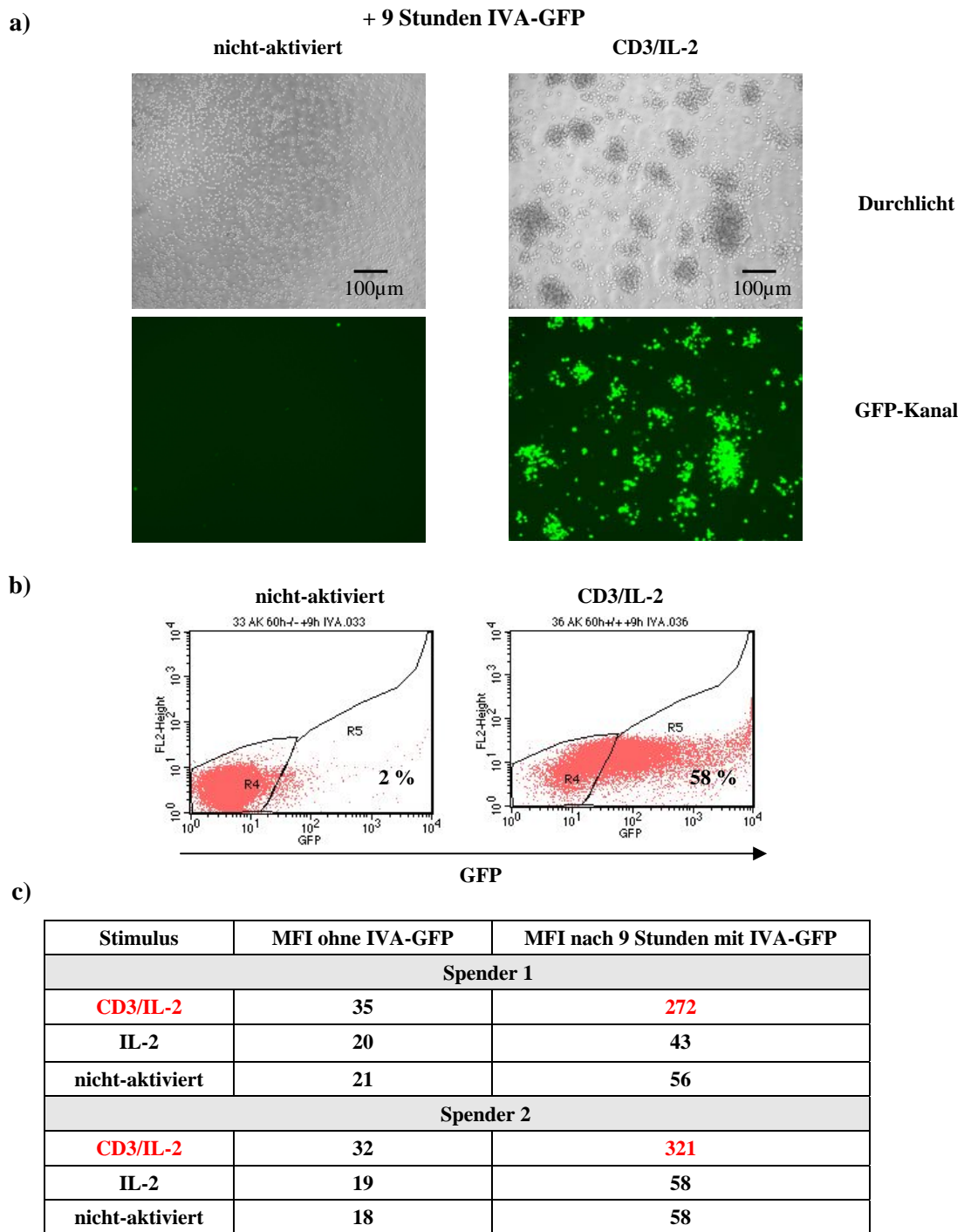


Abbildung 9. Aktivierte CD4⁺ T-Zellen waren deutlich anfälliger für eine Infektion mit rekombinantem Influenzavirus Typ A als ruhende, nicht-aktivierte CD4⁺ T-Zellen

Aus PBMC isolierte CD4⁺ T-Zellen wurden für jeweils 72 Stunden entweder mit einem anti-CD3-Antikörper und IL-2 aktiviert (CD3/IL2), nur in IL-2 gehalten [in **a**) und **b**) nicht gezeigt] oder ohne jeden Stimulus inkubiert (nicht-aktiviert). Dann wurden die Zellen für 9 Stunden mit IVA-GFP infiziert und in **a**) im Fluoreszenzmikroskop, aufgenommen mit fünfzigfacher Objektvergrößerung, oder im FACS [**b**) und **c**)] untersucht. Die Prozentangaben in **b**) entsprechen GFP-positiven Zellen. In **a**) und **b**) sind die Ergebnisse exemplarisch für einen von 6 untersuchten Spendern aufgeführt. In **c**) sind die Resultate der *mean fluorescence intensity* (MFI) für CD4⁺ T-Zellen von 2 von 6 untersuchten Spendern dargestellt. Die *gates* R4 und R5 in **b**) wurden so gesetzt, dass sich bei nicht infizierten Zellen $\geq 99\%$ der Zellen in R4 befanden (nicht dargestellt). Per Definition entspricht deshalb R5 dem Prozentsatz an GFP-positiven, infizierten Zellen.

In Abbildung 9a sind fluoreszenzmikroskopische Bilder der verschieden behandelten CD4⁺ T-Zellen gezeigt. Um die Unterschiede in der Grünfluoreszenz zu quantifizieren, wurden die Zellen im FACS analysiert (Abbildung 9b). Abhängig von der Infektionsdauer konnten bei CD3-aktivierten Zellen Infektionsraten von > 50 % erhalten werden, wohingegen ruhende T-Zellen nur zu < 5 % infizierbar waren. Auch die mittlere Intensität der Grünfluoreszenz von ruhenden und aktivierten T-Zellen, gemessen als MFI, wies signifikante Unterschiede auf. Während der MFI-Wert von ruhenden, infizierten gegenüber nicht-infizierten Zellen meist nur das Zwei- bis Dreifache betrug, war er bei aktivierten, infizierten Zellen circa zehnmal so hoch (Abbildung 9c). Eine Induktion der T-Zellproliferation mit IL-2 war hingegen alleine nicht in der Lage die Anfälligkeit der T-Zellen für eine IVA-Infektion zu steigern und lieferte vergleichbare Ergebnisse wie für nicht-aktivierte T-Zellen (ohne anti-CD3-Antikörper und ohne IL-2) (Abbildung 9c). Eine zusätzliche Stimulation mittels anti-CD28-Antikörper erhöhte den Anteil GFP-positiver T-Zellen weder im OKT3-aktivierten noch im nicht-aktivierten Kontext (Daten nicht gezeigt) und wurde deshalb nachfolgend nicht mehr verwendet. Die Resultate konnten durch ähnliche Ergebnisse in unabhängigen Experimenten mit 6 verschiedenen Spendern verifiziert werden (repräsentative Ergebnisse für 2 Spender zeigt Abbildung 9c).

6.4. Die Grünfluoreszenz der Zielzellen wurde durch die produktive Infektion und nicht durch rekombinantes Protein im Virusüberstand verursacht

Aufgrund des Herstellungsverfahrens waren Verunreinigungen der verwendeten Virusüberstände mit GFP nicht auszuschließen. Deshalb war es wichtig sicherzustellen, dass es sich bei den bisherigen Ergebnissen wirklich um eine produktive Infektion mit IVA-GFP und nicht um eine Beladung der Zellen mit GFP aus dem Virusüberstand handelte. Hierzu wurde zunächst die Menge an GFP im Virusüberstand durch Western-Blot-Analysen bestimmt (Abbildung 10) und dann gleiche Mengen an rekombinant-hergestelltem und aufgereinigtem GFP aktiv auf die Zielzellen geladen. Dies führte nicht zu dem beobachteten Anstieg der GFP-Fluoreszenz. Abbildung 11a zeigt dieses Experiment am Beispiel aktivierter CD4⁺ T-Zellen. In einem weiteren Experiment wurden aktivierte und nicht-aktivierte CD4⁺ T-Zellen (Abbildung 11b) sowie LCL (Daten nicht gezeigt) für ≤ 1 Stunde mit IVA-GFP inkubiert und dann im FACS untersucht. Innerhalb dieser kurzen Inkubationszeit sollte eine reine Beladung mit rekombinantem Protein gut erkennbar sein. Jedoch zeigte sich bei keiner der getesteten Zellen eine so ausgeprägte Grünfluoreszenz wie nach 6- bis 8-stündiger Inkubation. In einem dritten Ansatz wurde IVA-GFP mit Hitze (60 Minuten bei 60°C) oder mit UV-Licht (50 bzw. 100 mJ/cm²) behandelt, beides in einer Dosis, welche zur Inaktivierung des Virus führte ohne die fluoreszierenden Eigenschaften des GFP zu beeinträchtigen. Abbildung 11c zeigt, dass die Grünfluoreszenz der Zielzellen durch Inaktivierung des Virus verloren ging, was belegte, dass die Grünfluoreszenz von der Infektion der Zielzellen mit IVA-GFP und nicht von einer möglichen Beladung mit freiem, rekombinanten Protein abhing.

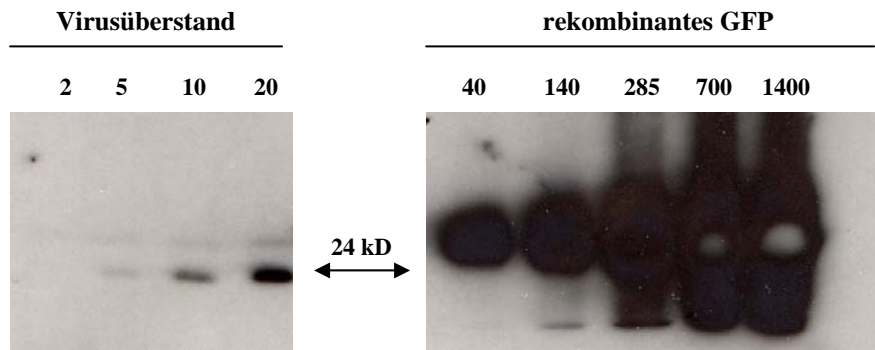


Abbildung 10. Untersuchung der Menge freien, rekombinanten Proteins im Virusüberstand

Verschiedene Mengen an IVA-GFP-Überstand (μL) und definierte Mengen an rekombinatem GFP (ng) wurden mittels SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese aufgetrennt, auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen, das GFP durch einen GFP-spezifischen Primärantikörper und einen HRP-gekoppelten Sekundärantikörper markiert und mittels Autoradiographie sichtbar gemacht. Das GFP im Virusüberstand (24 kD) ist etwas kleiner als das rekombinante GFP, welches einen zusätzlichen Histidin-Tag zur Aufreinigung trägt.

6.5. Parameter der aktivierungsabhängigen Infektion von CD4^+ T-Zellen mit rekombinanten Influenzaviren Typ A

Um Parameter zu definieren, welche für eine aktivierungsabhängige Infektion von CD4^+ T-Zellen mit IVA-GFP wichtig sind, sollte die notwendige Dauer von Aktivierung und Infektion sowie die notwendige Stärke des Stimulus bestimmt werden.

6.5.1. Maximale Infizierbarkeit von CD4^+ T-Zellen 60 bis 72 Stunden nach Aktivierung

Begonnen wurde mit der Untersuchung der Frage, wie lange ein Stimulus gegeben werden muss, um CD4^+ T-Zellen maximal anfällig für eine IVA-Infektion zu machen. Hierzu wurden CD4^+ T-Zellen aus peripherem Blut isoliert, nachfolgend für 0 bis 84 Stunden aktiviert und danach jeweils für 9 Stunden mit IVA-GFP infiziert. Der Anteil grüner Zellen wurde per FACS-Analyse bestimmt. Dies ist exemplarisch für 2 von 6 Spendern in Abbildung 12a gezeigt. Ein Anstieg der Infizierbarkeit, gemessen anhand der Grünfluoreszenz, war spenderabhängig nach 36 bis 48 Stunden Aktivierung zu sehen. Ein Maximum wurde nach 60 bis 72 Stunden erreicht. Danach stieg der Prozentsatz infizierter Zellen nicht mehr signifikant an. Bei der Aktivierung über mehr als 72 Stunden nahm jedoch der Anteil toter Zellen in der *in vitro*-Kultur zu, was bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden muss. Neben dem Anteil GFP-positiver Zellen war auch die MFI in den verschiedenen Ansätzen sehr unterschiedlich. Während sich die MFI bei ruhenden, infizierten CD4^+ T-Zellen kaum veränderte, stieg sie bei aktivierten CD4^+ T-Zellen um mehr als das Fünffache an (Abbildung 12b).

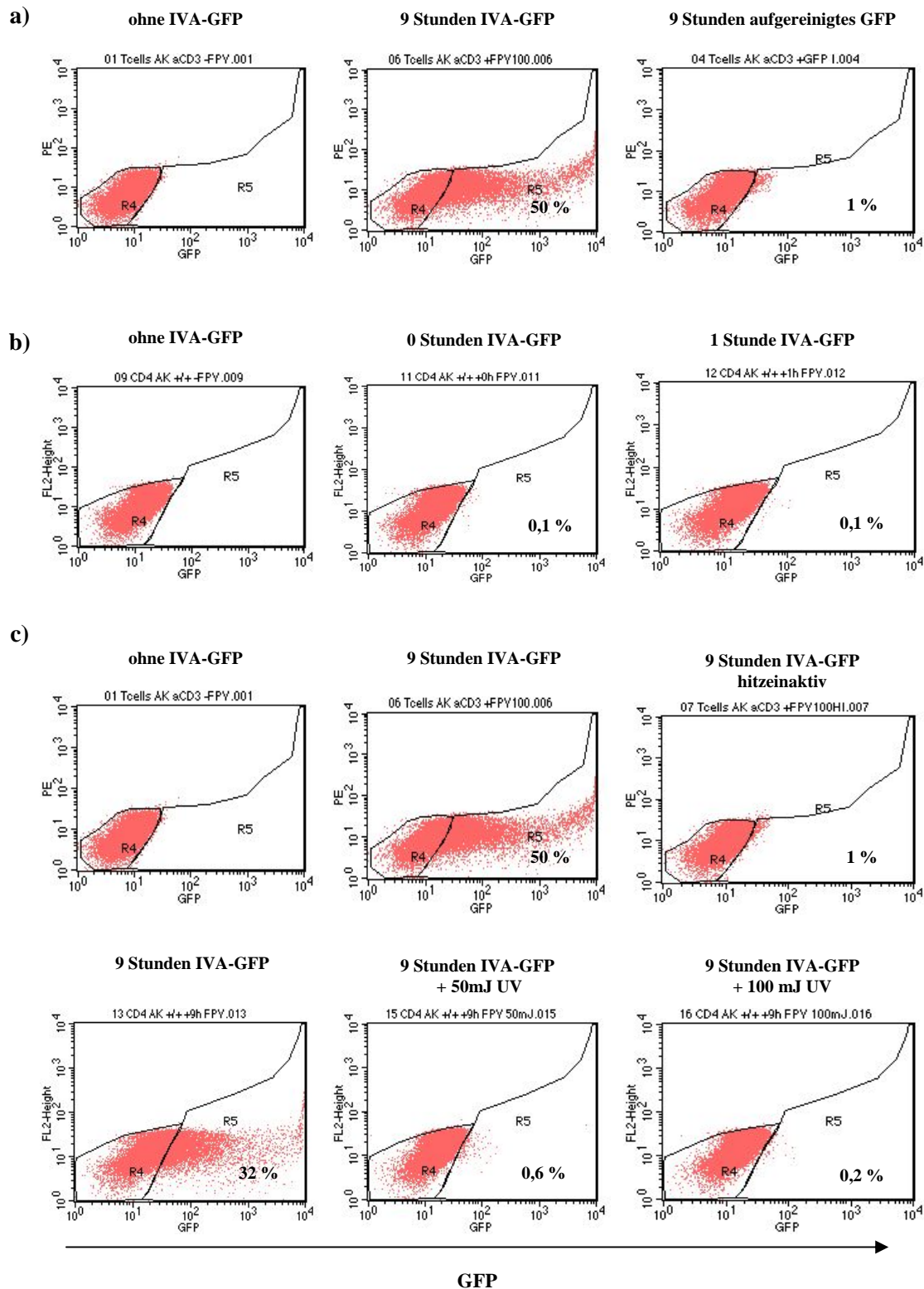


Abbildung 11. Die Grünfluoreszenz der aktivierten CD4⁺ T-Zellen beruhte auf einer produktiven Infektion mit IVA-GFP und nicht auf Proteintransfer

CD4⁺ T-Zellen aus peripherem Blut wurden 72 Stunden mit anti-CD3-Antikörpern und IL-2 aktiviert und nachfolgend für die angegebene Dauer [0, 1 (b) oder 9 Stunden (a und c)] mit verschiedenen präparierten IVA-GFP [unbehandelt (a bis c), hitzeinaktiviert (c), UV-bestraht mit 50 mJ/cm² oder 100 mJ/cm² (c)] (je 3 MOI) bzw. vergleichbaren Mengen an aufgereinigtem GFP (a) inkubiert oder nicht weiter behandelt (a bis c). Nachfolgend wurden die Zellen im FACS vermessen.

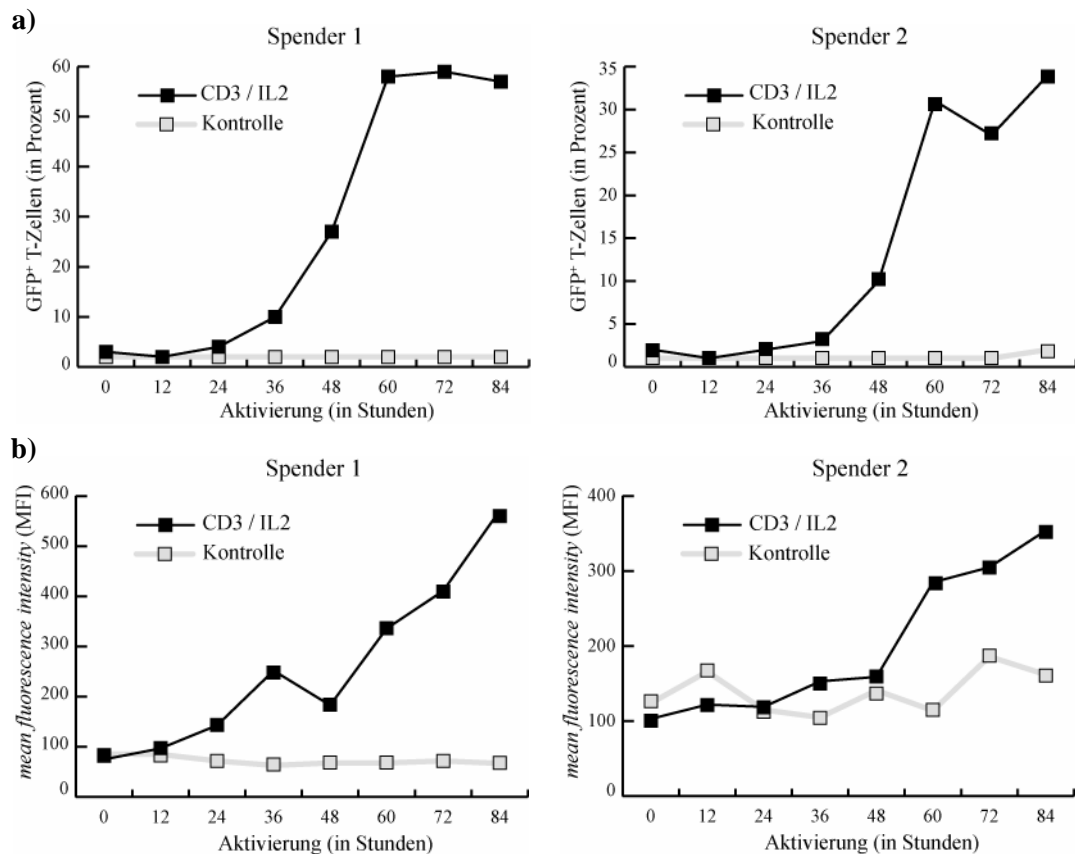


Abbildung 12. Kinetik der aktivierungsabhängigen Infektion von CD4⁺ T-Zellen mit rekombinantem Influenzavirus Typ A

Aus dem Blut isolierte CD4⁺ T-Zellen wurden für 0 bis 84 Stunden mit OKT3-Antikörper und IL-2 aktiviert (CD3/IL2) oder ruhend gehalten (Kontrolle), dann 9 Stunden mit IVA-GFP infiziert und abschließend im FACS analysiert. In **a)** wurde der Anteil GFP-positiver T-Zellen, in **b)** die MFI über den angegebenen Untersuchungszeitraum gemessen. Es sind exemplarisch die Ergebnisse für 2 von 6 untersuchten Spender dargestellt.

6.5.2. Die Stärke des Stimulus war entscheidend für eine erhöhte Anfälligkeit von CD4⁺ T-Zellen für eine Infektion mit rekombinantem Influenzavirus Typ A

Neben der Wirkung einer unterschiedlichen Aktivierungsdauer sollte auch der Einfluss unterschiedlich starker Stimuli auf die Infektionsrate der CD4⁺ T-Zellen untersucht werden. Hierzu wurden CD4⁺ T-Zellen aus PBMC isoliert, über 60 Stunden mit unterschiedlichen Mengen an anti-CD3-Antikörper aktiviert, weitere 9 Stunden mit IVA-GFP inkubiert und schließlich im FACS analysiert. Der Aktivierungsgrad der CD4⁺ T-Zellen wurde 24 Stunden nach Aktivierungsbeginn mittels ELISA über die Konzentration von ausgeschüttetem IFN- γ im Kulturüberstand gemessen (Abbildung 13). Dabei zeigte sich eine positive Korrelation der Stärke des Stimulus (Menge an eingesetztem OKT3-Antikörper) mit dem Aktivierungsgrad (IFN- γ -Ausschüttung) (Abbildung 13a) und der Infektionsrate der CD4⁺ T-Zellen (Rate der GFP-positiven Zellen) (Abbildung 13b). Ein sprunghafter Anstieg der

Infektionsrate war bei Erreichen der maximalen Aktivierung zu beobachten, während eine suboptimale Aktivierung keinen signifikanten Einfluss auf den Anteil der infizierten, grünfluoreszierenden Zellen hatte. Im Vergleich zur Zytokin-Ausschüttung war der Anstieg der Infizierbarkeit aber erst bei höheren anti-CD3-Antikörper-Mengen zu detektieren. Somit scheinen für die Infektionsanfälligkeit stärkere T-Zellaktivierungssignale von Nöten zu sein, als für die Induktion der Zytokinsekretion. Spenderabhängig wurde bei Antikörpermengen von $\geq 0,5 \mu\text{g}$ pro Ansatz entweder weiter ein Plateau (Abbildung 13) oder ein Abfall (Abbildung 25) von Infektionsrate und Zytokinkonzentration beobachtet. Beides wäre mit einer Überstimulation der T-Zellen und nachfolgendem *activation induced cell death* (AICD) erklärbar. Für die nachfolgenden Experimente wurde die Stärke des Stimulus deshalb, wenn nicht anders angegeben, im frühen Plateau-Bereich gewählt ($0,3 \mu\text{g}$ Antikörper pro Ansatz).

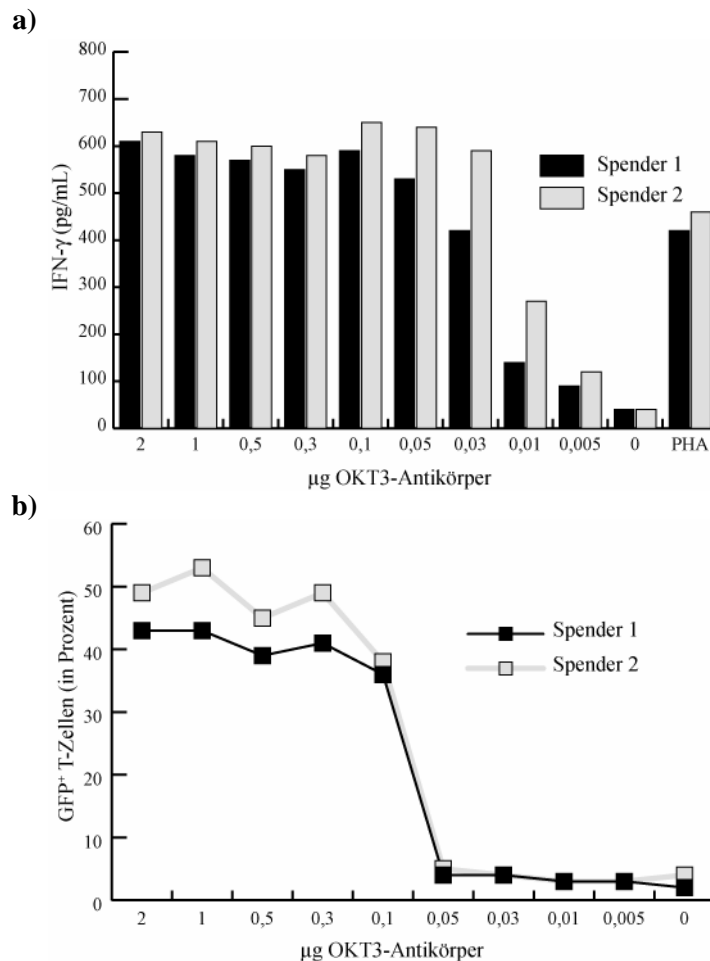


Abbildung 13. Korrelation der Stärke des Stimulus mit dem Aktivierungsgrad und der Infektionsrate der infizierten CD4⁺ T-Zellen

Aus peripherem Blut isolierte CD4⁺ T-Zellen wurden mit verschiedenen Mengen an OKT3-Antikörper stimuliert. **a)** 24 Stunden nach Aktivierungsbeginn wurde die IFN- γ -Konzentration im Kulturüberstand mittels ELISA detektiert (PHA = Positivkontrolle). **b)** 60 Stunden nach Aktivierungsbeginn wurden die T-Zellen mit IVA-GFP infiziert und 9 Stunden später der Anteil GFP-positiver Zellen als Maß der Infektionsrate im FACS gemessen. Gezeigt sind die repräsentativen Ergebnisse für 2 der insgesamt 5 untersuchten Spender. Lediglich bei maximaler Stimulation ($\geq 0,5 \mu\text{g}$ OKT3-Antikörper) zeigten sich Unterschiede (siehe Text).

6.5.3. Die Dauer des Stimulus beeinflusste ebenfalls die Anfälligkeit der CD4⁺ T-Zellen für eine Infektion mit rekombinantem Influenzavirus Typ A

Um zu klären, ob ein kürzerer Stimulus mit anschließender, stimulationsfreier Phase ähnliche Ergebnisse liefert, wie eine durchgehender Stimulation, wurden CD4⁺ T-Zellen über einen Zeitraum von 0 bis 72 Stunden aktiviert, dann der Stimulus entzogen und die Zellen bis zur Untersuchung nach einer Gesamtzeit von 72 Stunden in T-Zell-Medium ohne OKT3-Antikörper weiterkultiviert. Erst danach wurden alle CD4⁺ T-Zellen für 9 Stunden mit IVA-GFP infiziert (Abbildung 14).

Bereits bei einer Aktivierung über 12 bis 24 Stunden und anschließender Ruhephase von 60 bzw. 48 Stunden war ein Teil der CD4⁺ T-Zellen infizierbar. Jedoch führten längere Phasen der Aktivierung und entsprechend kürzere Ruhephasen zu einer noch höheren Infektionsrate. Dies deutete auf eine direkte Korrelation zwischen der Dauer der T-Zellaktivierung und der Infizierbarkeit der Zellen hin. Alternativ wäre es auch vorstellbar, dass das Aktivierungssignal, welches die T-Zellen für die IVA-Infektion anfällig macht, sehr kurzlebig ist bzw. dass die Infizierbarkeit der T-Zellen in längeren Ruhephasen nach Aktivierung wieder abnimmt.

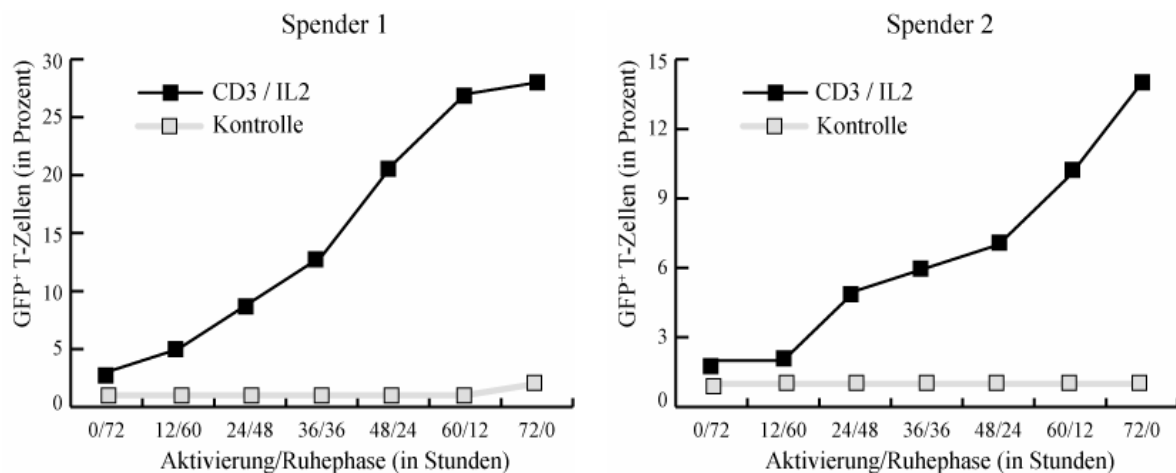


Abbildung 14. Die Anfälligkeit der CD4⁺ T-Zellen stieg mit der Dauer der Aktivierung an

Aus peripherem Blut isolierte CD4⁺ T-Zellen wurden für 0 bis 72 Stunden mit anti-CD3-Antikörper aktiviert, dann dem Stimulus entzogen und für den Rest einer Beobachtungszeit von 72 Stunden in nicht-aktivierendem Medium gehalten. Danach wurden alle T-Zellen für 9 Stunden mit IVA-GFP infiziert und im FACS vermessen. Kontroll-T-Zellen wurden während des gesamten Experiments in nicht-stimulierendem Medium gehalten. Infektion und Vermessung erfolgten wie bei den aktivierten T-Zellen nach Kultur über 72 Stunden. Dargestellt sind exemplarisch die Ergebnisse für 2 von 5 untersuchten Spendern.

6.5.4. Bei längerer Infektionsdauer und Einsatz einer höheren MOI stieg die Infektionsrate, aber auch der Anteil an toten CD4⁺ T-Zellen

Wie schon in Abschnitt 6.1. gezeigt, können Dauer der Infektion und MOI den gemessenen Anteil GFP-positiver Zellen und somit die detektierte Infektionsrate stark beeinflussen. Deshalb wurde in einer Reihe von zusätzlichen Experimenten untersucht, wie sich eine länger als 9-stündige Infektionsdauer auf die Infektionsraten von CD4⁺ T-Zellen auswirkten und ob durch längere Infektionszeiten verstärkt zytopathische Effekte auftraten.

Abbildung 15 zeigt Unterschiede der fluoreszenzmikroskopischer Bildes bei einer Infektionsdauer von 10 gegenüber 24 Stunden. Die längere Infektionsdauer führte zu einer verstärkten Grünfluoreszenz der aktivierten CD4⁺ T-Zellkulturen. Dies konnte daran liegen, dass in dieser Zeit pro Zelle mehr GFP exprimiert wurde und/oder dass mehr Zellen infiziert wurden.

Um die Ergebnisse zu quantifizieren und Aussagen über die Ursache der erhöhten Grünfluoreszenz treffen zu können, wurden die infizierten T-Zellen zusätzlich im FACS untersucht. Abbildung 16 zeigt, dass mit längerer Infektionsdauer sowohl die Anzahl der GFP-positiven CD4⁺ T-Zellen als auch die Anzahl der PI-positiven, toten Zellen [PI-positiv und im linken Teil des FSC/SSC lokalisiert (rote Ellipse)] anstieg.

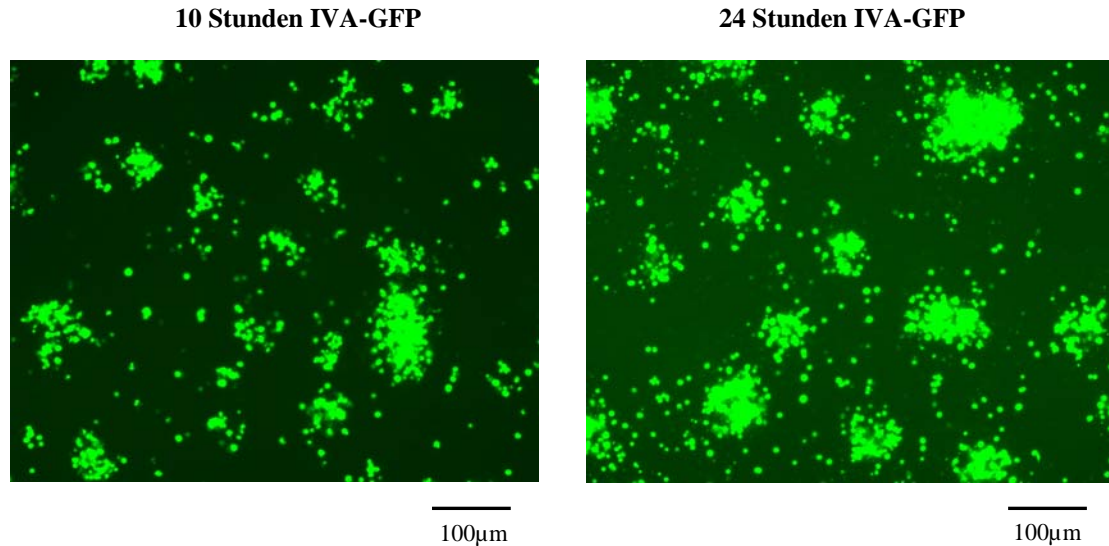


Abbildung 15. Zunahme der Grünfluoreszenz von CD4⁺ T-Zellen nach 10- versus 24-stündiger Infektion mit rekombinantem Influenzavirus Typ A

Aus Blut isolierte CD4⁺ T-Zellen wurden für 60 Stunden mit OKT3-Antikörper aktiviert und nachfolgend für 10 bzw. 24 Stunden mit IVA-GFP infiziert. Die Infektion der Zellen wurde mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops, aufgenommen mit einer fünfzigfachen Objektvergrößerung, detektiert und dokumentiert.

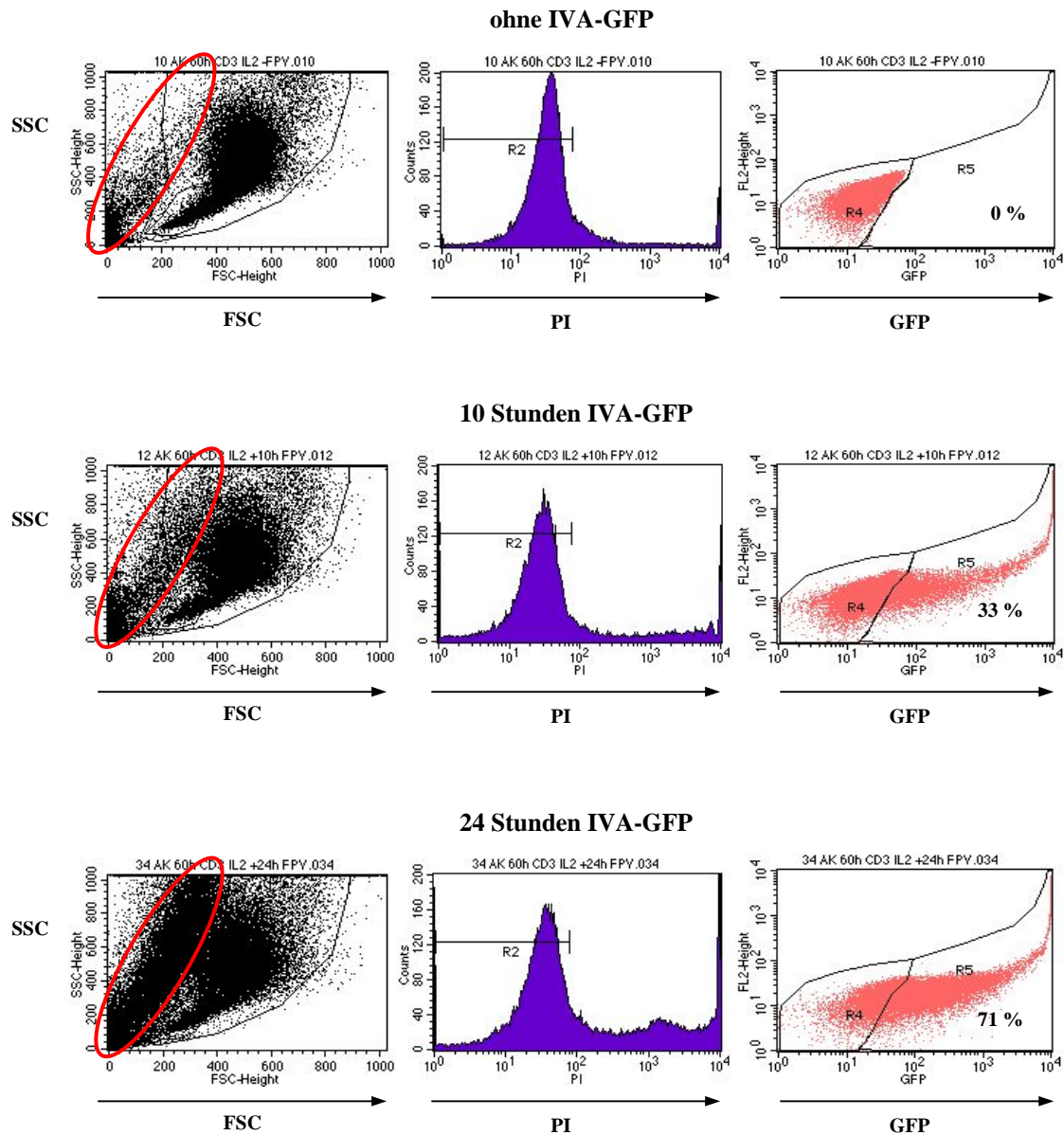


Abbildung 16. Anstieg der grünfluoreszierenden wie auch PI-positiven, toten T-Zellen nach 24 versus 10 Stunden Infektion von CD4⁺ T-Zellen mit IVA-GFP

Die wie in Abbildung 15 behandelten CD4⁺ T-Zellen wurden im FACS vermessen. Mit der roten Ellipse sind die PI-positiven Zellen im FSC/SSC (*forward scatter/side scatter*) markiert.

Für die beobachtete Zunahme der Infektionsrate und Rate an toten Zellen mit zunehmender Infektionsdauer war möglicherweise die Infektion einer größeren Anzahl von Zellen verantwortlich. Da die rekombinanten Viren aufgrund des bereits erwähnten „von Magnus Phänomens“ (v. Magnus 1954) nur noch wenige Nachkommen produzieren bzw. kaum lytisch wirken (Nimmerjahn *et al.* 2003), ist es unwahrscheinlich, dass eine Infektion von noch nicht befallenen Zellen durch freigesetzte, rekombinante Viren die alleinige Erklärung bot. Es war eher anzunehmen, dass neben rekombinantem Virus auch IVA-wt in der IVA-GFP-Präparation vorhanden war. IVA-infizierte Zellen

werden nach einer Infektionsdauer von etwa 12 Stunden lysiert (Sidorenko and Reichl 2004). Die zytopathischen Effekte des IVA-wt könnten somit gut erklären, warum es nach längerer Infektionsdauer zu einem relativen Anstieg der lebendigen, GFP-positiven Zellen kam.

Um die Effekte einer längeren Infektionsdauer auf die Infektionsrate noch detaillierter zu untersuchen, wurde eine Kinetik über 0 bis 24 Stunden durchgeführt. Dabei wurden die CD4⁺ T-Zellen vor der Infektion mit IVA-GFP für nur 48 Stunden mittels OKT3-Antikörper aktiviert, um den nicht-IVA-abhängige Zelltod *in vitro* zu minimieren. Wie in Abbildung 17a dargestellt, war bereits nach einer Infektionsdauer von 6 Stunden eine erhöhte Infektionsrate zu erkennen. Sie stieg innerhalb der nächsten Stunden weiter an, wobei die Effekte später als 12 Stunden wahrscheinlich wieder auf eine Kombination von vermehrter GFP-Expression und Absterben von IVA-wt-infizierten T-Zellen zurückzuführen waren.

Auch die MOI beeinflusste den Anteil GFP-positiver CD4⁺ T-Zellen nach Virusinfektion. Eine Erhöhung der MOI führte zu einem Zuwachs der infizierten T-Zellfraktion. Dieser Effekt war bei den aktivierten CD4⁺ T-Zellen viel stärker ausgeprägt als bei den nicht-aktivierten Zellen (Abbildung 17b).

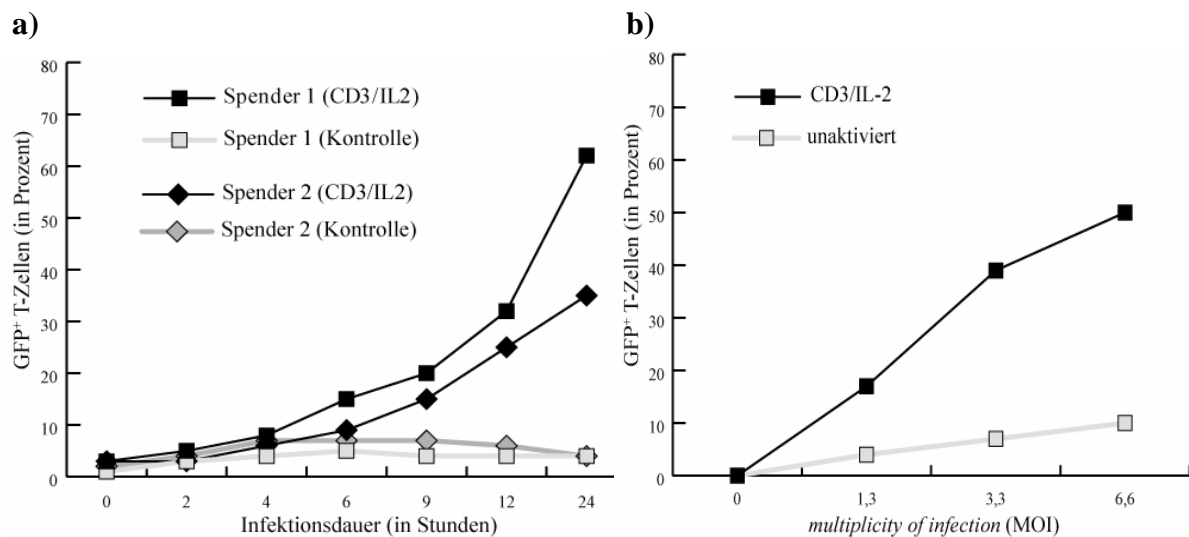


Abbildung 17. Der Anteil der grünfluoreszierenden CD4⁺ T-Zellen steigt mit längerer Infektionsdauer und höherer MOI deutlich an

Aus peripherem Blut aufgereinigte CD4⁺ T-Zellen wurden für 48 Stunden mit OKT3-Antikörper aktiviert oder nicht-aktiviert in Kultur gehalten und nachfolgend mit IVA-GFP in **a**) für 0 bis 24 Stunden (MOI = 3) oder in **b**) für 9 Stunden mit verschiedenen MOI infiziert. Die Analyse der GFP-positiven T-Zellen erfolgte im FACS.

6.6. Der Wildtyp des Influenzavirus Typ A induzierte Zelltod in aktivierten, jedoch kaum in ruhenden CD4⁺ T-Zellen

Um die Zeitabhängigkeit des Wildtyp-induzierten T-Zellsterbens eingehender zu untersuchen, wurden CD4⁺ T-Zellen nach 60-stündiger Aktivierung für verschieden lange Zeitspannen mit gleichen Mengen an IVA-wt (MOI 3) infiziert und der infektionsabhängige Zelltod untersucht.

Die Ergebnisse von einem von insgesamt 4 Spendern sind in Abbildung 18 zusammengefasst. Die Infektion der aktivierten CD4⁺ T-Zellen mit IVA-wt führte nach 24 gegenüber 0 und 9 Stunden zu einem massiven Zuwachs der toten Zellfraktion. Der zeitabhängige Anstieg des induzierten Zelltods war nach Infektion mit IVA-wt gegenüber IVA-GFP wesentlich deutlicher (Abbildung 18a). Dies unterstrich die reduzierte Replikationsfähigkeit des rekombinanten IVA-GFP, sprach aber weiterhin für Verunreinigungen der rekombinanten Viruspräparationen mit IVA-wt. Nicht-aktivierte CD4⁺ T-Zellen wiesen hingegen selbst nach 24-stündiger Infektion mit IVA-wt kaum zytotoxische Effekte auf (Abbildung 18b). Aktivierte, nicht-infizierte T-Zellen zeigten innerhalb der 24 Stunden keinen Zuwachs an toten Zellen (Abbildung 18a, oben). Dies belegte, dass der beobachtete Zelltod durch die Infektion selbst und nicht durch eine Aktivierung der T-Zellen oder die alleinige Kultur der Zellen *in vitro* ausgelöst wurde. Da die Infektion aktivierter CD4⁺ T-Zellen mit IVA-wt trotz massiver Induktion von Zelltod keinerlei Autofluoreszenz induzierte (Abbildung 18), konnte auch ausgeschlossen werden, dass der im FACS beobachtete Anstieg der aktivierten, GFP-positiven T-Zellpopulation (vgl. Abbildung 9 und 11 bis 17) auf eine Autofluoreszenz toter Zellen zurückzuführen war.

Um im Detail zu sehen, wie sich der Anteil der toten Zellen mit der Dauer der IVA-Infektion änderte, wurden CD4⁺ T-Zellen mit oder ohne aktivierende Stimuli (OKT3-Antikörper, IL-2) über 48 Stunden kultiviert und dann in einer Kinetik für 0 bis 24 Stunden mit IVA-GFP oder IVA-wt infiziert. Abbildung 19 zeigt die repräsentativen Ergebnisse für 2 von 4 untersuchten Spendern. Während es erst 24 Stunden nach Infektion mit IVA-GFP zu einem deutlich erhöhten Anteil toter Zellen innerhalb der aktivierten CD4⁺ T-Zellen kam, war bereits 9 Stunden nach Infektion mit IVA-wt ein Abfall der lebendigen Zellen um zirka 30 % zu sehen, was den kurzen Replikationszyklus von IVA-wt widerspiegelt (Sidorenko and Reichl 2004). Der Anteil toter Zellen wuchs nach Infektion mit IVA-wt stetig weiter an, so dass 24 Stunden nach Infektion spenderabhängig nur noch 10 bis 20 % der CD4⁺ T-Zellen lebten. Dies übertraf bei Weitem die zytopathische Wirkung des IVA-GFP (Abfall auf 30 bis 40 % lebendige Zellen in 24 Stunden).

Interessant war auch die Betrachtung der nicht-aktivierten T-Zellen. Ähnlich wie in Abbildung 18 wird aus Abbildung 19 ersichtlich, dass ruhende CD4⁺ T-Zellen insgesamt einen wesentlich geringeren Anteil an toten Zellen aufwiesen. Erst 24 Stunden nach Infektion stieg der Anteil leicht an, aber auch zu diesem Zeitpunkt waren noch mehr als zwei Drittel der T-Zellen lebendig.

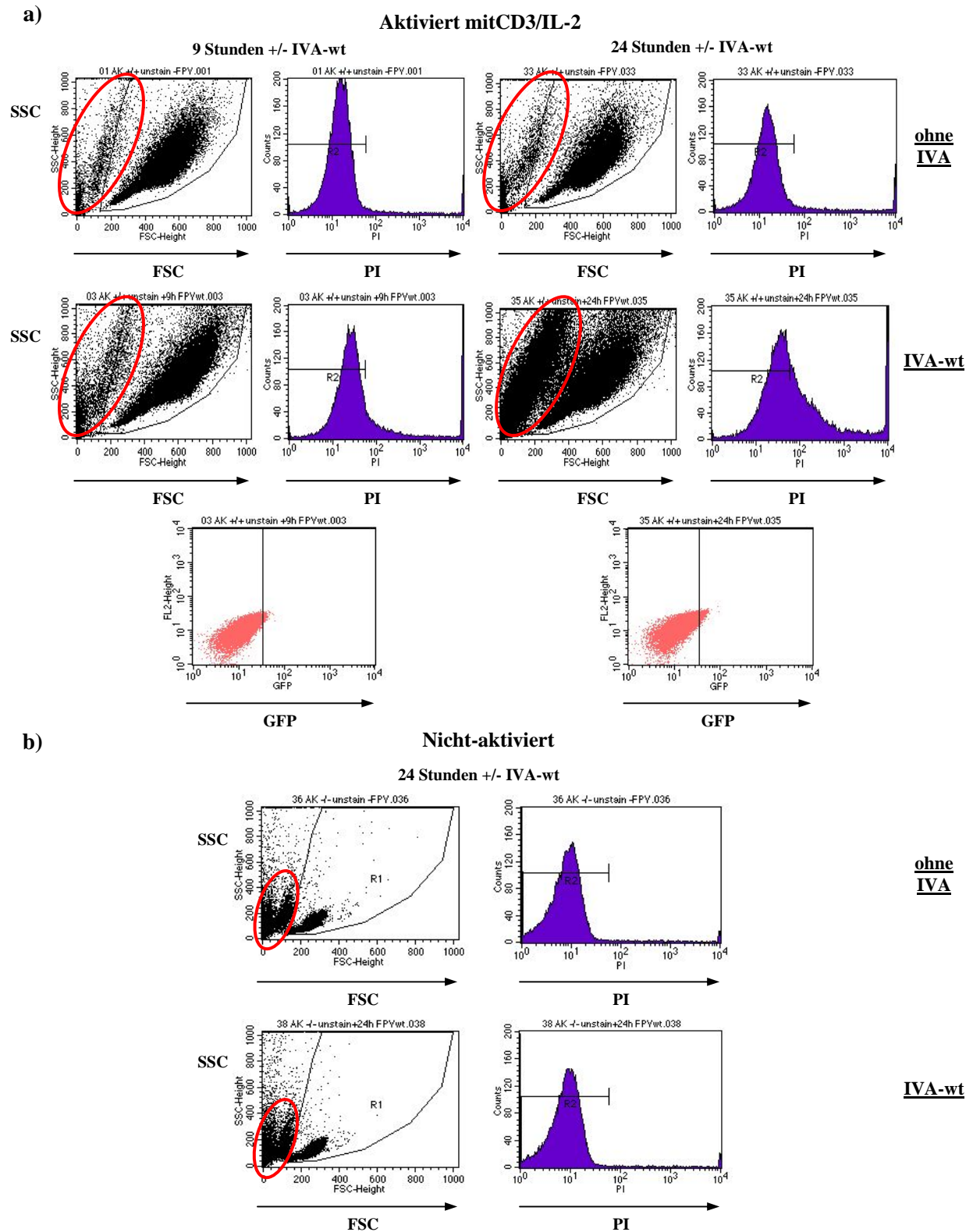


Abbildung 18. Inkubation von aktivierten CD4⁺ T-Zellen mit Wildtyp des Influenzavirus Typ A für länger als 9 Stunden induzierte Zelltod in den aktivierten, nicht jedoch in ruhenden Zellen

Aus peripherem Blut isolierte CD4⁺ T-Zellen wurden für 60 Stunden **a)** mit OKT3-Antikörper aktiviert oder **b)** nicht-aktiviert in Kultur gehalten. Nachfolgend wurden diese T-Zellen für 0 Stunden [nur in **b)** gezeigt], für 9 Stunden [nur in **a)** gezeigt] bzw. für 24 Stunden mit IVA-wt infiziert und der Anteil toter Zellen im FACS ermittelt [Tote Zellen sind PI-positiv bzw. im linken Teil des FSC/SSC (*forward scatters/side scatters*) als rote Ellipsen markiert].

Aktivierte $CD4^+$ T-Zellen verhielten sich somit insgesamt ähnlich wie die untersuchten, transformierten Zelllinien, bei denen eine verlängerte Infektionsdauer und eine höhere MOI ebenfalls zu einer erhöhten Anzahl an GFP-, aber auch PI-positiven Zellen geführt hatte. Ruhende $CD4^+$ T-Zellen dagegen ließen sich kaum infizieren und führten auch nach längerer Infektionsdauer und bei höherer MOI zu einem nur geringfügig erhöhten Anteil an toten Zellen.

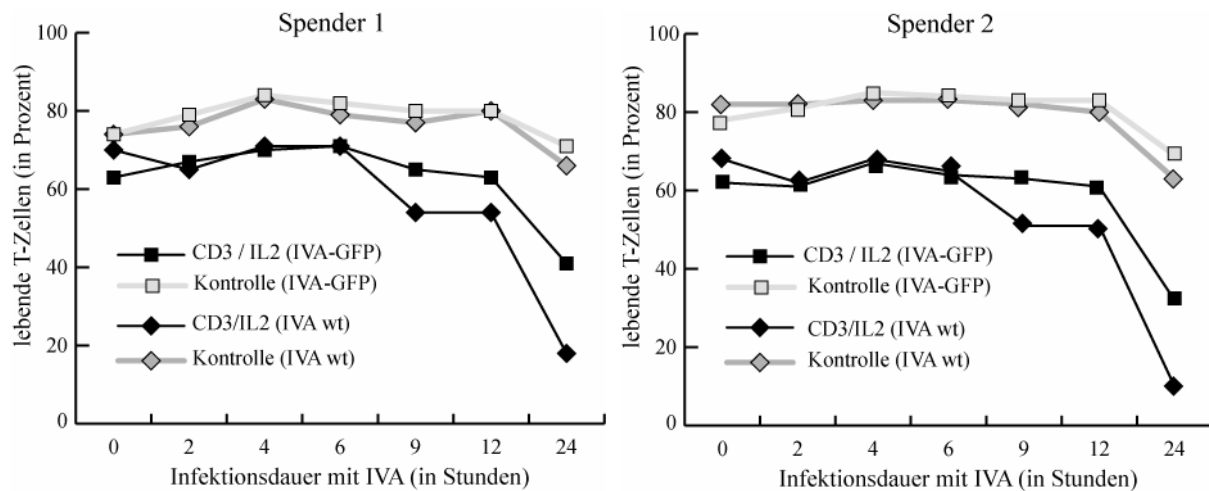


Abbildung 19. Eine längere Infektionsdauer erhöhte den Anteil toter Zellen in der aktivierten, aber kaum in der nicht-aktivierten T-Zellpopulation

Aus Blut isolierte $CD4^+$ T-Zellen wurden für 48 Stunden mit OKT-3-Antikörper aktiviert (CD3/IL2) oder nicht-aktiviert (Kontrolle) in Kultur gehalten und dann für 0 bis 24 Stunden mit IVA-GFP bzw. IVA-wt infiziert. Dargestellt ist das repräsentative Ergebnis für 2 Spender. In beiden Fällen nimmt der Anteil der mittels FACS als lebend definierten Zellen mit zunehmender Infektionszeit ab.

6.7. $CD4^+$ Gedächtnis-T-Zellen waren nach Aktivierung deutlich anfälliger für eine Infektion mit rekombinantem Influenzavirus Typ A als naive $CD4^+$ T-Zellen

Da in den bisherigen Experimenten selbst nach sehr starker Stimulation nie alle $CD4^+$ T-Zellen durch IVA infiziert wurden, stellte sich die Frage, ob möglicherweise nur bestimmte $CD4^+$ T-Zellsubpopulationen für eine IVA-Infektion anfällig sind.

$CD4^+$ T-Zellen im peripheren Blut werden unterteilt in naive Zellen, die noch keinen Antigenkontakt hatten und Gedächtnis (*memory*)-Zellen, die ihrem Antigen schon begegnet sind. Diese beiden Subpopulationen lassen sich über ihre Oberflächenmoleküle CD45RA (naiv) und CD45RO (Gedächtnis) unterscheiden und aufreinigen. Hierdurch bot sich die Gelegenheit zu untersuchen, ob es bei naiven $CD45RA^+$ $CD4^+$ T-Zellen und $CD45RA^-$ $CD4^+$ Gedächtnis-T-Zellen nach Aktivierung Unterschiede in der Anfälligkeit für eine Infektion mit IVA-GFP gab.

Um dieser Frage nachzugehen, wurden zunächst CD4⁺ T-Zellen durch MACS-Negativselektion aus PBMC aufgereinigt. In der Durchlauffraktion dieser Ansätze fanden sich bei Kontrollanalysen > 98 % CD3⁺ CD4⁺ T-Zellen. Die isolierten CD4⁺ T-Zellen wurden nachfolgend in naive (CD45RA⁺) und Gedächtnis-Zellen (CD45RA⁻) separiert. Die Reinheit der sortierten Populationen wurde mit Hilfe von anti-CD45RA- und anti-CD45RO-Antikörpern untersucht.

Wie in Abbildung 20 gezeigt, war eine komplette Trennung der beiden Subpopulationen mit dieser Methode nicht möglich. Allerdings gelang eine Anreicherung, die ausreichen sollte, um mögliche Unterschiede in der Infizierbarkeit der beiden Populationen zu detektieren. Spenderabhängig lag die Anreicherung der naiven T-Zellen (CD45RA⁺) bei 70 bis 90 %, die der Gedächtnis-T-Zellen (CD45RA⁻, aber CD45RO⁺) bei ca. 90 %.

Nachfolgend wurden die einzelnen CD4⁺ T-Zellpopulationen mit anti-CD3-Antikörper und IL-2 aktiviert. Das Mengenverhältnis von CD45RA⁺ und CD45RO⁺ Zellen blieb auch nach der Aktivierung erhalten (Abbildung 20b). Eine Veränderung des Verhältnisses von naiven zu Gedächtnis-T-Zellen nach Aktivierung wäre z. B. bei Proliferation der schon voraktivierten Gedächtnis-T-Zellen durchaus denkbar gewesen und hätte die Aussage über die Infizierbarkeit der beiden Einzelpopulationen verfälscht.

Um den Einfluss der Aktivierungsdauer zu studieren, wurden die CD45RA bzw. CD45RO angereicherten CD4⁺ T-Zellen von 2 verschiedenen Spendern den gleichen Kinetiken unterzogen, wie die unseparierten CD4⁺ T-Zellen. Die Zellen wurden hierfür für 0 bis 84 Stunden aktiviert und dann sofort infiziert (Abbildung 21). Dies lieferte für beide Spender jeweils ähnliche Ergebnisse. Zum einen konnte weder bei den naiven noch bei den Gedächtnis-T-Zellen eine signifikante Infektion nicht-aktivierter Zellen verzeichnet werden. Zum anderen zeigte sich bei den aktivierten Zellen ein deutlicher Unterschied zwischen naiven und Gedächtnis-T-Zellen. Die naiven CD4⁺ T-Zellen waren nach 72-stündiger Aktivierung zu 14 % und nach 84-stündiger Aktivierung zu 14 bis 18 % infizierbar. Die aktivierten Gedächtnis-T-Zellen hingegen wiesen 72 und 84 Stunden nach Aktivierungsbeginn eine Infizierbarkeit von über 30 % bzw. über 45 % auf. Wenn zudem in Betracht gezogen wird, dass die Aufreinigung der naiven T-Zellen nicht vollständig funktioniert hatte (70 bis 90 % Reinheit) und dementsprechend mit einer Kontamination von mehr als 10 % Gedächtnis-T-Zellen in der naiven, CD45RA⁺ Fraktion zu rechnen war, ist es möglich, dass der Unterschied zwischen naiven und Gedächtnis-T-Zellen in Wirklichkeit noch größer war.

Auffällig war darüber hinaus, dass die Gedächtnis-T-Zellen bereits früher nach Aktivierung anfällig für eine IVA-Infektion wurden als naive T-Zellen. Aus diesem Grund sollte eine Anschlusskinetik die Frage klären, ob es bei naiven und Gedächtnis-T-Zellen Unterschiede gab bezüglich der Stimulationsdauer, die für eine Infektion notwendig war. Hierzu wurden Experimente in Anlehnung an Abschnitt 6.5.3. (Seite 59) durchgeführt. CD45RA⁺ bzw. CD45RA⁻ CD4⁺ T-Zellen wurden für 0 bis 72 Stunden aktiviert und anschließend ohne Stimulus bis zur zeitgleichen Infektion mit IVA-GFP nach 72 Stunden weiter kultiviert. Die Infektion mit IVA-GFP lief über 9 Stunden (Abbildung 22).

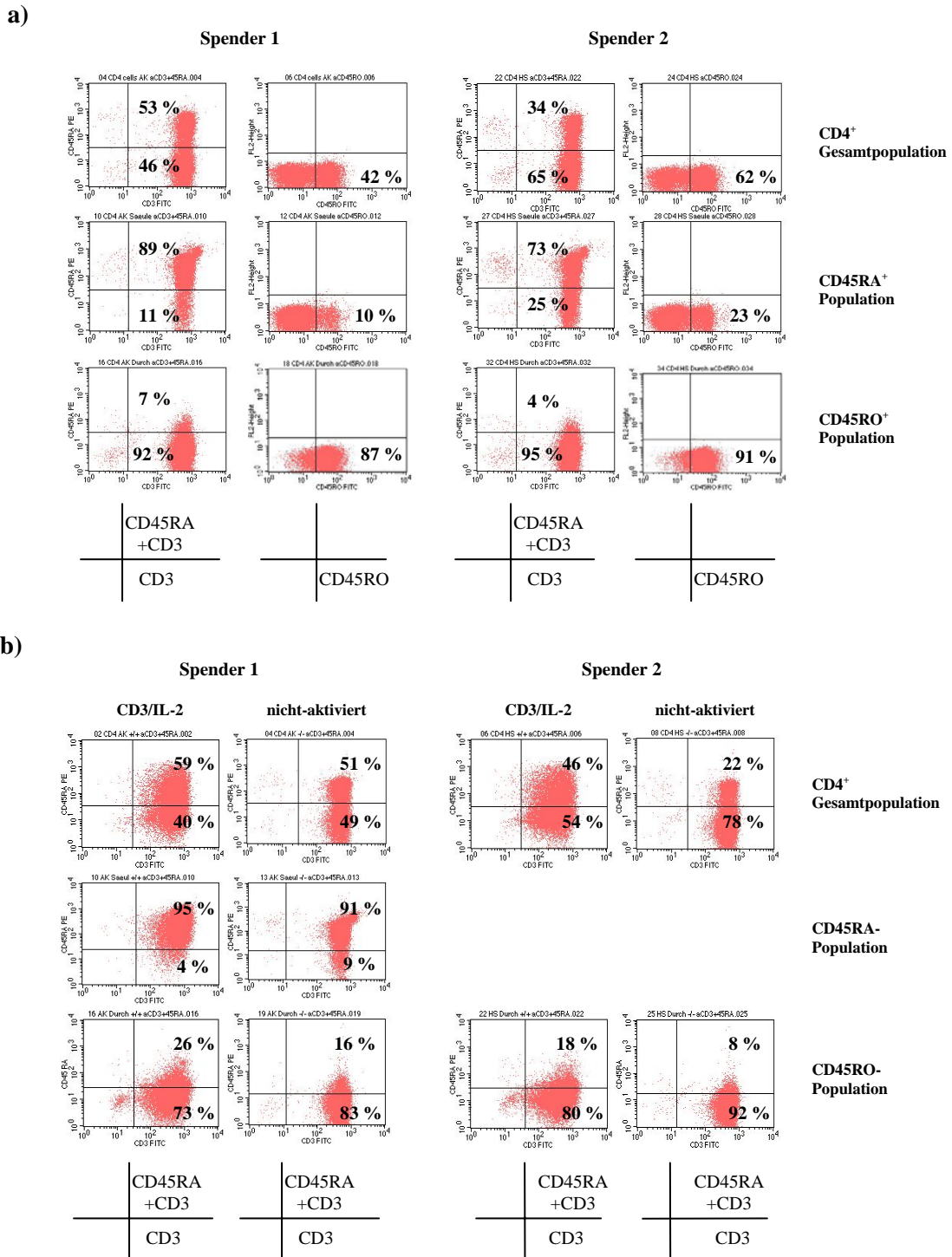


Abbildung 20. Separation von CD45RA⁺ CD4⁺ und CD45RO⁺ CD4⁺ T-Zellen

Aus PBMC wurden CD4⁺ T-Zellen mittels einer CD4-MACS-Negativselektion aufgereinigt und mit einer nachfolgenden MACS-Positivselektion in CD45RA⁺ CD45 RO⁻ naive und CD45RA⁻ CD45 RO⁺ Gedächtnis-T-Zellen separiert. Gezeigt sind repräsentative Ergebnisse für 2 Spender. **a)** Der Erfolg dieser MACS-basierten Trennung der beiden Populationen wurde durch Färbung der Zellen mit spezifischen Antikörpern gegen CD3 (FITC-gekoppelt) sowie CD45RA und CD45RO (PE-gekoppelt) im FACS verifiziert. **b)** In einer zweiten Reihe von Experimenten wurden die isolierten CD4⁺ Populationen nach 72-stündiger Aktivierung mit OKT3-Antikörpern im FACS auf eine Expression von CD3 und CD45RA untersucht, um zu dokumentieren, dass die erfolgte Aktivierung die Mengenverhältnisse in den einzelnen Subpopulationen kaum verändert hatte.

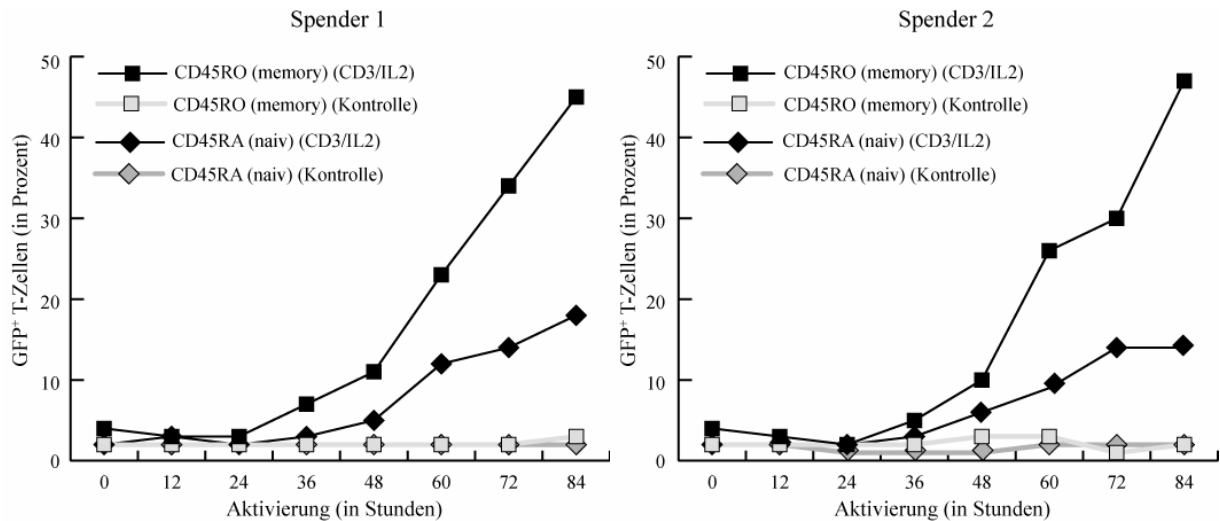


Abbildung 21. Aktivierte CD4⁺ Gedächtnis-T-Zellen ließen sich deutlich besser mit rekombinantem Influenzavirus Typ A infizieren als CD4⁺ naive T-Zellen

Aus dem peripheren Blut isolierte CD45RA⁺ CD45 RO⁻ naive und CD45RA⁻ CD45 RO⁺ Gedächtnis (*memory*) - T-Zellen wurden für 0 bis 84 Stunden mit OKT3-Antikörper und IL-2 stimuliert oder nicht stimuliert, dann 9 Stunden mit IVA-GFP infiziert und abschließend im FACS untersucht. Die maximale Infektionsrate wurde nach 72 bis 84 Stunden erreicht.

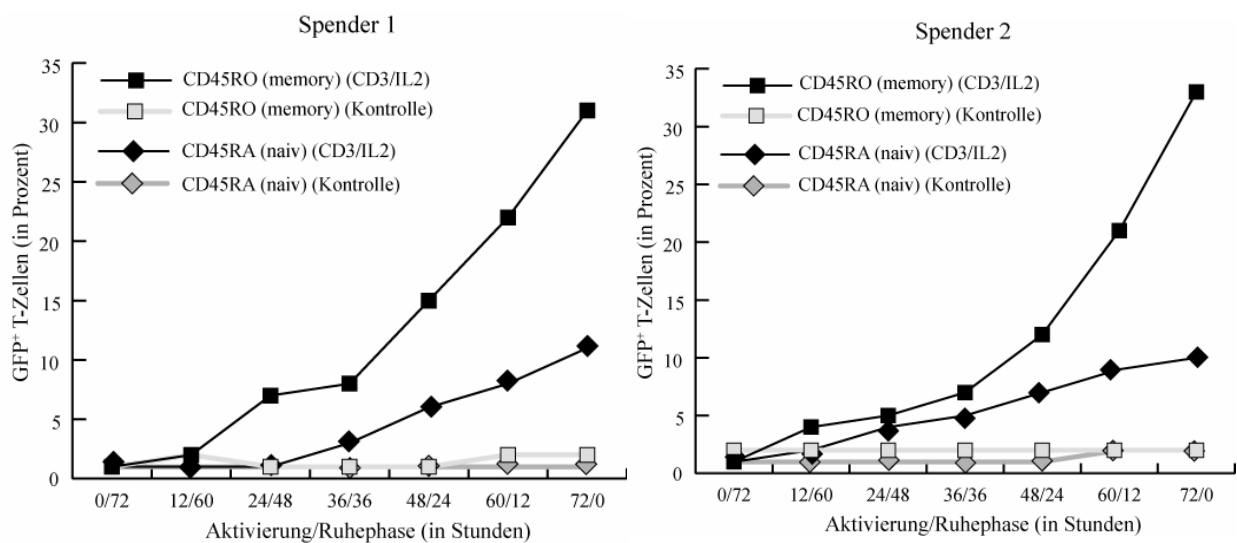


Abbildung 22. Mit zunehmender Aktivierungsdauer stieg die Infizierbarkeit mit rekombinantem Influenzavirus Typ A für CD4⁺ Gedächtnis-T-Zellen deutlicher an als für naive CD4⁺ T-Zellen

CD45RA⁺ CD45 RO⁻ naive und CD45RA⁻ CD45 RO⁺ Gedächtnis (*memory*)-T-Zellen von 2 verschiedenen Spendern wurden für 0 bis 72 Stunden mit anti-CD3-Antikörper aktiviert, dann dem Stimulus entzogen und für 72 Stunden abzüglich der Aktivierungszeit in nicht-aktivierendem Medium kultiviert. Danach wurden alle T-Zellen für 9 Stunden mit IVA-GFP infiziert und im FACS vermessen. Die Infizierbarkeit korrelierte bei beiden Populationen der beiden Spender mit der Aktivierungsdauer und war bei Gedächtnis-T-Zellen ausgeprägter.

Auch bei der differentiellen Analyse der Aktivierungsdauer ließen sich die CD45RA⁻ CD45RO⁺ Gedächtnis-T-Zellen weitaus besser infizieren als die CD45RA⁺ CD45RO⁻ naive Population der CD4⁺ T-Zellen. Die jeweils maximalen Infektionsraten lagen bei 30 % bzw. 10 %. Ähnlich wie für die CD4⁺ Gesamtpopulation (vgl. Abbildung 14) stieg auch bei den beiden Subpopulationen der Anteil der infizierbaren Zellen mit steigender Aktivierungsdauer bzw. kürzerer Ruhephase an, bei naiven CD4⁺ T-Zellen jedoch in geringerem Maße.

6.8. CD4⁺ T-Zellen, infiziert mit rekombinantem Influenzavirus Typ A, exprimierten das Oberflächenantigen CD25, ohne dass alle CD25⁺ T-Zellen infiziert wurden

Die im Vergleich zu naiven T-Zellen deutlich höheren Infektionsraten bei Gedächtnis-T-Zellen bestätigte die Hypothese, dass bestimmte Subpopulationen der CD4⁺ T-Zellen besonders anfällig für die IVA-Infektion sein könnten. Jedoch wurden wiederum nicht alle Zellen der Subpopulationen infiziert, so dass sich die Frage stellte, ob weitere Untergruppen mit besonders hoher Infektionsanfälligkeit identifiziert werden konnten. Zusätzliche Experimente zielten deshalb darauf ab, Zusammenhänge zwischen der Infektionsanfälligkeit und der Expression weiterer Oberflächenmoleküle der CD4⁺ T-Zellen aufzudecken.

Auf der Suche nach diesen Markern wurden aufgereinigte CD4⁺ T-Zellen für 24 bis 72 Stunden aktiviert, mit IVA-GFP infiziert und mittels spezifischer Antikörper im FACS auf die Expression verschiedener Oberflächenmarker hin untersucht. Das Augenmerk lag auf einer möglichen Korrelation der GFP-Expression bzw. IVA-GFP-Infektion mit der Expression bestimmter Oberflächenmarker, sowie der gleichzeitigen Detektion einer Zellpopulation, welche keine Grünfluoreszenz und auch keine Oberflächenexpression des untersuchten Marker zeigte. Eingesetzt wurden Antikörper gegen die Oberflächenmarker OX40 (CD134), CD40L (CD154), CD28 und CD25, da für diese Marker eine aktivierungsabhängige bzw. T-Zell-populationsabhängige Expression vorbeschrieben war.

Während die Oberflächenexpression der meisten verwendeten Marker kaum oder nur sehr schwach mit der IVA-GFP-Infektion der untersuchten CD4⁺ T-Zellen korrelierte, wurde für CD25 ein deutlicherer Zusammenhang beobachtet. Bereits 48 Stunden, aber besonders 60 Stunden nach Aktivierung, waren nach IVA-GFP-Infektion und Färbung mit einem PE-gekoppelten anti-CD25-Antikörper 2 Populationen zu erkennen. Die CD25⁻ Zellen waren auch GFP-negativ, wohingegen sich die CD25⁺ Zellen zu über 40 % GFP-positiv zeigten. Mit längerer Infektionsdauer (24 anstelle von 9 Stunden) konnte der Anteil an GFP-positiven CD25⁺ CD4⁺ T-Zellen auf > 60 % erhöht werden. Bei den CD25⁻ CD4⁺ T-Zellen war hingegen mit steigender Infektionszeit kein signifikanter Anstieg der GFP-Positivität zu beobachten (Abbildung 23).

Zusammenfassend bedeuten diese Befunde, dass die IVA-GFP-infizierten CD4⁺ T-Zellen CD25⁺ waren. Der Umkehrschluss, dass alle CD25⁺ Zellen mit IVA-GFP infiziert wurden galt jedoch nicht.

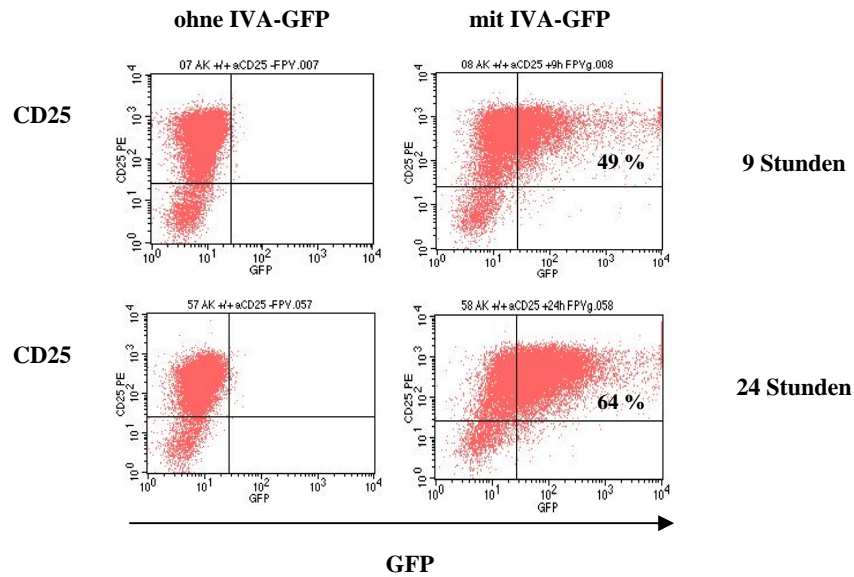


Abbildung 23. CD4⁺ T-Zellen, die mit rekombinantem Influenzavirus infiziert wurden, exprimierten das Oberflächenantigen CD25, ohne dass alle CD25⁺ T-Zellen infiziert wurden

CD4⁺ T-Zellen wurden für 60 Stunden mit OKT3-Antikörper aktiviert und nachfolgend für 9 bzw. 24 Stunden mit IVA-GFP infiziert. Danach wurden die Zellen mit einem CD25-spezifischen, PE-gekoppelten Antikörper gefärbt und im FACS untersucht.

6.9. Auch CD8⁺ T-Zellen wurden nach Aktivierung anfällig für eine Infektion mit Influenzavirus Typ A

Aufgrund der Bedeutung der CD4⁺ T-Zellen im Rahmen der IVA-Infektion lag der Hauptfokus der Untersuchung der aktivierungsabhängigen Infektion von T-Zellen zunächst auf CD4⁺ T-Zellen. Es war jedoch naheliegend, diese Fragestellung auch auf den anderen wichtigen Zweig der T-Zellimmunantwort auszudehnen und CD8⁺ T-Zellen zu untersuchen. Dafür wurden die gewonnenen Erkenntnisse in Bezug auf geeignete Parameter und Methodik zur Analyse einer IVA-Infektion auf über MACS-isolierte, CD8⁺ T-Zellen angewandt. Die Aufreinigung dieser Zellen war nicht so effizient wie die für CD4⁺ T-Zellen, jedoch konnte auch hier regelmäßig eine Reinheit von > 90 % erzielt werden (Abbildung 24).

Die isolierten CD8⁺ T-Zellen wurden zunächst mit verschiedenen Mengen anti-CD3-Antikörper aktiviert, um den Zusammenhang zwischen Aktivierungsstärke (gemessen als IFN- γ -Konzentration im Zellkulturüberstand) und der Infizierbarkeit mit IVA-GFP zu untersuchen. Die Ergebnisse der IFN- γ -ELISA und der FACS-Analysen zur Infektion von aktivierten CD8⁺ T-Zellen mit IVA-GFP (MOI = 3) sind in Abbildung 25 zusammengefasst. Zum Vergleich wurden parallel auch CD4⁺ T-Zellen derselben Spender untersucht.

Die Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen mit steigenden Mengen an anti-CD3-Antikörpern führte zu einem ähnlich ausgeprägten Anstieg der IFN- γ -Konzentration im Zellkulturüberstand wie bei den CD4⁺

T-Zellen. Die IFN- γ -Konzentrationen in den Kulturüberständen der CD8⁺ T-Zellen waren jedoch – vor allem beim Einsatz geringer Antikörpermengen – bis zu doppelt so hoch (Abbildung 25a). Ebenso wie bei CD4⁺ T-Zellen wurde bei Einsatz von 0,05 bis 0,1 μ g OKT3-Antikörper pro Ansatz ein Plateau erreicht. Allein aufgrund der ähnlichen IFN- γ -Ausschüttung wäre eine IVA-GFP-Anfälligkeit der CD8⁺ T-Zellen vergleichbar mit der von CD4⁺ T-Zellen oder sogar stärker zu erwarten gewesen. Dies war jedoch nicht der Fall (Abbildung 25b). Die CD8⁺ T-Zellen waren bei gleicher Aktivierung maximal halb so gut infizierbar wie die CD4⁺ T-Zellen (10 bis 25 % gegenüber 30 bis 50 % GFP-positive Zellen), meist sogar wesentlich schlechter.

Diese Ergebnisse ließen vermuten, dass die Kinetik der Aktivierung und IVA-GFP-Infektion von aktivierten CD8⁺ T-Zellen möglicherweise signifikante Unterschiede zu der von aktivierten CD4⁺ T-Zellen aufwies. Ruhende CD8⁺ T-Zellen verhielten sich wie ruhende CD4⁺ T-Zellen und waren kaum infizierbar.

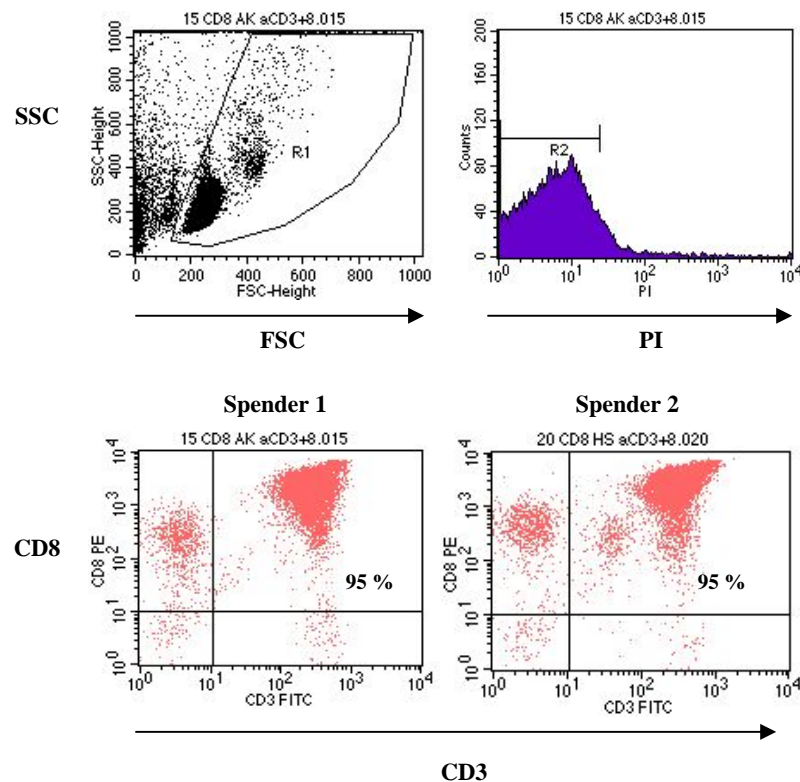


Abbildung 24. Über MACS-Positivselektion aufgereinigte CD8⁺ T-Zellen zeigten eine Reinheit von ca. 95 %

Aus PBMC isolierte CD8⁺ Zellen wurden mit FITC-gekoppelten, CD3- und PE-gekoppelten, CD8-spezifischen Antikörpern gefärbt und im FACS untersucht (FSC/SSC: *forward scatter/side scatter*).

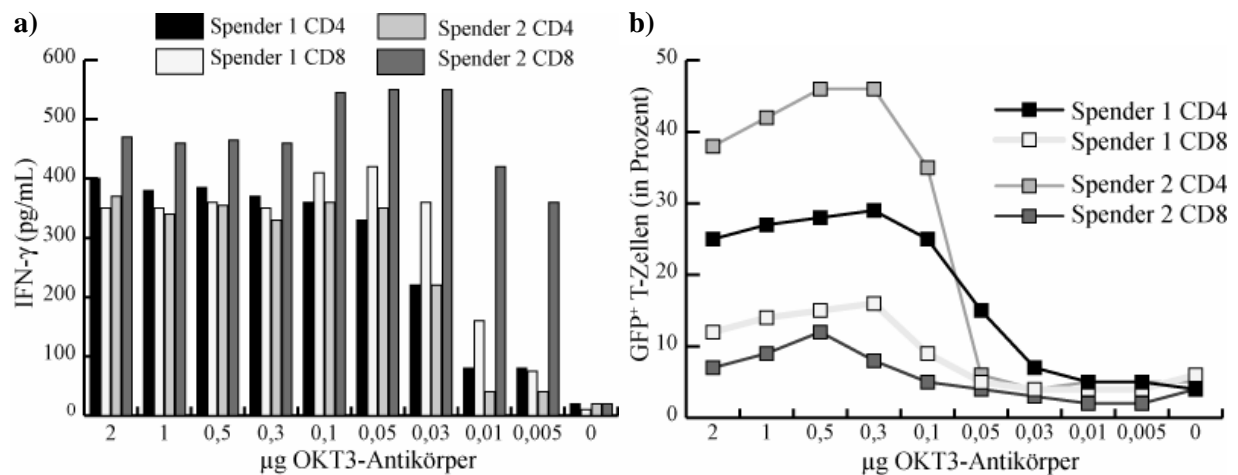


Abbildung 25. Aktivierungsabhängige Infizierbarkeit von CD8 $^+$ T-Zellen

Aus peripherem Blut isolierte CD8 $^+$ und CD4 $^+$ T-Zellen wurden mit verschiedenen Mengen an OKT-3-Antikörper stimuliert. **a)** 24 Stunden nach Start der Aktivierung wurde die IFN- γ -Konzentration im Zellkulturüberstand mittels ELISA gemessen. **b)** 60 Stunden nach Start der Aktivierung wurden die T-Zellen mit IVA-GFP infiziert und die Infektionsrate im FACS analysiert.

Um einen tieferen Einblick in die Aktivierung und Infizierbarkeit von CD8 $^+$ T-Zellen zu erlangen, wurde nachfolgend eine weitere Kinetik durchgeführt. CD8 $^+$ T-Zellen wurden aus peripherem Blut isoliert, für 0 bis 72 Stunden mit 0,3 μg OKT3-Antikörper pro Ansatz aktiviert (größere Mengen führten zu abnehmender Infizierbarkeit) und nachfolgend für 9 Stunden mit IVA-GFP infiziert. Bereits 48 Stunden nach Beginn der Aktivierung waren mehr als 50 % der stimulierten CD8 $^+$ T-Zellen tot, nach einer anschließenden Infektion mit IVA-GFP sogar mehr als 60 % (Daten nicht gezeigt).

Aus diesem Grund wurden die CD8 $^+$ T-Zellen in weiteren Experimenten für nur 48 Stunden aktiviert, für 0 bis 24 Stunden mit IVA-GFP infiziert und anschließend im FACS analysiert (Abbildung 26). Diese Experimente ergaben, dass auch bei aktivierten CD8 $^+$ T-Zellen der Anteil an GFP-positiven Zellen mit der Länge der Infektionsdauer zunahm. Nicht-aktivierte CD8 $^+$ T-Zellen wurden selbst 24 Stunden nach Infektion mit IVA-GFP nicht wesentlich besser infiziert als nach ≤ 4 Stunden. Dementsprechend gilt das Phänomen der aktivierungsabhängigen Infektion mit IVA-GFP auch für CD8 $^+$ T-Zellen (Abbildung 26a). Allerdings waren CD4 $^+$ T-Zellen nach gleicher Aktivierung und Infektion zwei- bis fünfmal besser infizierbar (siehe Abbildung 17). Die MFI war bei CD8 $^+$ T-Zellen um den Faktor 2 bis 3 niedriger als bei CD4 $^+$ T-Zellen und sank nach einem Maximum bei 6-stündiger Infektionsdauer wieder ab (Abbildung 26b).

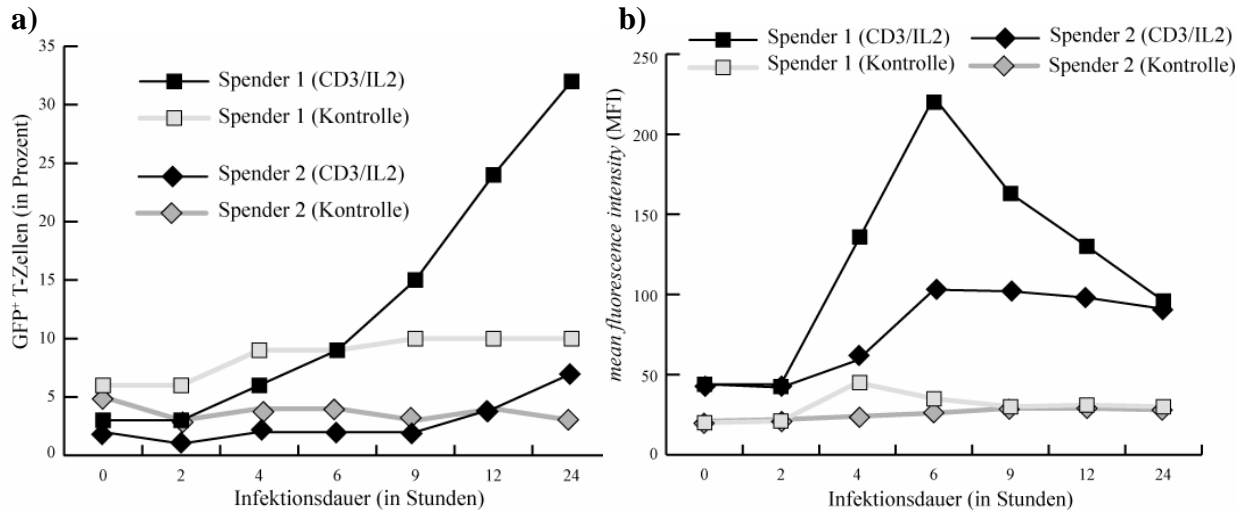


Abbildung 26. Aktivierte CD8⁺ T-Zellen zeigten nach Infektion mit rekombinantem Influenzavirus Typ A eine erhöhte, jedoch nicht so hohe GFP-Fluoreszenz wie CD4⁺ T-Zellen

Aus peripherem Blut aufgereinigte CD8⁺ T-Zellen wurden für 48 Stunden mit OKT3-Antikörper und IL2 aktiviert (CD3/IL2) oder nicht-aktiviert (Kontrolle) in Kultur gehalten und nachfolgend für 0 bis 24 Stunden mit IVA-GFP infiziert. Die Analyse der GFP-positiven T-Zellen erfolgte im FACS. Dargestellt ist **a)** der Anteil GFP-positiver Zellen und **b)** die MFI in Abhängigkeit von der Infektionsdauer.

Zusätzlich wurde auch der IVA-induzierte Zelltod untersucht. Hierzu wurden IVA-GFP oder IVA-wt verwendet, um 48 Stunden aktivierte CD8⁺ T-Zellen für 0 bis 24 Stunden zu infizieren (Abbildung 27). Diese Experimente ergaben, dass CD8⁺ T-Zellen nach 48 Stunden Aktivierung einen weitaus größeren Prozentsatz an toten Zellen aufwiesen als CD4⁺ T-Zellen. Während bei CD4⁺ T-Zellen der Anteil an toten Zellen bei nicht-aktivierten und für 48 Stunden-aktivierten Zellen vergleichbar war (Abbildung 19), zeigten aktivierte im Vergleich zu nicht-aktivierten CD8⁺ T-Zellen > 50 % mehr Zelltod. Dieser Unterschied vergrößerte sich darüber hinaus noch weiter nach Zugabe von IVA-GFP. Wie auch für CD4⁺ T-Zellen beobachtet (Abbildung 18/19), war dieser Unterschied noch ausgeprägter, wenn IVA-wt verwendet wurde. Aktivierte, nicht-infizierte CD8⁺ T-Zellen zeigten innerhalb der 24 Stunden keinen weiteren Anstieg der toten Zellen (Daten nicht gezeigt), so dass der Zelltod, wie bei CD4⁺ T-Zellen, durch die Infektion und nicht durch die Aktivierung der T-Zellen oder die *in vitro*-Kultur ausgelöst wurde.

Zusammengefasst verdeutlichen diese Experimente, dass auch CD8⁺ T-Zellen nach Aktivierung viel anfälliger für eine IVA-Infektion und vor allem für einen IVA-induzierten Zelltod waren. Ruhende CD8⁺ T-Zellen zeigten diese erhöhte Anfälligkeit, ähnlich wie ruhende CD4⁺ T-Zellen, in viel geringerem Ausmaß (Abbildung 27).

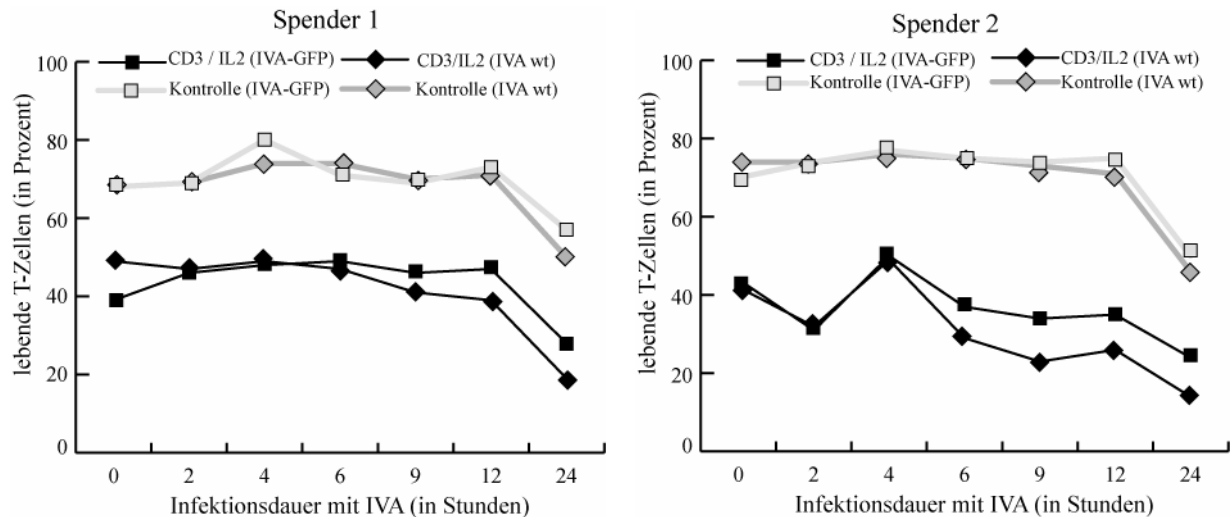


Abbildung 27. Aktivierte CD8⁺ T-Zellen starben rasch nach Infektion mit rekombinantem Influenzavirus Typ A, während ruhende CD8⁺ T-Zellen wesentlich resistenter waren.

CD8⁺ T-Zellen wurden für 48 Stunden mit OKT3-Antikörper und IL2 aktiviert (CD3/IL2) oder nicht-aktiviert (Kontrollen) in Kultur gehalten und dann für 0 bis 24 Stunden mit IVA-GFP oder IVA-wt infiziert. Dargestellt ist der durch FACS ermittelte Anteil lebender Zellen nach der jeweiligen Infektionsdauer.

6.10. Auch B-Zellen ließen sich aktivierungsabhängig mit Influenzavirus Typ A infizieren

Wie in Abbildung 6 dargestellt, zeigten ruhende B-Zellen eine nur geringe Infektion mit IVA-GFP. Im Gegensatz dazu waren LCL sehr gut infizierbar, was als Hinweis auf eine aktivierungsabhängige Infektionsanfälligkeit angesehen werden könnte. Als weiterer wichtiger Zelltyp der adaptiven Immunantwort war deshalb auch für B-Zellen die Untersuchung einer aktivierungsabhängigen Infektion mit IVA sehr interessant. Zu diesem Zweck wurden B-Zellen mittels CD19-MACS aus PBMC isoliert und mit oder ohne Aktivierung einer IVA-GFP-Infektion zugeführt (Abbildung 28).

Um eine aktivierungsabhängige Infektion von B-Zellen zu untersuchen, wurden aus primären B-Zellen durch die wöchentliche Stimulation mit CD40L und IL-4 sogenannte B-Blasten generiert. Diese wurden zunächst per FACS auf B-Zell-typische Oberflächenmarker hin untersucht (Abbildung 28a). Die B-Blasten waren > 95 % positiv für die B-Zellmarker CD19 und CD20, und für HLA-DR, welches als Marker für APC gilt. Um eine Aktivierung der B-Zellen zu erreichen, wurden sie 7 Tage nach der letzten Stimulation entweder mit CD40L, mit IL-4 oder mit einer Kombination der beiden stimuliert. 2 Tage nach Aktivierung wurden die Zellen für 9 Stunden mit IVA-GFP infiziert (MOI = 3). Um die B-Blasten im FACS von potentiell noch vorhandenen, CD40L-exprimierenden Stimulatorzellen (L1) unterscheiden zu können, wurden sie nach der Infektion mittels anti-HLA-DR-Antikörper gefärbt. Die murine Zelllinie L1 ist HLA-DR-negativ (Abbildung 28a). Als Negativkontrolle wurden unbehandelte B-Blasten sowie frisch isolierte primäre B-Zellen und als

Positivkontrolle LCL mitgeführt. Wie erwartet ließen sich LCL gut und primäre B-Zellen nur marginal mit IVA-GFP infizieren. Unstimulierte B-Blasen (Tag 9) sowie Blasen, die entweder mit CD40L oder mit IL-4 stimuliert worden waren, wiesen ebenfalls keine signifikante Infizierbarkeit auf. Dagegen zeigten B-Blasen, welche über 2 Tage mit einer Kombination von CD40L und IL-4 behandelt worden waren, erhöhte Infektionsraten (Abbildung 28b).

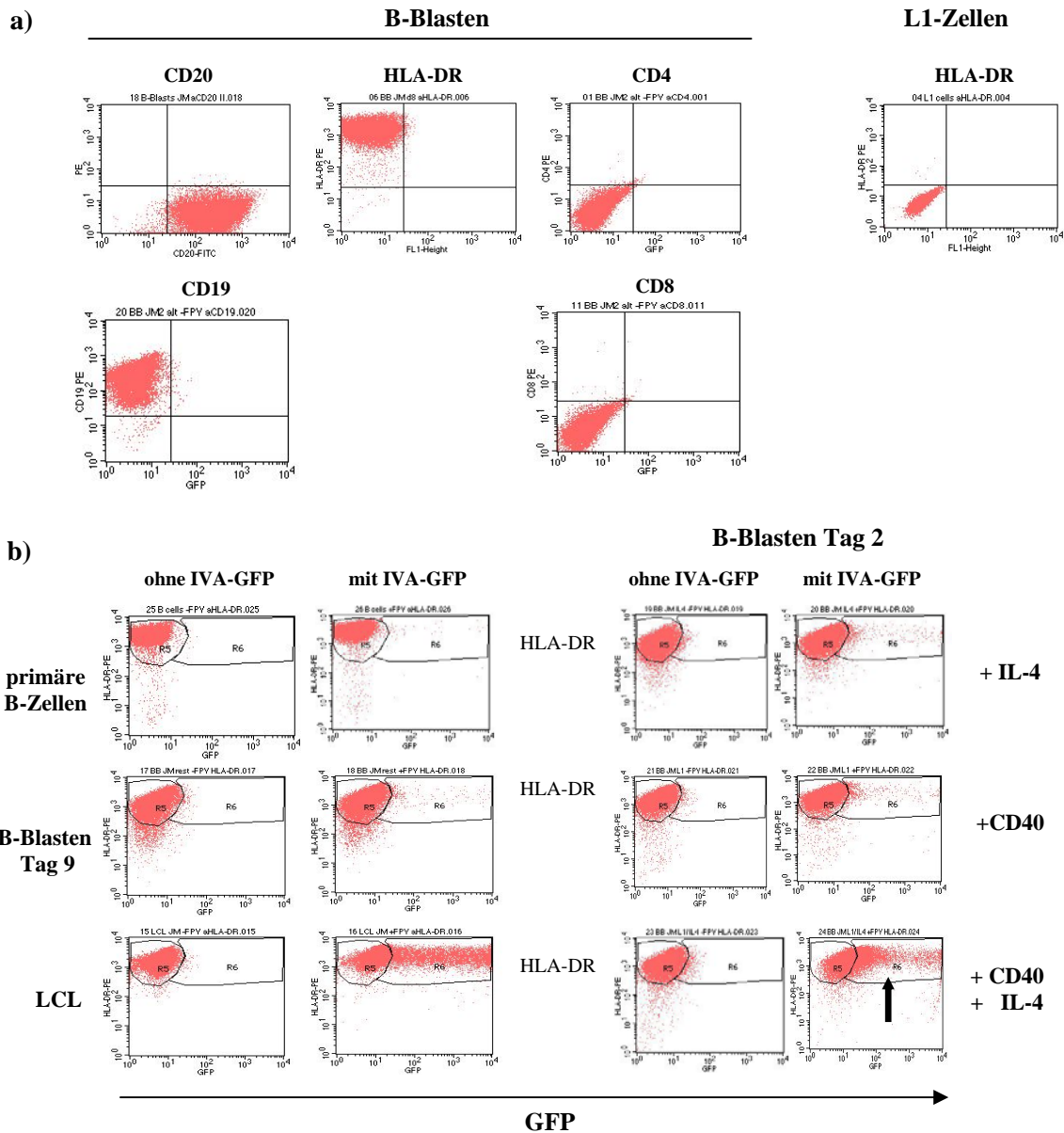


Abbildung 28. Auch B-Zellen wurden aktivierungsabhängig von IVA-GFP infiziert

a) Durch mehrfach wöchentliche Stimulation von CD19-selektierten B-Zellen aus dem peripherem Blut mit CD40L-exprimierenden L1-Zellen und IL-4 wurden B-Blasen generiert und diese nach Färbung mit B-Zell-spezifischen (anti-CD20-FITC, anti-CD19-PE), T-Zell-spezifischen (antiCD4-PE, anti-CD8-PE) und APC-spezifischen Antikörpern (anti-HLA-DR-PE) im FACS analysiert. Gleichzeitig wurde auch die Expression von HLA-DR auf den L1-Stimulatorzellen untersucht. **b)** Frisch isolierte B-Zellen, unstimulierte B-Blasen (Tag 9 nach der letzten Stimulation) und LCL sowie mit CD40L, IL-4 oder einer Kombination der beiden über 2 Tage stimulierte B-Blasen (Tag 2) wurden für 9 Stunden mit IVA-GFP infiziert oder nicht infiziert und nach HLA-DR-Färbung im FACS analysiert. Gemessen wurde der Anteil HLA-DR- und/oder GFP-positiver Zellen (Pfeil = GFP-positive B-Blasen).

In weiterführenden, nicht gezeigten Experimenten wurde nachfolgend eine Reihe von B-Blasten verwendet, welche schon mehr als 150 Tage in Kultur waren und nachweislich während dieser Zeit ihren EBV-negativen Status behalten hatten („Langzeit-B-Blasten“). Mit diesen Experimenten sollte verifiziert werden, dass die erhaltenen Ergebnisse nach Kurzzeitstimulation wirklich auf die gegebenen Stimuli und nicht auf Auswachsen von EBV-positiven Zellen zurückzuführen waren.

Die „Langzeit-B-Blasten“ wurden zunächst an Tag 2 bzw. Tag 9 nach Restimulation mit IVA-GFP infiziert und der Anteil von GFP-positiven Zellen im FACS gemessen. Die Tendenz, dass B-Zellen am Tag 2 nach Stimulation besser infizierbar waren als am Tag 9 nach Stimulation, bestätigte sich auch mit den „Langzeit-B-Blasten“. Der Unterschied in der Infizierbarkeit von restimulierten zu nicht-restimulierten B-Blasten lag zwischen Faktor 3 und 10.

Die Differenzen bezüglich der Infizierbarkeit der „Langzeit-B-Blasten“ waren einen Tag später, d.h. an Tag 3 bzw. Tag 10 nach Stimulation, schon sehr viel geringer und bei einigen B-Blastenlinien kaum noch detektierbar. Die könnte darauf hinweisen, dass die aktivierungsabhängige Infizierbarkeit von B-Blasten sehr schnell wieder verloren gegangen war.

Möglicherweise bewirkte die Stimulation über CD40 und den IL-4-Rezeptor ein vergleichsweise schwächeres oder kurzzeitigeres Aktivierungssignal als die Stimulation des T-Zellrezeptors durch den OKT3-Antikörper. Ob eine Stimulation des B-Zellrezeptors zu ähnlichen Infektionsraten wie bei T-Zellen führen kann, ist momentan noch ungeklärt. Dennoch zeigten diese Experimente, dass B-Zellen nach Stimulation mit CD40L und IL-4 unabhängig vom EBV-Status eine erhöhte Anfälligkeit für eine Infektion mit IVA aufwiesen.

6.11. Die Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen mittels *mixed lymphocyte reactions* führte zu einer erhöhten Anfälligkeit für eine Infektion mit Influenzavirus Typ A

Die bisher verwendeten Stimuli zur Aktivierung von T-Lymphozyten waren artifiziell. Um experimentell zu überprüfen, ob eine Aktivierung von T-Zellen über physiologische Stimuli ebenfalls zu einer deutlich erhöhten Infizierbarkeit führte, wurden sogenannte *mixed lymphocyte reactions* (MLR) durchgeführt. Hierbei wird ausgenutzt, dass etwa 10 % der T-Zellen eines Individuums gegen APC eines Spenders mit nicht-identischem HLA-Typus reagieren. Diese allogene Reaktivität der T-Zellen beruht auf der Erkennung von „fremden“ HLA-Molekülen. Die mit Abstand potentesten APC sind DC, da diese in hohem Maße MHC-Moleküle und co-stimulatorische Moleküle exprimieren, welche nicht nur für die Antigenerkennung, sondern auch für eine Aktivierung der T-Zellen essentiell sind.

Aus diesem Grund wurden DC aus peripherem Blut isoliert, *in vitro* gereift, mittels FACS phänotypisiert (Abbildung 29) und schließlich in nachfolgenden MLR zur zellbasierten Aktivierung von T-Zellen eingesetzt (Abbildung 30).

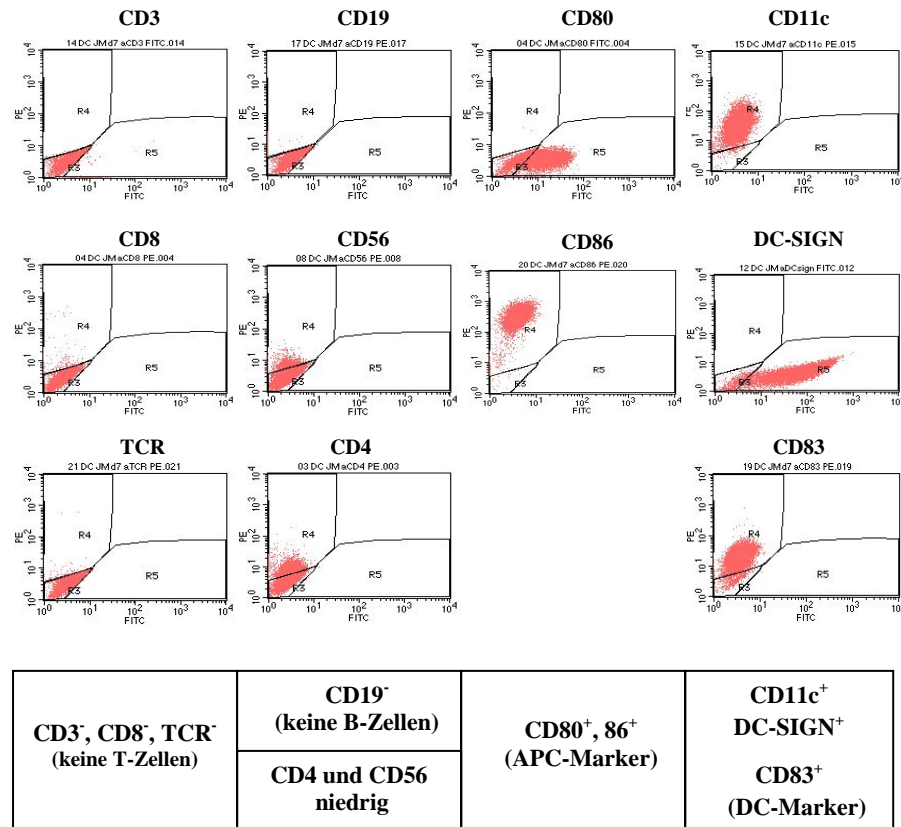


Abbildung 29. Phänotyp der generierten Dendritischen Zellen

Aus PBMC generierte DC wurden nach ihrer Reifung mittels spezifischer, FITC (CD3, CD80 und DC-SIGN) oder PE (CD4, CD8, CD11c CD19, CD56, CD83, CD86 und TCR)-gekoppelter Antikörper auf die angegebenen Oberflächenmarker hin untersucht. Die Tabelle unterhalb der Abbildung fasst die erhaltenen Ergebnisse zusammen.

Abbildung 29 zeigt, dass die generierten DC eine Vielzahl von DC-typischen Oberflächenmolekülen aufwiesen, hierunter auch die co-stimulatorischen Marker CD80 und 86 sowie die DC-Marker DC-SIGN, CD11c und CD83. T- und B-Zellmarker wurden nicht detektiert, so dass von einer guten Reinheit der DC ausgegangen werden konnte.

Diese DC wurden anschließend dazu verwendet, entweder eigene (autologe) CD4⁺ T-Zellen oder fremde (allogene) CD4⁺ T-Zellen eines unverwandten Spenders zu stimulieren. Die CD4⁺ T-Zellen wurden für diesen Zweck wie oben beschrieben aus PBMC isoliert. In Abbildung 30 ist exemplarisch ein repräsentatives Beispiel der Experimente gezeigt, bei denen DC von Spender 1 mit CD4⁺ T-Zellen von Spender 1 (autolog) oder Spender 2 (allogen) co-kultiviert wurden. In einem inversen Ansatz wurden DC von Spender 2 verwendet, um CD4⁺ T-Zellen von Spender 2 (autolog) oder Spender 1 (allogen) zu stimulieren. Um Unterschiede visualisieren zu können, wurde im FSC/SSC auf aktivierte CD4⁺ T-Zellen eingestellt (*Gate* R7). Die so selektierten, aktivierten CD4⁺ T-Zellen zeigten eine erhöhte Anfälligkeit für eine Infektion mit IVA-GFP. Dies war sowohl im autologen als auch im allogenen Kontext der Fall. Allogene Kulturen wiesen jedoch in beiden Fällen eine höhere Anzahl an aktivierten und auch infizierten CD4⁺ T-Zellen auf als die autologen Ansätze.

Eine Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen mittels anti-CD3-Antikörpern und gleichzeitiger Co-Kultur mit allogenen DC zeigte keinen signifikant additiven Effekt bezüglich der Infizierbarkeit der T-Zellen mit IVA-GFP (Daten nicht gezeigt). Dies deutete darauf hin, dass beide Stimulationsmethoden eine maximale Aktivierung desselben Signalweges der T-Zellen bewirkten.

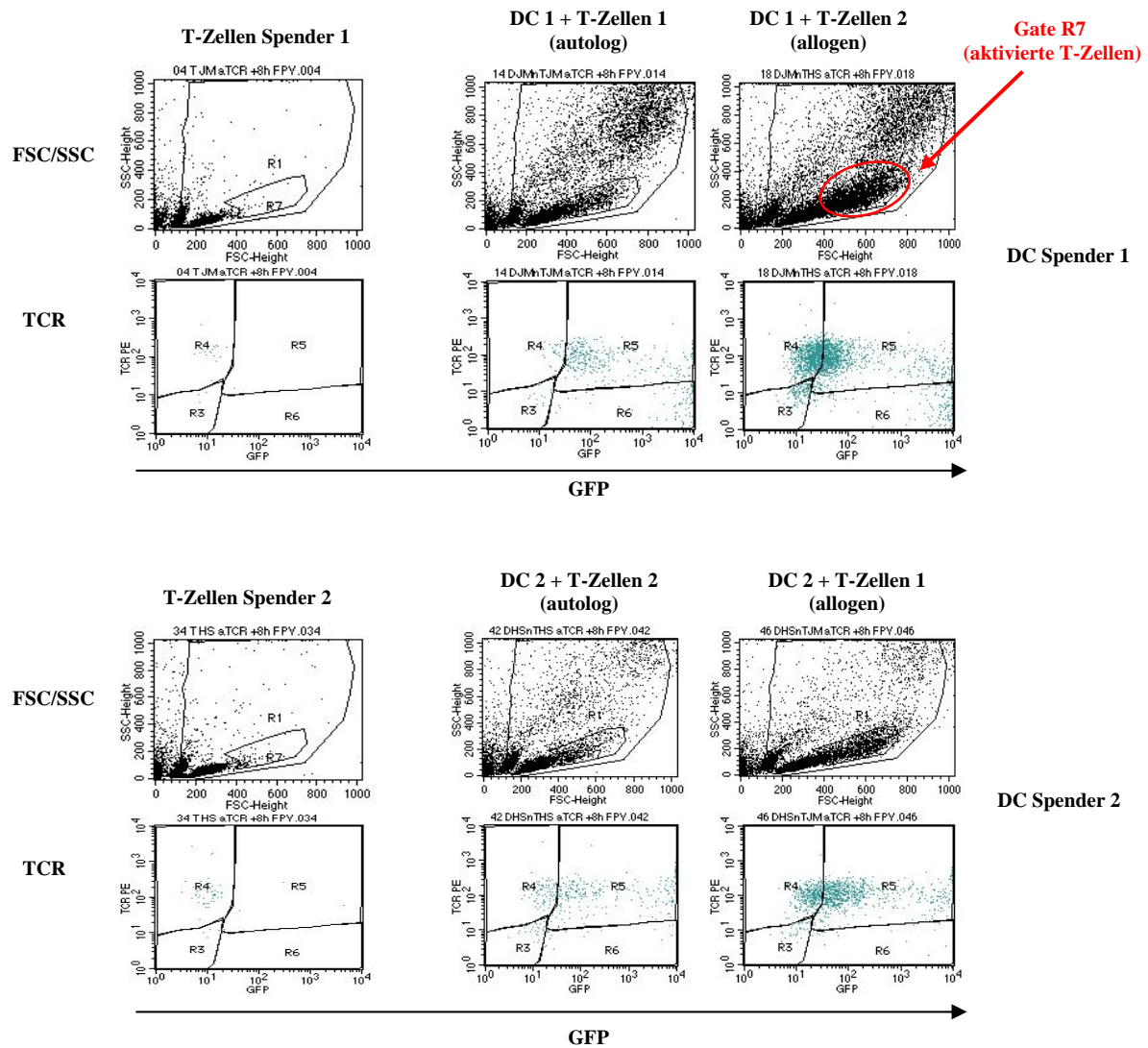


Abbildung 30. Mit allogenen Dendritischen Zellen aktivierte CD4⁺ T-Zellen zeigten eine stark erhöhte Anfälligkeit für eine Infektion mit rekombinantem Influenzavirus Typ A

Aus PBMC von 2 unverwandten Spendern wurden zum einen DC generiert und zum anderen CD4⁺ T-Zellen mittels MACS isoliert. Die gereiften DC wurden nachfolgend in MLRs eingesetzt, um autologe T-Zellen desselben Spenders oder allogene T-Zellen eines unverwandten Spenders mit nicht-identischem HLA-Typus zu stimulieren. Nach 60-stündiger Co-Kultur wurde das T-Zell-DC-Gemisch für 9 Stunden mit IVA-GFP infiziert. Nachfolgend wurden die Zellen zur besseren Unterscheidung von T-Zellen und DC mit einem PE-gekoppelten, TCR-spezifischen Antikörper angefärbt und im FACS untersucht (FSC/SSC: *forward scatter/side scatter*)

6.12. Die antigenspezifische Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen führte zu einer gesteigerten Anfälligkeit für eine Infektion mit rekombinantem Influenzavirus Typ A

Neben frisch isolierten T-Zellen standen auch antigenspezifische CD4⁺ T-Zellklone zur Verfügung. Diese boten gegenüber dem allogenen Ansatz den Vorteil einer hohen und vor allem spezifischen Erkennung eines definierten Antigen-MHC II-Komplexes.

Um die generelle Reaktivität und Anfälligkeit verschiedener T-Zellklone für eine Infektion mit IVA-GFP zu untersuchen, wurden diese zunächst unspezifisch mit humanen *feeder*-Zellen (bestrahlte PBMC) und PHA in T-Zell-Medium mit 20 U/mL IL-2 stimuliert und dann an verschiedenen Tagen nach dieser unspezifischen Restimulation für 9 Stunden mit IVA-GFP infiziert. Nach Färbung mit einem PE-gekoppelten anti-CD4-Antikörper, um die T-Zellen von noch vorhandenen Stimulatorzellen unterscheiden zu können, wurden die Zellen im FACS analysiert (Abbildung 31). Alle verwendeten T-Zellklone zeigten nach Aktivierung eine erhöhte Infizierbarkeit mit IVA-GFP. Je nach Klon und Stimulation setzte diese jedoch unterschiedlich schnell ein, variierte in ihrer Dauer und war zudem abhängig vom Wachstumsverhalten der T-Zellen und äußeren Faktoren wie einem Mediumwechsel. Allen gemeinsam war jedoch die Tendenz einer abnehmenden Infizierbarkeit mit längerer Kultivierung ohne Restimulation. Tag 14 bis 18 nach Stimulation war die Infektion der T-Zellklone signifikant niedriger als kurz nach Aktivierung. Auf der anderen Seite wurde jedoch ersichtlich, dass diese T-Zellklone, im Gegensatz zu ruhenden T-Zellen aus dem Blut, einen gewissen Grad einer „Voraktivierung“ besaßen und dass schon moderate Signale (z.B. in Form von IL-2 in neuem Medium) zu einer Reaktivierung führen konnten.

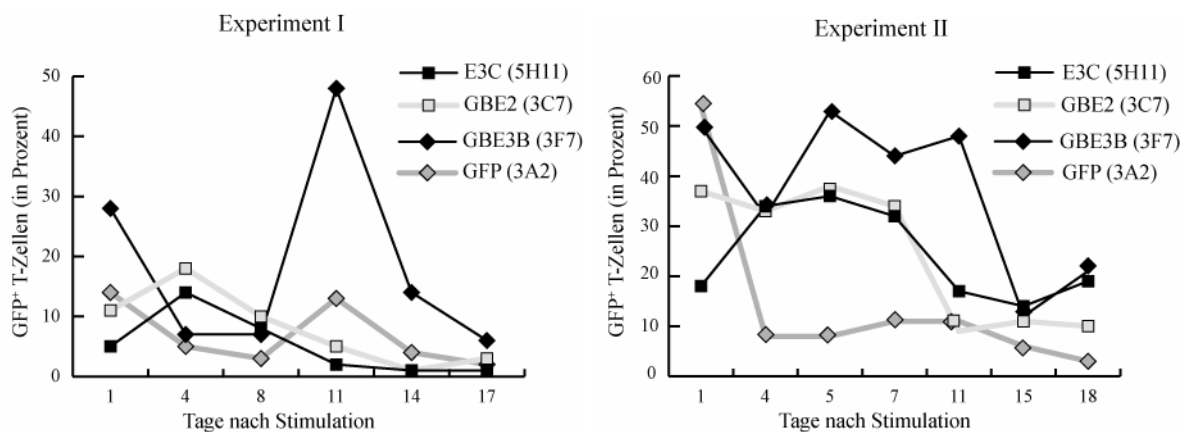


Abbildung 31. CD4⁺ T-Zellklone zeigten ebenfalls eine aktivierungsabhängige Anfälligkeit für eine Infektion mit rekombinantem Influenzavirus Typ A

Mittels PHA und humanen *feeder*-Zellen stimulierte CD4⁺ T-Zellklone wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach Stimulation für 9 Stunden mit IVA-GFP infiziert, die T-Zellen mit PE-gekoppeltem anti-CD4-Antikörper markiert und die Infektionsrate über den Anteil GFP-positiver Zellen im FACS detektiert. Gezeigt ist der Prozentsatz an infizierten T-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Restimulation, dargestellt für jeweils 4 verschiedene T-Zellklone aus 2 unabhängigen Experimenten.

Für einige T-Zellklone wurde anschließend eine Kinetik der IVA-GFP-Infektion durchgeführt, bei der die T-Zellen 5 Tage nach Restimulation für 0, 6, 10 bzw. 20 Stunden mit IVA-GFP infiziert und dann im FACS untersucht wurden (Abbildung 32).

Die Anzahl der GFP-positiven T-Zellen nahm mit der Dauer der Infektion um den Faktor 3 bis 5 zu. Insgesamt zeigten die CD4⁺ T-Zellklone erwartungsgemäß ein ähnliches Verhalten wie frisch aus dem Blut isolierte und dann aktivierte CD4⁺ T-Zellen, waren jedoch aufgrund ihrer Voraktivierung wesentlich schneller nach Stimulation infizierbar.

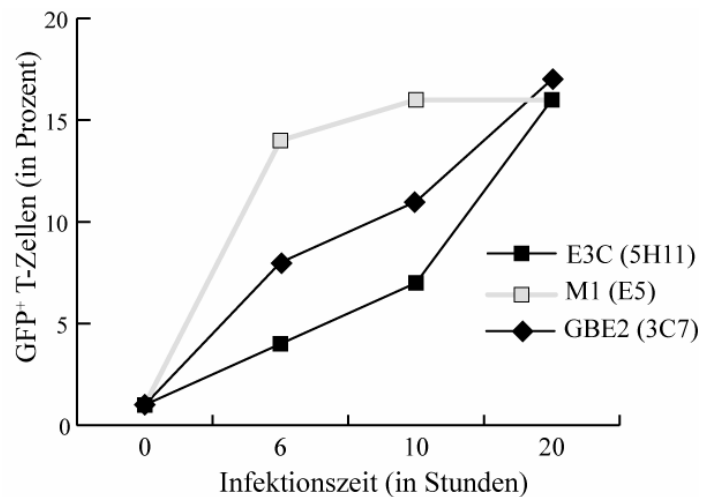


Abbildung 32. Auch bei CD4⁺ T-Zellklonen stieg der Anteil an infizierten Zellen mit längerer Infektionsdauer an

Verschiedene T-Zellklone wurden 5 Tage nach unspezifischer Stimulation für 0, 6, 10 und 20 Stunden mit IVA-GFP infiziert und der Anteil der GFP-positiven Zellen im FACS ermittelt.

Um die Antigenspezifität der vorhandenen CD4⁺ T-Zellklone zu nutzen und *in vitro* einer *in vivo*-ähnlichen, zellbasierten Aktivierung von T-Zellen möglichst nahe zu kommen, wurden in einer weiteren Reihe von Experimenten CD4⁺ T-Zellklone mit peptidbeladenen, autologen APC aktiviert. Hierzu wurden die T-Zellklone am Tag 14 nach der letzten Restimulation verwendet, da diese Zellen den geringsten Hintergrund an Aktivierung und IVA-GFP-Infizierbarkeit zeigten (Abbildung 31) und zugleich eine noch ausreichende Viabilität aufwiesen. Zudem wurde neben dem relevanten Peptid, welches im MHC-Klasse II-Kontext von dem jeweiligen T-Zellklon erkannt wurde, auch ein irrelevantes Kontrollpeptid auf APC beladen und zur Stimulation der T-Zellklone eingesetzt (Tabelle 3). Hiermit sollte kontrolliert werden, ob auch ein unspezifischer Stimulus zur Aktivierung der T-Zellen führte, wie es in Abbildung 31 für einige T-Zellklone der Fall war. Die verwendeten, relevanten oder irrelevanten Peptide als einziger variabler Parameter sollten eine saubere Untersuchung der antigenspezifischen Aktivierung und Infektion von T-Zellklonen erlauben. Als APC wurden LCL mit definiertem HLA-Status genutzt. Um deren Auswachsen zu verhindern, wurden die LCL nach Peptidbeladung über Nacht mit 80 Gray (Gy) bestrahlt und dann peptidspezifische T-Zellen zugesetzt. Nach 24 Stunden Co-Kultur wurden die Zellen für 9 Stunden mit IVA-GFP infiziert, die

T-Zellen über CD4-PE-Färbung markiert und im FACS analysiert. Die mittels Bestrahlung inaktivierten APC waren in der Lage CD4⁺ T-Zellklone peptidspezifisch zu aktivieren. APC mit relevantem Peptid konnten die entsprechenden T-Zellklone so stimulieren, dass nachfolgend bis zu dreimal mehr T-Zellen infizierbar waren als bei Verwendung der gleichen APC, beladen mit irrelevantem Peptid (Daten nicht gezeigt).

Jedoch wiesen die bestrahlten APC selbst noch eine gewisse Infizierbarkeit mit IVA-GFP auf. Um eine Verfälschung der Ergebnisse durch GFP-positive APC auszuschließen, wurden die LCL in Nachfolgeexperimenten, nach der Peptidbeladung über Nacht, mit 0,5 %iger Paraformaldehyd-Lösung fixiert, was eine produktive IVA-Infektion unterband, mit einer spezifischen Antigenpräsentation jedoch nicht interferierte. Die so inaktivierten LCL wurden dann in gleicher Form zur Aktivierung von CD4⁺ T-Zellklonen verwendet. In Tabelle 3 sind die genutzten Kombinationen von APC, Peptiden und T-Zellklonen aufgeführt.

T-Zellklon	APC	Relevantes Peptid	Irrelevantes Peptid
E3C (5H11)	LCL-JM	EBNA-3C (3C-F300)	E89I
GBE2 (3C7)	LCL-GB	GB-EBNA2	E89I
GBE2 (3C7)	ALF-LCL	GB-EBNA2	E89I
GBE3C (3H10)	LCL-GB	GB-EBNA3C	E89I
GBE3C (3H10)	ALF-LCL	GB-EBNA3C	E89I

Tabelle 3. Verwendete Kombinationen von Antigenpräsentierenden Zellen, Peptiden und CD4⁺ T-Zellklonen

Dargestellt sind die verwendeten Kombinationen aus CD4⁺ T-Zellklonen, verwendeten APC mit definiertem HLA-Status und die genutzten, relevanten (vom jeweiligen T-Zellklon erkannten) und irrelevanten Epitope in Peptidform. Die Ergebnisse der in rot markierten Kombination sind in Abbildung 33 dargestellt.

Nach 24-stündiger Co-Kultur wurden die Gemische von APC und CD4⁺ T-Zellklonen ebenfalls für 9 Stunden mit IVA-GFP infiziert, die T-Zellen mit Hilfe eines anti-CD4-PE-Antikörpers spezifisch gefärbt und nachfolgend mittels FACS analysiert. Die Resultate sind in Abbildung 33 zusammengefasst.

T-Zellklone, welche mit autologen APC plus relevantem Peptid stimuliert wurden, waren nachfolgend bis zu zehnmal besser mit IVA-GFP infizierbar als die gleichen T-Zellklone ohne Stimulation mit APC oder co-kultiviert mit den gleichen APC plus irrelevantem Peptid unter ansonsten identischen experimentellen Bedingungen. Dies ist exemplarisch für den T-Zellklon GBE3C (3H10) in Abbildung 33 dargestellt. Signifikante Unterschiede wurden auch beobachtet, wenn allogene LCL mit passendem HLA-Typ als APC verwendet wurden (im Fall von GBE3C neben LCL-GB auch ALF-LCL).

Insgesamt belegten diese Experimente eine erhöhte Anfälligkeit von CD4⁺ T-Zellen für eine nachfolgende IVA-Infektion auch im Kontext der antigenspezifischen, zellbasierten Aktivierung.

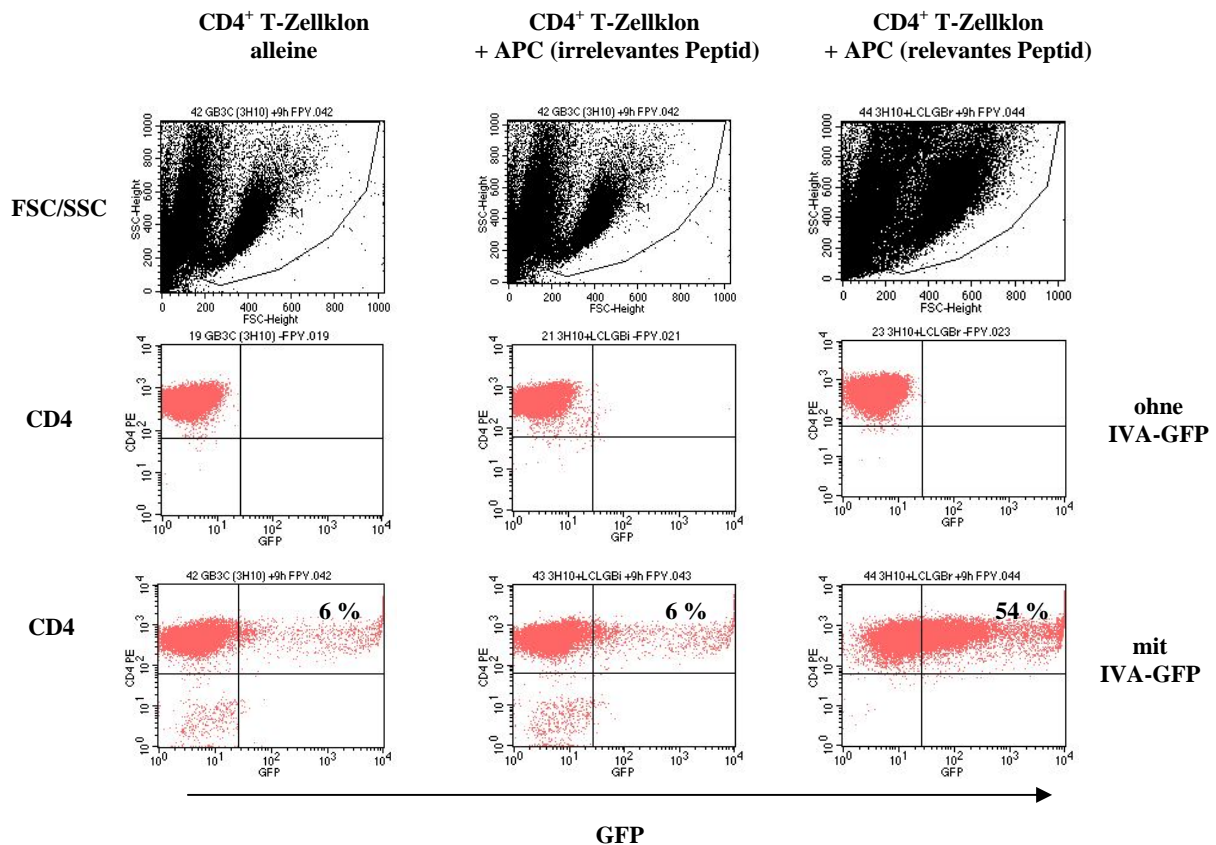


Abbildung 33. Antigen-spezifisch-stimulierte CD4⁺ T-Zellklone zeigten eine stark erhöhte Anfälligkeit für eine Infektion mit rekombinantem Influenzavirus Typ A

Autologe APC wurden zunächst über Nacht mit einem relevanten oder irrelevantem Peptid (Tabelle 3) beladen, dann mit einer 0,5 %iger Paraformaldehyd-Lösung fixiert und nachfolgend zur Stimulation des CD4⁺ T-Zellklons GBE3C (3H10) verwendet. Nach 24-stündiger Co-Kultur wurden die T-Zellen (einzeln bzw. in Co-Kultur mit APC) für 9 Stunden mit IVA-GFP infiziert, dann mit Hilfe eines PE-gekoppelten anti-CD4-Antikörpers gefärbt und im FACS untersucht. Exemplarisch dargestellt ist die in Tabelle 3 rot markierte Kombination aus APC, T-Zellklon und Peptiden (FSC/SSC: *forward scatter/side scatter*).

6.13. Nach Infektion mit Influenzavirus Typ A präsentieren primäre B-Zellen die viralen Antigene wesentlich schlechter auf MHC-Klasse II als Lymphoblastoide B-Zelllinien von demselben Spender

Die beschriebenen, aktivierungsabhängigen Unterschiede in der Infizierbarkeit von T- und B-Lymphozyten warfen die Frage auf, an welchem Punkt die IVA-Infektion in nicht-aktivierten Lymphozyten unterbrochen ist.

Um zu untersuchen, ob IVA in nicht-aktivierten Lymphozyten noch das endosomale Kompartiment erreicht, wurde ein indirektes Nachweisverfahren eingesetzt. LCL und primäre B-Zellen vom gleichen Spender wurden dabei mit steigenden Mengen an IVA-GFP beladen und anschließend die Erkennung

dieser virusbeladenen Zellen mit einem autologen CD4⁺ T-Zellklon abgefragt, welcher das IVA-Protein M1 erkennt. Das in Virionen vorhandene Matrixprotein M1 wird nach Endozytose der Viren in Peptide gespalten und diese auf MHC-Klasse II-Molekülen auf der Zelloberfläche an M1-spezifische CD4⁺ T-Zellen präsentiert. Neben unbehandelten wurden auch UV-inaktivierte Viren verwendet. Durch die Virusinaktivierung wurde sichergestellt, dass kein weiteres M1-Protein im Rahmen der Virusvermehrung in permissiven Zellen gebildet wird. Durch diesen experimentellen Ansatz konnte somit überprüft werden, ob nicht-aktivierte B-Zellen IVA noch rezeptorvermittelt in Endosomen aufnehmen können. Als Beladungs- und Präsentationskontrolle konnte zudem auf rekombinant-hergestelltes M1-Protein zurückgegriffen werden. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 34 dargestellt.

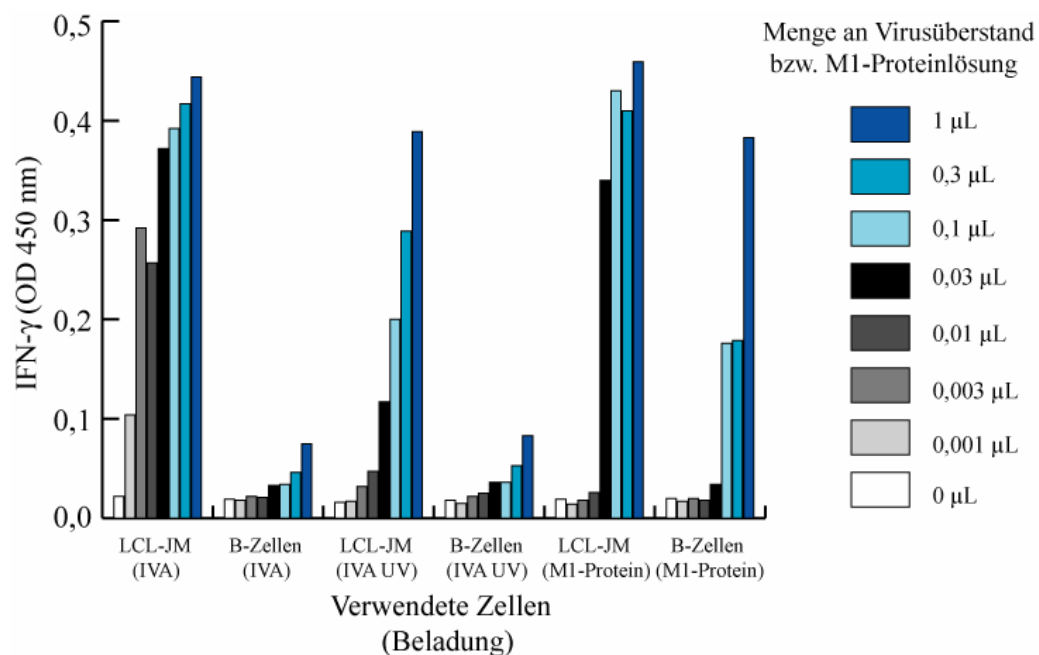


Abbildung 34. Nicht-aktivierte, primäre B-Zellen waren im Gegensatz zu lymphoblastoiden B-Zelllinien nicht in der Lage Antigene aus Viruspartikeln effektiv auf MHC-Klasse II zu präsentieren

Aus peripherem Blut isolierte B-Zellen und die B-Zelllinie LCL-JM wurden mit verschiedenen Mengen IVA-GFP (IVA), UV-inaktiviertem IVA-GFP (IVA UV) oder rekombinantem M1-Protein infiziert bzw. beladen. 8 Stunden danach wurden diese Zellen zur Stimulation des M1-spezifischen CD4⁺ T-Zellklons E5 eingesetzt. Die Aktivierung des T-Zellklons durch die B-Zellen wurde, nach 24-stündiger Co-Kultur, durch Detektion von IFN-γ im Kulturüberstand mittels ELISA analysiert (OD 450 nm = Optische Dichte bei 450 nm).

Während beide Zelltypen rekombinant-hergestelltes Antigen ähnlich gut präsentierten, waren nur LCL in der Lage ein Antigen der Virushülle effizient auf MHC-Klasse II zu präsentieren.

Dabei wurde UV-inaktiviertes, rekombinantes Virus ähnlich gut präsentiert wie die unbehandelte Form von IVA-GFP, was darauf hindeutet, dass UV-inaktivierte Viren noch in die Endosomen/Lysosomen gelangten. In ruhenden, primären B-Zellen war die Präsentation deutlich

minimiert, was darauf hinwies, dass IVA in diesen Zellen das endosomale/lysosomale Kompartiment gar nicht, oder nur in geringerem Maße erreichte. Durch die Nutzung von M1-Protein konnte zudem ausgeschlossen werden, dass die schlechtere Erkennung von virusbeladenen, primären B-Zellen durch den M1-spezifischen T-Zellklon auf einer weniger effizienten Präsentation von exogenem Antigen auf MHC-Klasse II beruhte.

Diese Experimente grenzten den Bereich, in welchem eine IVA-Infektion in ruhenden Lymphozyten blockiert wird, auf die Ereignisse zwischen rezeptorvermittelter Bindung des Virus an die Zelloberfläche und dem Transport der Partikel in das endosomale/lysosomale Kompartiment ein.

7. Diskussion

7.1. Influenzavirus Typ A und das zelluläre Immunsystem

IVA stellt und stellt eine große Gefahr für die menschliche Gesundheit dar, was durch Zehntausende von Opfern während der jährlichen Influenza-Epidemien und der drohenden Gefahr einer neuen Pandemie verdeutlicht wird (Thompson *et al.* 2003; Palese 2007; Wright 2007). Die Viren sind in der Lage angeborene und erworbene Immunabwehrmechanismen zu umgehen. Wie sie dies auf zellulärer Ebene bewerkstelligen, ist großteils noch unbekannt. Um nähere Einblicke in die Virus-Wirts-Beziehung zu erlangen, wurde mit Hilfe eines rekombinanten IVA des Subtyps H7N7, welches eine produktiv-infizierte Zelle durch Expression des grünfluoreszierenden Proteins GFP markiert, die Hypothese überprüft, ob IVA die antivirale, adaptive Immunantwort durch die Infektion und nachfolgende Elimination von Immuneffektorzellen unterläuft.

7.1.1. Influenzavirus Typ A infiziert Zellen mit aktivem NF- κ B-Signalweg

IVA-GFP infizierte etablierte Zelllinien sehr effektiv (Abschnitt 6.1.). Bereits wenige Stunden nach Infektion der Zellen mit niedriger MOI waren die meisten Zelllinien zu $\geq 60\%$ GFP-positiv. Höhere MOI oder längere Infektionszeiten steigerten den Anteil an grünfluoreszierenden Zellen weiter. Neben etablierten Zelllinien waren auch myeloische und monozytäre Zellen aus dem peripheren Blut gut infizierbar (Abschnitt 6.2.). Hingegen zeigten ruhende, lymphoide Zellen so gut wie gar keine Anfälligkeit für eine Infektion mit IVA-GFP.

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass ein aktiver NF- κ B-Signalweg bei der Anfälligkeit einer Zelle für eine Infektion mit IVA von entscheidender Bedeutung ist (Nimmerjahn *et al.* 2004). Da in T-Zellen der klassische NF- κ B-Weg über ein Signal via TCR aktiviert wird (Weil and Israel 2006), wurde getestet, ob T-Zellen nach Stimulation über den TCR besser infizierbar waren. Dazu wurde Blut von humanen Spendern verwendet, hieraus CD4⁺ T-Zellen aufgereinigt und über den T-Zellrezeptor stimuliert. Die aktivierten T-Zellen zeigten nachfolgend eine signifikant höhere Infizierbarkeit mit IVA-GFP als nicht-aktivierte T-Zellen (Abschnitt 6.3.). Durch einen Vergleich der Fluoreszenzeigenschaften der T-Zellen nach Infektion mit IVA-GFP, Infektion mit UV- oder hitzeinaktiviertem IVA-GFP oder reiner Proteinbeladung mit GFP konnte verifiziert werden, dass es sich wirklich um aktivierungsabhängige, produktive Infektion der T-Zellen handelte (Abschnitt 6.4.).

In weiterführenden Experimenten konnte gezeigt werden, dass 60 bis 72 Stunden Aktivierung zu einer nachfolgend maximalen Infektion der CD4⁺ T-Zellen führt. In diesem Kontext stellte sich die Frage, warum es bei T-Zellen im Vergleich zu etablierten Zelllinien einer vergleichsweise langen Phase bis

zur Infizierbarkeit bedarf. Laut Sidorenko und Reichl (Sidorenko and Reichl 2004) benötigt IVA 8 bis 12 Stunden, um eine permissive Zelle zu infizieren und apoptotisch zu eliminieren. In Zellen, in welchen IVA länger für diesen Zyklus braucht, fehlen vermutlich wichtige zelluläre Komponenten für eine effiziente Replikation. In ruhenden T-Zellen ist der NF- κ B-Weg nicht aktiv und daraus resultierend auch nicht die dadurch induzierten Gene/Proteine. Diese lange Aktivierungsdauer von ≥ 60 Stunden impliziert, dass für die IVA-Infektion nicht die Aktivierung von NF- κ B selbst, sondern die Expression nachgeschalteter Gene notwendig ist. In den meisten etablierten Zelllinien ist der NF- κ B-Weg bereits aktiv, so dass sich diese unmittelbar infizieren lassen. Eine Ausnahme bilden Burkitt-Lymphom (BL)-Zelllinien, die alle eine Chromosomentranslokation aufweisen, welche zu einer deregulierten Expression des Onkogens c-myc führt (Janz 2006). Vermutlich übernimmt c-myc in diesen Zellen die notwendige Aktivierung zellulärer Faktoren, resultierend in einer möglicherweise NF- κ B-unabhängigen Proliferation der Zellen (Schlee *et al.* 2007). Darüber hinaus benötigen BL-Zelllinien jedoch ein zusätzliches, kurzzeitiges NF- κ B-Aktivierungssignal von wenigen Stunden, um durch IVA infizierbar zu werden (Nimmerjahn *et al.* 2004). Diese Beobachtung impliziert eine direkte Rolle von NF- κ B oder unmittelbar durch NF- κ B-induzierter Gene für die IVA-Infektion. Hierfür spricht auch die Tatsache, dass CD4⁺ Gedächtnis-T-Zellen nach Aktivierung schneller und besser infizierbar waren als naive CD4⁺ T-Zellen (Abschnitt 6.7.). Erstere besitzen durch ihren bereits vorhandenen Antigenkontakt eine Voraktivierung, welche sie schneller auf das gleiche Antigen reagieren lässt (Iezzi *et al.* 1998), sie jedoch möglicherweise auch schneller für eine IVA-Infektion anfällig macht. Auch *in vitro* kultivierte CD4⁺ T-Zellklone wurden nach Restimulation innerhalb von 24 Stunden permissiv für eine IVA-Infektion (siehe unten und Abschnitt 6.12.).

Bei T-Zellen des peripheren Bluts spielten die Stärke (Abschnitt 6.5.2.) und die Dauer (Abschnitt 6.5.3.) des Stimulus gleichfalls eine entscheidende Rolle für die Infizierbarkeit einer T-Zelle mit IVA. Die Stärke des gegebenen Stimulus hat mit Sicherheit direkten Einfluss auf die über NF- κ B induzierte Proteinexpression und auf die daraus resultierende, erhöhte Infektionsanfälligkeit der Zellen. Ein länger gegebener Stimulus bewirkt zudem eine Akkumulation der für eine Infektion essentiellen Proteine. Alternativ wäre auch denkbar, dass das TCR-Signal so kurzlebig ist, dass ein Phase der Ruhe nach der Aktivierung – wie in Abschnitt 6.5.3. dargestellt – die T-Zellen nachfolgend wieder resistent für eine IVA-Infektion macht. Dieser Argumentation folgend sollte ein weiterer, kurzer Aktivierungspuls die zuvor erst aktivierten und dann ruhend gehaltenen T-Zellen wieder anfälliger für eine nachfolgende IVA-Infektion machen, vielleicht mit einer vergleichbaren Kinetik wie für etablierte Zelllinien. Interessant in diesem Kontext ist, dass eine Aktivierung über 72 Stunden und dann Infektion über 9 Stunden mit Entzug des primären Stimulus (Abbildung 14 und 22) im Vergleich mit einer dauerhaften Stimulation (Abbildung 12 und 21) zu einer Erniedrigung der Infizierbarkeit der Zellen um bis zu 50 % führte. Dies könnte ein Hinweis auf die Kurzlebigkeit des Signals über den TCR sein. Diese Beobachtung spricht für die Hypothese, dass eine Grundaktivierung der Zellen über ein ausgedehntes NF- κ B- oder c-myc-Signal Voraussetzung ist, dass aber darüber

hinaus auch ein unmittelbares NF- κ B-Signal notwendig ist, um Zellen anfällig für eine IVA-Infektion zu machen. In BL-Zelllinien und *in vitro* kultivierten T-Zellklonen ist diese Voraktivierung bereits gegeben, so dass hier offensichtlich ein kurzes NF- κ B-Signal ausreichend ist für eine IVA-Infektion.

Dass die Co-Stimuli CD28 oder IL-2 nicht das Potential hatten, T-Zellen hinreichend für eine IVA-Infektion zu aktivieren (Abschnitt 6.3. und Daten nicht gezeigt), unterstreicht weiter die Bedeutung von NF- κ B. IL-2 aktiviert den Janus-Kinase (JAK)/*signal transducers and activators of transcription* (STAT)-Signalweg und hat eine wichtige Funktion als Überlebensfaktor von T-Zellen *in vivo* und *in vitro* (Benczik and Gaffen 2004). Seine stimulierenden Eigenschaften sind aber im Kontext der IVA-Infektion zu gering. Dennoch waren dezente, additive Effekte auch bei IL-2 zu erkennen, denn CD3/CD28-stimulierte T-Zellen waren in T-Zell-Medium mit IL-2 schneller maximal infizierbar als in T-Zell-Medium ohne IL-2 (Daten nicht gezeigt). Ob das IL-2 das durch anti-CD3-Antikörper gesetzte Signal verstärkt oder indirekt zu einer höheren Infektionsanfälligkeit beiträgt, beispielsweise durch die Unterdrückung von Apoptose, ist noch ungeklärt.

CD28 scheint ein über den TCR gegebenes Signal in Richtung des kanonischen NF- κ B-Signalwegs eher zu modulieren als ein eigenes Signal zu senden (Schmitz and Krappmann 2006; Weil and Israel 2006). Unter den hier vorliegenden *in vitro*-Bedingungen mit starkem TCR-basierten Signal ist es deshalb kaum verwunderlich, dass durch einen anti-CD28-Antikörper keine weitere Steigerung der Aktivierung und einer nachfolgenden Infektion zu sehen war.

7.1.2. Influenzavirus Typ A infiziert CD4⁺ T-Zellsubpopulationen unterschiedlich effektiv

Selbst optimal aktivierte T-Zellen zeigten keine 100 %ige Infizierbarkeit mit IVA-GFP. Dafür gab es mehrere Gründe. I) Zum einen lag dies mit Sicherheit an der unvollständigen Reinheit der verwendeten, rekombinanten IVA. Aufgrund des Herstellungsprozesses war neben IVA-GFP auch IVA-wt in der Viruspräparation vorhanden. Da die GFP-Fluoreszenz jedoch als einziges Mittel zur Markierung einer infizierten Zelle diente, konnten IVA-wt-infizierte T-Zellen nicht als infiziert erkannt werden. Dies minimierte dementsprechend den prozentuellen Anteil der als positiv detektierten Zellen. II) Nicht auszuschließen war zudem, dass die Ausschüttung des antiviral wirkenden IFN- γ durch die T-Zellen nach Viruskontakt einen höheren Prozentsatz an positiven T-Zellen verhindert haben könnte. Zu testen wäre dies möglicherweise, indem der IFN- γ -Rezeptor mittels Antikörper blockiert und so die Wirkung des IFN- γ unterdrückt würde. III) Ein dritter Grund für die nicht zu 100 % vollständige Infektion der aktivierten T-Zellen war wahrscheinlich eine unterschiedliche Anfälligkeit bestimmter Subpopulationen für eine IVA-Infektion. So waren CD4⁺ Gedächtnis-T-Zellen der Literatur entsprechend schneller aktivierbar (Iezzi *et al.* 1998), jedoch auch infektionsanfälliger als naive T-Zellen (Abschnitt 6.7.). Womöglich würden auch naive T-Zellen nach genügend langer Stimulation entsprechende Prozentzahlen an infizierten Zellen zeigen. Jedoch

weisen naive T-Zellen *in vitro* die Tendenz auf eher zu sterben, da sie abhängiger von co-stimulatorischen Signalen sind als T-Zellen, welche schon Antigenkontakt hatten (Robertson *et al.* 2006). IV) Darüber hinaus ist auch vorstellbar, dass nicht alle T-Zellen zur gleichen Zeit infizierbar waren. Die Ergebnisse der Zeitkinetik weisen darauf hin, dass die T-Zellen nach Aktivierung einen permissiven Zustand nicht synchron, sondern unterschiedlich schnell erreichten, was möglicherweise eine Voraktivierung der Zellen *in vivo* reflektiert. Die Untersuchung der T-Zellen alle 12 Stunden stellte jeweils nur eine Momentaufnahme dar, in der ein Teil der Zellen möglicherweise schon infiziert und eliminiert wurde, bei einem Teil der Zellen die aktuelle Infektion detektierbar war und ein weiterer Teil womöglich noch nicht produktiv infiziert wurde.

Dies alles könnte den Anteil der als infiziert detektierten Zellen kleiner ausfallen lassen als den wirklichen Prozentsatz der anfälligen Zellen. Unklar ist im Moment zudem noch, ob die aktivierten Zellen die Infektionsanfälligkeit bei weiter bestehender Aktivierung wieder verlieren. Sollte dies der Fall sein, so hätte dies ebenfalls Einfluss auf den Prozentsatz an infizierten Zellen.

Gleichfalls waren CD25⁺ CD4⁺ T-Zellen weitaus anfälliger als CD25⁻ CD4⁺ T-Zellen (Abschnitt 6.8.). CD25 ist zum einen ein Marker für aktivierte T-Zellen, was den Zusammenhang zwischen Aktivierung und Infizierbarkeit der T-Zellen unterstreicht, zum anderen aber auch ein wichtiger Marker für regulatorische T-Zellen, so dass die Möglichkeit besteht, dass IVA bevorzugt oder zumindest auch regulatorische T-Zellen infizieren könnte. Dies wäre eine mögliche Erklärung für eine Dysregulation des Zytokinsystems im Kontext einer H5N1-IVA-Infektion (de Jong *et al.* 2006). Hierüber sollte eine Untersuchung zum möglichen Zusammenhang zwischen der Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3 (Hori *et al.* 2003) oder des Folatrezeptors 4 (FR4) (Yamaguchi *et al.* 2007), beides Marker für regulatorische T-Zellen, und der Infizierbarkeit der T-Zellen mit IVA-GFP Aufschluss geben.

Die Untersuchung von weiteren Markern, welche spezifisch für bestimmte T-Zellpopulationen sind, könnte zusätzliche Auskunft über besonders anfällige Subpopulationen im Kontext einer IVA-Infektion liefern. Zudem wäre es interessant zu klären, ob auch bei den CD8⁺ T-Zellen bestimmte Subpopulationen (z. B. naive *versus* Gedächtnis-T-Zellen) besonders anfällig für eine IVA-Infektion bzw. einen IVA- induzierten Zelltod sind.

7.1.3. Influenzavirus Typ A tötet aktivierte T-Lymphozyten

Neben erhöhter Anfälligkeit für eine IVA-Infektion nach Aktivierung war in aktivierten T-Zellen auch eine erhöhte Anfälligkeit für IVA-induzierten Zelltod nach längeren Infektionszeiten zu erkennen. Dies war für CD8⁺ T-Zellen (Abschnitt 6.9.) noch stärker ausgeprägt als für CD4⁺ T-Zellen (Abschnitt 6.5.3. und 6.6.). Der Anteil der toten Zellen in der aktivierten Population war jedoch in beiden Fällen signifikant höher als bei nicht-aktivierten, mit IVA inkubierten, ruhenden T-Zellen. IVA

ist in der Lage, Apoptose in Makrophagen und Monozyten auszulösen (Takizawa *et al.* 1993; Hinshaw *et al.* 1994; Brydon *et al.* 2005). In Mäusen, die mit hochpathogenem Virus infiziert wurden, konnte eine Lymphozytendepletion im Blut, in der Lunge und den lymphoiden Geweben nachgewiesen werden. Hiervon waren auch CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen betroffen. Mittels *terminal dUTP nick end-labeling* (TUNEL) konnte zudem Apoptose in Lunge und Milz der infizierten Mäuse detektiert werden, was eine Lymphozytenzerstörung als möglichen Grund für die IVA-Pathogenität nahe legt (Tumpey *et al.* 2000). Die Zerstörung von Lymphozyten kann über mehrere Mechanismen erfolgen, beispielsweise über Fas/FasL-Interaktion (Wada *et al.* 1995) oder TGF- β -Ausschüttung (Schultz-Cherry and Hinshaw 1996). Hieran sind neben NS1 (Schultz-Cherry *et al.* 2001) auch NA und die M-Proteine (Morris *et al.* 2002), sowie PB1-F2 (Chen *et al.* 2001) beteiligt. Ob es sich bei der Eliminierung von aktivierten T-Zellen nach IVA-Infektion ebenfalls um Apoptose oder um eine andere Form des Zelltods handelt, ist bisher nicht geklärt. Zudem ist unklar, welche IVA-Proteine daran beteiligt sind. Über PB1-F2 ist bekannt, dass manche Subtypen ein Stopcodon innerhalb des Gens tragen, was in einem verkürzten Protein ohne *mitochondrial targeting sequence* (MTS) und dadurch ohne apoptoseauslösende Eigenschaften resultiert (McAuley *et al.* 2007). Eine Untersuchung des IVA, welches im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde, und dessen PB1-F2 Protein könnte deshalb Hinweise auf den möglichen Mechanismus des induzierten Zelltods liefern.

Auch die Frage, warum CD8⁺ T-Zellen vermehrt abstarben und weniger produktiv mit IVA infiziert wurden, ist noch ungeklärt. Möglicherweise sind sie anfälliger für die durch IVA induzierten, jedoch bisher nicht näher definierten Zelltodmechanismen.

7.1.4. Influenzavirus Typ A infiziert aktivierte B-Lymphozyten

Neben CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen zeigten auch B-Lymphozyten (Abschnitt 6.10.) eine ähnliche Tendenz zur gesteigerten Infektion nach Aktivierung, so dass dieses Phänomen bei den drei Hauptvertretern der Lymphozytenpopulationen beobachtet werden konnte.

B-Zellen können über IL4 und/oder CD40 aktiviert werden. Eine erhöhte Anfälligkeit für die IVA-Infektion trat in den eigenen Experimenten bei gemeinsamem, nicht aber bei getrenntem Einsatz beider Stimuli auf. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass ein antigenspezifischer Stimulus über den B-Zellrezeptor (BCR) nicht unbedingt notwendig für eine IVA-Infektion von B-Zellen war. Allerdings genügte die Stärke der IL4- und CD40-induzierten Signale nicht, um die B-Zellen maximal anfällig (im Vergleich zu LCL) für die IVA-Infektion zu machen.

In B-Zellen resultiert das IL-4-Signal in der Aktivierung des JAK/STAT-Weges. Über CD40 wird in B-Zellen der NF- κ B-Signalweg induziert (<http://www.biocarta.com/genes/index.asp>). Über den BCR wird der kanonische NF- κ B-Signalweg initiiert, was für die Aktivierung und das Überleben der Zelle wichtig ist. Die Signalweiterleitung erfolgt hierbei über Proteinkinase C-beta (PKC β) und den

CARMA1/Bcl1/Malt10-Komplex (Guo *et al.* 2004; Sommer *et al.* 2005) bzw. über die Bruton's Tyrosinkinase (Btk) (Shinners *et al.* 2007). Es wäre denkbar, dass eine Stimulation direkt über den BCR im Kontext einer IVA-Infektion ein stärkeres Signal liefert und die B-Zellen eventuell infektionsanfälliger macht, als die kombinierte Stimulation mit CD40L und IL-4. Zudem zeigen neueste Studien, dass durch ein CD40- oder IL-4-Signal eine BCR-induzierte Aktivierung von NF- κ B über einen anderen, PKC- und Btk-unabhängigen Signalweg verläuft (Mizuno and Rothstein 2003; Mizuno and Rothstein 2005; Dye *et al.* 2007) und eine CD40L/CD40-Interaktion zudem auch den alternativen NF- κ B-Signalweg induzieren kann (Coope *et al.* 2002; Dejardin 2006). Dies könnte bedeuten, dass zwischen der Aktivierung von B-Zellen über CD40 und IL-4 *versus* dem BCR alleine oder CD40, IL-4 und dem BCR in Kombination möglicherweise nicht nur quantitative, sondern auch qualitative Unterschiede in Form von unterschiedlichen Sets an aktivierten Genen und Proteinen liegen.

Bemerkenswerterweise reichte in den untersuchten CD4⁺ T-Zellen eine alleinige Stimulation über CD28 oder IL-2 nicht aus, um eine erhöhte Infizierbarkeit zu erreichen (Daten nicht gezeigt). Lediglich bei gleichzeitiger Stimulation des TCR konnte eine ausreichende Aktivierung erzielt werden. Bei gemeinsamem Einsatz von anti-CD28-Antikörpern und anti-CD3-Antikörpern zeigten sich keine additiven oder synergistischen Effekte, während IL-2 eine dezente additive Wirkung hatte. Deshalb wurde die initial eingesetzte Co-Stimulation von T-Zellen über CD3 und CD28 (Abschnitt 6.3.) in den nachfolgenden Experimenten durch eine Stimulation über CD3 und IL-2 ersetzt. Ob die eingesetzten Mengen an anti-CD28-Antikörper für die aktivierende bzw. co-stimulierende Wirkung limitierend waren, kann nicht abschließend beurteilt werden.

7.1.5. Eine zellbasierte Aktivierung macht CD4⁺ T-Zellen infektionsanfälliger

Um die Untersuchungsbedingungen einer *in vivo*-Situation in Form einer Zell-Zell-Kontakt basierten Aktivierung von T-Zellen anzugleichen, wurden CD4⁺ T-Zellen einerseits durch allogene DC (Abschnitt 6.11.) und andererseits durch antigenbeladene, autologe APC (Abschnitt 6.12.) aktiviert. Aufgrund der guten Infizierbarkeit der DC war eine Interpretation der Ergebnisse nach Allostimulation zunächst problematisch. Da die grünfluoreszierenden DC im Standard-FACS von infizierten T-Zellen nicht gänzlich unterschieden werden konnten, wurden die T-Zellen mittels eines TCR-spezifischen Antikörpers gefärbt und die Analyse im FSC/SSC auf aktivierte T-Zellen eingestellt. Auf diese Weise wurden falsch positive Ergebnisse vermieden und Unterschiede zwischen allogener und autologer Stimulation detektierbar. In beiden Fällen waren T-Zellen infizierbar, jedoch im allogenen Szenario deutlich mehr. Eine gleichzeitige Stimulation von T-Zellen mit allogenen DC und OKT3-Antikörper brachte zwar keine additiven Effekte bezüglich einer nachfolgenden Infizierbarkeit mit IVA, jedoch wurden die Parameter (Verhältnis T-Zellen zu DC, eingesetzte OKT3-Mengen und Inkubationszeiten)

nur in begrenztem Maße variiert, so dass eine genauere Untersuchung möglicherweise noch tiefere Einblicke in die Aktivierung und Infizierbarkeit der T-Zellen mit Hilfe dieser beiden Stimuli liefern würde.

In einer weiteren Reihe von Experimenten wurden CD4⁺ T-Zellklone aktiviert und infiziert. Durch unspezifische Stimulation mit PHA und humanen *feeder*-Zellen zeigte sich, dass voraktivierte T-Zellklone bezüglich ihrer Infizierbarkeit eher etablierten Zelllinien ähnelten als frisch isolierten T-Zellen. T-Zellklone zeigten bereits ≤ 24 Stunden nach Restimulation eine gesteigerte Anfälligkeit für eine IVA-Infektion (Abschnitt 6.12.). Wurden die T-Zellklone dann an Tag 14 nach Restimulation zur spezifischen Aktivierung mittels peptidbeladener APC eingesetzt, zeigte sich ein deutlicher Unterschied bezüglich der Aktivierbarkeit, aber auch der Infizierbarkeit mit IVA. Mit relevantem Peptid im korrekten HLA-Kontext stimulierte T-Zellklone waren wesentlich anfälliger als mit irrelevantem Peptid in korrektem HLA-Komplex stimulierte CD4⁺ T-Zellen. Diese Experimente untermauerten die aktivierungsabhängige Infektion von T-Zellen im antigenspezifischen, zellbasierten Kontext.

7.1.6. In nicht-aktivierten Lymphozyten erreichen die Abbauprodukte des Influenzavirus Typ A nicht die Endosomen/Lysosomen

Durch die Verwendung von primären B-Zellen waren zusätzlich Aussagen über die potentiellen Gründe einer geringen IVA-Infektionsanfälligkeit ruhender Lymphozyten möglich. In ruhenden B-Zellen des peripheren Bluts erreichten die Viren nicht die Endosomen, welche bei einer IVA-Infektion den Ort der Freisetzung des viralen Ribonukleoprotein (RNP)-Komplex ins Zytosol der Zelle darstellen (Cross *et al.* 2001; Smith and Helenius 2004) und somit essentiell für die produktive Infektion einer Zelle durch die Viren sind (Abschnitt 6.13.). Die Funktionsfähigkeit der B-Zellen bezüglich Endozytose konnte mit Hilfe von rekombinantem Protein verifiziert werden, welches bei LCL und B-Zellen ähnlich gut präsentiert wurde.

Insgesamt konnte der Bereich, in welchem eine IVA-Infektion in ruhenden Lymphozyten blockiert wird, auf die Ereignisse zwischen rezeptorvermittelter Bindung des Virus an die Zelloberfläche und dem Transport der Partikel in das endosomale/lysosomale Kompartiment eingegrenzt werden. Ergebnisse der Arbeitsgruppe, die auf eine vergleichbare Zelloberflächenexpression der IVA-Rezeptoren in permissiven und nicht-permissiven Zellen hinweisen (Nimmerjahn *et al.* 2004), sprechen für eine Blockade des Infektionsprozesses in nicht-aktivierten Lymphozyten während der Virusinternalisation und/oder dem intrazellulären Vesikeltransport. Vergleichbare Experimente zur Detektion der Oberflächenexpression der IVA-Rezeptoren auf nicht-aktivierten und aktivierten T-Zellen mittels spezifischer Antikörper sollten darüber Aufschluss geben, ob dies auch für periphere Lymphozyten zutrifft.

Eine Überprüfung der minimierten Internalisierung bzw. des verminderten Vesikeltransports in primären Lymphozyten könnte durch eine experimentelle Umgehung des Endozytoseweges erfolgen. Durch die Behandlung von Zielzellen mit Chloroquin und der dadurch unterbundenen Ansäuerung von Endosomen kann die Freisetzung endozytierter Viren ins Zytoplasma blockiert werden. Die Inkubation dieser mit Chloroquin vorbehandelten Zellen mit IVA und die anschließende, kurzzeitige Ansäuerung des extrazellulären Mediums sollte zu einer HA-vermittelten Fusion der Virushülle mit der Zellmembran und zur Freisetzung der RNP-Komplexes direkt ins Zytoplasma führen (Stegmann *et al.* 1990). Falls ausschließlich Endozytose für die Unterbindung einer produktiven IVA-Infektion in nicht-aktivierten Lymphozyten verantwortlich ist, so sollte die Fusion der Viren mit der Zellmembran zu einer ähnlich effizienten Infektion beider Zellpopulationen führen. Darüber hinaus bieten neuere Methoden des *virus trackings* (Seisenberger *et al.* 2001) die Möglichkeit, den Infektionsvorgang mikroskopisch zu verfolgen. Alternativ könnte die Untersuchung der Genexpression von aktivierten und nicht-aktivierten Lymphozyten, beispielsweise durch Mikroarrays, Aufschluss über die Identität der verantwortlichen Moleküle geben.

Insgesamt stellt die aktivierungsabhängige Infektion und Eliminierung von Lymphozyten durch IVA einen neuen, bisher unbekanntem Mechanismus zur Unterdrückung oder Verlangsamung der antiviralen, adaptiven Immunantwort dar. Dies deckt einen weiteren Weg auf, wie IVA die antiviralen Immunfunktionen konterkariert.

7.2. Virale Strategien der Immunevasion

Neben IVA gibt es eine Vielzahl an DNA- und RNA-Viren, welche ebenfalls Mechanismen entwickelt haben, um der immunologischen Antwort des Wirtes zu entgehen, diese zu unterdrücken oder für ihre Zwecke zu manipulieren. Trotz der großen Anzahl an verschiedenen Virusfamilien, -gattungen und -arten, lassen sich die „anti-immunologischen“ Aktivitäten von Viren in einer Handvoll Konzepten zur Unterwanderung der Wirtsimmunität zusammenfassen. Dies liegt in der Tatsache begründet, dass alle die gleiche Wirtsabwehr zu bekämpfen haben, was in evolutionär parallel entstandenen Strategien zur Neutralisierung der Immunantwort resultiert.

Die Unterschiede in den verschiedenen viralen Immunevasionsstrategien beruhen in erster Linie auf virusspezifischen Eigenschaften wie Zelltropismus, Genomgröße oder Infektionsform. So stellt die ausschließlich lytische Infektion von Wirtszellen andere Anforderungen an eine virale Modulation des Immunsystems als die Etablierung einer lebenslangen Viruspersistenz. Für die rasche Infektionsausbreitung ausschließlich lytisch replizierender Viren ist eine möglichst komplette Immunsuppression des Wirts notwendig. Um hingegen bei latenten Infektionen eine lange Co-Existenz mit dem Wirt zu gewährleisten, muss eine selektive Immuntoleranz oder -ignoranz gegenüber viralen Antigenen induziert werden, gleichzeitig jedoch gewährleistet werden, dass eine

übermäßig starke Virusvermehrung den Wirt nicht irreparabel schädigt. Dies setzt voraus, dass gezielt in einzelne Aspekte des Immunregelwerks eingegriffen wird. Hierfür ist die Expression von meist mehreren immunmodulatorischen, viralen Proteinen und somit ein größeres virales Genom notwendig. Ein breiter Zelltropismus stellt zudem Anforderungen an die gewebsspezifische Modulation der Immunregulation. Beispielsweise macht die Infektion von MHC-Klasse II-positiven Wirtszellen eine entsprechende Beeinträchtigung der CD4⁺ T-Zellantwort notwendig, die bei einer Infektion von ausschließlich MHC-Klasse II-negativen Zielzellen nicht notwendig ist.

Die wichtigsten, bislang bekannten, viralen Immunevasionsmechanismen sollen im Folgenden kurz vorgestellt und anschließend im Kontext der IVA-Infektion diskutiert werden.

7.3. Die angeborene Immunantwort und die virale Immunevasion

Viren stehen nach Infektion zunächst der angeborenen Immunabwehr mit einer Fülle von Mechanismen, wie pro-inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen, dem Komplementsystem, NK-Zellen (in Abschnitt 7.5.2.1. näher behandelt) und antigenunspezifischer Phagozytose gegenüber. Gegen all diese Abwehrmechanismen haben Viren verschiedene Evasionsstrategien entwickelt. Vor allem DNA-Viren mit einem vergleichsweise großen Genom, wie z.B. Herpesviren und Pockenviren, gönnen sich den Luxus einzelne oder mehrere dieser Aspekte gezielt zu unterminieren. RNA-Viren mit einem kleineren Genom und daraus resultierend einer begrenzten Anzahl an viralen Proteinen müssen hingegen zentralere Mechanismen der Immunantwort aushebeln, um dieser entgehen zu können.

7.3.1. Große DNA-Viren und deren Bekämpfung der angeborenen Immunität

7.3.1.1. DNA-Viren und die Beeinflussung des Zytokin-/Chemokinsystems

Die Familie der Herpesviren lässt sich in Abhängigkeit von Replikationsdauer, Pathogenität und Zellspezifität in Alpha- [unter anderem die Herpes-Simplex-Viren 1 und 2 (HSV)], Beta- [unter anderem das Cytomegalievirus (CMV)] und Gamma-Herpesviren [unter anderem das Epstein-Barr-Virus (EBV)] unterteilen.

Die einzelnen Mitglieder besitzen ein doppelsträngiges DNA-Genom von 120 bis 230 kbp, welches für etwa 100 bis 200 Gene kodiert (Alcami 2003). Sie gehören in den meisten Fällen zu den persistierenden Viren, welche einen Wirt lebenslang infizieren und durch ihre anti-immunologischen Aktivitäten ihre vollständige Auslöschung verhindern. Herpesviren besitzen eine lytische Phase der Replikation, in welcher ihr volles Repertoire an immunogenen und immunmodulatorischen Proteinen

exprimiert wird, und eine latente Phase, in der die Viren durch Expression von möglichst wenig immunogenen, jedoch einigen immunmodulatorischen Proteinen versuchen der Immunantwort zu entgehen. Das große Genom bietet viel Platz für diese immunmodulatorischen Moleküle. Zur Unterwanderung einer antiviralen Immunantwort stehen den großen DNA-Viren neben viralen Homologen zellulärer Zytokine und Chemokine (vCK), auch virale, membranständige Zytokin- und Chemokinrezeptoren (vCKR), sowie lösliche Zytokin- und Chemokinrezeptoren zur Verfügung. Letztere zeigen eine gewisse Homologie zu den membranständigen, zellulären Gegenstücken, werden jedoch sezerniert und binden an die Zytokine/Chemokine des Wirts, um so deren Aktivität zu blockieren. Des Weiteren kodieren große DNA-Viren noch für sogenannte Zytokin- und Chemokinbindende Proteine (*viral chemokine binding proteins*; vCKBP), welche ähnlich arbeiten wie die viralen löslichen Zytokin-/Chemokinrezeptoren, jedoch keine bekannte Homologie zu Wirtsproteinen aufweisen (McFadden and Murphy 2000; Alcamí 2003; Sodhi *et al.* 2004; Nicholas 2005).

Unter den viralen Zytokinen ist vor allem das virale IL-10 (vIL-10) zu nennen, welches vom γ -Herpesvirus EBV sezerniert wird (Alcamí 2003). Das vIL-10 besitzt zwar die Fähigkeit zur Inhibierung der zellulären Immunantwort, hat jedoch keinerlei immunstimulatorische Aktivitäten, welche dem zellulären IL-10 zugeschrieben werden (Bowie *et al.* 2004). Dies unterstreicht, dass Viren nicht nur zelluläre Gene in ihre eigenes Genom integrieren, wie bei IL-10 wahrscheinlich geschehen, sondern diese Gene und Proteine nachfolgend für ihre Bedürfnisse optimieren (Alcamí 2003; Nicholas 2005).

Das Kaposi-Sarkom-assoziierte (γ -)Herpesvirus (KSHV) kodiert für virale Chemokine, die mit Chemokinrezeptoren auf T-Helferzellen vom Typ 2 (T_H2) interagieren, und so eine Polarisierung der Immunantwort in Richtung T_H2 und weg von einer protektiven T-Helferzellen Typ 1 (T_H1)-Antwort bewirken. Dies ist ein weiteres Beispiel für das Entgehen der Immunantwort durch Aktivierung einer Immunantwort, die ungeeignet zur Bekämpfung der Infektion ist. Gleichzeitig kann die KSHV-Replikation und -Verbreitung zu unkontrollierten Wachstumssignalen auch für uninfizierte Wirtszellen und, wie der Name des Virus andeutet, zu Tumoren führen (Nicholas 2005).

Im Bereich der viralen Zytokin-/Chemokinrezeptoren gibt es ebenfalls eine Fülle von Beispielen (Alcamí 2003; Sodhi *et al.* 2004; Finlay and McFadden 2006). Zusammengefasst erfüllen diese Rezeptoren zwei Funktionen. Zum einen nutzen Viren diese membranständigen Proteine, um Signale ins Zellinnere zu leiten (Sodhi *et al.* 2004). Zum anderen werden durch die Rezeptoren dem System Chemokine entzogen (Bodaghi *et al.* 1998).

Die zweite große Familie der DNA-Viren, welche für eine Vielzahl an immunmodulatorischen Genprodukten kodieren sind die Pockenviren. Ihr, je nach Familienmitglied, zwischen 130 und 300 kbp großes dsDNA-Genom kodiert für bis zu 200 Proteine. Die bekanntesten Pockenviren sind die Variolaviren, auslösendes Agens der humanen Pockenerkrankung, und die Vacciniaviren, eine von den Kuhpockenviren abstammende Pockenvirusart, welche als Impfstoff zur Bekämpfung der Variolaviren eingesetzt wurde. Die Familie der Pockenviren greift ebenfalls mit einer Vielzahl von

Proteinen in das Zytokin-/Chemokinsystem des Wirts ein. Die Tatsache, dass Pockenviren jedoch, im Gegensatz zu Herpesviren, nur eine akute Infektion auslösen, welche entweder zum Tode des Wirts oder zur Genesung mit vollständiger Auslöschung des Virus führt, spiegelt sich auch in ihrem anti-Chemokin-/Zytokinsystem-Repertoire wider. Während Herpesviren bevorzugt Homologe von Zytokinen, Chemokinen und den entsprechenden Rezeptoren exprimieren und damit die Immunantwort eher modulieren als inhibieren, exprimieren Pockenviren oft lösliche Zytokin- und Chemokinrezeptoren sowie Chemokinbindeproteine, welche zur Bindung der entsprechenden Liganden und damit einhergehend zu einer Inhibition der Zytokin-/Chemokinantwort führen (McFadden and Murphy 2000; Alcami 2003; Sodhi *et al.* 2004). Eine ganze Reihe an Pockenvirusarten besitzen zum Beispiel Tumor-Nekrosefaktor (TNF)-bindende, lösliche Zytokinrezeptoren (vTNFR), wodurch die TNF-Antwort inhibiert wird (Upton *et al.* 1991; Alcami 2003).

Insgesamt haben DNA-Viren eine Vielzahl an Mechanismen entwickelt dem Zytokin- und Chemokinsystem der Zelle entgegenzuwirken und es für ihre Zwecke zu nutzen. Gleichzeitig bietet die Untersuchung der verwendeten Mechanismen einen tieferen Einblick in die Interaktionen zwischen Viren und dem Immunsystem, verbunden mit der Möglichkeit virale Erkrankungen besser zu bekämpfen und die entsprechenden Mechanismen auch für die Behandlung von Krankheiten in anderen entzündlichen Kontexten zu nutzen (Lucas and McFadden 2004).

7.3.1.2. Immunmodulatoren und Adhäsionsmoleküle auf Oberflächen von infizierten Zellen und Viruspartikeln

Ein weiteres, wichtiges, antivirales Instrument der angeborenen Immunantwort stellt das Komplementsystem dar. Dieses aus mehreren Dutzend im Serum zirkulierenden oder an Zellen gebundenen Proteinen bestehende System beinhaltet 3 verschiedene Kaskaden (klassischer, alternativer und Lektin-Signalweg), welche anti-mikrobielle Effektoraktivitäten aufweisen und darauf abzielen fremde Partikel zu markieren, Makrophagen zu rekrutieren, sowie Mikroorganismen und infizierte Zellen zu lysieren. Aufgrund der potentiellen Gefahr für normales Gewebe muss das Komplementsystem strikt und exakt kontrolliert werden. Hierfür gibt es eine ganze Reihe an Komplementinhibitoren vorwiegend auf der Oberfläche von Wirtszellen. Dies haben sich einige Viren, vor allem die DNA-Viren der Pocken- und Herpesvirusfamilie, zu Nutze gemacht und die entsprechenden Gene in ihr Genom integriert oder während ihrer Evolution eigene Komplementinhibitoren entwickelt, um die Markierung oder Lyse der Virionen oder virusinfizierter Zellen zu verhindern. Beispielfähig sind hier das *Vaccinia Virus complement control protein* (VCP) des Vacciniavirus und die Glykoproteine gC-1 und gC-2 von HSV genannt (Bernet *et al.* 2003; Mullick *et al.* 2003; Blom 2004). Das humane CMV (HCMV) induziert zudem die Expression der

zellulären Komplementregulatoren *decay accelerating factor* (DAF; CD55) und *membrane cofactor protein* (MCP; CD46) auf der Oberfläche der infizierten Zelle und verhindern so die Lyse der Zelle (Blom 2004; Finlay and McFadden 2006). Bei der Abschnürung der Viruspartikel von der Zelloberfläche werden diese Komplementregulatoren dann in die Virushülle eingebaut. Dadurch werden auch die Virionen vor komplementvermittelter Lyse geschützt (Alcami and Koszinowski 2000; Bernet *et al.* 2003; Blom 2004; Cantin *et al.* 2005).

7.3.2. RNA-Viren unterwandern zentrale Mechanismen der angeborenen Immunität: Viren und die antivirale Interferonantwort

Trotz eines meist deutlich kleineren Genoms gelingt es auch vielen RNA-Viren sich der angeborenen Immunantwort erfolgreich zu entziehen. In den meisten Fällen wird die IFN-Antwort unterwandert, die früh nach Infektion induziert wird und eine Vielzahl an antiviralen Aktivitäten nach sich zieht. Zellen erkennen Pathogene mittels *pattern recognition receptors* (PRR), welche sogenannte *pathogen-associated molecular pattern* (PAMPs) detektieren. Dies sind molekulare Bestandteile von Pathogenen einschließlich der genetischen Information in Form von DNA und RNA. Die wohl bekanntesten PAMP-Rezeptoren/PRRs sind die Toll-like Rezeptoren (TLR) (Bonjardim 2005). Einige davon befinden sich auf der Oberfläche der Zelle (unter anderem TLR1, 2, 4 und 6) und einige in Endosomen im Zellinneren (unter anderem TLR3, 7, 8 und 9) (Boehme and Compton 2004). Zudem gibt es im Zytoplasma noch weitere PRRs, welche als *retinoic acid-inducible gene* (RIG-I) und *melanoma-differentiation associated gene 5* (MDA5) bezeichnet werden (Yoneyama *et al.* 2004). Nach Virusinfektion und -detektion durch die PAMP-Rezeptoren werden verschiedene Signalwege stimuliert. Hierzu gehören neben der Aktivierung der generellen Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 auch die Phosphorylierung und eine daraus resultierende Aktivierung vom *IFN regulatory factor-3* (IRF-3) (Weber *et al.* 2004). Die gleichzeitige Induktion dieser Transkriptionsfaktoren resultiert in der Transkription der frühen Gene der Typ I-IFN-Antwort, zu welchen das IFN- β und einige der IFN- α -Subtypen zählen. In einer nachfolgenden Reihe von Ereignissen werden diese Typ I-Interferone sezerniert und binden dann an Typ I-IFN-Rezeptoren (IFNAR) auf der infizierten, aber vor allem auf nicht-infizierten Nachbarzellen. Dadurch werden über den JAK/STAT-Signalweg und die nachfolgende Aktivierung von IFN-stimulierten Genen (ISG) eine Vielzahl von antiviral wirkenden Proteinen induziert. Hierzu gehören unter anderem die Virusreplikation-hemmenden Mx-Proteine (Haller and Kochs 2002) und die durch dsRNA induzierte Proteinkinase R (PKR), welche die Translation von mRNA in der Zelle inhibiert, zudem Apoptose induziert und so dem Virus die Grundlage für die Replikation nimmt (Grandvaux *et al.* 2002; Weber *et al.* 2004; Garcia *et al.* 2006). Des Weiteren wird das Protein 2-5 OAS induziert, welches die Synthese von kurzen 2'-5'-Oligoadenylaten katalysiert. Dies wiederum aktiviert die Ribonuklease (RNase) L, die

nachfolgend sowohl virale als auch zelluläre RNAs degradiert und so ebenfalls antiviral wirkt (Weber *et al.* 2004).

Für praktisch jeden Schritt dieses antiviralen IFN-Signalweges gibt es virale Inhibitoren, sei es zur Verhinderung der IFN-Synthese, zur Inaktivierung der ausgeschütteten IFN-Moleküle, zur Inhibition des anschließenden IFNAR-JAK-STAT-Signalweges oder zur Störung der durch IFN-induzierten, antiviralen Proteine (Weber *et al.* 2004). Die Wichtigkeit dieses Signalwegs zur Bekämpfung von Pathogenen lässt sich allein an der Tatsache ablesen, dass nahezu jedes Virus, selbst wenn es für eine nur sehr begrenzte Anzahl an Proteinen kodiert, einen Weg gefunden hat, das Interferonsystem zu beeinflussen (Alcami and Koszinowski 2000; Grandvaux *et al.* 2002; Weber *et al.* 2004; Bonjardim 2005; Hengel *et al.* 2005; Finlay and McFadden 2006). Dies beinhaltet auch IVA, welches über das virale Protein NS1 die IRF-3-Aktivierung (Talon *et al.* 2000), sowie den AP-1 (Ludwig *et al.* 2002) und NF- κ B-Signalweg (Wang *et al.* 2000) inhibiert. Zusätzlich verhindert NS1 die Aktivierung der PKR durch Binden von dsRNA, welche so nicht mehr von der PKR erkannt werden kann bzw. durch direkte Inhibition der PKR (Lu *et al.* 1995; Bergmann *et al.* 2000).

Dies alles zeigt, dass der Typ I-IFN-Signalweg ein globales, virales Ziel zur Inhibition der Induktion einer antiviralen Immunantwort darstellt. Für DNA-Viren ist dies nur einer von mehreren Mechanismen zur Unterdrückung oder Veränderung der angeborenen Immunität. Für RNA-Viren mit ihrem optimierten, kleinen Genom ist es meist die Hauptwaffe gegen eine angeborene Immunantwort.

7.4. Die adaptive, humorale Immunantwort und die virale Immunevasion

Die Virushülle und hierbei vor allem die viralen Adhäsionsmoleküle stellen den Hauptangriffspunkt des Immunsystems, insbesondere der humoralen Immunantwort, dar.

Große DNA-Viren entgehen teilweise der humoralen Immunantwort, indem sie die zelluläre Immunantwort, die für die Antikörperherstellung notwendig ist (siehe unten), durch die bereits diskutierte Expression von immunmodulatorischen Proteinen unterlaufen. Die Etablierung von Latenz in Wirtszellen bietet eine weitere Möglichkeit wie sich DNA-Viren der humoralen Immunantwort entziehen können.

Hierzu sind RNA-Viren nur bedingt in der Lage, da sie aufgrund ihres kleinen Genoms nicht für entsprechende Modulatoren kodieren können. Viele RNA-Viren nutzen stattdessen aus, dass zum einen ihr minimales Genom in kurzer Zeit repliziert werden kann und zum anderen die dabei verwendeten RNA-Replikasen mit nur mäßiger Genauigkeit arbeiten, da sie keine Korrekturlesefunktion besitzen. Hierdurch können in einem relativ kurzen Zeitraum eine Vielzahl an Virusvarianten entstehen, die durch die humorale Immunantwort nicht komplett eliminiert werden (Finlay and McFadden 2006). Paradebeispiele für solche schnell mutierende RNA-Viren sind das humane Immundefizienzvirus (HIV), das Hepatitisvirus C (HVC) und IVA. HIV und HVC verändern

sich dermaßen rasant, dass sich die Entwicklung von Impfstoffen als äußerst schwer gestaltet (Finlay and McFadden 2006) und auch IVA hat eine so hohe Mutationsrate, dass jedes Jahr neue Varianten auftauchen und der Impfschutz dementsprechend jährlich aufgefrischt werden muss (<http://www.who.int/csr/disease/influenza/vaccinerecommendations/en/index.html>).

Da bei IVA die virale RNA während eines Replikationszyklus zweimal umgeschrieben wird (von vRNA in cRNA und dann wieder in vRNA, welche in die Nachkommen-Virionen verpackt wird), erhöht dies die Chance auf mittels Mutation (*Antigen-drift*) entstandener Virusvarianten. Neukombination der einzelnen viralen Gensegmente (*Antigen-shift*) vergrößert die Variantenzahl weiter, so dass eine Vielzahl von sogenannten viralen Quasispezies entsteht. Von diesen Veränderungen sind vor allem das HA und die NA betroffen, da sie die Oberflächenproteine der Virionen und somit wichtige Ziele der humoralen Immunantwort darstellen und dieser so entgehen können (Webster *et al.* 1992; Hilleman 2002).

7.5. Die adaptive, zelluläre Immunantwort und die virale Immunevasion

7.5.1. Die adaptive Immunantwort gegen Viren

Intrazelluläre, virale Proteine wie die Polymerasen, das Matrixprotein M1 oder auch das Nukleoprotein NP sind sehr viel konservierter als die sich unter Selektionsdruck befindlichen Oberflächenproteine. Aufgrund der Wichtigkeit der internen Proteine im Hinblick auf eine optimale Replikation, ist deren Potential zu mutieren zudem wahrscheinlich eingeschränkt, was dem Immunsystem die Gelegenheit bietet eine T-Zell-vermittelte Immunantwort gegen diese Antigene zu richten (Epstein *et al.* 2005).

Nach dem Eindringen eines Pathogens in den Wirt spielen DC eine wichtige Rolle für die angeborene Immunität durch Detektion der Pathogene mittels PRRs wie TLRs und RIG-I und nachfolgender Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen (siehe oben). Zudem werden Antigene auf MHC-Klasse I und II-Molekülen an T-Zellen präsentiert. Dementsprechend haben DC eine wichtige Brückenfunktion zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort (Liu 2005; Rossi and Young 2005). Virusspezifische T_H1-Zellen unterstützen dabei die Aktivierung der CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen (CTL), welche dann ihre Effektorfunktionen ausführen und virusbefallene Zellen eliminieren. Zudem helfen CD4⁺ T-Zellen von Typ T_H1 und T_H2 bei der Aktivierung von virusspezifischen B-Zellen und der nachfolgenden humoralen Immunantwort gegen das Pathogen (Liu 2005).

7.5.2. Unterwanderung der adaptiven Immunität durch Viren

Aufgrund der Wichtigkeit der adaptiven Immunantwort zur Bekämpfung von Infektionen ist es ersichtlich, dass Viren und auch andere Pathogene Mechanismen entwickelt haben, um deren Induktion, aber auch die resultierenden Effektorfunktionen zu inhibieren, eliminieren, unterwandern oder gezielt in eine für den Wirt unvorteilhafte Richtung zu dirigieren.

Hierbei stellen die DC die prominentesten Opfer dar. Herpesviren (Novak and Peng 2005) und Pockenviren haben vielfältige Mechanismen entwickelt diese Zellen zu beeinflussen. So verhindert das Vacciniavirus durch Infektion der DC deren Wanderung, indem es die Expression des dafür essentiellen Chemokinrezeptors CCR7 auf den DC unterdrückt (Alcami 2007; Humrich *et al.* 2007) und minimiert über das Protein A39R deren Fähigkeit zur Phagozytose (Walzer *et al.* 2005). Zudem ist eine Vielzahl an Viren bekannt, welche die Reifung von DC verhindern. Hierzu gehören das HSV, das HCMV und das Vacciniavirus, welche selektiv die Expression von CD83, einem wichtigen Reifungsmarker von DC, herunterregulieren. Das HIV-Protein Vpr bewirkt ebenfalls, dass DC in einem unreifen Status mit niedriger Expression von CD80, CD83 und CD86 und zudem kaum Ausschüttung des T_H1-stimulierenden IL-12, hingegen starker Expression des inhibitorischen IL-10, verbleiben (Majumder *et al.* 2005). Des Weiteren können Viren DC so manipulieren, dass diese nachfolgend T_H2-Zellen durch die Sezernierung von IL-4 rekrutieren und dadurch eine T_H1-Zellantwort verhindern, welche notwendig für die Viruskontrolle wäre (Palucka and Banchereau 2002).

7.5.2.1. Manipulation der Antigenpräsentation auf MHC-Klasse I und II

Ein Hauptziel der viralen Maßnahmen gegen die Induktion der adaptiven Immunantwort ist die Unterdrückung der Antigenpräsentation auf MHC-Klasse I und II. Nahezu jeder Schritt der Antigenprozessierung und -präsentation wird durch das ein oder andere Virus inhibiert oder moduliert (Miller and Sedmak 1999; Hewitt 2003; Lilley and Ploegh 2005; Lin *et al.* 2007).

MHC-Klasse I-Moleküle sind auf allen kernhaltigen Zellen zu finden, dementsprechend sind sie Angriffspunkte vieler Viren unabhängig vom jeweiligen Zelltropismus und zielen darauf ab, die Detektion und Eliminierung der befallenen Zelle durch antigenspezifische CD8⁺ T-Zellen (über MHC-Klasse I) bzw. die Detektion durch CD4⁺ T-Zellen (über MHC-Klasse II) zu verhindern.

Viele Viren greifen direkt in den MHC-Klasse I-Präsentationsweg ein. Das Protein ICP47 des HSV bindet an den *transporter associated with antigen presentation* (TAP) und inhibiert so den Transport von Peptiden aus dem Zytosol ins ER (Miller and Sedmak 1999). Andere virale Proteine inhibieren den Transport der MHC-Klasse I-Moleküle aus dem ER oder bewirken einen Transport zurück ins

Zytoplasma bzw. in Lysosomen, was in beiden Fällen zur Degradation der MHC-Klasse I-Moleküle führt (Lilley and Ploegh 2005).

MHC-Klasse I-negative Zellen sind jedoch das primäre Ziel von NK-Zellen. Dabei handelt es sich um lymphoide Zellen, welche im Gegensatz zu B- und T-Zellen keinen klonotypischen, antigenspezifischen Rezeptor besitzen, sondern eine Vielzahl von Oberflächenrezeptoren, die entweder aktivierende oder inhibierende Signale ins Zellinnere senden. MHC-Klasse I und hier im Speziellen *human leukocyte antigen E* (HLA-E) binden inhibitorische NK-Zellrezeptoren und verhindern so eine zytotoxische Lyse der Zelle durch die NK-Zelle. Pathogene, die eine MHC-Klasse I-Oberflächenexpression verhindern, induzieren aus diesem Grund NK-Zellaktivität, die so eine wichtige Komponente der angeborenen Immunität darstellt und dem Immunsystem die Zeit gibt, antigenspezifische T- und B-Zellen zu produzieren. Während einer Virusinfektion werden zudem meist auch (virale) NK-Zell-aktivierende Moleküle auf der Zelloberfläche exprimiert. Aufgrund der potenten antiviralen Eigenschaften der NK-Zellen haben Viren Mechanismen entwickelt, um eine NK-Zellantwort zu verhindern. Dabei greifen sie in das System aus inhibierenden und aktivierenden Liganden und NK-Rezeptoren ein. Das HCMV zum Beispiel minimiert zwar die Expression der MHC-Klasse I-Moleküle HLA-A, B und C, induziert aber die HLA-E-Präsentation auf der Oberfläche (inhibitorischer NK-Rezeptor) und verhindert gleichzeitig den Transport von aktivierenden NK-Zellliganden an die Oberfläche. Ähnlich geht HIV mit Hilfe des Proteins Nef vor, welches HLA-A und -B herunterreguliert, HLA-C und -E jedoch nicht (Lodoen and Lanier 2005).

Zur Aktivierung benötigen $CD4^+$ T-Helferzellen die Präsentation von Antigenen auf MHC-Klasse II-Molekülen. Da die $CD4^+$ T-Zellantwort sehr wichtig für die gesamte adaptive Immunität ist, manipulieren Viren auch den MHC-Klasse II-Antigenpräsentationsweg, um die Aktivierung von T-Helferzellen zu verhindern. Einige virale Proteine greifen direkt in den MHC-Klasse II-Präsentationsweg ein. Hierbei sind die HCMV-Proteine US2 und US3 zu nennen, welche auch in der Inhibition des MHC-Klasse I-Weges involviert sind. US2 transportiert MHC-Klasse II-Moleküle aus dem ER ins Zytosol, wo sie dann proteasomal degradiert werden und US3 verhindert den Transport von MHC-Klasse II an die Oberfläche (Miller and Sedmak 1999; Lilley and Ploegh 2005; Lin *et al.* 2007). Das HSV verfolgt eine andere Strategie. Das virale Glykoprotein B (gB) bindet an HLA-DR und -DM und dirigiert diese in subzelluläre Vesikel, was den Transport an die Oberfläche verhindert (Neumann *et al.* 2003).

Im Kontext von stark mutierenden RNA-Viren ist die Mutation der Epitope, welche bevorzugt über MHC-Klasse I und II präsentiert werden, eine weitere Möglichkeit die Antigenpräsentation zu minimieren. Dies kann zu einer verminderten Fähigkeit des entsprechenden Epitops führen an das MHC-Molekül zu binden oder in einer verringerten Detektion durch die jeweiligen T-Zellen resultieren (Draenert *et al.* 2004; Leslie *et al.* 2004; Letvin 2006).

7.5.2.2. Pro- und anti-apoptotische Aktivitäten von Viren

Darüber hinaus modulieren Viren häufig Signalwege, welche über Leben oder Tod der infizierten Zelle entscheiden. Oft aktivieren Viren anti-apoptotische Signale, um genügend Zeit für die Herstellung von Nachkommen zu haben und/oder Latenz zu etablieren (Hiscott *et al.* 2001; Bowie *et al.* 2004). Auf der anderen Seite induzieren viele Viren Apoptose, um die Induktion einer adaptiven Immunantwort zu verhindern. So infizieren beispielsweise HSV, das Vacciniavirus, das Masernvirus und auch IVA DC, was zu deren Absterben führt. HIV unterminiert eine T-Helferzell-basierte Immunantwort, indem CD4⁺ T-Helferzellen infiziert und über zytopathische Effekte der viralen Proteine in die Apoptose bzw. Nekrose getrieben werden. Hierbei reguliert HIV einige anti-apoptotische Signalwege herunter und induziert gleichzeitig pro-apoptotische Faktoren (Naniche and Oldstone 2000; Ahr *et al.* 2004). Hierzu zählt auch der Fas/FasL (CD95/CD95L)-Signalweg, welcher neben den T-Zellen auch benachbarte, uninfizierte CD8⁺ CTL und B-Zellen in die Apoptose treiben kann (Gougeon 2005).

Für HIV ist zudem bekannt, dass das Virus bevorzugt über den TCR stimulierte, aktivierte T-Helferzellen befällt, da die Integration des Provirus ins Wirtsgenom einen aktivierten Status der Zelle benötigt (Oswald-Richter *et al.* 2004). Douek *et al.* (Douek *et al.* 2002) konnten sogar zeigen, dass HIV präferentiell HIV-spezifische CD4⁺ T-Zellen infiziert. Dies ist wahrscheinlich nicht auf eine Form von „MHC-Klasse II-Spezifität“ des Virus zurückzuführen, sondern vielmehr auf die Tatsache, dass die virusspezifischen T-Helferzellen, im Vergleich zu nicht-virusspezifischen T-Zellen, einen viel längeren und engeren Kontakt mit den APC zeigen. Mit HIV infizierte DC fungieren hierbei als Transporter, welche die Viren zur Zielzelle bringen, diese dadurch aktivieren, aber auch gleichzeitig Viren freisetzen, welches die T-Zelle befallen (Rinaldo and Piazza 2004). Dadurch missbraucht HIV einen für die adaptive Immunität wichtigen Prozess der Aktivierung von spezifischen T-Zellen durch APC zu seiner Verbreitung und gleichzeitigen Eliminierung der adaptiven Immunantwort.

7.5.2.3. Apoptotische Aktivitäten vom Influenzavirus Typ A

IVA infiziert DC ebenfalls sehr effizient (Strobel *et al.* 2000; Nimmerjahn *et al.* 2003). Im Gegensatz zu vielen anderen Viren wie dem Vacciniavirus und dem HSV führt dies aber nicht zu einer Beeinträchtigung der Antigenpräsentation, und virale Antigene werden effizient auf MHC-Molekülen präsentiert (Brimnes *et al.* 2003; Freigang *et al.* 2005; Pollara *et al.* 2005). Dies ist dementsprechend nicht die Ursache einer beeinträchtigten, zellulären Immunität im Kontext einer schweren bis letalen IVA-Infektion. Ein anderer Mechanismus, wie IVA die zelluläre Immunantwort unterwandern könnte, ist bisher nicht detailliert beschrieben worden. Es ist jedoch klar, dass T-Zellen und B-Zellen notwendig sind, um eine IVA-Infektion erfolgreich zu bekämpfen (Epstein *et al.* 2000; Hogan *et al.*

2001a; Hogan *et al.* 2001b; Brown *et al.* 2006). Die hohe Pathogenität von IVA kann jedoch nicht alleine in der Unterdrückung der IFN-Antwort mittels NS1 sowie der humoralen Immunantwort durch Antigen-*shift* und -*drift* begründet liegen.

Die Infektion und Eliminierung von T- und B-Zellen, welche notwendig zur effektiven Bekämpfung einer IVA-Infektion sind, könnte eine mögliche Erklärung für die hohe Pathogenität von IVA darstellen. Bei einer IVA-Infektion werden häufig, besonders bei sehr pathogenen Virusstämmen, eine Lymphopenie und eine Hyperzytokinämie verbunden mit einer „überaktiven“, pro-inflammatorischen Immunantwort beobachtet (de Jong *et al.* 2006; Kobasa *et al.* 2007; Loo and Gale 2007). Die Lymphopenie manifestierte sich durch erniedrigte CD3⁺ und CD4⁺ Lymphozytenzahlen in infizierten Personen. Dies war besonders ausgeprägt bei den Patienten, welche der Krankheit erlagen. Die Viruslast und die Lymphozytenanzahl zeigten eine inverse Korrelation, was durch Elimination der Lymphozyten erklärt werden könnte (Yuen *et al.* 1998; Oh *et al.* 2000; de Jong *et al.* 2006). Die Lymphozyten könnten dabei in Folge des aus den Fugen geratenen Zytokinmilieus in die Apoptose getrieben worden sein. Auf der anderen Seite könnte die Hyperzytokinämie auch die Konsequenz eines massiven Zelltods und der damit verbundenen Zytokinausschüttung von Immunzellen sein, welche durch die IVA-Infektion ausgelöst worden ist. Dies legen die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse nahe. Tabelle 4 fasst die verschiedenen antiviralen Immunabwehr- und viralen Immunevasionsstrategien zusammen und stellt sie in den Kontext von IVA.

7.5.2.4. Mögliches Szenario einer Infektion mit Influenzaviren Typ A und Konsequenzen für die menschliche Gesundheit

Daraus ergibt sich ein mögliches Szenario, in dem IVA die in den Lungen patrouillierenden DC infiziert. Dadurch erhalten die DC gleichzeitig die entsprechenden Signale, welche zu ihrer Reifung und damit verbunden zur Wanderung zum nächsten Lymphknoten führen (Brimnes *et al.* 2003). Dort aktivieren sie virusspezifische T-Zellen, welche nachfolgend infiziert werden könnten. Da T-Zellen erst 48 - 60 Stunden nach Stimulation optimal infizierbar sind, ist es jedoch unwahrscheinlich, dass eine Aktivierung der T-Zelle sofort in deren Infektion und Eliminierung resultiert. Andere bereits zuvor induzierte T-Zellen könnten jedoch im Lymphknoten befallen und eliminiert werden, was eine verringerte zelluläre Immunität gegen Nachfolgeinfektionen bedeuten könnte. Alternativ dazu könnten die aktivierten, IVA-spezifischen T-Zellen auch zum Ort der Primärinfektion (der Lunge) wandern, wie experimentell bereits gezeigt wurde (Debes *et al.* 2006), und dann dort infiziert und getötet werden.

		Virale Immunevasionsstrategien			
Teile der Immunität	Mechanismen der Immunabwehr	Große DNA-Viren	RNA-Viren im Allgemeinen	Influenzaviren (Typ A)	Abschnitt der Diskussion
<i>Angeborene Immunität</i>	Zytokine und Chemokine	virale Chemokine (vCK), virale Chemokinrezeptoren (vCKR), virale Chemokinbindeproteine (vCKBP)	Nur sehr wenige Beispiele für virale Homologe des Zytokin-/Chemokinsystems (HIV als Ausnahme)	/	7.3.1.1.
	Interferonantwort	Verhinderung der IFN-Synthese / Inaktivierung der ausgeschütteten IFN-Moleküle / Inhibition des IFNAR-JAK-STAT-Signalweges oder der resultierenden antiviralen Proteine		NS1	7.3.2.
	Komplement	Komplementinhibitoren (selbst kodiert oder von Wirtszelle entwendet)	Nur bei Retroviren Mitnahme von Komplementinhibitoren von Wirtszelle bekannt	/	7.3.1.2.
	NK-Zellvermittelte Immunität	Liganden für inhibitorische NK-Zellrezeptoren	Nef von HIV und E2 von HVC	/	7.5.2.1.
<i>Humorale, adaptive Immunität</i>	Antikörper zur Neutralisierung von Pathogenen	Beeinträchtigung der zellulären Immunität, welche der humoralen vorausgeht; Etablierung von Latenz; Mutationen bei starkem Selektionsdruck	Mutationen der viralen Oberflächen	Antigen-drift und Antigen-shift	7.4.
	Antikörper zur Markierung von Pathogenen und infizierten Zellen				
<i>Zelluläre, adaptive Immunität</i>	APC zur Aktivierung von B- und T-Zellen	Immunmodulatorische Proteine; Fehlerhafte Reifung der APC; Inhibierung von MHC-Klasse I und II	HIV inhibiert MHC-Klasse I und II-Weg; Inhibition der DC-Reifung und T-Zell-aktivierung	Infektion und möglicherweise Nutzung als Transportmittel	7.5.2.
	CD4-positive und CD8-positive T-Zellen	Fehlerhafte Reifung und fehlende Signale der APC verhindern Aktivierung	Mutationen der Antigene für CTL-Erkennung; Infektion und Eliminierung der CD4-positiven T-Zellen (HIV)	Infektion und Eliminierung	7.1. und 7.5.2.
	B-Zellen zur Induktion der humoralen Immunität	Nicht oder falsch aktivierte T-Helferzellen können B-Zellen nicht aktivieren	Apoptose ohne vorherige Infektion (HIV)	Infektion und Eliminierung	7.1. und 7.5.2.

Tabelle 4. Antivirale Immunabwehrmechanismen und virale Immunevasionsstrategien

Dies alles liefert ein Bild, in dem es einen Wettlauf zwischen der Unterdrückung des Immunsystems (durch IVA) und der Aktivierung von Effektorfunktionen gegen IVA (durch das Immunsystem) gibt. Ein bereits voraktiviertes Immunsystem (durch Impfung oder vorherigen Kontakt) führt zu einer schnellen Entdeckung und Eliminierung der Viren mittels eines vorhandenen immunologischen Gedächtnisses, verbunden mit moderatem Virustiter und lokaler Infektion. In diesem Fall könnte eine schnelle Immunantwort der beschleunigten Virusvermehrung entgegenwirken und ein ansonsten pathogenes Virus besiegen.

Ein für einen neuen Virusstamm naives oder zumindest kaum voraktiviertes Immunsystem führt hingegen, vor allem bei hochvirulenten, schnell replizierenden Viren, zu einer rasanten Vermehrung des Virus, was möglicherweise in einer systemischen Infektion und mitunter im Tod des Wirts resultiert. Was einen IVA-Stamm virulenter macht als einen anderen und damit über Leben oder Tod des Wirts entscheidet, ist noch nicht endgültig geklärt, scheint jedoch durch mehrere Faktoren bestimmt zu werden. Zum einen ist mit Sicherheit der Tropismus für einen bestimmten Wirt von großer Bedeutung. Hierfür sind, wie bereits eingehend beschrieben, HA und NA entscheidend. Neben HA und NA konnte auch gezeigt werden, dass die viralen Polymerasen, und hier vor allem PB2, eine bestimmende Rolle für die Virulenz von IVA spielen (Wright 2007). Dies könnte in einer effizienteren Replikation der Viren begründet liegen und zu einer schnelleren, aber vielleicht auch effizienteren Vermehrung der Viren innerhalb der Zielzellen führen und so in einem höheren Virustiter resultieren. Neueste Studien zeigen, dass auch das aus einem alternativen Leserahmen im PB1-Gen resultierende PB1-F2-Protein eine Rolle bei der gesteigerten Virusreplikation spielen könnte. Zudem induziert die vollständige Version dieses Proteins Apoptose durch Einlagerung in die Mitochondrienmembran, führt zu einer vermehrten Zytokinausschüttung in infizierten Mäusen und verschlimmert sekundäre, opportunistische bakterielle Infektionen in der Lunge nach IVA-Infektion (Chen *et al.* 2001; McAuley *et al.* 2007). Letzteres war bei hochpathogenen IVA-Stämmen – wie dem die Spanische Grippe im Jahre 1918 auslösenden IVA – besonders ausgeprägt und könnte möglicherweise die Ursache in einer vermehrten Eliminierung von Immunzellen im Allgemeinen und aktivierten Lymphozyten im Speziellen haben. Dadurch könnten besonders aggressiv replizierende IVA-Stämme sogar in der Lage sein ein bereits voraktiviertes Immunsystem erfolgreich zu unterwandern. Dies wird durch die gesteigerte Anzahl von Toten zwischen 18 und 65 Jahren während Pandemien unterstrichen. Den pandemieauslösenden, hochpathogenen Viren fielen viele Menschen mit intaktem, „ausgebildetem“ Immunsystem zum Opfer (Wright 2007). In diesem Kontext stellt sich die Frage, ob es einem IVA Vorteile bringt, seinen Wirt auf diese Weise zu töten. Lebenslang persistierende Viren versuchen eher eine Co-Existenz mit ihrem Wirt einzugehen, um sich nicht selber ihrer Lebensgrundlage zu berauben. Bei IVA ist dies jedoch nicht notwendig. Zum einen gewährleistet die schnelle Replikation und Virusfreisetzung eine effiziente Verbreitung. Aus diesem Grund muss IVA nicht darauf achten den Wirt am Leben zu lassen, sondern kann sich evolutionär in Richtung optimale Vermehrung und Verbreitung hin entwickeln, mit dem Töten des Wirtes als mögliches Beiprodukt. Zum anderen hat IVA ein natürliches Reservoir in Wasservögeln, so dass selbst die vollständige Auslöschung einer bestimmten Wirtsart nicht zu Eliminierung dieser Virusfamilie führen würde (Webster *et al.* 1992). Da es zudem nur einer begrenzten Anzahl an Veränderungen des HA-Moleküls bedarf (Glaser *et al.* 2005; Stevens *et al.* 2006), um den Wirtstropismus zu verändern, sind hochpathogene IVA, wie H5N1 nicht zu unterschätzen. Aufgrund einer bisher unzureichenden Adaption an den humanen Wirt, ist bei Letzterem bislang keine Mensch-zu-Mensch-Übertragung möglich. IVA zeigt jedoch das Phänomen der Anpassung des HA-Moleküls an den infizierten Wirt durch die Mutation der Rezeptorbindestelle

(Mochalova *et al.* 2003). Dies ist wahrscheinlich von großer Bedeutung für das Überspringen einer Speziesbarriere durch einen IVA-Subtyp und, in Kombination mit dem nahezu unerschöpflichen Reservoir an neuen Virusvarianten aus Wasservögeln, bedeutend für die Entstehung neuer, humanpathogener IVA-Subtypen. Deshalb ist ein grundlegendes Verständnis der Wechselwirkungen zwischen Virus und Wirt unerlässlich. Hierdurch könnten zelluläre Faktoren identifiziert werden, welche es erlauben eine IVA-Infektion zu verhindern. Diese sollten, im Vergleich zur direkten Bekämpfung der viralen Proteine, eine wesentlich geringere Gefahr in sich bergen durch Mutationen therapeutisch unwirksam zu werden, was im Rahmen von Impfungen und antiviralen Medikamenten gegen IVA ein exorbitantes Problem darstellt.

8. Ausblick

Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte gezeigt werden, dass IVA aktivierte T-Lymphozyten infiziert und eliminiert. Durch Vorarbeiten ist bekannt, dass für eine produktive Infektion eine NF- κ B-Aktivierung vorliegen muss (Nimmerjahn *et al.* 2004). Daraus lässt sich schließen, dass durch den NF- κ B-Signalweg induzierte Effektormoleküle für die Entscheidung verantwortlich zeichnen, ob eine produktive Virusinfektion möglich ist. Diese Effektormoleküle zu identifizieren und im Falle einer IVA-Infektion gezielt inhibieren zu können, würde die oben gestellten Anforderungen an eine effektive, von Virusmutationen wahrscheinlich weitgehend unabhängige Bekämpfung des Virus erfüllen. Die Inhibition des NF- κ B-Signalweges selber stellt eine bereits angedachte Möglichkeit dar (Wurzer *et al.* 2004; Mazur *et al.* 2007). In einen so vielfältig involvierten Signalweg einzugreifen birgt jedoch immer die Gefahr von unerwünschten Nebeneffekten. Zudem sind viele der zur Zeit verfügbaren NF- κ B-Inhibitoren hochtoxisch. Die experimentellen Ansätze zur Blockierung einer produktiven IVA-Infektion in ruhenden B-Zellen haben den vorhandenen Block in ruhenden Lymphozyten auf den Bereich zwischen Bindung des Virus und Transport in die Endosomen eingengt. Eine Untersuchung der hieran beteiligten Moleküle in Abhängigkeit von NF- κ B in aktivierten gegenüber ruhenden Lymphozyten könnte die möglichen Kandidaten weiter reduzieren. Ob die entsprechenden Proteine dann auch in aktivierten und ruhenden T-Zellen unterschiedlich exprimiert werden, bleibt abzuwarten. Sollte dies jedoch der Fall sein, würde dies deren Bedeutung unterstreichen.

Eine Untersuchung der Eliminierung der aktivierten T-Zellen durch IVA und der zugrunde liegenden Mechanismen könnte weitere interessante Einblicke in die Interaktionen zwischen Virus und Wirtszelle liefern. Es ist bekannt, dass IVA auf mehreren Wegen Apoptose induzieren kann (Chen *et al.* 2001; Schultz-Cherry *et al.* 2001; Brydon *et al.* 2005; Zhou *et al.* 2006). Ob eine davon auch für T-Zellen verantwortlich zeichnet, bleibt zu verifizieren.

Der in dieser Arbeit verwendete IVA-Subtyp besitzt Vogelpathogenität. Um die Untersuchungen der aktivierungsabhängigen Infektion und Eliminierung von humanen T- und B-Lymphozyten auf eine breitere Basis zu stellen, wäre letztendlich die Verwendung eines humanpathogenen IVA-Subtyps interessant und lehrreich. Zu vermuten wäre eine noch größere und vielleicht sogar zeitlich schnellere Infektion der aktivierten T-Zellen. Auch dies Bedarf jedoch eingehender Untersuchungen.

9. Literatur

- Adhikary, D., U. Behrends, A. Moosmann, K. Witter, G. W. Bornkamm and J. Mautner (2006) Control of Epstein-Barr virus infection in vitro by T helper cells specific for virion glycoproteins. *J Exp Med.* **203**, 995-1006.
- Ahr, B., V. Robert-Hebmann, C. Devaux and M. Biard-Piechaczyk (2004) Apoptosis of uninfected cells induced by HIV envelope glycoproteins. *Retrovirology.* **1**, 12.
- Akarsu, H., W. P. Burmeister, C. Petosa, I. Petit, C. W. Muller, R. W. Ruigrok and F. Baudin (2003) Crystal structure of the M1 protein-binding domain of the influenza A virus nuclear export protein (NEP/NS2). *EMBO J.* **22**, 4646-55.
- Alcami, A. (2003) Viral mimicry of cytokines, chemokines and their receptors. *Nat Rev Immunol.* **3**, 36-50.
- Alcami, A. (2007) New insights into the subversion of the chemokine system by poxviruses. *Eur J Immunol.* **37**, 880-3.
- Alcami, A. and U. H. Koszinowski (2000) Viral mechanisms of immune evasion. *Immunol Today.* **21**, 447-55.
- Azzeh, M., R. Flick and G. Hobom (2001) Functional analysis of the influenza A virus cRNA promoter and construction of an ambisense transcription system. *Virology.* **289**, 400-10.
- Baltimore, D. (1971) Expression of animal virus genomes. *Bacteriol Rev.* **35**, 235-41.
- Bancroft, C. T. and T. G. Parslow (2002) Evidence for segment-nonspecific packaging of the influenza A virus genome. *J Virol.* **76**, 7133-9.
- Barchet, W., A. Krug, M. Cella, C. Newby, J. A. Fischer, A. Dzionek, A. Pekosz and M. Colonna (2005) Dendritic cells respond to influenza virus through TLR7- and PKR-independent pathways. *Eur J Immunol.* **35**, 236-42.
- Baudin, F., I. Petit, W. Weissenhorn and R. W. Ruigrok (2001) In vitro dissection of the membrane and RNP binding activities of influenza virus M1 protein. *Virology.* **281**, 102-8.
- Beaton, A. R. and R. M. Krug (1981) Selected host cell capped RNA fragments prime influenza viral RNA transcription in vivo. *Nucleic Acids Res.* **9**, 4423-36.
- Beigel, J. H., J. Farrar, A. M. Han, F. G. Hayden, R. Hyer, M. D. de Jong, S. Lochindarat, T. K. Nguyen, T. H. Nguyen, T. H. Tran, A. Nicoll, S. Touch and K. Y. Yuen (2005) Avian influenza A (H5N1) infection in humans. *N Engl J Med.* **353**, 1374-85.
- Belshe, R. B., F. K. Newman, J. Cannon, C. Duane, J. Treanor, C. Van Hoecke, B. J. Howe and G. Dubin (2004) Serum antibody responses after intradermal vaccination against influenza. *N Engl J Med.* **351**, 2286-94.
- Benczik, M. and S. L. Gaffen (2004) The interleukin (IL)-2 family cytokines: survival and proliferation signaling pathways in T lymphocytes. *Immunol Invest.* **33**, 109-42.
- Bergh, J., K. Nilsson, L. Zech and B. Giovanella (1981) Establishment and characterization of a continuous lung squamous cell carcinoma cell line (U-1752). *Anticancer Res.* **1**, 317-22.
- Bergmann, M., A. Garcia-Sastre, E. Carnero, H. Pehamberger, K. Wolff, P. Palese and T. Muster (2000) Influenza virus NS1 protein counteracts PKR-mediated inhibition of replication. *J Virol.* **74**, 6203-6.
- Bernet, J., J. Mullick, A. K. Singh and A. Sahu (2003) Viral mimicry of the complement system. *J Biosci.* **28**, 249-64.
- Blom, A. M. (2004) Strategies developed by bacteria and virus for protection from the human complement system. *Scand J Clin Lab Invest.* **64**, 479-96.
- Bodaghi, B., T. R. Jones, D. Zipeto, C. Vita, L. Sun, L. Laurent, F. Arenzana-Seisdedos, J. L. Virelizier and S. Michelson (1998) Chemokine sequestration by viral chemoreceptors as a novel viral escape strategy: withdrawal of chemokines from the environment of cytomegalovirus-infected cells. *J Exp Med.* **188**, 855-66.
- Boehme, K. W. and T. Compton (2004) Innate sensing of viruses by toll-like receptors. *J Virol.* **78**, 7867-73.
- Bonjardim, C. A. (2005) Interferons (IFNs) are key cytokines in both innate and adaptive antiviral immune responses--and viruses counteract IFN action. *Microbes Infect.* **7**, 569-78.

- Bot, A., S. Casares, S. Bot, H. von Boehmer and C. Bona (1998) Cellular mechanisms involved in protection against influenza virus infection in transgenic mice expressing a TCR receptor specific for class II hemagglutinin peptide in CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *J Immunol.* **160**, 4500-7.
- Bowie, A. G., J. Zhan and W. L. Marshall (2004) Viral appropriation of apoptotic and NF-kappaB signaling pathways. *J Cell Biochem.* **91**, 1099-108.
- Brimnes, M. K., L. Bonifaz, R. M. Steinman and T. M. Moran (2003) Influenza virus-induced dendritic cell maturation is associated with the induction of strong T cell immunity to a coadministered, normally nonimmunogenic protein. *J Exp Med.* **198**, 133-44.
- Brown, D. M., A. M. Dilzer, D. L. Meents and S. L. Swain (2006) CD4 T cell-mediated protection from lethal influenza: perforin and antibody-mediated mechanisms give a one-two punch. *J Immunol.* **177**, 2888-98.
- Brydon, E. W., S. J. Morris and C. Sweet (2005) Role of apoptosis and cytokines in influenza virus morbidity. *FEMS Microbiol Rev.* **29**, 837-50.
- Bullido, R., P. Gomez-Puertas, C. Albo and A. Portela (2000) Several protein regions contribute to determine the nuclear and cytoplasmic localization of the influenza A virus nucleoprotein. *J Gen Virol.* **81**, 135-42.
- Cantin, R., S. Methot and M. J. Tremblay (2005) Plunder and stowaways: incorporation of cellular proteins by enveloped viruses. *J Virol.* **79**, 6577-87.
- Chanturiya, A. N., G. Basanez, U. Schubert, P. Henklein, J. W. Yewdell and J. Zimmerberg (2004) PB1-F2, an influenza A virus-encoded proapoptotic mitochondrial protein, creates variably sized pores in planar lipid membranes. *J Virol.* **78**, 6304-12.
- Chen, H., G. Deng, Z. Li, G. Tian, Y. Li, P. Jiao, L. Zhang, Z. Liu, R. G. Webster and K. Yu (2004) The evolution of H5N1 influenza viruses in ducks in southern China. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101**, 10452-7.
- Chen, H., G. J. Smith, S. Y. Zhang, K. Qin, J. Wang, K. S. Li, R. G. Webster, J. S. Peiris and Y. Guan (2005) Avian flu: H5N1 virus outbreak in migratory waterfowl. *Nature.* **436**, 191-2.
- Chen, J., J. J. Skehel and D. C. Wiley (1999a) N- and C-terminal residues combine in the fusion-pH influenza hemagglutinin HA(2) subunit to form an N cap that terminates the triple-stranded coiled coil. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**, 8967-72.
- Chen, W., P. A. Calvo, D. Malide, J. Gibbs, U. Schubert, I. Bacik, S. Basta, R. O'Neill, J. Schickli, P. Palese, P. Henklein, J. R. Bennink and J. W. Yewdell (2001) A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat Med.* **7**, 1306-12.
- Chen, Z., Y. Li and R. M. Krug (1999b) Influenza A virus NS1 protein targets poly(A)-binding protein II of the cellular 3'-end processing machinery. *EMBO J.* **18**, 2273-83.
- Chizhnikov, I. V., F. M. Geraghty, D. C. Ogden, A. Hayhurst, M. Antoniou and A. J. Hay (1996) Selective proton permeability and pH regulation of the influenza virus M2 channel expressed in mouse erythroleukaemia cells. *J Physiol.* **494** (Pt 2), 329-36.
- Claas, E. C., A. D. Osterhaus, R. van Beek, J. C. De Jong, G. F. Rimmelzwaan, D. A. Senne, S. Krauss, K. F. Shortridge and R. G. Webster (1998) Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus. *Lancet.* **351**, 472-7.
- Clements, M. L., R. F. Betts, E. L. Tierney and B. R. Murphy (1986) Serum and nasal wash antibodies associated with resistance to experimental challenge with influenza A wild-type virus. *J Clin Microbiol.* **24**, 157-60.
- Compans, R. W., J. Content and P. H. Duesberg (1972) Structure of the ribonucleoprotein of influenza virus. *J Virol.* **10**, 795-800.
- Compans, R. W., H. Meier-Ewert and P. Palese (1974) Assembly of lipid-containing viruses. *J Supramol Struct.* **2**, 496-511.
- Connor, R. J., Y. Kawaoka, R. G. Webster and J. C. Paulson (1994) Receptor specificity in human, avian, and equine H2 and H3 influenza virus isolates. *Virology.* **205**, 17-23.
- Coope, H. J., P. G. Atkinson, B. Huhse, M. Belich, J. Janzen, M. J. Holman, G. G. Klaus, L. H. Johnston and S. C. Ley (2002) CD40 regulates the processing of NF-kappaB2 p100 to p52. *EMBO J.* **21**, 5375-85.
- Couceiro, J. N., J. C. Paulson and L. G. Baum (1993) Influenza virus strains selectively recognize sialyloligosaccharides on human respiratory epithelium; the role of the host cell in selection of hemagglutinin receptor specificity. *Virus Res.* **29**, 155-65.

- Cros, J. F., A. Garcia-Sastre and P. Palese (2005) An unconventional NLS is critical for the nuclear import of the influenza A virus nucleoprotein and ribonucleoprotein. *Traffic*. **6**, 205-13.
- Cros, J. F. and P. Palese (2003) Trafficking of viral genomic RNA into and out of the nucleus: influenza, Thogoto and Borna disease viruses. *Virus Res*. **95**, 3-12.
- Cross, K. J., L. M. Burleigh and D. A. Steinhauer (2001) Mechanisms of cell entry by influenza virus. *Expert Rev Mol Med*. **2001**, 1-18.
- de Jong, M. D., V. C. Bach, T. Q. Phan, M. H. Vo, T. T. Tran, B. H. Nguyen, M. Beld, T. P. Le, H. K. Truong, V. V. Nguyen, T. H. Tran, Q. H. Do and J. Farrar (2005a) Fatal avian influenza A (H5N1) in a child presenting with diarrhea followed by coma. *N Engl J Med*. **352**, 686-91.
- de Jong, M. D., C. P. Simmons, T. T. Thanh, V. M. Hien, G. J. Smith, T. N. Chau, D. M. Hoang, N. V. Chau, T. H. Khanh, V. C. Dong, P. T. Qui, B. V. Cam, Q. Ha do, Y. Guan, J. S. Peiris, N. T. Chinh, T. T. Hien and J. Farrar (2006) Fatal outcome of human influenza A (H5N1) is associated with high viral load and hypercytokinemia. *Nat Med*. **12**, 1203-7.
- de Jong, M. D., T. T. Tran, H. K. Truong, M. H. Vo, G. J. Smith, V. C. Nguyen, V. C. Bach, T. Q. Phan, Q. H. Do, Y. Guan, J. S. Peiris, T. H. Tran and J. Farrar (2005b) Oseltamivir resistance during treatment of influenza A (H5N1) infection. *N Engl J Med*. **353**, 2667-72.
- Debes, G. F., M. E. Dahl, A. J. Mahiny, K. Bonhagen, D. J. Campbell, K. Siegmund, K. J. Erb, D. B. Lewis, T. Kamradt and A. Hamann (2006) Chemotactic responses of IL-4-, IL-10-, and IFN-gamma-producing CD4+ T cells depend on tissue origin and microbial stimulus. *J Immunol*. **176**, 557-66.
- Dejardin, E. (2006) The alternative NF-kappaB pathway from biochemistry to biology: pitfalls and promises for future drug development. *Biochem Pharmacol*. **72**, 1161-79.
- Doms, R. W., R. A. Lamb, J. K. Rose and A. Helenius (1993) Folding and assembly of viral membrane proteins. *Virology*. **193**, 545-62.
- Douek, D. C., J. M. Brenchley, M. R. Betts, D. R. Ambrozak, B. J. Hill, Y. Okamoto, J. P. Casazza, J. Kuruppu, K. Kunstman, S. Wolinsky, Z. Grossman, M. Dybul, A. Oxenius, D. A. Price, M. Connors and R. A. Koup (2002) HIV preferentially infects HIV-specific CD4+ T cells. *Nature*. **417**, 95-8.
- Draenert, R., S. Le Gall, K. J. Pfafferott, A. J. Leslie, P. Chetty, C. Brander, E. C. Holmes, S. C. Chang, M. E. Feeney, M. M. Addo, L. Ruiz, D. Ramduth, P. Jeena, M. Altfeld, S. Thomas, Y. Tang, C. L. Verrill, C. Dixon, J. G. Prado, P. Kiepiela, J. Martinez-Picado, B. D. Walker and P. J. Goulder (2004) Immune selection for altered antigen processing leads to cytotoxic T lymphocyte escape in chronic HIV-1 infection. *J Exp Med*. **199**, 905-15.
- Dye, J. R., A. Palvanov, B. Guo and T. L. Rothstein (2007) B cell receptor cross-talk: exposure to lipopolysaccharide induces an alternate pathway for B cell receptor-induced ERK phosphorylation and NF-kappa B activation. *J Immunol*. **179**, 229-35.
- Eccles, R. (2005) Understanding the symptoms of the common cold and influenza. *Lancet Infect Dis*. **5**, 718-25.
- Eichelberger, M., W. Allan, M. Zijlstra, R. Jaenisch and P. C. Doherty (1991a) Clearance of influenza virus respiratory infection in mice lacking class I major histocompatibility complex-restricted CD8+ T cells. *J Exp Med*. **174**, 875-80.
- Eichelberger, M. C., M. L. Wang, W. Allan, R. G. Webster and P. C. Doherty (1991b) Influenza virus RNA in the lung and lymphoid tissue of immunologically intact and CD4-depleted mice. *J Gen Virol*. **72** (Pt 7), 1695-8.
- Elleman, C. J. and W. S. Barclay (2004) The M1 matrix protein controls the filamentous phenotype of influenza A virus. *Virology*. **321**, 144-53.
- Elton, D., M. Simpson-Holley, K. Archer, L. Medcalf, R. Hallam, J. McCauley and P. Digard (2001) Interaction of the influenza virus nucleoprotein with the cellular CRM1-mediated nuclear export pathway. *J Virol*. **75**, 408-19.
- Engelhardt, O. G., M. Smith and E. Fodor (2005) Association of the influenza A virus RNA-dependent RNA polymerase with cellular RNA polymerase II. *J Virol*. **79**, 5812-8.
- Epstein, S. L., W. P. Kong, J. A. Misplon, C. Y. Lo, T. M. Tumpey, L. Xu and G. J. Nabel (2005) Protection against multiple influenza A subtypes by vaccination with highly conserved nucleoprotein. *Vaccine*. **23**, 5404-10.

- Epstein, S. L., A. Stack, J. A. Misplon, C. Y. Lo, H. Mostowski, J. Bennink and K. Subbarao (2000) Vaccination with DNA encoding internal proteins of influenza virus does not require CD8(+) cytotoxic T lymphocytes: either CD4(+) or CD8(+) T cells can promote survival and recovery after challenge. *Int Immunol.* **12**, 91-101.
- Finlay, B. B. and G. McFadden (2006) Anti-immunology: evasion of the host immune system by bacterial and viral pathogens. *Cell.* **124**, 767-82.
- Fleischer, B., H. Becht and R. Rott (1985) Recognition of viral antigens by human influenza A virus-specific T lymphocyte clones. *J Immunol.* **135**, 2800-4.
- Fodor, E., D. C. Pritlove and G. G. Brownlee (1995) Characterization of the RNA-fork model of virion RNA in the initiation of transcription in influenza A virus. *J Virol.* **69**, 4012-9.
- Fortes, P., A. Beloso and J. Ortin (1994) Influenza virus NS1 protein inhibits pre-mRNA splicing and blocks mRNA nucleocytoplasmic transport. *EMBO J.* **13**, 704-12.
- Fouchier, R. A., V. Munster, A. Wallensten, T. M. Bestebroer, S. Herfst, D. Smith, G. F. Rimmelzwaan, B. Olsen and A. D. Osterhaus (2005) Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J Virol.* **79**, 2814-22.
- Fouchier, R. A., P. M. Schneeberger, F. W. Rozendaal, J. M. Broekman, S. A. Kemink, V. Munster, T. Kuiken, G. F. Rimmelzwaan, M. Schutten, G. J. Van Doornum, G. Koch, A. Bosman, M. Koopmans and A. D. Osterhaus (2004) Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101**, 1356-61.
- Freigang, S., H. C. Probst and M. van den Broek (2005) DC infection promotes antiviral CTL priming: the 'Winkelried' strategy. *Trends Immunol.* **26**, 13-8.
- Fujii, K., Y. Fujii, T. Noda, Y. Muramoto, T. Watanabe, A. Takada, H. Goto, T. Horimoto and Y. Kawaoka (2005) Importance of both the coding and the segment-specific noncoding regions of the influenza A virus NS segment for its efficient incorporation into virions. *J Virol.* **79**, 3766-74.
- Fujii, Y., H. Goto, T. Watanabe, T. Yoshida and Y. Kawaoka (2003) Selective incorporation of influenza virus RNA segments into virions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100**, 2002-7.
- Garcia-Robles, I., H. Akarsu, C. W. Muller, R. W. Ruigrok and F. Baudin (2005) Interaction of influenza virus proteins with nucleosomes. *Virology.* **332**, 329-36.
- Garcia-Sastre, A., A. Egorov, D. Matassov, S. Brandt, D. E. Levy, J. E. Durbin, P. Palese and T. Muster (1998) Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems. *Virology.* **252**, 324-30.
- Garcia, M. A., J. Gil, I. Ventoso, S. Guerra, E. Domingo, C. Rivas and M. Esteban (2006) Impact of protein kinase PKR in cell biology: from antiviral to antiproliferative action. *Microbiol Mol Biol Rev.* **70**, 1032-60.
- Garman, E. and G. Laver (2004) Controlling influenza by inhibiting the virus's neuraminidase. *Curr Drug Targets.* **5**, 119-36.
- Garrone, P., E. M. Neidhardt, E. Garcia, L. Galibert, C. van Kooten and J. Banchereau (1995) Fas ligation induces apoptosis of CD40-activated human B lymphocytes. *J Exp Med.* **182**, 1265-73.
- Gaush, C. R., W. L. Hard and T. F. Smith (1966) Characterization of an established line of canine kidney cells (MDCK). *Proc Soc Exp Biol Med.* **122**, 931-5.
- Geiss, G. K., M. Salvatore, T. M. Tumpey, V. S. Carter, X. Wang, C. F. Basler, J. K. Taubenberger, R. E. Bumgarner, P. Palese, M. G. Katze and A. Garcia-Sastre (2002) Cellular transcriptional profiling in influenza A virus-infected lung epithelial cells: the role of the nonstructural NS1 protein in the evasion of the host innate defense and its potential contribution to pandemic influenza. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99**, 10736-41.
- Gil, J. and M. Esteban (2000) Induction of apoptosis by the dsRNA-dependent protein kinase (PKR): mechanism of action. *Apoptosis.* **5**, 107-14.
- Glaser, L., J. Stevens, D. Zamarin, I. A. Wilson, A. Garcia-Sastre, T. M. Tumpey, C. F. Basler, J. K. Taubenberger and P. Palese (2005) A single amino acid substitution in 1918 influenza virus hemagglutinin changes receptor binding specificity. *J Virol.* **79**, 11533-6.
- Gomez-Puertas, P., C. Albo, E. Perez-Pastrana, A. Vivo and A. Portela (2000) Influenza virus matrix protein is the major driving force in virus budding. *J Virol.* **74**, 11538-47.

- Gonzalez, S. and J. Ortin (1999) Distinct regions of influenza virus PB1 polymerase subunit recognize vRNA and cRNA templates. *EMBO J.* **18**, 3767-75.
- Gougeon, M. L. (2005) To kill or be killed: how HIV exhausts the immune system. *Cell Death Differ.* **12 Suppl 1**, 845-54.
- Grandvaux, N., B. R. tenOever, M. J. Servant and J. Hiscott (2002) The interferon antiviral response: from viral invasion to evasion. *Curr Opin Infect Dis.* **15**, 259-67.
- Guan, Y., J. S. Peiris, A. S. Lipatov, T. M. Ellis, K. C. Dyrting, S. Krauss, L. J. Zhang, R. G. Webster and K. F. Shortridge (2002) Emergence of multiple genotypes of H5N1 avian influenza viruses in Hong Kong SAR. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99**, 8950-5.
- Gubareva, L. V., L. Kaiser and F. G. Hayden (2000) Influenza virus neuraminidase inhibitors. *Lancet.* **355**, 827-35.
- Guillot, L., R. Le Goffic, S. Bloch, N. Escriou, S. Akira, M. Chignard and M. Si-Tahar (2005) Involvement of toll-like receptor 3 in the immune response of lung epithelial cells to double-stranded RNA and influenza A virus. *J Biol Chem.* **280**, 5571-80.
- Guo, B., T. T. Su and D. J. Rawlings (2004) Protein kinase C family functions in B-cell activation. *Curr Opin Immunol.* **16**, 367-73.
- Haller, O. and G. Kochs (2002) Interferon-induced mx proteins: dynamin-like GTPases with antiviral activity. *Traffic.* **3**, 710-7.
- Harper, S. A., K. Fukuda, T. M. Uyeki, N. J. Cox and C. B. Bridges (2005) Prevention and control of influenza. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep.* **54**, 1-40.
- Hatada, E., M. Hasegawa, J. Mukaigawa, K. Shimizu and R. Fukuda (1989) Control of influenza virus gene expression: quantitative analysis of each viral RNA species in infected cells. *J Biochem (Tokyo).* **105**, 537-46.
- Hatada, E., S. Saito and R. Fukuda (1999) Mutant influenza viruses with a defective NS1 protein cannot block the activation of PKR in infected cells. *J Virol.* **73**, 2425-33.
- Hayden, F. G., R. L. Atmar, M. Schilling, C. Johnson, D. Poretz, D. Paar, L. Huson, P. Ward and R. G. Mills (1999) Use of the selective oral neuraminidase inhibitor oseltamivir to prevent influenza. *N Engl J Med.* **341**, 1336-43.
- Hengel, H., U. H. Koszinowski and K. K. Conzelmann (2005) Viruses know it all: new insights into IFN networks. *Trends Immunol.* **26**, 396-401.
- Hers, J. F. and J. Mulder (1961) Broad aspects of the pathology and pathogenesis of human influenza. *Am Rev Respir Dis.* **83(2)Pt 2**, 84-97.
- Hewitt, E. W. (2003) The MHC class I antigen presentation pathway: strategies for viral immune evasion. *Immunology.* **110**, 163-9.
- Hien, T. T., M. de Jong and J. Farrar (2004) Avian influenza--a challenge to global health care structures. *N Engl J Med.* **351**, 2363-5.
- Hilleman, M. R. (2002) Realities and enigmas of human viral influenza: pathogenesis, epidemiology and control. *Vaccine.* **20**, 3068-87.
- Hinshaw, V. S., C. W. Olsen, N. Dybdahl-Sissoko and D. Evans (1994) Apoptosis: a mechanism of cell killing by influenza A and B viruses. *J Virol.* **68**, 3667-73.
- Hiscott, J., H. Kwon and P. Genin (2001) Hostile takeovers: viral appropriation of the NF-kappaB pathway. *J Clin Invest.* **107**, 143-51.
- Hogan, R. J., E. J. Usherwood, W. Zhong, A. A. Roberts, R. W. Dutton, A. G. Harmsen and D. L. Woodland (2001a) Activated antigen-specific CD8+ T cells persist in the lungs following recovery from respiratory virus infections. *J Immunol.* **166**, 1813-22.
- Hogan, R. J., W. Zhong, E. J. Usherwood, T. Cookenham, A. D. Roberts and D. L. Woodland (2001b) Protection from respiratory virus infections can be mediated by antigen-specific CD4(+) T cells that persist in the lungs. *J Exp Med.* **193**, 981-6.
- Holsinger, L. J., D. Nichani, L. H. Pinto and R. A. Lamb (1994) Influenza A virus M2 ion channel protein: a structure-function analysis. *J Virol.* **68**, 1551-63.
- Hori, S., T. Nomura and S. Sakaguchi (2003) Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science.* **299**, 1057-61.
- Horimoto, T. and Y. Kawaoka (1994) Reverse genetics provides direct evidence for a correlation of hemagglutinin cleavability and virulence of an avian influenza A virus. *J Virol.* **68**, 3120-8.

- Huang, X., T. Liu, J. Muller, R. A. Levandowski and Z. Ye (2001) Effect of influenza virus matrix protein and viral RNA on ribonucleoprotein formation and nuclear export. *Virology*. **287**, 405-16.
- Hui, E. K., S. Barman, D. H. Tang, B. France and D. P. Nayak (2006) YRKL sequence of influenza virus M1 functions as the L domain motif and interacts with VPS28 and Cdc42. *J Virol*. **80**, 2291-308.
- Hui, E. K., S. Barman, T. Y. Yang and D. P. Nayak (2003) Basic residues of the helix six domain of influenza virus M1 involved in nuclear translocation of M1 can be replaced by PTAP and YPDL late assembly domain motifs. *J Virol*. **77**, 7078-92.
- Hui, E. K. and D. P. Nayak (2001) Role of ATP in influenza virus budding. *Virology*. **290**, 329-41.
- Humrich, J. Y., P. Thumann, S. Greiner, J. H. Humrich, M. Averbeck, C. Schwank, E. Kampgen, G. Schuler and L. Jenne (2007) Vaccinia virus impairs directional migration and chemokine receptor switch of human dendritic cells. *Eur J Immunol*. **37**, 954-65.
- Iezzi, G., K. Karjalainen and A. Lanzavecchia (1998) The duration of antigenic stimulation determines the fate of naive and effector T cells. *Immunity*. **8**, 89-95.
- Ito, T., J. N. Couceiro, S. Kelm, L. G. Baum, S. Krauss, M. R. Castrucci, I. Donatelli, H. Kida, J. C. Paulson, R. G. Webster and Y. Kawaoka (1998) Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. *J Virol*. **72**, 7367-73.
- Iwatsuki-Horimoto, K., T. Horimoto, Y. Fujii and Y. Kawaoka (2004) Generation of influenza A virus NS2 (NEP) mutants with an altered nuclear export signal sequence. *J Virol*. **78**, 10149-55.
- Janz, S. (2006) Myc translocations in B cell and plasma cell neoplasms. *DNA Repair (Amst)*. **5**, 1213-24.
- Jellison, E. R., S. K. Kim and R. M. Welsh (2005) Cutting edge: MHC class II-restricted killing in vivo during viral infection. *J Immunol*. **174**, 614-8.
- Johnson, N. P. and J. Mueller (2002) Updating the accounts: global mortality of the 1918-1920 "Spanish" influenza pandemic. *Bull Hist Med*. **76**, 105-15.
- Jones, I. M., P. A. Reay and K. L. Philpott (1986) Nuclear location of all three influenza polymerase proteins and a nuclear signal in polymerase PB2. *EMBO J*. **5**, 2371-6.
- Klenk, H. D., R. Rott, M. Orlich and J. Blodorn (1975) Activation of influenza A viruses by trypsin treatment. *Virology*. **68**, 426-39.
- Kobasa, D., S. M. Jones, K. Shinya, J. C. Kash, J. Copps, H. Ebihara, Y. Hatta, J. H. Kim, P. Halfmann, M. Hatta, F. Feldmann, J. B. Alimonti, L. Fernando, Y. Li, M. G. Katze, H. Feldmann and Y. Kawaoka (2007) Aberrant innate immune response in lethal infection of macaques with the 1918 influenza virus. *Nature*. **445**, 319-23.
- Kochs, G., M. Reichelt, D. Danino, J. E. Hinshaw and O. Haller (2005) Assay and functional analysis of dynamin-like Mx proteins. *Methods Enzymol*. **404**, 632-43.
- Krug, R. M., W. Yuan, D. L. Noah and A. G. Latham (2003) Intracellular warfare between human influenza viruses and human cells: the roles of the viral NS1 protein. *Virology*. **309**, 181-9.
- Kundu, A., R. T. Avalos, C. M. Sanderson and D. P. Nayak (1996) Transmembrane domain of influenza virus neuraminidase, a type II protein, possesses an apical sorting signal in polarized MDCK cells. *J Virol*. **70**, 6508-15.
- Lamb, J. R., J. N. Woody, R. J. Hartzman and D. D. Eckels (1982) In vitro influenza virus-specific antibody production in man: antigen-specific and HLA-restricted induction of helper activity mediated by cloned human T lymphocytes. *J Immunol*. **129**, 1465-70.
- Lamb, R. A. and P. W. Choppin (1981) Identification of a second protein (M2) encoded by RNA segment 7 of influenza virus. *Virology*. **112**, 729-37.
- Lamb, R. A., P. W. Choppin, R. M. Chanock and C. J. Lai (1980) Mapping of the two overlapping genes for polypeptides NS1 and NS2 on RNA segment 8 of influenza virus genome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **77**, 1857-61.
- Lawrence, C. W., R. M. Ream and T. J. Braciale (2005) Frequency, specificity, and sites of expansion of CD8+ T cells during primary pulmonary influenza virus infection. *J Immunol*. **174**, 5332-40.
- Lazarowitz, S. G. and P. W. Choppin (1975) Enhancement of the infectivity of influenza A and B viruses by proteolytic cleavage of the hemagglutinin polypeptide. *Virology*. **68**, 440-54.

- Le, Q. M., M. Kiso, K. Someya, Y. T. Sakai, T. H. Nguyen, K. H. Nguyen, N. D. Pham, H. H. Ngyen, S. Yamada, Y. Muramoto, T. Horimoto, A. Takada, H. Goto, T. Suzuki, Y. Suzuki and Y. Kawaoka (2005) Avian flu: isolation of drug-resistant H5N1 virus. *Nature*. **437**, 1108.
- Lee, T. G., J. Tomita, A. G. Hovanessian and M. G. Katze (1992) Characterization and regulation of the 58,000-dalton cellular inhibitor of the interferon-induced, dsRNA-activated protein kinase. *J Biol Chem*. **267**, 14238-43.
- Leslie, A. J., K. J. Pfafferoth, P. Chetty, R. Draenert, M. M. Addo, M. Feeney, Y. Tang, E. C. Holmes, T. Allen, J. G. Prado, M. Altfeld, C. Brander, C. Dixon, D. Ramduth, P. Jeena, S. A. Thomas, A. St John, T. A. Roach, B. Kupfer, G. Luzzi, A. Edwards, G. Taylor, H. Lyall, G. Tudor-Williams, V. Novelli, J. Martinez-Picado, P. Kiepiela, B. D. Walker and P. J. Goulder (2004) HIV evolution: CTL escape mutation and reversion after transmission. *Nat Med*. **10**, 282-9.
- Letvin, N. L. (2006) Progress and obstacles in the development of an AIDS vaccine. *Nat Rev Immunol*. **6**, 930-9.
- Li, K. S., Y. Guan, J. Wang, G. J. Smith, K. M. Xu, L. Duan, A. P. Rahardjo, P. Puthavathana, C. Buranathai, T. D. Nguyen, A. T. Estoepongastie, A. Chaisingh, P. Auewarakul, H. T. Long, N. T. Hanh, R. J. Webby, L. L. Poon, H. Chen, K. F. Shortridge, K. Y. Yuen, R. G. Webster and J. S. Peiris (2004) Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia. *Nature*. **430**, 209-13.
- Li, S., J. Y. Min, R. M. Krug and G. C. Sen (2006) Binding of the influenza A virus NS1 protein to PKR mediates the inhibition of its activation by either PACT or double-stranded RNA. *Virology*. **349**, 13-21.
- Li, X. and P. Palese (1994) Characterization of the polyadenylation signal of influenza virus RNA. *J Virol*. **68**, 1245-9.
- Liang, Y., Y. Hong and T. G. Parslow (2005) cis-Acting packaging signals in the influenza virus PB1, PB2, and PA genomic RNA segments. *J Virol*. **79**, 10348-55.
- Lilley, B. N. and H. L. Ploegh (2005) Viral modulation of antigen presentation: manipulation of cellular targets in the ER and beyond. *Immunol Rev*. **207**, 126-44.
- Lin, A., H. Xu and W. Yan (2007) Modulation of HLA expression in human cytomegalovirus immune evasion. *Cell Mol Immunol*. **4**, 91-8.
- Lin, C., S. G. Zimmer, Z. Lu, R. E. Holland, Jr., Q. Dong and T. M. Chambers (2001) The involvement of a stress-activated pathway in equine influenza virus-mediated apoptosis. *Virology*. **287**, 202-13.
- Liu, C., M. C. Eichelberger, R. W. Compans and G. M. Air (1995) Influenza type A virus neuraminidase does not play a role in viral entry, replication, assembly, or budding. *J Virol*. **69**, 1099-106.
- Liu, J., H. Xiao, F. Lei, Q. Zhu, K. Qin, X. W. Zhang, X. L. Zhang, D. Zhao, G. Wang, Y. Feng, J. Ma, W. Liu, J. Wang and G. F. Gao (2005) Highly pathogenic H5N1 influenza virus infection in migratory birds. *Science*. **309**, 1206.
- Liu, Y. J. (2005) IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu Rev Immunol*. **23**, 275-306.
- Lodoen, M. B. and L. L. Lanier (2005) Viral modulation of NK cell immunity. *Nat Rev Microbiol*. **3**, 59-69.
- Loo, Y. M. and M. Gale, Jr. (2007) Influenza: fatal immunity and the 1918 virus. *Nature*. **445**, 267-8.
- Lu, Y., X. Y. Qian and R. M. Krug (1994) The influenza virus NS1 protein: a novel inhibitor of pre-mRNA splicing. *Genes Dev*. **8**, 1817-28.
- Lu, Y., M. Wambach, M. G. Katze and R. M. Krug (1995) Binding of the influenza virus NS1 protein to double-stranded RNA inhibits the activation of the protein kinase that phosphorylates the eIF-2 translation initiation factor. *Virology*. **214**, 222-8.
- Lucas, A. and G. McFadden (2004) Secreted immunomodulatory viral proteins as novel biotherapeutics. *J Immunol*. **173**, 4765-74.
- Ludwig, S., X. Wang, C. Ehrhardt, H. Zheng, N. Donelan, O. Planz, S. Pleschka, A. Garcia-Sastre, G. Heins and T. Wolff (2002) The influenza A virus NS1 protein inhibits activation of Jun N-terminal kinase and AP-1 transcription factors. *J Virol*. **76**, 11166-71.
- Lund, J. M., L. Alexopoulou, A. Sato, M. Karow, N. C. Adams, N. W. Gale, A. Iwasaki and R. A. Flavell (2004) Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **101**, 5598-603.

- Majumder, B., M. L. Janket, E. A. Schafer, K. Schaubert, X. L. Huang, J. Kan-Mitchell, C. R. Rinaldo, Jr. and V. Ayyavoo (2005) Human immunodeficiency virus type 1 Vpr impairs dendritic cell maturation and T-cell activation: implications for viral immune escape. *J Virol.* **79**, 7990-8003.
- Martin-Benito, J., E. Area, J. Ortega, O. Llorca, J. M. Valpuesta, J. L. Carrascosa and J. Ortin (2001) Three-dimensional reconstruction of a recombinant influenza virus ribonucleoprotein particle. *EMBO Rep.* **2**, 313-7.
- Martin, K. and A. Helenius (1991a) Nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins: the viral matrix protein (M1) promotes export and inhibits import. *Cell.* **67**, 117-30.
- Martin, K. and A. Helenius (1991b) Transport of incoming influenza virus nucleocapsids into the nucleus. *J Virol.* **65**, 232-44.
- Maruoka, S., S. Hashimoto, Y. Gon, H. Nishitoh, I. Takeshita, Y. Asai, K. Mizumura, K. Shimizu, H. Ichijo and T. Horie (2003) ASK1 regulates influenza virus infection-induced apoptotic cell death. *Biochem Biophys Res Commun.* **307**, 870-6.
- Matlin, K. S., H. Reggio, A. Helenius and K. Simons (1981) Infectious entry pathway of influenza virus in a canine kidney cell line. *J Cell Biol.* **91**, 601-13.
- Mazur, I., W. J. Wurzer, C. Ehrhardt, S. Pleschka, P. Puthavathana, T. Silberzahn, T. Wolff, O. Planz and S. Ludwig (2007) Acetylsalicylic acid (ASA) blocks influenza virus propagation via its NF-kappaB-inhibiting activity. *Cell Microbiol.* **9**, 1683-94.
- McAuley, J. L., F. Hornung, K. L. Boyd, A. M. Smith, R. McKeon, J. Bennink, J. W. Yewdell and J. A. McCullers (2007) Expression of the 1918 Influenza A Virus PB1-F2 Enhances the Pathogenesis of Viral and Secondary Bacterial Pneumonia. *Cell Host and Microbe.* **2**, 240-249.
- McCullers, J. A. (2006) Insights into the interaction between influenza virus and pneumococcus. *Clin Microbiol Rev.* **19**, 571-82.
- McFadden, G. and P. M. Murphy (2000) Host-related immunomodulators encoded by poxviruses and herpesviruses. *Curr Opin Microbiol.* **3**, 371-8.
- McKimm-Breschkin, J. L. (2005) Management of influenza virus infections with neuraminidase inhibitors: detection, incidence, and implications of drug resistance. *Treat Respir Med.* **4**, 107-16.
- Medcalf, L., E. Poole, D. Elton and P. Digard (1999) Temperature-sensitive lesions in two influenza A viruses defective for replicative transcription disrupt RNA binding by the nucleoprotein. *J Virol.* **73**, 7349-56.
- Miller, D. M. and D. D. Sedmak (1999) Viral effects on antigen processing. *Curr Opin Immunol.* **11**, 94-9.
- Mizuno, T. and T. L. Rothstein (2003) Cutting edge: CD40 engagement eliminates the need for Bruton's tyrosine kinase in B cell receptor signaling for NF-kappa B. *J Immunol.* **170**, 2806-10.
- Mizuno, T. and T. L. Rothstein (2005) B cell receptor (BCR) cross-talk: CD40 engagement creates an alternate pathway for BCR signaling that activates I kappa B kinase/I kappa B alpha/NF-kappa B without the need for PI3K and phospholipase C gamma. *J Immunol.* **174**, 6062-70.
- Mochalova, L., A. Gambaryan, J. Romanova, A. Tuzikov, A. Chinarev, D. Katinger, H. Katinger, A. Egorov and N. Bovin (2003) Receptor-binding properties of modern human influenza viruses primarily isolated in Vero and MDCK cells and chicken embryonated eggs. *Virology.* **313**, 473-80.
- Morris, S. J., G. E. Price, J. M. Barnett, S. A. Hiscox, H. Smith and C. Sweet (1999) Role of neuraminidase in influenza virus-induced apoptosis. *J Gen Virol.* **80** (Pt 1), 137-46.
- Morris, S. J., H. Smith and C. Sweet (2002) Exploitation of the Herpes simplex virus translocating protein VP22 to carry influenza virus proteins into cells for studies of apoptosis: direct confirmation that neuraminidase induces apoptosis and indications that other proteins may have a role. *Arch Virol.* **147**, 961-79.
- Moscona, A. (2005) Neuraminidase inhibitors for influenza. *N Engl J Med.* **353**, 1363-73.
- Moskophidis, D. and D. Kioussis (1998) Contribution of virus-specific CD8+ cytotoxic T cells to virus clearance or pathologic manifestations of influenza virus infection in a T cell receptor transgenic mouse model. *J Exp Med.* **188**, 223-32.

- Mould, J. A., H. C. Li, C. S. Dudlak, J. D. Lear, A. Pekosz, R. A. Lamb and L. H. Pinto (2000) Mechanism for proton conduction of the M(2) ion channel of influenza A virus. *J Biol Chem.* **275**, 8592-9.
- Mozdzanowska, K., M. Furchner, D. Zharikova, J. Feng and W. Gerhard (2005) Roles of CD4+ T-cell-independent and -dependent antibody responses in the control of influenza virus infection: evidence for noncognate CD4+ T-cell activities that enhance the therapeutic activity of antiviral antibodies. *J Virol.* **79**, 5943-51.
- Mullick, J., A. Kadam and A. Sahu (2003) Herpes and pox viral complement control proteins: 'the mask of self'. *Trends Immunol.* **24**, 500-7.
- Muramoto, Y., A. Takada, K. Fujii, T. Noda, K. Iwatsuki-Horimoto, S. Watanabe, T. Horimoto, H. Kida and Y. Kawaoka (2006) Hierarchy among viral RNA (vRNA) segments in their role in vRNA incorporation into influenza A virions. *J Virol.* **80**, 2318-25.
- Naniche, D. and M. B. Oldstone (2000) Generalized immunosuppression: how viruses undermine the immune response. *Cell Mol Life Sci.* **57**, 1399-407.
- Nayak, D. P., E. K. Hui and S. Barman (2004) Assembly and budding of influenza virus. *Virus Res.* **106**, 147-65.
- Nemeroff, M. E., S. M. Barabino, Y. Li, W. Keller and R. M. Krug (1998) Influenza virus NS1 protein interacts with the cellular 30 kDa subunit of CPSF and inhibits 3'end formation of cellular pre-mRNAs. *Mol Cell.* **1**, 991-1000.
- Neumann, G., G. G. Brownlee, E. Fodor and Y. Kawaoka (2004) Orthomyxovirus replication, transcription, and polyadenylation. *Curr Top Microbiol Immunol.* **283**, 121-43.
- Neumann, G., M. R. Castrucci and Y. Kawaoka (1997) Nuclear import and export of influenza virus nucleoprotein. *J Virol.* **71**, 9690-700.
- Neumann, G., M. T. Hughes and Y. Kawaoka (2000) Influenza A virus NS2 protein mediates vRNP nuclear export through NES-independent interaction with hCRM1. *EMBO J.* **19**, 6751-8.
- Neumann, J., A. M. Eis-Hubinger and N. Koch (2003) Herpes simplex virus type 1 targets the MHC class II processing pathway for immune evasion. *J Immunol.* **171**, 3075-83.
- Nicholas, J. (2005) Human gammaherpesvirus cytokines and chemokine receptors. *J Interferon Cytokine Res.* **25**, 373-83.
- Nichols, J. E., J. A. Niles and N. J. Roberts, Jr. (2001) Human lymphocyte apoptosis after exposure to influenza A virus. *J Virol.* **75**, 5921-9.
- Nimmerjahn, F., D. Dudziak, U. Dirmeier, G. Hobom, A. Riedel, M. Schlee, L. M. Staudt, A. Rosenwald, U. Behrends, G. W. Bornkamm and J. Mautner (2004) Active NF-kappaB signalling is a prerequisite for influenza virus infection. *J Gen Virol.* **85**, 2347-56.
- Nimmerjahn, F., D. Kobelt, A. Steinkasserer, A. Menke, G. Hobom, U. Behrends, G. W. Bornkamm and J. Mautner (2003) Efficient generation and expansion of antigen-specific CD4+ T cells by recombinant influenza viruses. *Eur J Immunol.* **33**, 3331-41.
- Noda, T., H. Sagara, A. Yen, A. Takada, H. Kida, R. H. Cheng and Y. Kawaoka (2006) Architecture of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus particles. *Nature.* **439**, 490-2.
- Novak, N. and W. M. Peng (2005) Dancing with the enemy: the interplay of herpes simplex virus with dendritic cells. *Clin Exp Immunol.* **142**, 405-10.
- O'Neill, R. E., R. Jaskunas, G. Blobel, P. Palese and J. Moroianu (1995) Nuclear import of influenza virus RNA can be mediated by viral nucleoprotein and transport factors required for protein import. *J Biol Chem.* **270**, 22701-4.
- O'Neill, R. E., J. Talon and P. Palese (1998) The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins. *EMBO J.* **17**, 288-96.
- Oh, S., J. M. McCaffery and M. C. Eichelberger (2000) Dose-dependent changes in influenza virus-infected dendritic cells result in increased allogeneic T-cell proliferation at low, but not high, doses of virus. *J Virol.* **74**, 5460-9.
- Oswald-Richter, K., S. M. Grill, M. Leelawong and D. Unutmaz (2004) HIV infection of primary human T cells is determined by tunable thresholds of T cell activation. *Eur J Immunol.* **34**, 1705-14.
- Palese, P. and R. W. Compans (1976) Inhibition of influenza virus replication in tissue culture by 2-deoxy-2,3-dehydro-N-trifluoroacetylneuraminic acid (FANA): mechanism of action. *J Gen Virol.* **33**, 159-63.

- Palese, P., M. L. Shaw (2007) Chapter 47: Orthomyxoviridae. *Fields Virology, 5th Edition*, pp 1647-1689, Lipincott Williams & Wilkins.
- Palese, P., K. Tobita, M. Ueda and R. W. Compans (1974) Characterization of temperature sensitive influenza virus mutants defective in neuraminidase. *Virology*. **61**, 397-410.
- Palucka, K. and J. Banchereau (2002) How dendritic cells and microbes interact to elicit or subvert protective immune responses. *Curr Opin Immunol*. **14**, 420-31.
- Parry, J. (2006) Uncertainty still surrounds oseltamivir after 13 year old dies. *BMJ*. **332**, 5.
- Peiris, M., K. Y. Yuen, C. W. Leung, K. H. Chan, P. L. Ip, R. W. Lai, W. K. Orr and K. F. Shortridge (1999) Human infection with influenza H9N2. *Lancet*. **354**, 916-7.
- Pinto, L. H., L. J. Holsinger and R. A. Lamb (1992) Influenza virus M2 protein has ion channel activity. *Cell*. **69**, 517-28.
- Pollara, G., A. Kwan, P. J. Newton, M. E. Handley, B. M. Chain and D. R. Katz (2005) Dendritic cells in viral pathogenesis: protective or defective? *Int J Exp Pathol*. **86**, 187-204.
- Potter, C. W. and J. S. Oxford (1979) Determinants of immunity to influenza infection in man. *Br Med Bull*. **35**, 69-75.
- Puck, J. M., W. P. Glezen, A. L. Frank and H. R. Six (1980) Protection of infants from infection with influenza A virus by transplacentally acquired antibody. *J Infect Dis*. **142**, 844-9.
- Reid, A. H., T. G. Fanning, T. A. Janczewski, R. M. Lourens and J. K. Taubenberger (2004) Novel origin of the 1918 pandemic influenza virus nucleoprotein gene. *J Virol*. **78**, 12462-70.
- Richardson, J. C. and R. K. Akkina (1991) NS2 protein of influenza virus is found in purified virus and phosphorylated in infected cells. *Arch Virol*. **116**, 69-80.
- Richman, D. D., B. R. Murphy, S. Baron and C. Uhlenhof (1976) Three strains of influenza A virus (H3N2): interferon sensitivity in vitro and interferon production in volunteers. *J Clin Microbiol*. **3**, 223-6.
- Rinaldo, C. R., Jr. and P. Piazza (2004) Virus infection of dendritic cells: portal for host invasion and host defense. *Trends Microbiol*. **12**, 337-45.
- Roberts, P. C., R. A. Lamb and R. W. Compans (1998) The M1 and M2 proteins of influenza A virus are important determinants in filamentous particle formation. *Virology*. **240**, 127-37.
- Robertson, J. M., M. MacLeod, V. S. Marsden, J. W. Kappler and P. Marrack (2006) Not all CD4+ memory T cells are long lived. *Immunol Rev*. **211**, 49-57.
- Roman, E., E. Miller, A. Harmsen, J. Wiley, U. H. Von Andrian, G. Huston and S. L. Swain (2002) CD4 effector T cell subsets in the response to influenza: heterogeneity, migration, and function. *J Exp Med*. **196**, 957-68.
- Rossi, M. and J. W. Young (2005) Human dendritic cells: potent antigen-presenting cells at the crossroads of innate and adaptive immunity. *J Immunol*. **175**, 1373-81.
- Roy, A. M., J. S. Parker, C. R. Parrish and G. R. Whittaker (2000) Early stages of influenza virus entry into Mv-1 lung cells: involvement of dynamin. *Virology*. **267**, 17-28.
- Ruigrok, R. W., A. Barge, P. Durrer, J. Brunner, K. Ma and G. R. Whittaker (2000) Membrane interaction of influenza virus M1 protein. *Virology*. **267**, 289-98.
- Scheiffele, P., A. Rietveld, T. Wilk and K. Simons (1999) Influenza viruses select ordered lipid domains during budding from the plasma membrane. *J Biol Chem*. **274**, 2038-44.
- Scheiffele, P., M. G. Roth and K. Simons (1997) Interaction of influenza virus haemagglutinin with sphingolipid-cholesterol membrane domains via its transmembrane domain. *EMBO J*. **16**, 5501-8.
- Scherle, P. A., G. Palladino and W. Gerhard (1992) Mice can recover from pulmonary influenza virus infection in the absence of class I-restricted cytotoxic T cells. *J Immunol*. **148**, 212-7.
- Schlee, M., M. Holzel, S. Bernard, R. Mailhammer, M. Schuhmacher, J. Reschke, D. Eick, D. Marinkovic, T. Wirth, A. Rosenwald, L. M. Staudt, M. Eilers, F. Baran-Marszak, R. Fagard, J. Feuillard, G. Laux and G. W. Bornkamm (2007) C-myc activation impairs the NF-kappaB and the interferon response: implications for the pathogenesis of Burkitt's lymphoma. *Int J Cancer*. **120**, 1387-95.
- Schmitt, A. P. and R. A. Lamb (2005) Influenza virus assembly and budding at the viral budzone. *Adv Virus Res*. **64**, 383-416.
- Schmitz, M. L. and D. Krappmann (2006) Controlling NF-kappaB activation in T cells by costimulatory receptors. *Cell Death Differ*. **13**, 834-42.

- Schultz-Cherry, S., N. Dybdahl-Sissoko, G. Neumann, Y. Kawaoka and V. S. Hinshaw (2001) Influenza virus ns1 protein induces apoptosis in cultured cells. *J Virol.* **75**, 7875-81.
- Schultz-Cherry, S. and V. S. Hinshaw (1996) Influenza virus neuraminidase activates latent transforming growth factor beta. *J Virol.* **70**, 8624-9.
- Seisenberger, G., M. U. Ried, T. Endress, H. Buning, M. Hallek and C. Brauchle (2001) Real-time single-molecule imaging of the infection pathway of an adeno-associated virus. *Science.* **294**, 1929-32.
- Seo, S. H., E. Hoffmann and R. G. Webster (2002) Lethal H5N1 influenza viruses escape host anti-viral cytokine responses. *Nat Med.* **8**, 950-4.
- Seo, S. H., E. Hoffmann and R. G. Webster (2004) The NS1 gene of H5N1 influenza viruses circumvents the host anti-viral cytokine responses. *Virus Res.* **103**, 107-13.
- Shapiro, G. I., T. Gurney, Jr. and R. M. Krug (1987) Influenza virus gene expression: control mechanisms at early and late times of infection and nuclear-cytoplasmic transport of virus-specific RNAs. *J Virol.* **61**, 764-73.
- Shimizu, K., A. Iguchi, R. Gomyou and Y. Ono (1999) Influenza virus inhibits cleavage of the HSP70 pre-mRNAs at the polyadenylation site. *Virology.* **254**, 213-9.
- Shinners, N. P., G. Carlesso, I. Castro, K. L. Hoek, R. A. Corn, R. L. Woodland, M. L. Scott, D. Wang and W. N. Khan (2007) Bruton's tyrosine kinase mediates NF-kappaB activation and B cell survival by B cell-activating factor receptor of the TNF-R family. *J Immunol.* **179**, 3872-80.
- Shinya, K., M. Ebina, S. Yamada, M. Ono, N. Kasai and Y. Kawaoka (2006) Avian flu: influenza virus receptors in the human airway. *Nature.* **440**, 435-6.
- Shortridge, K. F., N. N. Zhou, Y. Guan, P. Gao, T. Ito, Y. Kawaoka, S. Kodihalli, S. Krauss, D. Markwell, K. G. Murti, M. Norwood, D. Senne, L. Sims, A. Takada and R. G. Webster (1998) Characterization of avian H5N1 influenza viruses from poultry in Hong Kong. *Virology.* **252**, 331-42.
- Sidorenko, Y. and U. Reichl (2004) Structured model of influenza virus replication in MDCK cells. *Biotechnol Bioeng.* **88**, 1-14.
- Simons, K. and E. Ikonen (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature.* **387**, 569-72.
- Simonsen, L. (1999) The global impact of influenza on morbidity and mortality. *Vaccine.* **17 Suppl 1**, S3-10.
- Skehel, J. J., T. Bizebard, P. A. Bullough, F. M. Hughson, M. Knossow, D. A. Steinhauer, S. A. Wharton and D. C. Wiley (1995) Membrane fusion by influenza hemagglutinin. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* **60**, 573-80.
- Skehel, J. J. and D. C. Wiley (2000) Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem.* **69**, 531-69.
- Smith, A. E. and A. Helenius (2004) How viruses enter animal cells. *Science.* **304**, 237-42.
- Smith, G. L. and A. J. Hay (1982) Replication of the influenza virus genome. *Virology.* **118**, 96-108.
- Smith, G. L., J. Z. Levin, P. Palese and B. Moss (1987) Synthesis and cellular location of the ten influenza polypeptides individually expressed by recombinant vaccinia viruses. *Virology.* **160**, 336-45.
- Sodhi, A., S. Montaner and J. S. Gutkind (2004) Viral hijacking of G-protein-coupled-receptor signalling networks. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **5**, 998-1012.
- Sommer, K., B. Guo, J. L. Pomerantz, A. D. Bandaranayake, M. E. Moreno-Garcia, Y. L. Ovechkina and D. J. Rawlings (2005) Phosphorylation of the CARMA1 linker controls NF-kappaB activation. *Immunity.* **23**, 561-74.
- Sonoguchi, T., M. Sakoh, N. Kunita, K. Satsuta, H. Noriki and H. Fukumi (1986) Reinfection with influenza A (H2N2, H3N2, and H1N1) viruses in soldiers and students in Japan. *J Infect Dis.* **153**, 33-40.
- Sprenger, M. J., P. G. Mulder, W. E. Beyer, R. Van Strik and N. Masurel (1993) Impact of influenza on mortality in relation to age and underlying disease, 1967-1989. *Int J Epidemiol.* **22**, 334-40.
- Stegmann, T., J. M. White and A. Helenius (1990) Intermediates in influenza induced membrane fusion. *EMBO J.* **9**, 4231-41.
- Stevens, J., O. Blixt, L. Glaser, J. K. Taubenberger, P. Palese, J. C. Paulson and I. A. Wilson (2006) Glycan microarray analysis of the hemagglutinins from modern and pandemic influenza viruses reveals different receptor specificities. *J Mol Biol.* **355**, 1143-55.

- Stieneke-Grober, A., M. Vey, H. Angliker, E. Shaw, G. Thomas, C. Roberts, H. D. Klenk and W. Garten (1992) Influenza virus hemagglutinin with multibasic cleavage site is activated by furin, a subtilisin-like endoprotease. *EMBO J.* **11**, 2407-14.
- Strobel, I., M. Krumbholz, A. Menke, E. Hoffmann, P. R. Dunbar, A. Bender, G. Hobom, A. Steinkasserer, G. Schuler and R. Grassmann (2000) Efficient expression of the tumor-associated antigen MAGE-3 in human dendritic cells, using an avian influenza virus vector. *Hum Gene Ther.* **11**, 2207-18.
- Sturm-Ramirez, K. M., T. Ellis, B. Bousfield, L. Bissett, K. Dyrting, J. E. Rehg, L. Poon, Y. Guan, M. Peiris and R. G. Webster (2004) Reemerging H5N1 influenza viruses in Hong Kong in 2002 are highly pathogenic to ducks. *J Virol.* **78**, 4892-901.
- Suarez, D. L., M. L. Perdue, N. Cox, T. Rowe, C. Bender, J. Huang and D. E. Swayne (1998) Comparisons of highly virulent H5N1 influenza A viruses isolated from humans and chickens from Hong Kong. *J Virol.* **72**, 6678-88.
- Subbarao, K., A. Klimov, J. Katz, H. Regnery, W. Lim, H. Hall, M. Perdue, D. Swayne, C. Bender, J. Huang, M. Hemphill, T. Rowe, M. Shaw, X. Xu, K. Fukuda and N. Cox (1998) Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. *Science.* **279**, 393-6.
- Sweet, C., F. G. Hayden, K. J. Jakeman, S. Grambas and A. J. Hay (1991) Virulence of rimantadine-resistant human influenza A (H3N2) viruses in ferrets. *J Infect Dis.* **164**, 969-72.
- Takizawa, T., S. Matsukawa, Y. Higuchi, S. Nakamura, Y. Nakanishi and R. Fukuda (1993) Induction of programmed cell death (apoptosis) by influenza virus infection in tissue culture cells. *J Gen Virol.* **74 (Pt 11)**, 2347-55.
- Talon, J., C. M. Horvath, R. Polley, C. F. Basler, T. Muster, P. Palese and A. Garcia-Sastre (2000) Activation of interferon regulatory factor 3 is inhibited by the influenza A virus NS1 protein. *J Virol.* **74**, 7989-96.
- Tan, S. L. and M. G. Katze (1998) Biochemical and genetic evidence for complex formation between the influenza A virus NS1 protein and the interferon-induced PKR protein kinase. *J Interferon Cytokine Res.* **18**, 757-66.
- Taubenberger, J. K., A. H. Reid, A. E. Krafft, K. E. Bijwaard and T. G. Fanning (1997) Initial genetic characterization of the 1918 "Spanish" influenza virus. *Science.* **275**, 1793-6.
- Taubenberger, J. K., A. H. Reid, R. M. Lourens, R. Wang, G. Jin and T. G. Fanning (2005) Characterization of the 1918 influenza virus polymerase genes. *Nature.* **437**, 889-93.
- Thompson, W. W., D. K. Shay, E. Weintraub, L. Brammer, N. Cox, L. J. Anderson and K. Fukuda (2003) Mortality associated with influenza and respiratory syncytial virus in the United States. *JAMA.* **289**, 179-86.
- To, K. F., P. K. Chan, K. F. Chan, W. K. Lee, W. Y. Lam, K. F. Wong, N. L. Tang, D. N. Tsang, R. Y. Sung, T. A. Buckley, J. S. Tam and A. F. Cheng (2001) Pathology of fatal human infection associated with avian influenza A H5N1 virus. *J Med Virol.* **63**, 242-6.
- Topham, D. J. and P. C. Doherty (1998) Clearance of an influenza A virus by CD4+ T cells is inefficient in the absence of B cells. *J Virol.* **72**, 882-5.
- Tran, T. H., T. L. Nguyen, T. D. Nguyen, T. S. Luong, P. M. Pham, V. C. Nguyen, T. S. Pham, C. D. Vo, T. Q. Le, T. T. Ngo, B. K. Dao, P. P. Le, T. T. Nguyen, T. L. Hoang, V. T. Cao, T. G. Le, D. T. Nguyen, H. N. Le, K. T. Nguyen, H. S. Le, V. T. Le, D. Christiane, T. T. Tran, J. Menno de, C. Schultz, P. Cheng, W. Lim, P. Horby and J. Farrar (2004) Avian influenza A (H5N1) in 10 patients in Vietnam. *N Engl J Med.* **350**, 1179-88.
- Tumpey, T. M., C. F. Basler, P. V. Aguilar, H. Zeng, A. Solorzano, D. E. Swayne, N. J. Cox, J. M. Katz, J. K. Taubenberger, P. Palese and A. Garcia-Sastre (2005) Characterization of the reconstructed 1918 Spanish influenza pandemic virus. *Science.* **310**, 77-80.
- Tumpey, T. M., X. Lu, T. Morken, S. R. Zaki and J. M. Katz (2000) Depletion of lymphocytes and diminished cytokine production in mice infected with a highly virulent influenza A (H5N1) virus isolated from humans. *J Virol.* **74**, 6105-16.
- Ungchusak, K., P. Auewarakul, S. F. Dowell, R. Kitphati, W. Auwanit, P. Puthavathana, M. Uiprasertkul, K. Boonnak, C. Pittayawonganon, N. J. Cox, S. R. Zaki, P. Thawatsupha, M. Chittaganpitch, R. Khontong, J. M. Simmerman and S. Chunsuttiwat (2005) Probable person-to-person transmission of avian influenza A (H5N1). *N Engl J Med.* **352**, 333-40.

- Upton, C., J. L. Macen, M. Schreiber and G. McFadden (1991) Myxoma virus expresses a secreted protein with homology to the tumor necrosis factor receptor gene family that contributes to viral virulence. *Virology*. **184**, 370-82.
- v. Magnus, P. (1954) Incomplete forms of influenza virus. *Adv. Virus Res.* **2**, 59-79.
- Virelizier, J. L. (1975) Host defenses against influenza virus: the role of anti-hemagglutinin antibody. *J Immunol.* **115**, 434-9.
- Vreede, F. T., T. E. Jung and G. G. Brownlee (2004) Model suggesting that replication of influenza virus is regulated by stabilization of replicative intermediates. *J Virol.* **78**, 9568-72.
- Wada, N., M. Matsumura, Y. Ohba, N. Kobayashi, T. Takizawa and Y. Nakanishi (1995) Transcription stimulation of the Fas-encoding gene by nuclear factor for interleukin-6 expression upon influenza virus infection. *J Biol Chem.* **270**, 18007-12.
- Walzer, T., L. Galibert and T. De Smedt (2005) Poxvirus semaphorin A39R inhibits phagocytosis by dendritic cells and neutrophils. *Eur J Immunol.* **35**, 391-8.
- Wang, P., P. Palese and R. E. O'Neill (1997) The NPI-1/NPI-3 (karyopherin alpha) binding site on the influenza A virus nucleoprotein NP is a nonconventional nuclear localization signal. *J Virol.* **71**, 1850-6.
- Wang, X., M. Li, H. Zheng, T. Muster, P. Palese, A. A. Beg and A. Garcia-Sastre (2000) Influenza A virus NS1 protein prevents activation of NF-kappaB and induction of alpha/beta interferon. *J Virol.* **74**, 11566-73.
- Weber, F., G. Kochs, S. Gruber and O. Haller (1998) A classical bipartite nuclear localization signal on Thogoto and influenza A virus nucleoproteins. *Virology*. **250**, 9-18.
- Weber, F., G. Kochs and O. Haller (2004) Inverse interference: how viruses fight the interferon system. *Viral Immunol.* **17**, 498-515.
- Webster, R. G., W. J. Bean, O. T. Gorman, T. M. Chambers and Y. Kawaoka (1992) Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev.* **56**, 152-79.
- Weil, R. and A. Israel (2004) T-cell-receptor- and B-cell-receptor-mediated activation of NF-kappaB in lymphocytes. *Curr Opin Immunol.* **16**, 374-81.
- Weil, R. and A. Israel (2006) Deciphering the pathway from the TCR to NF-kappaB. *Cell Death Differ.* **13**, 826-33.
- Wright, P. F., G. Neumann, Y. Kawaoka (2007) Chapter 48: Orthomyxoviruses. *Fields Virology, 5th Edition*, pp 1691-1740, Lipincott Williams & Wilkins.
- Wurzer, W. J., C. Ehrhardt, S. Pleschka, F. Berberich-Siebelt, T. Wolff, H. Walczak, O. Planz and S. Ludwig (2004) NF-kappaB-dependent induction of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and Fas/FasL is crucial for efficient influenza virus propagation. *J Biol Chem.* **279**, 30931-7.
- Yamaguchi, T., K. Hirota, K. Nagahama, K. Ohkawa, T. Takahashi, T. Nomura and S. Sakaguchi (2007) Control of immune responses by antigen-specific regulatory T cells expressing the folate receptor. *Immunity*. **27**, 145-59.
- Yoneyama, M., M. Kikuchi, T. Natsukawa, N. Shinobu, T. Imaizumi, M. Miyagishi, K. Taira, S. Akira and T. Fujita (2004) The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol.* **5**, 730-7.
- Yuen, K. Y., P. K. Chan, M. Peiris, D. N. Tsang, T. L. Que, K. F. Shorridge, P. T. Cheung, W. K. To, E. T. Ho, R. Sung and A. F. Cheng (1998) Clinical features and rapid viral diagnosis of human disease associated with avian influenza A H5N1 virus. *Lancet.* **351**, 467-71.
- Zamarin, D., A. Garcia-Sastre, X. Xiao, R. Wang and P. Palese (2005) Influenza virus PB1-F2 protein induces cell death through mitochondrial ANT3 and VDAC1. *PLoS Pathog.* **1**, e4.
- Zhang, J., A. Pekosz and R. A. Lamb (2000) Influenza virus assembly and lipid raft microdomains: a role for the cytoplasmic tails of the spike glycoproteins. *J Virol.* **74**, 4634-44.
- Zheng, H., P. Palese and A. Garcia-Sastre (1996) Nonconserved nucleotides at the 3' and 5' ends of an influenza A virus RNA play an important role in viral RNA replication. *Virology*. **217**, 242-51.
- Zhirnov, O. P., L. S. Kirzhner, A. V. Ovcharenko and N. A. Malyshev (1996) [Clinical effectiveness of aprotinin aerosol in influenza and parainfluenza]. *Vestn Ross Akad Med Nauk*, 26-31.
- Zhirnov, O. P. and H. D. Klenk (1997) Histones as a target for influenza virus matrix protein M1. *Virology*. **235**, 302-10.

- Zhirnov, O. P., A. V. Ovcharenko and A. G. Bukrinskaya (1984) Suppression of influenza virus replication in infected mice by protease inhibitors. *J Gen Virol.* **65 (Pt 1)**, 191-6.
- Zhou, J., H. K. Law, C. Y. Cheung, I. H. Ng, J. S. Peiris and Y. L. Lau (2006) Functional tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand production by avian influenza virus-infected macrophages. *J Infect Dis.* **193**, 945-53.
- Zur Hausen, H. (1967) Induction of specific chromosomal aberrations by adenovirus type 12 in human embryonic kidney cells. *J Virol.* **1**, 1174-85.

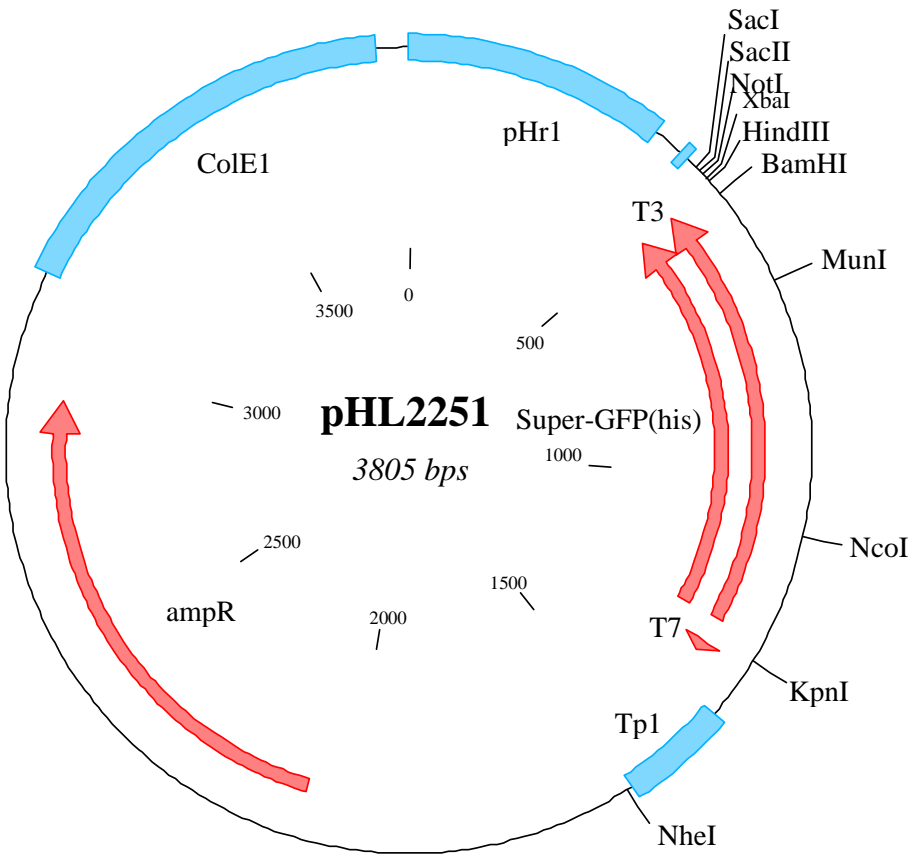
Anhang I: Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin	GA	Galaktose
α	anti / alpha	gB	Glykoprotein B von HSV
AK	Antikörper	GFP	grünfluoreszierendes Protein
Amp	Ampicillin	Glu (E)	Glutaminsäure
AICD	<i>activation induced cell death</i>	GM-CSF	Granulozyten/Monozyten-Kolonie stimul. Faktor
APC	<i>antigen presenting cell</i>	(v)GPCR	<i>(viral) G protein coupled receptor(s)</i>
APS	Ammoniumpersulfat	Gy	Gray
AS	Aminosäure	h	human
Asp (D)	Asparaginsäure	h	<i>hours</i> (Stunden)
ATP	Adenosintriphosphat	H ₂ O	Wasser
β	beta	H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
BB	B-Blasten	H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
BCR	<i>B cell receptor</i> (B-Zellrezeptor)	HA	Hämagglutinin von IVA
BL	Burkitt-Lymphom (Zellen)	HCl	Salzsäure
bp	Basenpaar	HCMV	humane Cytomegalievirus
BSA	<i>bovine serum albumin</i>	HEPES	(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl-ethansulfonsäure
Btk	Bruton's Tyrosinkinase	HHV	humanes Herpesvirus
bzw.	beziehungsweise	HIV	humanes Immundefizienzvirus
C	Carboxy-	HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
C	Cytosin	HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettich Peroxidase)
(v)CBP	(virales) Chemokinbindeprotein	HSV	Herpes-Simplex-Virus
CD	<i>cluster of differentiation</i>	HVC	Hepatitisvirus Typ C
(v)CK	(virales) Chemokin	IFN	Interferon
(v)CKR	(viraler) Chemokinrezeptor	IFNR	IFN-Rezeptor
cm	Zentimeter	Ig	Immunglobulin
CMV	Cytomegalievirus	IL	Interleukin
cRNA	<i>complementary</i> (komplementäre) RNA	IRF	<i>IFN regulatory factor</i>
CsA	Cyclosporin A	IVA	Influenzavirus Typ A
CTL	<i>cytotoxic T lymphocytes</i> (CD8 ⁺)	IVA-GFP	GFP-RNA-tragendes IVA
d	days (Tage)	IVB	Influenzavirus Typ B
DAF	<i>decay accelerating factor</i>	IVC	Influenzavirus Typ C
DC	Dendritische Zelle	JAK	Janus-Kinase
d. h.	das heißt	KCl	Kaliumchlorid
DMEM	Dulbeccos-Modified-Eagle-Medium	kD	Kilodalton
DMSO	Dimethylsulfoxid	KSHV	Kaposi-Sarkoma-assoziiertes Herpesvirus
DNA	<i>2'-deoxyribonucleic acid</i>	L	Liter
Dox	Doxycyclin	LB	<i>lysogeny broth</i>
dsRNA	doppelsträngige RNA	LCL	Lymphoblastoide Zelllinie
EBNA	Epstein-Barr-Virus nukleäres Antigen	LMP	Latentes Membranprotein
EBV	Epstein-Barr-Virus	m	Maus / murin
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	M	Mol/molar
EDTA	<i>ethylene diamine tetra acetic acid</i>	M1/M2	Matrixproteine des Influenzavirus
eIF2 α	<i>eukaryotic initiation factor-2α</i>	MACS	<i>magnetic cell sorting/separation</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>	MCP	<i>membrane cofactor protein</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum	MDA5	<i>melanoma-differentiation associated gene 5</i>
EtOH	Ethanol	MDCK	<i>Madin-Darby canine kidney (cells)</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell scanning</i>	MFI	<i>mean fluorescence intensity</i>
Fc	konstantes Fragment eines Antikörpers	MgCl ₂	Magnesiumchlorid
FCS	<i>fetal calf serum</i> (Fötales Kälberserum)	MgSO ₄	Magnesiumsulfat
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat	MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
FPV	<i>fowl plaque virus</i>	min	Minute(n)
FSC	<i>forward scatter</i>	μ F	Mikrofarad
g	Gramm	μ g	Mikrogramm
G	Guanin	μ L	Mikroliter
γ	Gamma	μ M	Mikromol/mikromolar

mA	Milliampere	PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
mg	Milligramm	RD	<i>reagent diluent</i>
mJ	Millijoule	RIG-I	<i>retinoic acid-inducible gene</i>
mL	Milliliter	RKI	Robert-Koch-Institut
mM	Millimol / millimolar	RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
MLR	<i>mixed lymphocyte reaction(s)</i>	RNase	Ribonuklease
MOI	<i>multiplicity of infection</i>	(v)RNP	(virales) Ribonukleoprotein
mRNA	<i>messenger RNA</i>	RSV	<i>respiratory syncytial virus</i>
myc	Gen des Myelocytomatose-Virus	RT	Raumtemperatur
N	Amino-	s/sec	Sekunden
NA	Neuraminidase von IVA	SA	<i>sialic acid</i> (Sialinsäure)
NaAc	Natriumacetat	SDS	Sodiumdodecylsulfat
NaCl	Natriumchlorid	SSC	<i>side scatter</i>
NaN ₃	Natriumazid	STAT	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
NaOH	Natriumhydroxid	STIKO	Ständige Impfkommission
n.b.	nicht bestimmt	T	Thymin
NEAA	<i>non-essential amino acids</i>	TAE	Tris/Acetat/EDTA (Puffer)
NEP	Nukleares Exportprotein	TAP	<i>transporter associated with antigen presentation</i>
NF-κB	Nukleärer Faktor-kappa B	TBS	<i>Tris buffered saline</i>
ng	Nanogramm	TCR	<i>T cell receptor</i> (T-Zellrezeptor)
NK	natürliche Killer (Zellen)	TE	Tris/EDTA (Puffer)
NLS	nukleäres Lokalisationssignal	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-Ethylendiamin
nm	Nanometer	T _H 1/2	T-Helferzelle (CD4 ⁺) Typ 1 oder 2
nM	Nanomol/nanomolar	TIR	Toll/IL-1-Rezeptor
NP	Nukleoprotein	TLR	<i>Toll-like-Rezeptor</i>
NS1/2	Nicht-strukturelles Protein 1 bzw. 2	TNF	Tumor-Nekrosefaktor
Ω	Ohm	(v)TNFR	(viraler) Tumor Nekrosefaktor Rezeptor
OD	Optische Dichte	TRAIL	<i>TNF-related apoptosis inducing ligand</i>
OKT3	anti-CD3-Antikörper	TRIF	<i>TIR domain-containing adapter inducing IFN-β</i>
ORF	<i>open reading frame</i> (offener Leserahmen)	Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
PA	saure Polymerase von IVA	TUNEL	<i>terminal dUTP nick end-labeling</i>
PAA	Polyacrylamid	U	<i>units</i> (Einheiten)
PAGE	PAA-Gel-Elektrophorese	U	Uracil
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>	UV	Ultraviolett
PB1/2	basische Polymerasen von IVA	V	Volt
PBL	periphere Bluteukozyten	VCP	<i>Vaccinia Virus complement control protein</i>
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>	vRNA	virale RNA
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>	vs.	<i>versus</i>
PE	Phycoerythrin	VV	Vacciniavirus
PEI	Polyethylenimin	WHO	<i>world health organization</i>
PFA	Paraformaldehyd	wt	Wildtyp
PGE2	Prostaglandin-E2	x g	x-fache Schwerkraft
PHA	Phytohämagglutinin	z. B.	zum Beispiel
PI	Propidiumiodid	#	Nummer/Bestellnummer
PKC/R	Proteinkinase C bzw. R	%	Prozent

Im Rahmen der Arbeit verwendete Begriffe aus dem Englischen wurden durch kursive Schreibweise gekennzeichnet.

Anhang II: Plasmidkarte pHL2251 (zur Generierung von IVA-GFP)



Ehrenwörtliche Erklärung gemäß der Promotionsordnung für Biologie der LMU München

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst, keine anderen als die erlaubten Quellen und Hilfsmittel verwendet und Zitate kenntlich gemacht habe.

Sämtliche Experimente wurden von mir selbst durchgeführt, sofern nicht explizit auf Dritte verwiesen wird.

Hiermit erkläre ich zudem, dass diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat. Ich habe weder bereits früher Doktorgrade erworben noch versucht diese zu erwerben.

München, den 12.11.2007

Thorsten Krause

Danksagungen

Dr. Josef Mautner und Dr. Uta Behrends danke ich für die Möglichkeit meine Doktorarbeit in ihrer Arbeitsgruppe anfertigen zu dürfen, das ständig offene Ohr für meine wissenschaftlichen Fragen und Probleme und das unerschütterliche Engagement beim Korrekturlesen der Arbeit.

Prof. Dr. Dirk Eick möchte ich für die offizielle Betreuung meiner Doktorarbeit und das Erstellen des Erstgutachtens danken. Für die Anfertigung des Zweitgutachtens möchte ich mich zudem bei Prof. Dr. Elisabeth Weiß bedanken.

Bei Alexander, Dinesh und Olivia möchte ich mich für die ständige Gesprächs- und Hilfsbereitschaft im Labor, aber auch die schönen Stunden außerhalb des Labors bedanken. Ich hoffe wir werden noch viel Gelegenheit haben dies fortzuführen.

Bei Frau Lechner, Heike, Iris B., Iris P., Regine, Thomas und allen anderen Mitarbeitern des Hämatologikums, besonders der Klinischen Molekularbiologie, möchte ich mich für die nette Arbeitsatmosphäre, die Hilfsbereitschaft und die tolle Zusammenarbeit bedanken.

Ich danke auch meinen Freunden und Verwandten, die während meiner Doktorarbeit zu mir gehalten haben, auch wenn ich nicht immer die Zeit für sie hatte, die sie verdient hätten.

Meinen Eltern möchte ich für ihre Unterstützung und Liebe danken. Schade, dass Ihr meinen Dokortitel nicht mehr miterleben dürft. Hoffentlich seid Ihr trotzdem stolz auf mich, wo immer Ihr auch sein mögt.

Mein größter Dank gilt meinem Schatz Anja, die die harte Zeit der Doktorarbeit mit mir gemeinsam überstanden hat. Ich liebe Dich und hoffe auf eine wunderschöne, gemeinsame Zukunft.

Lebenslauf

Name: Krause
Vorname: Thorsten
Geboren am: 05. Juli 1975
In: Bielefeld

Promotion:

12/2003 – heute Promotion an der GSF – Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit in München; Hämatologikum Großhadern; Klinische Molekularbiologie und Tumorgenetik

Arbeitsgruppe von Dr. Uta Behrends und Dr. Josef Mautner
Thema: Das zelluläre Immunsystem als Ziel des Influenzavirus Typ A

Studium:

03/2002 – 03/2003 Diplomarbeit am Lehrstuhl für Biochemie & Molekulare Immunologie; Fakultät für Chemie; Universität Bielefeld
Gesamtnote sehr gut

01/2002 Erfolgreiches Bestehen der mündlichen Diplomprüfungen
Gesamtnote sehr gut (1,2)

1999 – 2002 Hauptstudium der Biochemie an der Universität Bielefeld
Abschluss Diplom-Biochemiker; Note sehr gut

1997 – 2000 Grundstudium der Biochemie an der Universität Bielefeld
Vordiplomsnote: sehr gut

Abitur:

1992 - 1995 Gymnasialen Oberstufe der Martin-Niemöller-Gesamtschule
Abschluss Abitur; Note 1,2

München, im November 2007